

TERESA JAROSZYŃSKA

SIARKA W CYKLU ROZWOJOWYM KOMÓREK *CHLORELLA ELLIPSOIDEA* GERNECK

Od roku 1953 do chwili obecnej ukazało się szereg prac dotyczących zaobserwowanego przez badaczy japońskich cyklu rozwojowego u *Chlorella*, który nazwano cyklem Tamiya *. Jak wynika z tych obserwacji komórki *Chlorella* w czasie swego rozwoju, począwszy od momentu wydostania się autospory z ciała komórki macierzystej, przechodzą następujące stadia (Rys.2):

1. powstające komórki ciemne (Dn) — komórki młode, świeżo wytworzone z komórek macierzystych,
2. aktywne komórki ciemne (Da) — bogatsze w chlorofil i aktywniejsze fotosyntetycznie od poprzednich,
3. komórki w stadium przejściowym (D-L) między komórkami ciemnymi a jasnymi,
4. niedojrzałe komórki jasne (L_1), które mają większą od poprzednich objętość, lecz nie są jeszcze zdolne do podziału w ciemności,
5. pół-dojrzałe komórki jasne (L_2) — w ciemności dzielą się tylko częściowo,
6. dojrzałe komórki jasne (L_3) — zdolne do całkowitego podziału w ciemności,
7. komórki jasne (L_4) w stadium bezpośrednio poprzedzającym podział.

Stosując synchroniczne hodowle tych glonów zbadano przebieg szeregu procesów metabolicznych w poszczególnych stadiach rozwojowych. W Instytucie Tokugawa (Tokio) E. Hase i współpracownicy (1957) przeprowadzili doświadczenia dotyczące zmian zawartości podstawowych pierwiastków N, P, K, Mg i S w komórkach oraz ich znaczenia dla cyklu rozwojowego *Chlorella*. Wśród tych pierwiastków szczególną rolę należy przypisać siarce. Mimo, że stanowi ona tylko 0,5% suchej masy okazała się ważnym czynnikiem ograniczającym. Z tego względu podjęto szczegółowe badania mające na celu dokładniejsze poznanie roli siarki w procesie rozwoju komórek *Chlorella*. Zastosowano różne metody hodowli, a uzyskany materiał komórkowy poddano analizom chemicznym.

* Dotychczas w piśmiennictwie polskim ukazały się dwie prace przeglądowe na temat cyklu rozwojowego Tamiya u glonów: J. Zurzycki (1958) i T. Jaroszyńska (1965).

Metody hodowli i analizy

Do doświadczeń użyto komórek Da pochodzących z hodowli synchronicznej w pełnej pożywce wg. Tamiya (1953) *. Materiał komórkowy potrzebny do analiz uzyskiwano przy zastosowaniu następujących metod hodowli:

1. hodowla synchroniczna w pożywce pełnej
2. hodowla synchroniczna w pożywce pełnej zawierającej S^{35}
3. hodowla synchroniczna w pożywce bezsiarkowej (siarczany zastąpiono azotanami)
4. hodowla synchroniczna w roztworze siarczanu znaczonego S^{35} przy stałym naświetlaniu i przewietrzaniu powietrzem wzbogaconym w CO_2
5. hodowla synchroniczna w roztworze siarczanu znaczonego S^{35} przy stałym naświetlaniu i przewietrzaniu powietrzem pozbawionym CO_2
6. hodowla synchroniczna w mieszaninie siarczanu znaczonego S^{35} i azotanu.

Zawiesinę komórek pochodzących z kolejnych stadiów rozwojowych ekstrahowano różnymi zestawami rozpuszczalników, jak etanol, kwas trójchlorooctowy (TCA), eter i kwas nadchlorowy (PCA). Uzyskane odrębne frakcje poddano następnie analizie.

Do rozdzielenia i identyfikacji związków zawartych w poszczególnych ekstraktach i frakcji pozostałości zastosowano dwukierunkową chromatografię bibułową, chromatografię z wymianą anionów, elektroforezę oraz próby radioaktywności i reakcji z ninhydriną.

