

УДК 575.224.52 : 582.282.232

Яак КАЛЬДМА, Ану ТИЙДЕМА

ИНДУКЦИЯ ρHO^- -МУТАЦИЙ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ ПЕРЕСЕВАХ НА ГЛЮКОЗУ

Дрожжи были одним из первых объектов при разработке методики изучения цитоплазматической наследственности, в частности генетики митохондрий. Распространенность подобных исследований объясняется удобством изучения факультативных анаэробных дрожжей *S. cerevisiae*, способных расти как на сбраживаемом, так и на несбраживаемом источнике углерода (этанол, глицерине). Именно *S. cerevisiae* послужил объектом, на котором были разработаны генетические, микробиологические и биохимические методы исследования митохондрий.

Показано, что большинство генетических признаков дрожжей локализованы в ядерных хромосомах и лишь незначительная часть — в митохондриальной ДНК (мтДНК). Митохондриальные мутации типа ρHO^- сыграли важную роль при расшифровке специфичности мутационного и рекомбинационного процессов. Изучение ρHO^- -мутаций приобрело особую значимость в связи с тем, что злокачественные клетки имеют ρHO^- -фенотип (Nagley и др., 1979; Heude и др., 1979; Lewin и др., 1978; Dujon, 1981).

Уже в 1953 году Б. Эфрусси (Ephrussi, 1953) обнаружил карликовые колонии ρHO^- -мутаций у дрожжей, потерявших способность расти на глицерине, в то время как на среде с глюкозой образовывались колонии меньших размеров, чем нормальные. Гаплоидные мутанты в скрещиваниях с нормальным по дыханию штаммом давали менделевское расщепление этого признака среди мейотического гаплоидного потомства. У *petite*-мутантов, позднее названных ρHO^- или иногда «аэр»-мутантами, дефектность дыхания связана с отсутствием ряда цитохромов и других ферментов окислительного фосфорилирования. Дальнейшие исследования показали связь между *petite*-мутациями и мтДНК (Nagley и др., 1979).

Petite-мутации делятся на нейтральные и супрессивные. Супрессивность выявляется в скрещиваниях с нормальным по дыханию (ρHO^+) штаммом. Нейтральные *petite* дают зиготное потомство с ρHO^+ -типом клеток, а супрессивные — зиготное потомство с ρHO^+ и ρHO^- (количество последних зависит от супрессивности и может достигать 90%). Оказалось, что в мтДНК супрессивных *petite* обнаруживаются делеции, а в оставшейся части ДНК последовательность нуклеотидных оснований изменена. У нейтральных *petite* мтДНК элиминирована полностью.

Кроме цитоплазматических *petite* известны мутации, ведущие к дыхательной недостаточности, наследуемые по менделевским законам и детерминированные ядерными генами (*Pet*-мутации, расщепление в тетрадах $2^+ : 2^-$). Как *Pet*⁻, так и *petite*-мутации могут возникать спонтанно или индуцированно. *Pet*-мутации могут ревертировать, *petite* — нет. В отличие от ядерных мутаций, *petite* могут возникать с большой частотой. Спонтанная частота возникновения ρHO^- у разных штаммов колеблется от доли процента до 1—2% (иногда до 10% и выше). Мутации

ρho^- индуцируются разными физическими (действие УФ-лучей, непериодическая температура) и химическими агентами (этидий бромид, акрифлавин, 5-фторурацил). Индукция ρho^- этими агентами происходит с большой частотой, так, например, УФ-облучением можно получить до 50% мутантов, а с помощью этидий бромид — до 100% (Nagley и др., 1979).

На частоту ρho^- влияют многие ядерные и митохондриальные гены. Известен ядерный мутант, у которого 90% клеток превращаются в ρho^- при 18°C (Weislogel, Bytow, 1970). В работе А. Гендуокера (Handwerker и др., 1973) выделен мутант, у которого 90% клеток превращаются в ρho^- при 35°C. Митохондриальные мутации *uvs rho 72* значительно повышают частоту возникновения ρho^- при УФ-облучении (Perlman, Mahler, 1973).

