

1. Яковенко К. Н., Троицкий Н. А. Протопласты микроорганизмов.— Минск: Наука и техника, 1985.—159 с.
2. Chang S., Cohen S. N. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA // Mol. and Gen. Genet.—1979.—168, N 1.— P. 111—115.
3. Akamatsu T., Sekiguchi J. Selection methods in bacilli for recombinants and transformants of intra- and interspecific fused protoplasts // Arch. Microbiol.—1983.—134, N 4.— P. 303—308.
4. Staniewski R., Rugala A. Frequency of infection and efficiency of transfection of *Rhizobium meliloti* cells and spheroplasts // Acta microbiol. pol. A.—1975.— N 3.— P. 151—160.
5. Berry J., Atherley A. G. Spheroplasts of *Rhizobium japonicum* // Can. J. Microbiol.—1984.—30, N 2.— P. 415—419.
6. Child J. J., Sietsma J. N. Spheroplasts from *Rhizobium japonicum* // Plant Sci. Lett.—1975.—4, N 3.— P. 267—271.
7. Получение протопластов у клубеньковых бактерий люцерны *Rhizobium meliloti* / О. В. Филатова, Б. В. Симаров, В. В. Кучко и др. // Изв. АН СССР.—1982.— № 1.— P. 140—142.
8. DNA sequences homology in *Rhizobium meliloti* plasmids / L. Jouanin, P. de Lajudie, S. Bazetoux, T. Huguet // Mol. and Gen. Genet.—1981.—182, N 2.— P. 189—195.
9. Allen O. N. Experiments in soil bacteriology.—Minneapolis: Burgess publ. co., 1959.—59 p.
10. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия.— М.: Мир, 1984.— 238 с.
11. Максимова Н. П., Желдакова Р. А., Фомичев Ю. К. Получение протопластоподобных структур *Pseudomonas putida* и их реверсия в бактериальные формы // Микробиология.—1982.—51, № 4.— С. 628—631.
12. Bergersen F. J. The growth of *Rhizobium* on synthetic media // Austr. J. Biol. Sci.—1961.—14, N 1.— P. 349—360.
13. McQuillen K. Bacterial protoplasts // The Bacteria.— New York: Acad. press, 1981.— Vol. 1.— P. 249—360.
14. Ценин А. Н., Каримова Г. А., Рыбчин В. Н. Рекомбинация при слиянии протопластов *E. coli* // Докл. АН СССР.— 1978.—243, № 4.— С. 1066—1068.
15. Weiss R. L. Protoplast formation in *Escherichia coli* strains // J. Bacteriol.—1976.—128, N 2.— P. 668—670.
16. Leive L. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment *Escherichia coli* // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1965.—21, N 1.— P. 290—296.
17. Goldschmidt M. C., Wyss O. Chelation effects on *Azotobacter* cells and cysts // J. Bacteriol.—1966.—91, N 1.— P. 120—124.

ВНИИ с.-х. микробиологии, Ленинград

Получено 27.08.86

УДК 575.24

ОТСУТСТВИЕ У ПРИРОДНЫХ САХАРОМИЦЕТОВ Ту ЭЛЕМЕНТОВ И 2 мкм ДНК

С. А. Булат

Введение. В геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* присутствуют локализованные в хромосомах перемещающиеся элементы — *Tu* транспозоны [1—3] и экстрахромосомный элемент специфической структуры — 2 мкм плазида [4, 5]. Первая группа элементов (транспозоны) является, по-видимому, обязательной компонентой генома всякой эукариотической клетки, вторая же — 2 мкм ДНК, может рассматриваться как элемент, специфичный для дрожжей [4—8]. Поскольку биологическая роль этих элементов в дрожжах остается нераскрытой, несмотря на интенсивные исследования, мы будем называть их крипточескими генетическими элементами дрожжей.

Для решения проблемы биологической значимости крипточеских генетических элементов представляется важным дополнить молекулярно-генетическое их изучение в дрожжах *S. cerevisiae* филогенетическим и экологическим аспектами, т. е. расширить круг организмов — объектов исследования с учетом их родства и биологических связей и использовать метод трансгенеза элементов. В соответствии с этим планом нами начата работа по изучению распространения известных крипточе-

ских элементов генома *S. cerevisiae* в родственных видах дрожжей. Первые результаты такого анализа, в котором использовали различные по происхождению штаммы природных дрожжей-сахаромицетов *S. terrestris*, приведены в настоящем сообщении.

