

На правах рукописи

УДК 575.1 : 582.282.23

БАНИКОВА
Мария Александровна

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ЦИТОДУКЦИИ У ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

03.00.15 — генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ЛЕНИНГРАД
1986

Работа выполнена на кафедре генетики и селекции биолого-почвенного факультета Ленинградского государственного университета имени А. А. Жданова.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор **С. Г. Инге-Вечтомов**.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук **С. В. Каменева**; кандидат биологических наук **Б. Ф. Яровой**.

Ведущая организация: ВНИИ Сельхозмикробиологии, г. Ленинград.

Защита состоится « » 1986 г. в часов на заседании специализированного совета Д.063.57.21 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.15 «Генетика» при Ленинградском государственном университете им. А. А. Жданова по адресу: 199164, Ленинград, Университетская набережная, 7/9, аудитория № .

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Горького Ленинградского государственного университета.

Автореферат разослан « » 1986 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат биологических наук

Н. М. Иркаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность тем. Одним из наиболее популярных объектов современной генетики являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Интерес к этому объекту обусловлен тем, что дрожжи - легко культивируемые генетически маркированные - одноклеточные эукариоты. Многие выводы, сделанные на основании генетического изучения дрожжей, можно экстраполировать на высшие эукариоты, кроме того дрожжи широко используются в микробиологической промышленности.

Дрожжи могут быть использованы как генетическая модель процесса образования зиготы. Механизм образования зиготы, в частности процесс кариогамии у дрожжей-сахаромицетов и других эукариот, до конца не выяснен. Слабая изученность кариогамии связана с отсутствием мутантов, у которых маркированы разные этапы слияния ядер. Показано, что у дрожжей вследствие нарушения процесса кариогамии наряду с обычными диплоидными зиготами образуются гетерокариотичные зиготы, при сегрегации которых появляются цитодуктанты - одноядерные гаплоиды с цитоплазмой смешанного происхождения. Поэтому критерием нарушения процесса кариогамии можно считать повышение частоты цитодукции. Таким образом получение мутантов, способных к цитодукции с повышенной частотой, позволит генетически изучить процесс образования зигот у дрожжей.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы заключалась в изучении генетического контроля цитодукции. Это требовало создания и характеристики коллекции мутантов, повышающих частоту цитодукции. В связи с поставленной целью в задачи экспериментальной работы входило:

1. Получение мутантов с повышенной частотой цитодукции (nfc^+).

2. Фенотипическая и генотипическая характеристика полученных мутантов (характеристика частоты цитодукции у мутантов nfc^+ , учет ослабления комплементации по селективным маркерам, установление доминантности-рецессивности полученных мутаций, анализ сцепления мутаций nfc^+ с центромером и другими маркерами родительских штаммов, анализ аллелизма мутантов nfc^+).

3. Выявление связи цитодукции с другими клеточными процессами (влияние мутаций по клеточному циклу на частоту цитодукции, связь цитодукции с изменениями в аппарате трансляции).

Научная новизна. Впервые получены мутанты hfc^+ температурочувствительные по жизнеспособности и не аллельные cdc мутантам. При создании коллекции мутантов впервые показано, что частота возникновения мутантов hfc^+ достоверно не отличается у штаммов $a-$ и α -типа спаривания, т.е. состояние MAT локуса не влияет на частоту возникновения мутантов, способных к цитодукции с повышенной частотой. Разработана система для массового анализа доминантно-рецессивных отношений у мутантов hfc^+ , основанная на способности штаммов α -типа спаривания скрещиваться (с низкой частотой) между собой. Изучена способность мутаций по клеточному циклу (cdc) повышать частоту цитодукции. Впервые показано, что частоту цитодукции повышают мутации cdc , изменяющие синтез хромосомной ДНК. Показано влияние источника углерода на эффективность доминантных нонсенс-супрессоров (slr), установлена способность мутаций slr супрессировать нонсенс (UAA) на среде с неферментируемыми источниками углерода при рестриктивной температуре ($30^\circ C$). Впервые показано влияние изменений в аппарате трансляции на частоту цитодукции и мутаций hfc^+ на фенотипическую супрессию нонсенсов на средах без глюкозы.

Практическая ценность. Разработанная нами методика позволяет проводить массовой отбор мутантов hfc^+ , температурочувствительных по жизнеспособности, и анализировать их доминантно-рецессивные отношения. Полученные мутанты могут быть использованы для изучения процессов кариогамии и клеточного цикла дрожжей; для получения дополненных и замещенных по отдельным хромосомам линий дрожжей; для переноса внехромосомных детерминант; для конструирования штаммов с заданными геномами и плазмонами.

