

Н. И. РОМАНОВА, С. В. ШЕСТАКОВ

ВЫДЕЛЕНИЕ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ У СИНЕЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *ANACYSTIS NIDULANS*

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 X 1975)

Большинство фотосинтезирующих и, особенно, облигатно фотоавтотрофных микроорганизмов характеризуется малым спектром и низкой частотой возникновения ауксотрофных мутантов (^{1, 2}). К моменту начала нашего исследования неоднократно сообщалось о неудачных попытках выделения ауксотрофов у синезеленой водоросли (³⁻⁶). Недавно были изолированы единичные мутанты, нуждающиеся в триптофане — у *Agmenellum quadruplicatum* (⁷), в фенилаланине и орнитине — у *Synechococcus sodgorum* (⁸), в метионине, цистеине, биотине (⁹), серине, аденине (¹⁰), урациле (⁹), лейцине (¹²) у *Anacystis nidulans*. Однако причины, ограничивающие возможности выделения большого числа различных ауксотрофов у *Synechocystis* по-прежнему остаются неясными.

Ранее мы рассмотрели (^{12, 13}) ряд гипотез, объясняющих трудности в получении ауксотрофных мутантов у синезеленых водорослей, исходя из генетических и физиологических особенностей этих организмов. Согласно одной из гипотез, частота возникновения и селективные преимущества обратных мутантов могут оказаться столь значительными, что ауксотрофные клетки будут быстро вытеснены из популяции уже в процессе формирования микроколоний. Селективная ценность ауксотрофных клеток снизится из-за метаболических нарушений, обусловленных ингибирующим действием экзогенных факторов роста или токсических продуктов, накапливающихся у мутантов.

С целью проверки этого предположения мы предприняли попытку выделить ауксотрофные мутанты у синезеленой водоросли *Anacystis nidulans* на сложно-органических питательных средах, обогащенных единичным фактором роста.

Водоросли выращивали двое суток в жидкой минимальной модифицированной среде С (¹⁴) в люминостате при 37° и освещенности 3000 лк. Сгущенную в цитратно-фосфатном буфере pH 7,0 суспензию водорослей (10⁸ клеток в 1 мл) обрабатывали N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином (50 или 100 мкг/мл) в течение 20—75 мин. в темноте при комнатной температуре. После выдерживания с мутагеном клетки собирали центрифугированием, дважды промывали и ресуспендировали в свежей среде С. По 0,1 мл суспензии высевали на 8—10 параллельных чашках с 1,5% агаризованной средой, содержащей метионин, фенилаланин, бактотриптон, дрожжевой экстракт (по 100 мкг/мл), лейцин, тиамин (по 50 мкг/мл). Растворы ростовых факторов (pH 7,5) стерилизовали пропусканием через стеклянный фильтр G-7. Через 10—12 дней культивирования в люминостате на чашках учитывали число колоний (для определения выживаемости клеток), отбирали 200—1000 клонов и пересевали их штрихом или уколом на чашки с минимальной средой С и параллельно на чашки, обогащенные соответствующим фактором роста. Клоны, не растущие на минимальной среде, дважды штрихом пересевали для проверки на ауксотрофность. Мутанты идентифицировали с помощью генетической трансформации по опубликованной ранее методике (¹⁵).

Таблица 1

Выделение ауксотрофных мутантов, индуцированных нитрозогуанидином

Фактор обогащения среды	Число проверенных колоний	Тип ауксотрофных мутантов	Общее число ауксотрофных клонов *	Число стабильных мутантов	Частота встречаемости стабильных мутантов
Метионин	2340	met ⁻	6	4	$1,7 \cdot 10^{-3}$
Тиамин	2400	thi ⁻	4	4	$1,7 \cdot 10^{-3}$
Фенилаланин	600	phe ⁻	6	2	$3,3 \cdot 10^{-3}$
Лейцин	200	leu ⁻	2	2	$1,0 \cdot 10^{-2}$
Дрожжевой экстракт	800	aux **	14	0	
Бактотриптон	1100	aux **	11	0	
Дрожжевой экстракт + + бактотриптон	1000	aux **	17	0	

* Клоны, не растущие на минимальной среде после первого пересева.

** Ауксотрофы, нуждающиеся в неидентифицированных факторах роста.

В табл. 1 приведены результаты серии опытов по выделению стабильных биохимических мутантов, изолированных при тотальной проверке клонов, прорастающих на средах, обогащенных различными факторами роста. Опыты проводили в условиях оптимальных для культуры *A. nidulans* мутагенеза (¹³): выживаемость обработанных нитрозогуанидином клеток составляла 1–4%, частота возникновения морфологических (филаментозных) и пигментных мутантов в популяции достигала 2–4%. При использовании селективных сред с единичными факторами роста выявлены стабильные ауксотрофные мутанты, нуждающиеся в метионине, тиамина, фенилаланине или лейцине.

Большинство мутантов, изолированных путем такого векторного отбора (т. е. направленного поиска определенного типа ауксотрофов на среде с соответствующим единичным фактором роста), стабильно сохраняют признак ауксотрофности после 5–6 последовательных пересевов на плотных и жидких селективных средах. Стабильные ауксотрофные мутанты появляются в обработанной нитрозогуанидином популяции водорослей с достаточно высокой частотой (10^{-2} – 10^{-3}), превышающей частоту появления (в аналогичных условиях мутагенеза) мутантов, устойчивых к эритромицину или стрептомицину (¹³).