Роль источника углерода при индукции ρho^- -мутаций мало изучена. Данное сообщение посвящено характеристике нового типа — индукции ρho^- -мутации глюкозой, обнаруженной только у штамма *S. cerevisiae* y-768-18.

Материал и методика

В работе использовали дрожжевые культуры *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. vini*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii* (табл. 1).

Среды. Применяли стандартные среды (Захаров, Квитко, 1967). Полная среда (П), г/л: KH_2PO_4 — 2; MgSO_4 — 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1; глюкоза — 20; агар — 15—25. Полная среда без глюкозы (СПП) со спиртом — 20 мл/л. Полная среда с заменой глюкозы на другие источники углерода: галактозу, мальтозу, сахарозу, арабинозу, фруктозу, инулин и глицерин (по 20 г/л). Среда для споруляции (S), г/л: CH_3COONa — 10; KCl — 5; агар — 25. Минимальная среда (М) не содержит дрожжевого автолизата + биотин (0,2 мкг/л), тиамин (200 мкг/л).

Дрожжи выращивали при пермиссивной (+30°C) температуре.

Анаэробно. Культуры выращивали на косяках во флаконах (по 25 мл), откуда выкачивали воздух, который заменяли на азот или гелий.

Таблица 1

Список использованных штаммов

Наименование штамма	Генотип		
<i>S. cerevisiae</i> y-768-18	homothall	ura ⁻	ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> y-768-2	homothall		ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> y-458-1c	heterothall		ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII	heterothall	RAD6	ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> y-166-6c	heterothall		ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> TMP	heterothall		ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII P192	heterothall	<i>a ade</i> ₂	ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII 6PG3	heterothall	<i>a ade</i> ₁	ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII 6PG3	heterothall	<i>a ade</i> ₁	ρho^-
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII	heterothall	<i>alc</i> ₄	ρho^+
<i>S. cerevisiae</i> 7A	heterothall	<i>leu</i> ₂ <i>his</i> ₃	ρho^+
<i>S. paradoxus</i> y-32	homothall		ρho^+
<i>S. paradoxus</i> y-387	homothall		ρho^+
<i>S. vini</i>			ρho^+
<i>Z. bailii</i>			ρho^+

Идентификацию ρho^- -мутаций проводили путем репликации (бархатом) исследуемых колоний на П и СПП; отсутствие роста на СПП показывает наличие дыхательной мутации. Для идентификации ρho^- -мутаций скрещивали исследуемые дыхательные мутанты с ρho^+ -штаммом. Полученные зиготы подвергали мейозу на S-среде. Спорулирующую культуру обрабатывали улиточным соком и произрастание освободившихся гаплоидных сегрегантов проверяли на СПП (произрастание колоний свидетельствует о цитоплазматической природе дыхательных мутаций).

Определение цитохромного спектра проводили на СФ-10 (Яровой и др., 1970) в области от 480 до 640 нм с захватом α - и β -полос поглощения цитохромов. Использовали водяную суспензию дрожжевых клеток. При идентификации принимали во внимание только α -полосы с максимумами поглощения 603, 563 и 550 нм, соответствующие цитохромам *a*, *b* и *c*.

Результаты и обсуждение

Частота возникновения ρho^- -мутаций при пересеве дрожжей с этанола на глюкозу. Лабораторные гомоталломные дрожжи *S. cerevisiae* у-768-18 пересевали на полную среду с этанолом для очищения культуры от накопившихся ρho^- -мутаций. При пересеве культуры с этанола на глюкозу количество ρho^- -мутаций увеличилось по сравнению с пересевами с П на П.

Митохондриальная природа мутантов сводится к следующему: а) отсутствие менделевского расщепления среди мейотического гаплоидного потомства, б) отсутствие у дыхательных мутантов цитохромов *a* и *b*.

Отсутствие среди зиготного потомства ρho^- -мутантов при скрещивании исходных ρho^- на ρho^+ указывает на нейтральность мутаций и свидетельствует о полной элиминации мтДНК.