Апробация работы. Результаты исследований, представленные в данной работе, докладывались на УШ Всесоюзном симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (Пушино, май 1984 г.), конференции молодых ученых "Актуальные вопросы современной биологии" (Ленинград, апрель 1985 г.), X Международном специализированном симпозиуме по генетике и молекулярной биологии дрожжей (Варна, НРБ, ноябрь 1985 г.), а также на научных семи-

нарах лаборатории физиологической генетики БИНИ ЛГУ, отдела цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 3 печатных работах.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, состоит из введения, 6 глав, выводов и списка литературы, включающего 207 наименований; содержит 20 таблиц и 19 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы посвящен генетическому контролю жизненного цикла дрожжей-сахаромикетов и состоит из трех частей. В первой части приводятся сведения о клеточном цикле дрожжей-сахаромикетов: описаны основные события клеточного цикла; рассмотрены мутации по клеточному циклу (*cdc*); приведена карта клеточного цикла и обсуждена концепция старта - основополагающего момента клеточного цикла. Во второй части обзора литературы рассматриваются основные данные о мейозе и споруляции у дрожжей: условия вступления клетки дрожжей в споруляцию; последовательность событий во время мейоза; генетический контроль мейоза и образование аскоспор у дрожжей-сахаромикетов; генетические аспекты различных путей мейоза. Третья часть посвящена процессу спаривания у дрожжей-сахаромикетов: описаны типы спаривания у дрожжей, α -, a - и a/α - контролируемые циклы; приведены данные о возможных механизмах слияния клеток (цитогамии) и ядер (кариогамии), о генетическом контроле кариогамии у дрожжей-сахаромикетов и плейотропном эффекте некоторых мутаций на кариогамию. В заключение рассмотрены взаимосвязь всех процессов жизненного цикла дрожжей-сахаромикетов и принципы создания селективных систем цитодукции. Приведенные данные показывают, что наиболее слабо изученным в генетическом плане является процесс кариогамии, что и является обоснованием актуальности проделанной нами экспериментальной работы.

Материал и методы.

Стенды. В работе использованы штаммы Петергофских генетических линий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и Берклейской

коллекции (США).

Среды. Использованы среды: полная — YAPD, минимальная — M, а также СП и ААК (отличаются от YAPD и M, соответственно, тем, что содержат вместо глюкозы 2% этанола), ААК — среда с α -аминоадипиновой кислотой (Shattoe et al., 1979). При необходимости в M, ААК и ААК добавляли аминокислоты и азотистые основания, в которых нуждались ауксотрофные штаммы.

Методы. В экспериментах использованы стандартные методики частной генетики дрожжей (Захаров и др., 1984; Инге-Вечтомов, 1982).

Селективные системы цитодукции. В работе применен принцип селекции цитодуктантов, основанный на использовании в качестве селективных маркеров рибосомных супрессоров *sup1* и *sup2* (Инге-Вечтомов, Карпова, 1984). Селекцию цитодуктантов осуществляли в системе из двух штаммов противоположного типа спаривания — донора и реципиента цитоплазмы. В качестве реципиента использовали дыхательно-некомпетентные штаммы, маркированные *sup2* и супресслируемыми рецессивными супрессорами консенсами *his7-1* и *ade 1-6* (YAA) или *his 7-1* и *ade 1-14* (YIA). Донор маркировали теми же консенсами *ade 1-6* (*ade 1-14*), *his7-1* и дополнительными маркерами ауксотрофности (табл. I). Среда, селективная для цитодуктантов, содержала этанол в качестве источника углерода и все необходимые для роста реципиента метаболиты за исключением глюкозы. На такой среде вырастали только колонии цитодуктантов. В табл. I представлены использованные системы селекции цитодуктантов.

Индукцию и отбор мутантов, способных к цитодукции с повышенной частотой (*ige⁺*), проводили на штаммах-донорах цитоплазмы (Карпова, 1984) используя метод отпечатков. Индуцировали мутации УФ-светом в дозе 300 Дж/м². Отдельные колонии, выросшие на матричной чашке (по 200 колоний на чашку), печатали на газон реципиента (10⁶ клеток), предварительно нанесенный на YAPD. Через двое суток скрещивавшие перепечатывали на среды, селективные для цитодуктантов. С матричных чашек отбирали колонии донора, на отпечатках ко рн возникало повышенное количество цитодуктантов. Эти колонии рассеивали истоающим штрихом, затем проверяли по 4 клона из рассева каждой колонии в качественном тесте на цитодукцию.