Материалы и методы. Штаммы дрожжей. В работе использовали штаммы трех видов дрожжей-аскомицетов, два из которых относятся к сахаромицетам.

S. cerevisiae: штамм ТП-8-9 (генотип [citr^o] МАТа *leu2-3, 112 ura3-160, 180*; содержит в I хромосоме встроившую эписомную плазмиду *pYF91* [9] с нормальной аллелью гена *LEU2* [10]; происходит из спорового клона межлинейного гибрида между гатчинскими и зарубежными лабораторными линиями); штамм *15B-4П* (генотип [citr⁺] МАТа, принадлежит к Петергофским генетическим линиям дрожжей и происходит из отселектированной на фертильность линии XII₇, которая, в свою очередь, берет начало от производственного штамма) [11].

S. terrestris: штаммы *1-3A, 2-2D, 3-3A, 4-2B, 5-4B* и *6-3A* (моноспоровые культуры гомоталлических прототрофов, выделенных из почв V. Jensen [12]; штамм *BKM Y-2472-4C* (моноспоровая культура гомоталлического прототрофа, выделенного В. И. Голубевым из почв Подмоскovie) [13]); штамм *CBS5829* (гомоталлический прототроф; условия выделения неизвестны).

Все штаммы *S. terrestris* любезно переданы Г. И. Наумовым (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов).

Yarrowia lipolytica: штамм *H222* (гаплоидный прототроф); любезно передан Г. Бартом (коллекция ЦИМЕТ АН ГДР).

Для культивирования всех дрожжевых штаммов использовали среду APD (0,5 %-ный дрожжевой автолизат; 1 %-ный бактопептон; 2 %-ная глюкоза). Геномную ДНК дрожжей выделяли по [14] из клеток в логарифмической стадии роста.

Зонды для гибридизации. *Ty*-зонд. Сконструирован на основе дрожжевого транспозона класса 2 (*Ty1-17* [1]), часть которого присутствует в составе плазмиды *pYF91* [9]. Плазмида рестрицирована *HindIII*+*Sall*, и фрагмент размером ~1,2 тысяч пар нуклеотидов (т. н. н.), покрывающий внутреннюю часть транспозона (без дельта последовательности), был извлечен из геля [15] и клонирован в полилинкер плазмиды *pUC19* [16].

2 мкм ДНК-зонд. Использовали плазмиду *ospl*, состоящую из полной 2 мкм ДНК, клонированной в *EcoRI* сайт *pBR322* (сконструирована и любезно передана В. Л. Ларионовым, ИИЦ АН СССР).

Для конструирования и размножения плазмид использовали штамм *E. coli HB101* [15]. Плазмидную ДНК выделяли по [17].

Гибридизация. Геномную ДНК дрожжей, рестрицированную *BamHI* или *EcoRI*, фракционировали гель-электрофорезом в 0,8 %-ной агарозе, перенесли на нитроцеллюлозные фильтры (S/S BA85) [18] и гибридизовали с ник-транслированным [15] зондом ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ или $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$; $(1-3)\cdot 10^7$ имп·мин⁻¹·мкг⁻¹ ДНК) в средних (30 %-ный формамид, 42 °С [19]) или жестких (65 °С) [20] условиях. После отмывки фильтры экзонировали на пленке РТ-1 (-20 °С, 1-2 сут) в присутствии усиливающих экранов.