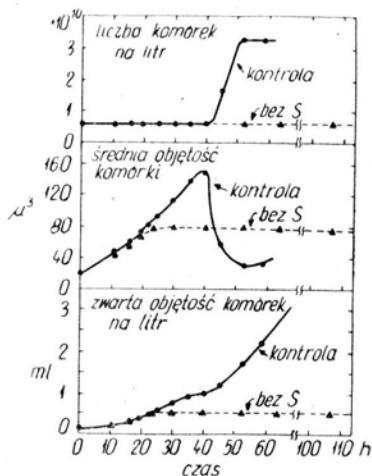
Wyniki badań

Komórki Da przeniesione do pożywki bezsiarkowej osiągają jedynie wczesne stadia komórek jasnych, lecz nie są zdolne do wytworzenia autospor (Rys. 1). Nie odzyskują one zdolności do podziału mimo przeniesienia do roztworu siarczanu potasu. Również w pełnej pożywce, w ciemności, nie dzielą się. Komórki ulegają podziałowi dopiero po pewnym okresie hodowli w pełnej pożywce, w warunkach fotosyntezy. Zmieniając w pożywkach związki towarzyszące siarce stwierdzono, że do wywołania podziału komórek hodowanych przez pewien czas w warunkach głodu siarkowego konieczne jest jednoczesne dostarczenie siarki w formie siarczanu i azotu w formie azotanu. Podziały komórkowe można osiągnąć również drogą hodowli na świetle w czystym siarce, przy stałym przewietrzaniu bez CO_2 .

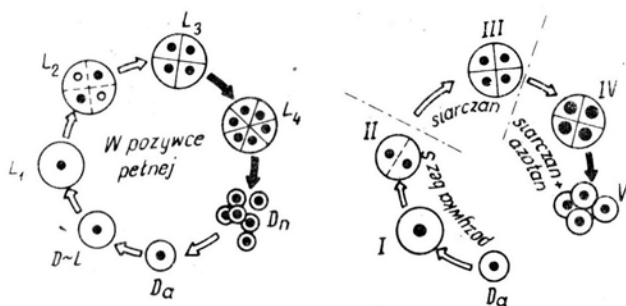
Przez odpowiednio dozowane dostarczanie soli S i N do pożywki można uzyskać kontrolę nad podziałem komórek i rozdzielenie w czasie procesu kario- i cytokinezy (Hase i wsp. 1958). Jeżeli komórki Da wyrosłe w pełnej pożywce poddane zostaną synchronizacji w środowisku bezsiarkowym z zachowaniem warunków fotosyntezy, następuje pewien przyrost zawartości DNA. Prowadzi to do podziału jądra, lecz cytokineza nie następuje. Po przeniesieniu komórek do roztworu siarczanu ma

*Skład pożywki wg. Tamiya: na 1 l aq. dest. 5, 0g KNO_3 ; 2,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,25 g K_2HPO_4 ; 0,003 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; mikroelementy A₅ i B₆ wg. Arnona (1938) po 1 ml.

miejsce dalsza synteza DNA i dalszy podział jądra, lecz również bez podziału komórkowego. Cytokineza zachodzi dopiero po dodaniu do pożywki azotanu (Rys. 2).

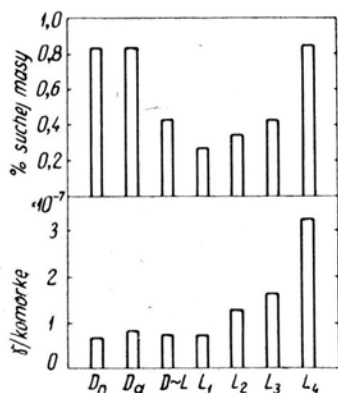


Rys. 1. Przebieg cyklu rozwojowego komórek Da w pożywce pełnej (kontrola) i bezsiarkowej (Hase i wsp. 1957).

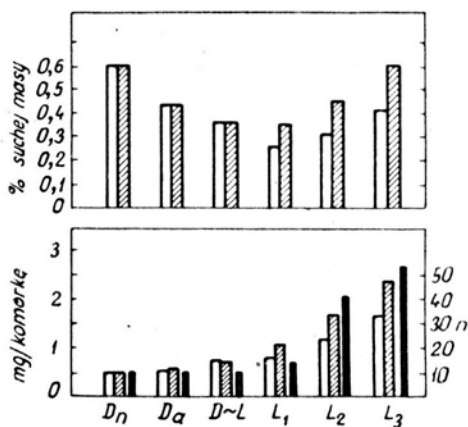


Rys. 2. Schematy cyklu rozwojowego w pożywce pełnej i z kontrolowanym dostarczeniem siarki i azotu (Hase i wsp. 1959).