Таблица I

Селективные системы протонукции

Система	Штаммы	Генотип
I.	Д ₁ : 7A-II192 Д ₂ : ay10-7A-II192 } ay20-7A-II192 } Д ₃ : 12B-II3990 Д ₄ : 29B-II156 Д ₅ : A364A P: I-ay16-3IB- П3585	MATa ade1-6 his7-1 met A1 MATa ade1-6 his7-1 met A1 sup1 MATa ade1-14 his7-1 lys2-A12 MATa ade1-14 his7-1 met A1 MATa ade1 ade2 ura1 his7 lys2 tyr1 gal1 MATα[rho ⁻] ade1-6 his7-1 sup2 his4-B26 thr4-B15 leu2-1
2.	Д ₁ : 60B-II3990 Д ₂ : 54B-II315 Д ₃ : 128-2B-II3962 Д ₄ : 9-II3663 Д ₅ : 48-II3663 Д ₆ : 65-II3663 P: ρ ⁻ 3-шк1-ay16- 3IB-II3585*	MATα ade1-14 his7-1 met A1 thr4-B15 MATα ade1-6 his4-B26 his6-B25 lys2-A36 thr4-B15 leu2-1 MATα ade1-14 his7-1 lys2-87 leu2-1 thr4-B15 MATα ade1-6 met A1 MATα ade1-6 his7-1 lys2-A12 leu2-2 MATα ade1-6 lys2-A12 leu2-2 MATa [rho ⁻] ade1-6 his7-1 sup2 his4-B26 thr4-B15 leu2-1
3.	Д: 90-D201 P: ρ ⁻ I-D310	MATa phe A10 ade2-144, 791 his7-1 lys9-A21 leu2-3, 112 MATα[rho ⁻] ade2-144, 791 his7-1 lys2-A21 thr4-B15 leu2-3, 112 sup2

Примечание: Д. - донор цитоплазмы, P. - реципиент цитоплазмы.

* - получен М.В.Решневской в результате переключения типа спаривания α на а у реципиента I-ay16-3IB-II3585.

Оценка частоты цитодукции. Точную оценку частоты цитодукции давал количественный тест на цитодукцию, который заключался в следующем: отдельные колонии донора и реципиента смешивали в капле воды на YARД, инкубировали 4,5 часа или сутки, смывали клетки и рассеивали суспензию на селективные среды. Частоту цитодукции рассчитывали, как отношение числа колоний цитодуктантов, выросших на среде, селективной для цитодуктантов, к числу колоний на среде, селективной для гибридов и цитодуктантов. Для сравнения мутантов по эффективности цитодукции использовали качественный тест на цитодукцию (Инге-Вечтомов, Карпова, 1984). В качественном тесте по количеству колоний цитодуктантов, вырастающих на перекрестях донора и реципиента, приблизительно оценивали частоту цитодукции для данной пары донора и реципиента.

Селективность системы оценивали по тому какую часть колоний на перекрестях составляют цитодуктанты. Для этого колонии с перекрестий рассеивали истоющим штрихом на YARД. Из каждого рассева испытывали 4-8 клонов на серии селективных сред, СП и в тесте на копуляцию.

Тест на доминантность проводили в двух вариантах: для мутантов hfc^+ а- и α -типа спаривания. При проведении теста на доминантность штаммов а-типа спаривания исходный штамм и его мутанты hfc^+ гибридизовали с тестерным гаплоидом α -типа спаривания. У гибридов, гетерозиготных по мутации, приводящей к повышенной способности к цитодукции, индуцировали УФ-светом (50 Дж/м^2) гомозиготизацию по локусу типа спаривания. Полученные сегреганты а-типа спаривания проверяли в качественном тесте на цитодукцию, сравнивая с исходным штаммом и сегрегантами а-типа спаривания гибрида исходного штамма с тестером.

При проведении теста на доминантность штаммов α -типа спаривания гибридизовали исходный штамм и полученные из него мутанты hfc^+ с тестером α -типа спаривания, индуцируя гибридизацию УФ-светом (75 Дж/м^2). Среди возникавших гибридов были некопулирующие и α -копулирующие. Отбирали гибриды α -типа спаривания для постановки качественного теста. Сравнивали количество колоний цитодуктантов, выросших на перекрестях реципиентов и

а) - α -копулирующих гибридов из скрещивания с мутантом hfc^+

б) - α -копулирующих гибридов из скрещивания с исходным штаммом,

в) - мутанта hfc^+ ,

г) - исходного штамма.