Результаты. Прежде чем исследовать природные сахаромицеты на наличие в их геноме *Ty* элементов, необходимо было проверить, отвечает ли сконструированный нами *Ty*-зонд требованию универсальной гомологии с дрожжевыми транспозонами. Как описано выше, этот зонд был создан на основе транспозона класса 2, копии которого составляют меньшинство в общем числе дрожжевых транспозонов [1]. Однако, поскольку была взята внутренняя часть *Ty1-17* элемента, которая считается общей для обоих классов *Ty* элементов [1], предполагалось, что зонд мог бы быть универсальным. Для оценки специфичности *Ty*-зонда *HindIII-Sall* фрагмент *Ty1-17* элемента был ник-транслирован и использован в гибридизации с иммобилизованной на фильтре геномной ДНК трех разных видов дрожжей (рис. 1). Позитивные сигналы в виде хорошо различимых 11-13 полос были получены для ДНК штамма ТП-8-9 *S. cerevisiae*, расщепленной рестриктазами *BamHI* и *EcoRI*. Число гибридизовавшихся фрагментов в обоих случаях было сходным, тогда как их расположение в геле, т. е. размеры, — различными. Для

ДНК, рестрицированной *EcoRI*, размеры фрагментов доходили до 2 т. п. н. и даже менее, *BamHI* — более 4 т. п. н. Такое распределение фрагментов по размеру можно объяснить, допустив, что использованный *Ty*-зонд действительно является универсальным, т. е. способен гибридизоваться с последовательностями транспозонов обоих классов. Это следует из того факта, что транспозоны класса 2 не содержат внутреннего *EcoRI* сайта [1] и потому не могут давать позитивно гибридизующихся фрагментов ДНК, рестрицированной *EcoRI*, размером менее 5—6 т. п. н. Таким образом, сконструированный нами *Ty*-зонд мог

Рис. 1. Гибридизация геномной ДНК трех видов дрожжей с меченым *HindIII-Sall* фрагментом *Ty1-17* ДНК (*Ty*-зонд) и ДНК фага λ : 1, 8 — λ ДНК-*HindIII* маркеры молекулярной массы (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 т. п. н.); 2, 4 — ДНК *Y. lipolytica* (штамм *H222*), рестрицированная *BamHI* и *EcoRI* соответственно; 3, 5 — ДНК *S. cerevisiae* (штамм *ТП-8-9*), рестрицированная *BamHI* и *EcoRI* соответственно; 6 — ДНК *S. cerevisiae* (штамм *15В-П4*), нерестрицированная; 7 — ДНК *S. terrestris* (штамм *CBS5829*), нерестрицированная



Fig. 1. Hybridization of three yeasts genomic DNAs with the labelled *HindIII-Sall* fragment of *Ty1-17* of DNA (*Ty*-sond) and the λ DNA

быть использован для идентификации гомологичных последовательностей транспозонов. Более того, из-за малого размера зонда число позитивных полос, которые можно получить с его участием, должно соответствовать количеству копий гомологичных транспозонов в геноме.

В рассмотренном эксперименте гибридизовалась также перестрицированная геномная ДНК прототрофного штамма *15В-П4* дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 1), что хорошо согласуется с ожидаемым результатом. Однако для геномной ДНК штамма *CBS5829* дрожжей *S. terrestris*, как и ДНК дрожжей *Y. lipolytica*, взятой для негативного контроля, не было получено положительного сигнала при гибридизации, что может указывать на отсутствие в этих дрожжах последовательностей, гомологичных *Ty* элементам.

Для получения статистически достоверного результата геномная ДНК восьми различных штаммов *S. terrestris* была перенесена на фильтр и использована в гибридизации с ник-транслированной ДНК того же *Ty*-зонда. В результате ни в одном из штаммов *S. terrestris* не было обнаружено позитивных сигналов, тогда как в контроле (два штамма *S. cerevisiae*) соответствующие сигналы в области высокомолекулярной ДНК были получены (рис. 2). Таким образом, нам удалось показать, что в геноме дрожжей *S. terrestris* отсутствуют последовательности, гомологичные *Ty* элементам, и, следовательно, нет самих *Ty* элементов. По этому признаку два вида сахаромисетов явно различаются.