Zawartość siarki w komórkach zmienia się znacznie w ich cyklu rozwojowym. Zarówno w odniesieniu do suchej masy, jak i w przeliczeniu na jedną komórkę, najniższy procent siarki mają komórki w fazie wzrostu (od stadium D-L do L₃). W fazie dojrzewania (L₃-L₄) i podziału (L₄-D) ilość siarki raptownie wzrasta (Rys. 3). Siarka jest więc asymilowana w dość późnym okresie rozwoju, kiedy aktywność



Rys. 3. Zmiany zawartości siarki w odniesieniu do suchej masy i jednej komórki w cyklu rozwojowym *Chlorella* (Hase i wsp. 1957).



Rys. 4. Zmiany zawartości DNA w odniesieniu do suchej masy i jednej komórki w cyklu rozwojowym *Chlorella* (Iwamura 1955).

fotosyntetyczna jest już znacznie słabsza, a komórki przygotowują się do podziału. Zmiany zawartości siarki są analogiczne do zmian zawartości DNA (Rys. 4), której rola w procesie podziału jest, jak wiadomo, decydująca.

Przy analizie komórek wzrastających w pełnej pożywce, zawierającej siarczanym znaczone S^{35} okazało się, że wzrost zawartości siarki dotyczy głównie związków rozpuszczalnych w etanolu i TCA. Procent siarki zawartej w związkach, nie podlegających ekstrakcji wymienionymi rozpuszczalnikami, jest względnie stały i wynosi 60—70% związanej siarki. Drogą analizy chromatograficznej obu ekstraktów i frakcji pozostałości wykryto związki podane w tabeli 1. Prócz nich w ekstrakcie etanolowym komórek L_1 i L_2 stwierdzono obecność beziarkowego związku o charak-

terze peptydowym (po hydrolizie daje na chromatogramie zamiast jednej — dwie plamy), którego nie udało się oznaczyć.

Tabela 1

Wyniki analizy chromatograficznej komórek wzrastających w pełnej pożywce zawierającej S⁸⁵

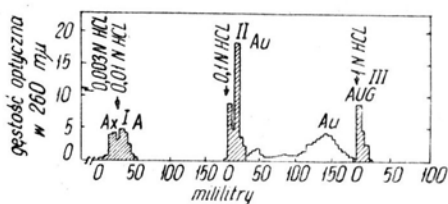
		Ekstrakt Etanolowy	TCA	Pozostałość
Przed hydrolizą	Analiza radiografi- czna	Cysteina Nieznany związek o wysokiej warto- ści R _F	Nieznany związek ninhydryno-ujemny	
	Próba ninhydrynowa	Glicyna Alanina Seryna Kw. asparaginowy Kw. glutaminowy		
Po hydrolizie	Próba ninhydrynowa		Glicyna Alanina Seryna Cystyna Kw. asparaginowy Kw. glutaminowy Arginina	Cystyna Metionina

Po przeniesieniu komórek Da do pożywki bezsiarkowej, już po 20 godz. hodowli 90% związanej uprzednio siarki przechodzi do związków proteinowej frakcji pozostałości. Frakcja TCA wykazuje przyrost zawartości związków siarkowych w okresie podziału jądra i chloroplastów (Rys. 5).

Komórki hodowane w roztworze siarczanu wiążą siarkę w substancje wykrywane we frakcji etanolowej, z których przechodzi ona następnie do związków proteinowej frakcji pozostałości.

Po przeniesieniu komórek z czystego siarczanu do mieszaniny siarczanu i azotanu, wiążą one siarkę w cysteinę i następnie w nieznany związek o wysokiej wartości R_F, wykrywany w ekstrakcie etanolowym. Ekstrakt TCA daje na chromatogramie jedną radioaktywną plamkę, zmniejszającą się w miarę przyrostu masy komórkowej. Frakcja pozostałości wykazuje dopiero w późniejszych stadiach obecność siarki, początkowo w formie cystyny a następnie metioniny.

Dokładniejszej obserwacji poddano nieznany, bezsiarkowy związek, występujący w ekstrakcie etanolowym. Stwierdzono, że ma on charakter peptydowy. W komórkach hodowanych w środowisku czystego siarczanu, które wykazują już wewnętrzny podział jądra i chloroplastów, nie wykrywa się go. Związek ten pojawia się po upływie około 25 godz. od chwili dodania do pożywki azotanu. Ilość jego wzrasta dość szybko, lecz w okresie podziału komórkowego zmniejsza się pra-



Rys. 5. Zmiany zawartości związków siarki w normalnych komórkach *Chlorella* hodowanych w warunkach głodu siarkowego (Hase i wsp. 1959).

wie do zera. Mimo, że substancja ta nie zawiera siarki, do jej wytworzenia konieczne są zarówno siarka jak i azot.