Картирование мутаций проводили на основании тетрадного анализа, а также дестабилизации хромосом в штаммах cir^+ , гетерозиготных по интегрированной плазмиде с 2 мкм ДНК. Для картирования использовали тестеры cir^0 со встроенной в разные хромосомы (I, II, III, IV, V, VI, IX, XII, XV) плазмидой с 2 мкм ДНК, созданные в лаборатории И.А.Захарова (ЛИИФ). Штамм, маркированный мутацией hfc , скрещивали с набором тестеров. Гибридные колонии суспендировали и рассеивали на YAGD, затем перепечатывали на М. О локализации мутации в определенной хромосоме судили по выходу в гемизиготу картируемой мутации у колоний, потерявших плазмиду (Булат и др., 1983).

Статистическую обработку результатов проводили стандартными биометрическими методами (Глотов и др., 1982).

Результаты и их обсуждение

I. Получение и фенотипическая характеристика мутантов hfc^+ .

Отбор мутантов с повышенной частотой цитодукции вели на штаммах-донорах α - и α -типа спаривания. Создана коллекция из 92 мутантов с повышенной частотой цитодукции, среди них 13 температурочувствительных по жизнеспособности. На 6 штаммах-донорах α -типа спаривания - 7A-II92, ay10-7A-II92, ay20-7A-II92, 29B-II156, 42E-II3990, a10-90-1201 - отобрано 80 мутантов hfc^+ . На 5 штаммах-донорах α -типа спаривания - 60B-PI3990, 12E-2B-PI3982, 9-PI3663, 65-PI3663 - 12 мутантов hfc^+ (табл.2). Проведено сравнение частоты возникновения мутантов hfc^+ у штаммов α - и α -типа спаривания по непараметрическому критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. Частота возникновения мутантов hfc^+ у штаммов α - и α -типа спаривания достоверно не отличалась и составляла $(0,8-7,1) \cdot 10^{-3}$ для штаммов α -типа спаривания и $(0,2-2,9) \cdot 10^{-3}$ для штаммов α -типа спаривания. Таким образом показано, что аллель локуса типа спаривания не влияет на частоту возникновения мутантов hfc^+ . Все полученные мутанты были охарактеризованы в качественном тесте на цитодукцию. В зависимости от количества цитодуктантов на перекрестях мутанты разбили на 4 группы и

присвоили им условный ранг. Из каждой ранговой группы брали по несколько мутантов и анализировали у них частоту цитодукции (табл.3).

Таблица 2
Отбор мутантов hfc^+

Штамм	Тип спаривания	Исследовано колоний		Частота возникновения мутантов hfc^+ $\times 10^{-3}$
		Всего	Мутантов hfc^+	
7A-II92	a	7599	26(13)*	3,4 $\pm$ 0,6 (1,7 $\pm$ 0,4)**
ay10-7A-II92		15586	23	1,5 $\pm$ 0,3
ay20-7A-II92		2525	18	7,1 $\pm$ 1,7
a10-90- p201		1249	1	0,8 $\pm$ 0,8
605-П3990	a	1361	4	2,9 $\pm$ 1,4
128-2B-П3982		16915	3	0,2 $\pm$ 0,1
9-П3663		1594	1	0,6 $\pm$ 0,5
48-П3663		1880	2	1,1 $\pm$ 0,7
65-П3663		1815	2	1,1 $\pm$ 0,7

Примечание: * - в скобках указано количество мутантов $hfc^+/ts/$ среди мутантов hfc^+ .

** - в скобках указана частота возникновения мутантов $hfc^+/ts/$.

Оказалось, что у мутантов, отнесенных к первому рангу, частота цитодукции: II-60%, у мутантов, отнесенных ко второму рангу - 6-10,9%, к третьему - 3-5,6%, к четвертому - 1-2,9%. В целом у мутантов hfc^+ частота цитодукции составляла от 1,03 до 81,10%. У исходных штаммов, которые были отнесены к рангу V, частота цитодукции составляла 0,3-0,9%. Селективная система цитодукции, примененная в работе чувствительна, т.к. позволяет выявить мутантов незначительно повышающих частоту цитодукции.

Для выявления в коллекции мутаций типа kar , вызывающих блок кариогамии, был проведен тест на ослабления комплементации у гибридов, т.к. для мутантов kar - типа характерно более позднее появление гибридов на селективной среде. В коллекции

Таблица 3

Частота цитодукции у исходных штаммов и мутантов hfc^+ .