В отличие от мутантов, изолированных путем векторного отбора, ауксотрофные клоны, регулярно появляющиеся после первичного высева обработанной мутагеном культуры на селективные среды, обогащенные дрожжевым экстрактом или бактотриптоном, теряют свойство ауксотрофности после 2–3 пересевов на сложно-органических питательных средах. Появление этого «возвратного эффекта» препятствует выделению и идентификации ауксотрофных мутантов.

Мутантная природа ряда независимо полученных ауксотрофных линий была подтверждена с помощью метода генетической трансформации (табл. 2). При инкубации реципиентных клеток ауксотрофных мутантов с трансформирующей ДНК из клеток дикого типа в популяции обнаруживаются трансформанты с прототрофными свойствами. Частота встречаемости met⁺- и phe⁺-трансформантов сопоставима с частотой трансформации по маркерам устойчивости к эритромицину или стрептомицину (¹³) и существенно превышает частоты появления спонтанных ревертантов к прототрофности у анализируемых ауксотрофных штаммов (табл. 2). Вместе с тем большинство штаммов характеризуется сравнительно высокой частотой возникновения спонтанных обратных мутаций к прототрофности, превышающей, по-видимому, частоты спонтанных прямых мутаций к ауксотрофности. Частота появления у *A. nidulans* спонтанных мутаций, устойчивых к эритромицину или стрептомицину составляет $2 \cdot 10^{-8}$ – $6 \cdot 10^{-9}$ (¹⁴).

Важно отметить, что клетки некоторых штаммов, ауксотрофных по метионину (met⁻ 42; met⁻ 16) или тиамину (T-1, T-2), более чувствительны к ингибирующему действию дрожжевого экстракта и бактотриптона. В отличие от дикого типа, разведенные культуры этих штаммов (5·10³ клеток/мл среды) не образуют колоний на плотных средах, содержащих бактотриптон или дрожжевой экстракт в концентрации 1 мг/мл.

Приведенные данные можно трактовать в пользу того, что одна из причин, затрудняющих выявление ауксотрофных мутантов у синезеленых во-

Таблица 2

Спонтанные обратные мутации и трансформация к прототрофности у ауксотрофных штаммов

Реципиентные ауксотрофные штаммы	Ауксотрофность	Частота встречаемости	
		прототрофные трансформанты (×10 ⁻⁴)	прототрофные спонтанные ревертанты (×10 ⁻⁷)
met ⁻ 13	По метионину	1,2	9,02
met ⁻ 42	То же	1,4	3,2
met ⁻ 43	» »	1,5	4,0
leu ⁻ 1	По лейцину	2,5	40
phe ⁻ 26	По фенилаланину	3,6	1,3
phe ⁻ 29	То же	3,0	1,0

дорослей, заключается в нестабильности ауксотрофных мутантов в популяции, обусловленной сочетанием двух факторов — высокой частотой возникновения прототрофных ревертантов и низкой селективной ценностью ауксотрофных клеток. Бактотриптон и дрожжевой экстракт, очевидно, угнетают рост различных ауксотрофных клеток сильнее, чем прототрофных ревертантов, клетки которых способны полностью вытеснить ауксотрофы из популяции. Поэтому среды, обогащенные сложно-органическими источниками факторов роста, малоприспособлены для селекции ауксотрофных мутантов у *A. nidulans*.

Предложенный нами метод векторного отбора, основанный на применении простых сред, содержащих единственный селективируемый фактор роста, снижает вероятность угнетения развития ауксотрофных клеток метаболитами и, таким образом, способствует выявлению ауксотрофных мутантов. Высказанные представления хорошо согласуются с данными других авторов (^{7, 10}), выделивших у одноклеточных синезеленых водорослей группу различных ауксотрофных мутантов с помощью селекции на искусственных питательных средах, содержащих ограниченный набор аминокислот и витаминов.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
2 VIII 1975

ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. L. Li, G. P. Redei, C. S. Govans, *Molec. Gen. Genet.*, v. 100, 77 (1967).
- ² C. Van Baalen, In: *Biology of Blue Green Algae*, Oxford, v. 186, 1973. ³ C. Van Baalen, *Science*, v. 149, 70 (1965).
- ⁴ Y. Asato, C. E. Folsome, *Mut. Res.*, v. 8, 531 (1969).
- ⁵ J. A. Houghton, *Brit. Phicol. J.*, v. 6, 39 (1971).
- ⁶ A. R. Kaney, H. P. Doolittle, *Genetics*, v. 71, 465 (1972).
- ⁷ L. O. Ingram, D. Pierson et al., *J. Bacteriol.*, v. 111, 112 (1972).
- ⁸ A. R. Kanney, *Arch. Mikrobiol.*, v. 92, 139 (1973).
- ⁹ M. Herdman, N. G. Carr, *J. Gen. Microbiol.*, v. 70, 213 (1972).
- ¹⁰ M. Herdman, S. F. Delaney, N. G. Carr, *J. Gen. Microbiol.*, v. 79, 233 (1973).
- ¹¹ R. A. Singer, W. F. Doolittle, *Abstr. Ann. Meeting of ASM*, v. 128 (1975).
- ¹² С. В. Шестаков, В. Д. Жевнер, Сб.: *Биология синезеленых водорослей*, «Наука», в. 2, 1969, стр. 110.
- ¹³ С. В. Шестаков, Сб.: *Актуальные проблемы биологии синезеленых водорослей*, «Наука», 1974, стр. 18.
- ¹⁴ В. Н. Столетов, В. Д. Жевнер и др., *Генетика*, № 6, 61 (1965).
- ¹⁵ S. V. Shestakov, Nguen Than Khuyen, *Molec. Gen. Genet.*, v. 107, 372 (1970).