Przy analizie eluatów 0,01n, 0,1n i 1n HCl, otrzymanych z chromatogramu z wymianą anionu ekstraktu TCA, stwierdzono, że wszystkie frakcje zawierają adeninę wolną lub połączoną z uracylem, uracylem i guaniną, lub z jakąś nieznaną substancją (Rys. 6). Prócz tego zawierają one jeszcze cukier o typie rybozy. Wskazuje to na nukleotydowy charakter zawierającego siarkę związku rozpuszczalnego w TCA. W tabeli II podane są aminokwasy uzyskane po hydrolizie poszczególnych frakcji.

Tabela II

Aminokwasy ekstraktu TCA komórek *Chlorella* rozdzielone metodą chromatografii z wymianą anionu

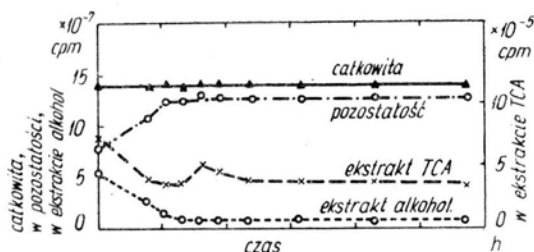
F r a k c j a		
I 0,01n HCl	II 0,1n HCl	III 1,0n HCl
Cystyna-cysteina Dwa niezidentyfikowane związki siarki Glicyna Kwas asparaginowy Seryna	Cystyna-cysteina Arginina Kwas glutaminowy Alanina	Cystyna-cysteina Kwas glutaminowy Kwas asparaginowy Seryna Związek niezidentyfikowany

Otrzymane wyniki nasunęły przypuszczenie, że aminokwasy i nieznaną substancją tworzą peptyd (-y) połączony z nukleotydem (-ami). Może to być prosty związek kompleksowy rozkładany przy chromatografii na mniejsze jednostki.

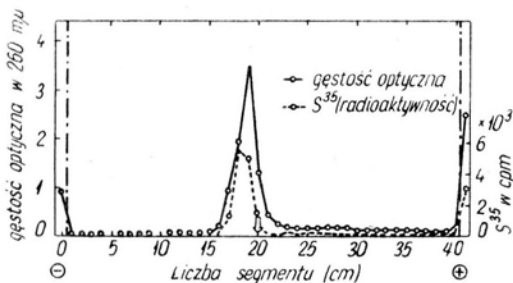
Badania Hase i współpracowników (1959 b) oparte na elektroforezie przy pH 3,6 potwierdziły to przypuszczenie. Stwierdzono, że zarówno substancje zawierające siarkę, jak i pochłaniające promienie UV, przesuwają się razem ku katodzie tworząc pojedynczy szczyt (Rys. 7). W tym samym segmencie występowała również największa ilość substancji peptydowych. Związkami siarkowymi są cystyna lub cysteina. Jako główne składniki substancji pochłaniających UV wykryto adeninę, uracyl i kilka niezidentyfikowanych jeszcze związków.

Jeżeli elektroforeza prowadzona jest przy pH 5,0, substancje siarkowe i pochłaniające UV rozpadają się na kilka frakcji, co wskazuje na słabe wiązania między składnikami tego peptydowo-nukleotydowego związku.

Ponieważ omawiany kompleks jest bardzo nietrwały, porównano wyniki uzyskane przy zastosowaniu różnych metod ekstrakcji materiału komórkowego (Hase i wsp. 1959 c). Substancje zawarte w wyciągu TCA wytrącano etanolem lub wytrąsano z eterem i poddawano liofilizacji. Przy zastosowaniu etanolu znaczny procent substancji siarkowych i pochłaniających UV ulegał rozpuszczeniu. Przy użyciu metody liofilizacji okazało się, że prawie wszystkie związki siarkowe i pochłaniające UV pozostają w połączeniu, tworząc pojedynczy związek kompleksowy, łatwo dysocjujący pod wpływem etanolu.



Rys. 6. Chromatogram z wymianą anionów ekstraktu TCA komórek *Chlorella*. A-adenina, U-uracyl, G-guanina, χ -nieznana substancja (Hase i wsp. 1959).



Rys. 7. Wynik elektroforezy ekstraktu TCA komórek *Chlorella*. Środowisko — skrobia o pH⁸, 6; temperatura +3°C; czas — 40 godz. Strzałka wskazuje miejsce naniesienia próbki. Segmenty Nr 0 i 41 odpowiadają pojemnikom buforowym (Hase i wsp. 1959).