Штамм	Ранг hfc^+	Ослабление комплементации *	Частота цитодукции (в %)	Селек- тивность **
7А-П192	5	-	$0,33 \pm 0,06$	0,8
цит1-7А-П192	1	+	$40,49 \pm 0,63$	0,8
цит128-7А-П192	1	-	$15,29 \pm 1,07$	- ***
цит158-7А-П192	1	+	$14,48 \pm 1,65$	-
цит163-7А-П192	3	-	$4,55 \pm 0,76$	1,0
цит120-7А-П192	3	-	$3,31 \pm 0,64$	1,0
цит148-7А-П192 (ts)	1	+	$39,73 \pm 0,69$	1,0
цит190-7А-П192 (ts)	3	-	$2,97 \pm 0,13$	0,9
цит118-7А-П192 (ts)	4	-	$1,39 \pm 0,27$	1,0
цит160-7А-П192 (ts)	4	-	$1,11 \pm 0,49$	-
цит189-7А-П192 (ts)	4	-	$1,51 \pm 0,10$	1,0
цит202-7А-П192 (ts)	4	+	$1,16 \pm 0,23$	1,0
цит211-7А-П192 (ts)	4	-	$1,03 \pm 0,22$	-
42Б-П3990	5	-	$1,08 \pm 0,10$	0,7
цит1-42Б-П3990	1	-	$58,39 \pm 1,17$	1,0
цит8-42Б-П3990	1	-	$81,10 \pm 2,29$	-
60Б-П3990	4	-	$2,28 \pm 0,06$	1,0
цит7-60Б-П3990	1	-	$16,31 \pm 2,42$	-
цит2-60Б-П3990	3	-	$3,33 \pm 0,23$	1,0
цит9-60Б-П3990	3	-	$5,51 \pm 0,53$	-
9-П3663	2	-	$7,71 \pm 2,64$	1,0
цит1-9-П3663	1	+	$18,66 \pm 2,70$	0,9
128-2В-П3982	4	-	$2,02 \pm 0,05$	1,0
цит2-128-2В-П3982	1	-	$20,90 \pm 2,87$	1,0
цит3-128-2В-П3982	1	-	$12,87 \pm 0,54$	-
цит4-128-2В-П3982	2	-	$8,19 \pm 0,75$	-

Примечания: * - штаммы тестировали на ослабление комплементации;

"+" - у гибридов, гетерозиготных по мутации hfc , наблюдалось ослабление комплементации по селективным маркерам.

"-" - ослабления комплементации не наблюдали.

~~жж~~ - при вычислении селективности системы анализировали по 8-14 колоний с селективной среды, в столбце указана доля цитодуктантов среди проанализированных колоний.

~~жжж~~ - в некоторых случаях селективность системы не вычисляли.

были обнаружены мутанты *kar*-типа как α - так и α -типа спаривания (табл.3). Они принадлежали ко всем ранговым группам. Таким образом не выявлено взаимосвязи между частотой цитодукции и ослаблением комплементации.

II. Генетический анализ мутантов hfc^+ . Проведен анализ характера наследования признака hfc^+ , сцепления мутаций hfc с маркерами родительских штаммов и центромером, доминантно-рецессивных отношений между мутантами hfc^+ .

Поскольку в тесте на доминантность сравнивали частоту цитодукции у диплоида и гаплоида, необходимо было выяснить, как уровень пloidности влияет на частоту цитодукции. При получении митотических сегрегантов α -типа спаривания происходила митотическая гомозиготизация $MaTa$, поэтому выясняли, как тип спаривания влияет на частоту цитодукции. При сравнении частоты цитодукции у гаплоидов и изогенных автодиплоидов установили, что частота цитодукции у диплоидов обоих типов спаривания в 4 раза ниже, чем у гаплоидов (табл.4). При качественном сравнении снижения частоты цитодукции у гаплоидов не зарегистрировано.

Таблица 4

Частота цитодукции у гаплоидов и автодиплоидов штаммов 54Б-П315 (α -типа спаривания) и 7А-П192 (α -типа спаривания) в %

Штамм	Уровень пloidности	
	n	2n
54Б-П315	$4,14 \pm 0,47$	$1,04 \pm 0,18$
7А-П192	$0,82 \pm 0,08$	$0,21 \pm 0,03$

У α -копулирующих гибридов от скрещивания 60Б-П3990 х Л28-2В-П3982 частота цитодукции была снижена по сравнению с исходными гаплоидными штаммами (Табл.5).

Снижение частоты цитодукции у " $\alpha\alpha$ " гибридов не было отмечено при качественном сравнении частоты цитодукции.