Геномная ДНК тех же восьми штаммов *S. terrestris* была проверена на присутствие последовательностей, гомологичных 2 мкм ДНК дрожжей *S. cerevisiae*. В качестве 2 мкм ДНК-зонда использовали ник-транслированную плазмиду *ocp1*. Для контроля были взяты два штамма *S. cerevisiae*, один из которых (*ТП-8-9*) был [*cir*^o]-генотипа, по содержал встроенную эписомную (т. е. содержащую фрагмент 2 мкм ДНК) плазмиду, а другой (*15В-П4*) — [*cir*⁺]-генотипа (по данным гелеэлектрофореза). И вновь позитивные сигналы были получены лишь для ДНК дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 3). При этом для штамма *ТП-8-9*

был выявлен лишь один слабой интенсивности сигнал в области высокомолекулярной ДНК, что согласуется с природой этого штамма и его [citr^o]-генотипом. Для штамма 15В-П4 были обнаружены многочисленные интенсивные сигналы-полосы, по размерам и взаиморасположению соответствующие различным формам мономера и мультимеров 2 мкм плазмиды. Таким образом, мы не обнаружили в геноме *S. terrestris* последовательностей, гомологичных 2 мкм ДНК, и, следовательно,

Рис. 2. Гибридизация геномной ДНК дрожжей *S. terrestris* с меченым *Ty*-зондом (*pUC19-Ty* фрагмент): 1—8 — ДНК штаммов *S. terrestris* 1-3А, 2-2D, 3-3А, 4-2В, 5-4В, 6-3А, ВКМ Y-2472-4С, CBS5829 соответственно; 9 — ДНК *S. cerevisiae* (штамм 15В-П4); 10 — ДНК *S. cerevisiae* (штамм ТП-8-9)

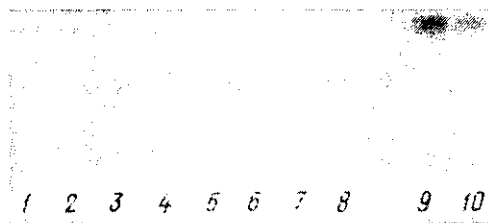


Fig. 2. Hybridization of the *S. terrestris* yeast strains genomic DNAs with the labelled *Ty*-sound (*pUC19-Ty* fragment)

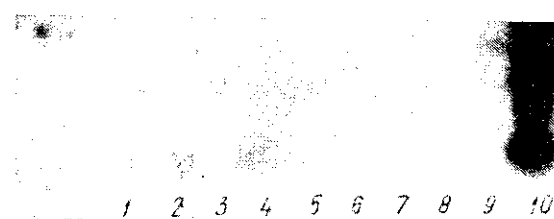


Рис. 3. Гибридизация геномной ДНК дрожжей *S. terrestris* с меченым 2 мкм ДНК-зондом (*ocpl*-плазмида): 1—8 — ДНК штаммов *S. terrestris* (см. рис. 2); 9 — ДНК *S. cerevisiae* (штамм ТП-8-9); 10 — ДНК *S. cerevisiae* (штамм 15В-П4)

Fig. 3. Hybridization of the *S. terrestris* yeast strains genomic DNAs with the labelled 2 μ m DNA-sound (*ocpl* plasmid)

в этих дрожжах нет 2 мкм плазмид. По этому признаку дрожжи *S. cerevisiae* и *S. terrestris* тоже различаются.

Обсуждение. Природные дрожжи-сахаромицеты выделены в отдельный вид *S. terrestris* (или *S. paradoxus*) в основном по критерию нежизнеспособности спорогого потомства гибридов между ними и дрожжами *S. cerevisiae* [21—23]. Других строгих доказательств их иной видовой принадлежности нет, что связано с отсутствием универсального видового критерия, равно применимого ко всем организмам безотносительно способов их размножения [24].

Мы полагаем, что криптические элементы генома дрожжей и эукариот в целом (в первую очередь транспозоны) могут иметь отношение к видовым различиям и в определенном смысле служить индикаторами видового статуса. Поиск генетических элементов, присутствие или отсутствие которых коррелировало бы с видовым сходством или различием, поможет выяснить биологическую роль этих элементов для эукариотической клетки и, возможно, прояснит молекулярную основу видообразования.