Для проверки достоверности этого феномена была поставлена серия опытов со штаммом у-768-18. Количество ρho^- -мутаций дрожжей изучали дважды: при пересеве со среды с этанолом на среду с глюкозой и при пересеве со среды с глюкозой на среду с глюкозой. Несмотря на колебания в результатах (причины которого неизвестны) можно убедиться, что пересев с этанола на глюкозу действительно увеличивает частоту возникновения ρho^- -мутаций в культуре по сравнению с пересевами с глюкозы на глюкозу (табл. 2). Частота ρho^- -мутаций при пересеве с этанола на глюкозу превышает частоту ρho^- при пересеве с глюкозы на глюкозу в среднем в 2,8 раза (последняя отражает спонтанную частоту ρho^- -мутаций у этого штамма). Следовательно, пересев с этанола на глюкозу является фактором, индуцирующим ρho^- -мутации.

Мутагенное действие этанола на дрожжевые митохондрии известно из работ И. А. Захарова и Е. Л. Бандаса (1979). Однако ими была обнаружена индукция ρho^- -мутаций при крайне большой концентрации этанола (24%), где наряду с мутагенным эффектом наблюдалось и понижение выживаемости.

В литературе нет сведений о способности индуцировать ρho^- -мутации пересевом дрожжей с несбраживаемого источника (2%-ный этанол) на сбраживаемый (глюкозу). Для выяснения распространенности индукции ρho^- -мутаций при пересеве с этанола на глюкозу было проверено несколько штаммов, происходящих из факультативных дрожжей разных видов: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. vini*, *K. lactis*, *Z. baili* (табл. 3). Выяснилось, что разные штаммы ведут себя в отношении индуцирующего эффекта пересева по-разному. Частота ρho^- -мутаций у большинства подопытных штаммов низкая и существенных различий в количестве

rho⁻ между пересевами не наблюдалось. Штаммы дрожжей *S. cerevisiae* у-126-7А, у-166-6с и Р192 с более высокой частотой rho⁻-мутаций дают при пересевах с этанола на глюкозу гораздо меньше rho⁻-колоний, чем при пересевах с глюкозы на глюкозу. Это соответствует общепринятому понятию о элиминации rho⁻-клеток в культуре дрожжей при выращивании на несбраживаемом источнике углерода; только у штамма *S. cerevisiae* у-458-1с элиминации rho⁻-клеток при пересеве с этанола на глюкозу не происходит (соответственно 6,6 и 8,9% rho⁻).

Таблица 2

Частота возникновения rho⁻-мутаций у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* у-768-18 при пересевах на глюкозу

№ опыта	Пересев культуры с П на П		Пересев культуры с СПП на П	
	Изучено колоний	rho ⁻ , %	Изучено колоний	rho ⁻ , %
1	328	3,6	343	16,9
2	136	7,4	135	17,8
3	355	3,1	195	13,3
4	394	2,1	376	12,5
5	370	9,5	516	14,9
6	163	8,6	422	17,1
7	331	2,1	274	14,1
8	588	2,4	469	13,6
9	394	6,4	597	15,7
10	193	3,3	588	16,7
11	558	4,0	524	11,1
Σ	3477	5,1	4442	14,2

Примечание: П — полная среда с глюкозой; СПП — полная среда, где глюкоза заменена этанолом.

Таблица 3

Частота возникновения rho⁻-мутаций у разных штаммов дрожжей при пересевах на глюкозу