Таблица 5

Частота цитодукции у штаммов α -типа спаривания 60Б-П3990 и Л28-2В-П3982 и их гибридов

Штамм	Частота цитодукции
60Б-П3990	$2,28 \pm 0,06$
Л28-2В-П3982	$2,02 \pm 0,05$
" $\alpha\alpha$ " гибрид №1	$0,18 \pm 0,02$
" $\alpha\alpha$ " гибрид №2	$0,10 \pm 0,01$
" $\alpha\alpha$ " гибрид №10	$2,24 \pm 0,11$
" $\alpha\alpha$ " гибрид №12	$0,36 \pm 0,02$

Примечание: гибрид №10 гемизиготен по α -аллели MAT локуса, о чем судили по появлению гибридов в скрещивании с α -тестером; гибриды №1, №2, №12 были гомозиготны по α -аллели MAT локуса, т.к. не давали гибридов с α -тестером.

Таким образом, увеличение уровня плоидности в сочетании с увеличением дозы III хромосомы вызывает понижение частоты цитодукции.

Проведен анализ 19 мутантов а- и α -типа спаривания. Среди 12 мутантов а-типа спаривания выявлено 6 доминантных, 5 рецессивных, 1 полудоминантная мутация. При исследовании 7 мутантов hfc^+ из штаммов α -типа спаривания выявлены 1 доминантная, 3 рецессивных и 3 полудоминантных мутации. Отсутствие селективных для выделения гибридов маркеров не позволило поставить тест на аллелизм по признаку hfc между рецессивными мутантами hfc^+ .

Проведен анализ характера наследования признака hfc . В результате гибридологического анализа двух рецессивных мутантов установлено моногенное наследование признака hfc в обоих слу-

чаях.

При создании коллекции мутантов hfc^+ были отобраны температурочувствительные по жизнеспособности мутанты $hfc^+/ts/$. Было установлено, что температурочувствительность мутантов $hfc^+/ts/$ рецессивна. Тетрадный анализ показал, что температурочувствительность 3 мутантов наследовалась моногенно. Отклонение от моногенного наследования у 5 мутантов объясняется наличием модификаторов. У трех мутантов с моногенным наследованием ($hfc\ 202$, $hfc\ 189$, $hfc\ 190$) температурочувствительность оказалась сцепленной с центромером (табл.6).

Таблица 6

Анализ сцепления с центромером $hfc^+/ts/ 202$, $hfc^+/ts/ 189$,
 $hfc^+/ts/ 190$

Гибрид	Маркеры	Типы тетрад			P_{Ho} 2:4
		P	N	T	
цит189-7A-П192 х 18В-П3663	$ts-MAT$	10	14	22	< 0,05
	$ts-LEU2^*$	13	11	19	< 0,05
	$ts-MET\ A1^*$	8	3	30	> 0,05
цит190-7A-П192 х 65-П3663	$ts-MAT$	16	18	38	< 0,05
	$ts-LEU2^*$	17	23	25	< 0,05
	$ts-MET\ A1^*$	10	11	47	> 0,05
цит202-7A-П192 х 18В-П3663	$ts-MAT$	4	2	1	< 0,05
	$ts-LEU2$	4	2	1	< 0,05
	$ts-MET\ A1$	1	2	4	> 0,05

Примечание: Полученные соотношения типов тетрад сравнивали с теоретически ожидаемым $2(P+N):4T$.

MAT и $LEU2$ сцеплены с центромером, $MET\ A1$ - несцеплен.

* - в нескольких полных тетрадах наблюдается отклонение от нормального расщепления по MET и LEU .

При дополнительном картировании ts -мутаций с помощью тестерных линий с идентифицированной в хромосоме 2 лям ДНК удалось выяснить, что $hfc\ 190$ находится в IV хромосоме.

Температурочувствительные сегреганты были использованы для постановки функционального теста на аллелизм (по признаку температурочувствительности). Проанализировали аллельность 8 мутантов *hfc⁺/ts/*. Два мутанта, маркированные *hfc188* и *hfc190* - были аллельны, их гибриды не росли при 36°C. Сделан вывод, что *ts*-мутациями маркировано не менее 7 разных генов. Показана также аллельность двух мутаций *hfc* генам клеточного цикла *cdc*. На основании аллельности *cdc7-1* - *hfc202* и *cdc16-1* - *hfc189* сделан вывод о способности мутаций в генах *cdc* повышать частоту цитодукции.