В данной работе сделана первая попытка такого рода. Взятые два близкородственных вида дрожжей-сахаромицетов, и их геномы проанализированы на содержание известных криптических элементов дрожжей *S. cerevisiae* — *Ty* элементов и 2 мкм ДНК. Оказалось, что в дрожжах *S. terrestris* эти элементы отсутствуют. Означает ли это, что получены строгие доказательства различной видовой принадлежности двух близких сахаромицетов, пока не ясно по двум причинам. Во-первых, мы не знаем есть ли в геноме *S. cerevisiae* криптические элементы *S. terrestris*, которые еще не идентифицированы. Во-вторых, нельзя исключить существования гомологии между *Ty* элементами и неизвестными элементами *S. terrestris* на уровне их белковых продуктов, ибо известно, что и сами дрожжевые транспозоны не полностью гомологичны на уровне ДНК [24].

Отсутствие *Ty* элементов у *S. terrestris* не продвигает также решения вопроса о происхождении *Ty* транспозонов. Наиболее популярная гипотеза говорит о происхождении дрожжевых транспозонов от ретровирусов [25]. Мы, однако, придерживаемся иного взгляда, согласно которому возникновение транспозонов связывается с появлением первой эукариотической клетки. Предковые транспозоны как неотъемлемая часть эукариотического генома, раз появившись, далее претерпевали эволюционные изменения, которые могли сопровождать видовые различия или лежать в их основе. В ходе этих изменений, относительно независимых от остальной части генома, транспозоны стали *Ty* элементами в дрожжах *S. cerevisiae*, а в *S. terrestris* могли стать чем-то иным, не гомологичным *Ty* транспозонам. Как уже подчеркивалось, необходимо иметь в виду, что сходство между элементами может сохраняться на уровне их белковых продуктов.

Выявленное нами различие не представляет собой уникального явления среди других родственных видов организмов. Известно, что у *Drosophila melanogaster* есть ряд транспозонных семейств, по которым этот вид не только отличается от близкого к нему *D. erecta* [27], но и сам может быть разделен на природные и лабораторные популяции [28, 29].

Полученные в работе данные по отсутствию 2 мкм ДНК у *S. terrestris*, на наш взгляд, не могут быть привлечены к обоснованию видовых различий. Известны случаи спонтанной потери 2 мкм плазмиды у *S. cerevisiae*, что, тем не менее, не вызывает очевидных изменений в клеточном цикле и видовом статусе [*circ*^o]-штаммов [4]. Плазмиды дрожжей, подобные 2 мкм ДНК, могут быть вовлечены в механизмы повышения эффективного использования дрожжевыми популяциями условий своего существования (адаптации). Этот вопрос, однако, требует специального изучения.

THE ABSENCE OF *TY* ELEMENTS AND 2 μ m DNA IN NATURAL SACCHAROMYCES

S. A. Bulat

B. P. Konstantinov Leningrad Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina

Summary

We have analyzed the spreading of the well-studied repetitive elements of *S. cerevisiae* genome (*Ty* elements and 2 μ m DNA) in the related natural species of *S. terrestris*. None of the homologous DNA sequences were found in different isolates of *S. terrestris*. The result is discussed in terms of hypothesis about the eukaryotic repetitive elements role in the species molecular determination.

1. Williamson V. M. Transposable elements in yeast // *Int. Rev. Cytol.*—1983.—83.—P. 1—25.
2. Roeder G. S., Fink G. R. Transposable elements in yeast // *Mobile genet. elements* / Ed. J. A. Shapiro.—New York: Acad. press, 1983.—P. 299—328.
3. Fink G. R., Boeke J. D., Garfinkel D. J. The mechanism and consequences of retrotransposons // *Trends Genet.*—1986.—2, N 5.—P. 118—123.
4. Broach J. R. The yeast plasmid 2 μ circle // *Mol. biol. of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance.*—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1981.—P. 445—470.
5. Gunge N. Yeast DNA plasmids // *Annu. Rev. Microbiol.*—1983.—37.—P. 253—276.
6. Molecular and functional organization of yeast plasmid *pSRI* / H. Araki, A. Jearnpi-patkul, H. Tatsumi et al. // *J. Mol. Biol.*—1985.—182, N 1.—P. 191—203.
7. Utatsu I., Utsunomiya A., Toh-E A. Functions encoded by the yeast plasmid *pSB3* isolated from *Zygosaccharomyces rouxii* IFO 1730 (Formerly *Saccharomyces bisporus* var. *mellis*) // *J. Gen. Microbiol.*—1986.—132, N 5.—P. 1359—1365.
8. Analysis of a 1.6- μ m circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilorum*: structure and molecular dimorphism / C. Falcone, M. Saliola, X. J. Chen et al. // *Plasmid.*—1986.—15, N 3.—P. 248—252.
9. Chimeric plasmids for cloning of deoxyribonucleic acid sequences in *Saccharomyces cerevisiae* / R. K. Storm, J. B. McNeil, P. S. Khandekar et al. // *J. Bacteriol.*—1979.—140, N 1.—P. 73—82.