Штаммы	Пересев культуры с П на П		Пересев культуры с СПП на П	
	Число изученных колоний	Кол-во rho ⁻ , %	Число изученных колоний	Кол-во rho ⁻ , %
<i>S. cerevisiae</i> у-768-18	3477	5,1	4442	14,2
<i>S. cerevisiae</i> у-768-2	520	0	681	0,2
<i>S. cerevisiae</i> у-458-1с	458	6,6	428	8,9
<i>S. cerevisiae</i> RAD 6	355	0	370	0
<i>S. cerevisiae</i> TMP	400	0,5	532	0
<i>S. cerevisiae</i> у-126-7А	298	15,4	665	2,9
<i>S. cerevisiae</i> 7А	501	0	361	0
<i>S. cerevisiae</i> у-166-6с	218	4,6	599	0
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII alc ₄	480	0	637	0,3
<i>S. cerevisiae</i> PG-XII Р192	1934	5,0	1588	0,6
<i>S. paradoxus</i> у-32	311	0,6	227	0,4
<i>S. paradoxus</i> у-387	206	0	207	0
<i>S. vini</i>	254	0,4	371	1,3
<i>K. lactis</i>	359	0	173	0
<i>Z. bailii</i>	322	0	471	0

Таким образом, индукция ρho^- -мутаций, обнаруженная у штамма у-768-18, не распространяется на другие испытанные штаммы и, следовательно, индуцирующий эффект пересева ограничивается в случае ρho^- -мутаций генотипом конкретного штамма.

Частота возникновения ρho^- -мутаций при пересеве дрожжей на разные источники углерода. Этот вопрос возник в связи с обнаружением индуцирующего ρho^- -мутации эффекта пересева с несбраживаемого субстрата (глицерин, арабиноза) на сбраживаемый (галактоза, сахароза, мальтоза, фруктоза, инулин). В этих целях исследовалось несколько вариантов пересева: а) с разных несбраживаемых источников углерода на глюкозу и другие источники углерода, б) с разных сбраживаемых источников углерода на глюкозу и другие сбраживаемые источники. Спонтанную частоту ρho^- -мутаций изучали при пересевах на разные источники углерода.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что ρho^- -мутации возникают только в вариантах, где дрожжи пересевают на глюкозу (табл. 4). Частота возникновения ρho^- -мутантов при пересевах на разные источники углерода разная, но ни в коем случае не зависит от сбраживаемости источника. Высокая частота ρho^- наблюдается как при пересевах с несбраживаемой арабинозы (24%), так и со сбраживаемой сахарозы (20%), а низкая частота — при пересевах с несбраживаемого глицерина (7,1%) и со сбраживаемого инулина (9,3%). Надо отметить, что использование для пересева одновременно двух источников углерода (этанол + глюкоза) приводит к изменению частоты ρho^- -мутаций. Добавление глюкозы в исходную среду (СПП + глюкоза \rightarrow П) приводит к сильному снижению частоты возникновения ρho^- -мутаций (3,3%). Подобный эффект можно объяснить конкурентоспособностью разных источников энергии — дрожжи в первую очередь усваивают глюкозу (Petrović, 1969).

Таблица 4

Частота возникновения ρho^- -мутаций при пересеве дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* у-768-18 на среды с разными источниками углерода

Тип пересева со среды на среду	Изучено колоний	Возникновение ρho^- -мутаций	
		Всего	%
глюкоза \rightarrow глюкоза	1400	39	2,8
этанол \rightarrow глюкоза	1766	251	14,2
этанол \rightarrow глюкоза + этанол	1720	177	10,3
этанол глюкоза \rightarrow глюкоза + этанол	2201	112	5,1
этанол глюкоза \rightarrow глюкоза	2229	74	3,3
этанол \rightarrow галактоза	494	0	0
этанол \rightarrow мальтоза	481	0	0
этанол \rightarrow сахароза	647	0	0
мальтоза \rightarrow глюкоза	1048	130	13,2
галактоза \rightarrow глюкоза	333	61	18,3
L-арабиноза \rightarrow глюкоза	1144	281	24,5
инулин \rightarrow глюкоза	1460	136	9,3
сахароза \rightarrow глюкоза	1558	311	20,0
глицерин \rightarrow глюкоза	3137	224	7,1
галактоза \rightarrow галактоза	821	0	0
сахароза \rightarrow сахароза	1591	0	0
мальтоза \rightarrow мальтоза	1680	0	0
галактоза \rightarrow сахароза	1663	0	0
сахароза \rightarrow галактоза	1284	0	0
фруктоза \rightarrow глюкоза	240	330	13,8

Таким образом, опыты по пересевам штамма у-768-18 со сред с разными источниками углерода на глюкозу позволили обнаружить индукцию ρho^- -мутаций и тем самым исключить возможность объяснения данного эффекта мутагенным действием этанола на митохондрии, т. е. наблюдаемый эффект можно действительно объяснить высокой глюкозочувствительностью штамма.