III. Связь цитодукции с другими процессами клеточной физиологии. Проведено исследование плейотропного эффекта мутаций в генах *cdc* на нарушение кариогамии. В работе Dutcher и Hartwell (1982), установлено, что 4 *cdc* гена, влияющие на структуру и функции веретена деления (*cdc 4*, *cdc 28*, *cdc 34*, *cdc 37*) способны повышать частоту цитодукции. В связи с нашими данными о способности мутаций *cdc7* и *cdc16* влиять на эффективность цитодукции была проверена способность 25 мутантов *cdc* повышать частоту цитодукции в использованной нами селективной системе. 11 мутантов *cdc* проявили способность повышать частоту цитодукции (табл. 7). Среди мутантов *cdc*, повышающих частоту цитодукции есть: влияющие на структуру и функции веретена деления (*cdc 1*, *cdc 3*, *cdc 11*, *cdc 16*, *cdc 19*) и нарушающие синтез хромосомной ДНК (*cdc 6*, *cdc 7*, *cdc 8*, *cdc 9*). Влияние мутаций *cdc* второй группы на цитодукцию описано впервые. Таким образом выявлена зависимость процесса кариогамии от других процессов клеточной физиологии.

Учитывая специфику нашей селективной системы цитодукции - применение в качестве селективных маркеров мутаций, затрагивающих трансляцию - мы могли ожидать появления мутаций, повышающих частоту цитодукции, и одновременно влияющих на функции аппарата белкового синтеза. В работе получены данные в пользу того, что повышение частоты цитодукции может быть связано с изменениями в аппарате трансляции. У штаммов-доноров, имеющих супрессорную мутацию *sup1* (*ay10-7A-PI92* и *ay20-7A-PI92*), частота цитодукции была выше, чем у исходного штамма (7A-PI92). На основании качественного теста 7A-PI92 был отнесен к У рангу

Таблица 7

Частота цитодукции *cdc* мутантов

Мутант <i>cdc</i>	Частота цитодукции (в %)	Селективность [*]	Повышение частоты цитодукции по отношению к А364А ^{ЖЖ}
А364А (<i>cdc</i> ⁺)	1,38±0,06	1,0	-
<i>cdc</i> I-I	2,56±0,06	1,0	+
3-I	3,59±0,19	0,88	+
4-I	2,52±0,10	0,75	±
6-I	2,99±0,12	0,75	+
7-I	1,77±0,09	-	±
8-I	2,47±0,09	1,0	+
9-I	9,60±0,61	1,0	+
II-I	3,07±0,11	1,0	+
12-I	1,27±0,05	0,75	-
13-I	1,52±0,06	0,13	-
15-I	1,66±0,13	1,0	±
16-I	11,27±0,15	1,0	+
17-I	3,03±0,07	-	+
18-I	3,04±0,07	0,13	-
19-I	1,67±0,05	1,0	±
21-I	-	1,0	-
23-I	2,43±0,07	0,75	±
25-I	0,91±0,03	0,75	-
26-I	0,70±0,06	1,0	-
27-I	0,82±0,06	1,0	-
28-I	4,82±0,64	0,75	+
29-I	6,28±0,10	-	+
30-I	1,04±0,03	1,0	-
31-I	1,48±0,03	0,63	-

Примечания: *cdc* 21-1 в количественном опыте на цитодукцию не дал ни одной колонии (гибрида и цитодуктанта) на селективных средах.

* - при изучении селективности анализировали по 8 клонов предполагаемых цитодуктантов, иногда селективность не изучалась (" - ")

~~жж~~ - в этом столбце суммированы данные количественного и качественного тестов на цитодукцию:

"-" - частота цитодукции у *cdc* мутанта не выше, чем у A364A;

"±" - частота цитодукции у *cdc* мутанта незначительно выше, чем у A364A;

"+" - частота цитодукции у *cdc* мутанта превышает частоту цитодукции A364A.

(0,3-0,9%), а *ay10-7A-Π192* и *ay20-7A-Π192* - к IV рангу (1-2,9%) по частоте цитодукции. К тому же у этих штаммов не было отобрано ни одного мутанта *nfc*⁺ типа *kar*, следовательно мутация, изменяющая структуру рибосом (*sup1*), влияет не только на частоту цитодукции, но и на спектр отбираемых мутаций *nfc*.

При изучении взаимодействия *psi*-фактора, который является слабым супрессором нонсенсов и наличие которого не изменяет частоту цитодукции, с мутациями *nfc*⁺ пришли к выводу, что некоторые *nfc* мутации являются антисупрессорными (табл.8).