10. Генетическое изучение интеграции плазмид в дрожжевые хромосомы. Сообщ. 5. Картирование сайтов интеграции плазмиды *pYF91* / С. А. Булат, Е. В. Межевая, В. П. Степанов и др. // Генетика.— 1987.—23, № 8.— С. 1407—1413.
11. Инге-Вечтомов С. Г. Дрожжи // Общ. пробл. биологии.— М.: ВИНТИ, 1982.— Т. 1.— С. 148—192.
12. Наумов Г. И. Биологический вид *Saccharomyces terrestris* // Докл. АН СССР.— 1979.—249, № 5.— С. 1228—1230.
13. Дрожжевая флора торфов / В. И. Голубев, В. М. Благодатская, А. Р. Манукян, О. Л. Лисс // Изв. АН СССР.— 1981.— № 2.— С. 181—187.
14. Sherman F., Fink G. R., Lawrence C. W. Isolation of yeast nuclear and mitochondrial DNA // Meth. in yeast genet.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1984.— P. 77—80.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Сэлбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—479 с.
16. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved *M13* phage cloning vectors and host strains; nucleotide sequences of the *M13mp18* and *pUC19* vectors // Gene.— 1985.—33, N 1.— P. 103—119.
17. Holmes D. S., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids // Anal. Biochem.— 1981.—114, N 1.— P. 193—197.
18. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.— 1975.—98, N 3.— P. 503—517.
19. Madaule P., Axel R. A novel ras-related gene family // Cell.— 1985.—41, N 1.— P. 31—40.
20. Сиунг Н., Кучерланати Р. Выявление специфических последовательностей ДНК в гибридах соматических клеток и в клетках, зараженных вирусной ДНК // Методы генетики сомат. клеток.— М.: Мир, 1985.— Т. 2.— С. 520—534.
21. Наумов Г. И., Никоненко Т. А. Дивергенция геномов культурных и диких дрожжей *Saccharomyces sensu stricto*: четыре вида-двойника // Докл. АН СССР.— 1987.—294, № 2.— С. 476—479.
22. Наумов Г. И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщ. 23. Необычное наследование токсинообразования у *Saccharomyces paradoxus batschinskaja* // Генетика.— 1985.—21, № 11.— С. 1794—1798.
23. Наумов Г. И. Генетическая дифференциация и экология дрожжей *Saccharomyces paradoxus batschinskaja* // Докл. АН СССР.— 1986.—291, № 3.— С. 754—757.
24. Проблемы вида и рода у грибов / Под ред. Э. Пармасто.— Таллин: Изд-во АН ЭССР, 1986.—194 с.
25. Variants within the yeast Ty sequence family encode a class of structurally conserved proteins / A. M. Fulton, J. Mellor, M. J. Dobson et al. // Nucl. Acids Res.— 1985.—13, N 10.— P. 4097—4112.
26. LaPorte D. C. Are the Ty elements of yeast ancient viruses? // Trends Biochem. Sci.— 1986.—11, N 7.— P. 273—275.
27. Dowsell A. P. Closely related species of *Drosophila* can contain different libraries of middle repetitive DNA sequences // Chromosoma.— 1983.—88, N 2.— P. 104—108.
28. Engels W. R. The P family of transposable elements in *Drosophila* // Ann. Rev. Genet.— 1983.—17.— P. 315—344.
29. The molecular basis of I—R hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: identification, cloning and properties of the I factor / A. Bucheton, R. Paro, H. M. Sang et al. // Cell.— 1984.—38, N 1.— P. 153—163.

Ленингр. ин-т ядер. физики
им. Б. П. Константинова АН СССР

Получено 03.12.86