Сведения о индукции ρho^- -мутаций глюкозой встречаются только в работе Т. Негротти и Д. Уилки (Negrotti, Wilkie, 1968). Им удалось выделить чувствительные к глюкозе мутанты g_i (glucose inducible) среди устойчивых к ионам CO^{2+} -колоний. По данным П. Хорна и Д. Уилки (Horn, Wilkie, 1966), ионы CO^{2+} в концентрации 2 мМ ингибируют нормальные по дыханию ρho^+ -клетки, но не препятствуют росту ρho^- -клеток. При этом количество ρho^- , обнаруженное на среде с кобальтом, соответствует спонтанному уровню мутирования этого штамма, т. е. ионы кобальта не индуцируют ρho^- -мутаций, а лишь селективируют их. g_i -мутанты этого штамма были выделены на среде с кобальтом из выросших ρho^+ -колоний, которые представляли собой смесь ρho^- - и ρho^+ -клеток. Отобранные ρho^+ -клетки (g_i -мутанты) ведут себя на среде с несбраживаемым глицерином как морфологически нормальные гладкие колонии с ρho^+ -фенотипом клетки, но при пересеве на среду с глюкозой дают начало папиллярным колониям, где наряду с ρho^- -клетками растут в виде папиллы и ρho^+ -клетки. Клонированные из папиллы ρho^+ -клетки стабильно сохраняют папиллярный тип колонии при последующих пересевах на глюкозу.

В отличие от g_i -мутантов, штамм у-768-18, неселектированный на устойчивость к ионам CO^{2+} , образует на глюкозе не папиллярные, а морфологически нормальные гладкие колонии с ρho^+ -типом клеток. Предварительные данные, полученные на штамме у-768-18, показали при выращивании на среде с кобальтом иную реакцию дрожжей. По-видимому, ионы CO^{2+} не только ингибируют рост ρho^+ -клеток, но и селективируют их, а также индуцируют ρho^- -мутации. Устойчивость разных штаммов к ионам CO^{2+} сильно варьирует. Что касается интересующего нас штамма у-768-18, то он обладает по сравнению с другими штаммами существенной устойчивостью к ионам CO^{2+} . Попытка выделить на среде с кобальтом мутанты типа g_i не дала результатов.

Анаэробноз. Известно (Negrotti, Wilkie, 1968), что анаэробноз эффективно индуцирует ρho^- -мутации у g_i -мутантов. При выращивании штамма у-768-18 на сбраживаемых источниках (мальтозе и фруктозе) индукции ρho^- -мутаций не обнаружилось, наоборот, частота их возникновения даже уменьшилась (табл. 5). Не только выращивание, но и экспозиция дрожжевой культуры в анаэробнозе на среде с несбраживаемым источником (глицерином и этанолом) уменьшают при пересеве на глю-

Таблица 5

Влияние анаэробноза на возникновение ρho^- -мутаций у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* у-768-18 при пересевах на глюкозу

Пересев со среды на среду	С аэробнозной среды		С анаэробнозной среды	
	Изучено колоний	ρho^- , %	Изучено колоний	ρho^- , %
глюкоза→глюкоза	364	5,0	262	5,0
этанол→глюкоза	298	13,4	305	5,9
мальтоза→глюкоза	682	18,0	207	5,0
фруктоза→глюкоза	240	13,8	381	3,9
глицерин→глюкоза	392	7,9	227	5,3

козу частоту возникновения ρho^- -мутантов до 5%. Это еще раз подтверждает отличие глюкозочувствительности штамма у-768-18 от известных g_i -мутантов.