Таблица 8

Влияние *psi*-фактора на рост гибридов 7A-Π192 и *nfc*⁺ мутантов на среде без аденина

Мутант <i>nfc</i> ⁺ из 7A-Π192 (<i>psi</i> ⁰)	Рост на среде АЛК+гис гибридов от скрещивания с I25A-Π2156 (<i>psi</i> ⁺)	Ослабление комплементации у мутантов <i>nfc</i> ⁺	Частота цитодукции (в %)
I	+	+	59,7
22	-	-	1,1
23	-	-	13,4
24	+	-	10,5
31	-	+	42,2
58	+	-	39,8
Π18	-	-	1,4
I88	+	-	0,6
I89	+	-	1,5
I90	+	-	3,0
202	+	+	1,2
7A-Π192	+	-	0,46

Примечание. Учет роста гибридов проводили на 4 и 6 сутки.

Таким образом некоторые мутации *hfc* (независимо от их принадлежности к *Kar* типу) ведут себя как антисупрессоры по отношению к *pr1*-фактору.

У штамма 90-1201 содержащего *pr1*-фактор и характеризующегося нечетким проявлением *lys* 9-A2I, *his* 7-I (обе мутации -- UAA) при 20°C и *phe* A10 (молекулярная природа мутации не известна) при любых условиях культивирования, была получена антисупрессорная мутация. Выделенный мутант a10-90-1201 стал *his⁺lys⁺phe⁺* и для него была характерна повышенная частота цитодукции.

ВЫВОДЫ

1. У *Saccharomyces cerevisiae* создана коллекция из 92 мутантов *hfc⁺*. Частота возникновения мутантов *hfc⁺* не различается у исследованных гаплоидных штаммов α - и α -типа спаривания и составляет $(0,2-7,1) \cdot 10^{-3}$.

2. Показано, что автодиплоиды и гибридные диплоиды, гомозиготные по локусу типа спаривания (*MAT*) в количественных опытах имеют сниженную частоту цитодукции по сравнению с гаплоидными штаммами.

3. Разработана система для определения доминантности и аллелизма *hfc⁺* мутантов α -типа спаривания. Среди 19 исследованных мутантов *hfc⁺* α - и α -типа спаривания обнаружено 7 доминантных, 8 рецессивных и 4 полудоминантных мутаций.

4. Получены *hfc⁺* мутанты, температурочувствительные по жизнеспособности. Температурочувствительность *hfc* 202, *hfc* 189 и *hfc* 190 наследуется моногенно, но подвержена действию модификаторов. *hfc* 190 сцеплен с центромером IV хромосомы.

5. В тесте на аллелизм *hfc⁺/ts/* мутантов по их температурочувствительности установлено, что *ts*-мутации распределяются не менее, чем по 7 генам.

6. В тесте на аллелизм *hfc⁺/ts/* и *cdc* мутантов установлена аллельность пар *189-7A-1192 cdc16-1* и *202-7A-1192 cdc 7-I* по температурочувствительности.

7. Показано, что мутанты *cdc* 1, *cdc* 3, *cdc* 6, *cdc* 7, *cdc* 8, *cdc* 9, *cdc* 11, *cdc* 15, *cdc* 16, *cdc* 17, *cdc* 19, *cdc* 23, *cdc* 29, способны повышать частоту цитодукции.

8. Показано, что часть slr^+ мутантов имеет цитотропный эффект (антисупрессорный) на супрессию нонсенсов на среде без глюкозы.

9. Показано повышение эффективности супрессии нонсенсов у мутантов slr на среде с неферментируемыми источниками углерода при рестриктивной температуре (30°C).

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Инге-Вечтомов С.Г., Карпова Т.С., Банникова М.А. Влияние различных источников углерода на проявление признака slr (супрессия при пониженной температуре) у дрожжей-сахаромикетов, - Вестник МГУ, 1984, М15, биология, вып.3, с.35-37.

2. Банникова М.А., Карпова Т.С., Инге-Вечтомов С.Г. Генетический контроль кариогамии у дрожжей-сахаромикетов, - В сб.: VIII Всесоюзный симпозиум Структура и функции клеточного ядра (Пушино, 15-18 мая 1984 г.): Тез. докл. Пушино: ОНТИ АН СССР, 1984, с. 190-191.

3. Karpova T.S., Bannicova M.A., Inge-Vechtomov S.G. The genetic control of cytoduction in yeast. - In: Abstracts of Xth international specialised symposium on yeast genetics and molecular biology (Varna, Bulgaria, 4-9 november 1985), p.24.

Ртп, Тип. Втр. Зак. 654, Тпр. 100, М-34351, 25.06.86.