То, что ρho^- -мутации обнаруживаются у штамма у-768-18 только на глюкозе, а не на других сбраживаемых источниках углерода позволяет говорить о спонтанном мутировании ρho -фактора только в отношении глюкозы.

Причина высокой глюкозочувствительности штамма у-768-18 неизвестна. Регуляция дыхательного аппарата факультативных дрожжей — процесс чрезвычайно сложный. Это обусловлено контролем синтеза дыхательных ферментов как со стороны ядерных, так и со стороны митохондриальных генов. При этом регуляция во времени происходит действием многочисленных ферментов, участвующих в синтезе дыхательного аппарата.

Метаболизм факультативного анаэроба строго зависит от природы субстрата. Дрожжевые клетки, культивируемые в аэробных условиях на этаноле и глицерине, обладают хорошо сформированными митохондриями и наличием ферментов цитохромного комплекса. Однако при пересеве активно дышащих клеток с этанола на глюкозу в митохондриях происходят резкие изменения, называемые «глюкозной репрессией» или «эффектом Кребти». Глюкозная репрессия вызывает изменения в фосфолипидном составе, уменьшение дыхательной активности цитохромов, цитохромоксидазы, редуктазы и дегидрогеназы. Происходит деструкция митохондрий на стадии промитохондрий (Dharmalingam, Jayaraman, 1971; Jayaraman и др., 1971).

Можно полагать, что глюкозная репрессия, происходящая при пересеве активно дышащих дрожжей у-768-18 на глюкозу, приводит именно к тем резким деструктивным изменениям в митохондриях, которые оказывают дестабилизирующее влияние на митохондриальный геном, обуславливая его элиминацию. В пользу такого объяснения говорит факт, что анаэробноз репрессирует индукцию ρho^- -мутаций при пересеве дрожжей на глюкозу. В анаэробнозе митохондрии находятся в стадии промитохондрий с минимальным количеством дыхательных ферментов (Котельникова, Звягильская, 1973). Аэробная адаптация дрожжей, по-видимому, не приводит к тем дестабилизирующим изменениям митохондрий, которые могут произойти при глюкозной репрессии.

Авторы выражают благодарность И. А. Захарову за предоставление штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

- Захаров И. А., Бандас Е. Л. Индукция этиловым спиртом мутаций дыхательной недостаточности у дрожжей. // Генетика, 1979, 15, № 5, 927—929.
- Захаров И. А., Квитко К. В. Генетика микроорганизмов. Л., 1967.
- Котельникова А. В., Звягильская Р. А. Биохимия дрожжевых митохондрий. М., 1973.
- Яровой Б. Ф., Юрченко Л. В., Захаров И. А. Генные мутации, нарушающие систему цитохромов у дрожжей. // Генетика, 1970, 6, № 6, 138—143.
- Dharmalingam, K., Jayaraman, J. Mechanism of glucose repression of mitochondrialogenesis: induction of phospholipases. // Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 45, 115—118.
- Dujon, B. Mitochondrial genetics and function. // Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance. New York, 1981, 505—635.
- Ephrussi, B. Nucleocytoplasmic Relations in Microorganisms. Oxford, 1953.
- Handwerker, A., Schweyen, R. J., Wolf, K., Kaudewitz, K. Evidence for an extrakaryotic mutation affecting the maintenance of the rho factor in yeast. // J. Bact., 1973, 113, N 3, 1307—1310.
- Heude, M., Fukuhara, H., Moustacchi, E. Spontaneous and induced ρho^- mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: Patterns of loss of mitochondrial genetic markers. // J. Bact., 1979, 139, 460—467.

- Horn, P., Wilkie, D. Selective advantage of the cytoplasmic respiratory mutant of *Saccharomyces cerevisiae* in a cobalt medium. // *Heredity*, 1966, 21, N 4, 625—635.
- Jayaraman, J., Padmanaban, G., Malathik, K., Sarmo, P. S. Haem synthesis during mitochondrialogenesis in yeast. // *Biochem. J.*, 1971, 121, N 3, 531—535.
- Lewin, A., Morimoto, R., Rabinowitz, M., Fukuhara, H. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: classification of petites, and deletion mapping of mitochondrial genes. // *Mol. Gen. Genet.*, 1978, 163, 257—275.
- Nagley, P., Sriprakash, K. S., Linnane, A. W. Structure, synthesis and genetics of yeast mitochondrial DNA. // *Advances in genetics*, 1979, 20, 157—277.
- Negrotti, T., Wilkie, D. Induction of respiratory deficiency by repression of respiratory system in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 153, 341—349.
- Perlman, P. S., Mahler, H. R. Induction of respiration deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by berenil. II. Characteristics of the process. // *Mol. Gen. Genet.*, 1973, 121, N 4, 295—306.
- Petrovič, S. Staticka kultura kvasinkovitych mikroorganizmov na rozličnych eukroch. // *Biologia*, 1969, 24, N 12, 912—922.
- Weislogel, P., Butow, R. Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory deficiency in a cold sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, N 1, 52—58.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
25/XII 1987

Jaak KALDMA, Anu TIIDEMA

GLUKOOSI PÕHJUSTATUD RHO⁻ MUTATSIOONIDE INDUTSEERIMINE PÄRMSEENTEL *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Pärmseente *Saccharomyces cerevisiae* y-768-18 ümberkülv söötmelt, kus süsinikuallikaks on mittefermenteeritav etanool, fermenteeritava glükoosiga söötmel kutsub esile rho⁻ mutatsioone.

Etanoolilt glükoosile ümberkülvamisel täheldatav rho⁻ mutatsioonide tekkesagedus ületab spontaanse muteerumissageduse ligi 2,8 korda. Teistel erineva päritoluga tüvedel ei leitud ümberkülvil indutseerivat toimet rho⁻ mutatsioonide tekkele. See osutab eespool nimetatud efekti unikaalsusele.

Pärmseente tüve y-768-18 kasvatamine erinevatel fermenteeritavatel (maltoos, fruktoos, galaktoos, sahharoos ja inuliin) või mittefermenteeritavatel (arabinoos ja glütseriin) substraatidel näitas tüve kõrget glükoositundlikkust: ainult glükoosile ümberkülvil võis täheldada rho⁻ mutatsioonide suurt tekkesagedust. Rho⁻ mutatsioonide tekkesagedus on erinev substraatidel, millelt külvati glükoosile, ja ei sõltu substraadi fermenteeritavusest.

Tüve y-768-18 glükoositundlikkus erineb kirjandusest tuntud g_i mutantide omast selle poolest, et glükoosil moodustuvad normaalse fenotüübiga kolooniad ja anaeroobsetes tingimustes rho⁻ mutatsioone ei indutseerita.

Jaak KALDMA, Anu TIIDEMA

INDUCTION OF RHO⁻ MUTATION IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ON GLUCOSE CONTAINING MEDIUM

It has been found that transporting the homothallic yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* y-768-18 from the growth medium containing nonfermentable ethanol to the medium with fermentable glucose induces rho⁻ type mutation. The frequency of the rho⁻ mutation increases about 2.8-fold as compared to the spontaneous frequency on the glucose medium. Other facultative anaerobic yeast strains (different by origin) lacked such effect.

Glucose sensitivity was found by testing the strain y-768-18 on several fermentable (maltose, sucrose, galactose, fructose and inulin) and nonfermentable (glycerol and arabinose) carbon sources. The rho⁻ mutation was induced only when the yeast culture was transferred to the glucose medium. The frequency of the rho⁻ mutation varied with the carbon sources but was not independent on whether the substrate was fermentable or nonfermentable.

The strain y-768-18 differs from the well-known g_i mutants in two aspects: it gives colonies of the normal phenotype on glucose medium and the rho⁻ mutations are not induced by anaerobic conditions.

The probable reason of the rho⁻ mutation induction is discussed.