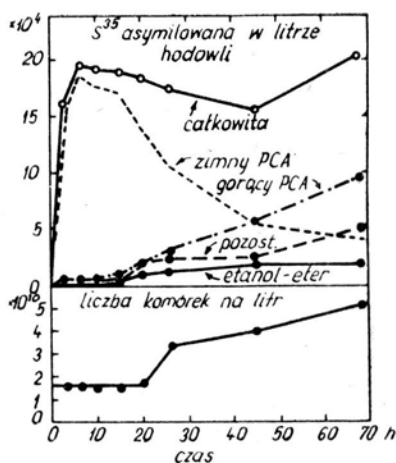
W 1960 r. Hase i współpracownicy powtórzyli badania dotyczące zmian zawartości związków siarki w komórkach w czasie ich cyklu rozwojowego. Materiał komórkowy z różnych stadiów ekstrahowano kolejno: 1. zimnym kwasem nadchlorowym, 2. mieszaniną etanol-eter, 3. gorącym kwasem nadchlorowym.

Stwierdzono, że siarka asymilowana jest bardzo szybko i prawie całkowicie w związkach frakcji rozpuszczalnej w zimnym PCA osiągając maksimum w szóstej godzinie eksperymentu. Od tej chwili ilość jej stale się zmniejsza, podczas gdy za-

wartość siarki w innych frakcjach wzrasta. W 69-tej godzinie (końcowa faza podziału) połowa zasymilowanej S^{35} przypada na frakcję rozpuszczalną w gorącym PCA (Rys. 8).

Analiza elektroforetyczna frakcji rozpuszczalnej w zimnym PCA wykazała, że początkowo (do 15-tej godz.) S wiązana jest głównie w substancje nieorganiczne i niewielkie ilości związków organicznych. Wśród tych ostatnich znajduje się związek peptydowo-nukleotydowy, zidentyfikowany na podstawie absorpcji UV i dodatniej reakcji ninhydrinowej. W miarę rozwoju komórek, ilość siarki nieorganicznej zmniejsza się na korzyść S zawartej w związku peptydowo-nukleotydowym. Osiąga ona 50% całkowitej ilości S^{35} w 60-tej godzinie eksperymentu.

Omawiana frakcja wykazuje obecność związków pochłaniających UV jeszcze przed dostarczeniem S^{35} . Są to nukleotydy identyczne z występującymi w związku peptydowo-nukleotydowym, lecz nie zawierające wykrywalnej ilości składnika peptydowego. Dostarczenie siarki powoduje tworzenie się peptydu, który łączy się z istniejącymi już nukleotydami. Maksymalną zawartość związku peptydowo-nukleotydowego wykrywa się w komórkach między 20-tą a 26-tą godziną eksperymentu, po czym ilość jego zmniejsza się.



Rys. 8. Zmiany zawartości związków siarki w różnych ekstraktach materiału komórkowego uzyskanego z hodowli w siarczenie potasu znacznym S^{35} . Wzrost liczby komórek (dolna część wykresu) wskazuje moment podziału (Hase i wsp. 1960).

Badając proces włączania S^{35} do frakcji DNA i RNA stwierdzono, że substancje zawierające siarkę należą w większości do DNA. Frakcja ta zawiera siarkę związaną w nieorganicznym siarczeniu i w substancjach występujących łącznie z pochodnymi puryny i pirymidyny. Czynniki wiążącymi wprowadzoną w tych badaniach siarkę nie jest jednak ani cystyna ani metionina.

Wnioski

Siarka i azot odgrywają podstawową rolę w procesie podziału jądrowego i komórkowego.

Podział jądra poprzedzony jest nagromadzeniem w komórce substancji azotowych zawierających siarkę. Mają one charakter nukleotydowy i są rozpuszczalne w 10% kwasie trójchlorooctowym i gorącym kwasie nadchlorowym.

Podział komórki poprzedzony jest nagromadzeniem substancji azotowych nie zawierających siarki, jednak wytwarzanych jedynie przy jej obecności w środowisku. Substancje te mają charakter peptydowy i są rozpuszczalne w etanolu i zimnym kwasie nadchlorowym.

Obie te substancje tworzą związek kompleksowy o bardzo słabych wiązaniach.

W czasie cyklu rozwojowego komórki wiążą siarkę początkowo w związki nieorganiczne, z których następnie przechodzi ona do związku peptydowo-nukleotydowego. W trakcie dalszego metabolizmu związanego z podziałem, zawartość tego związku w komórkach maleje, a obie jego części przekształcają się w inne substancje.

Rola siarki w procesie podziału polega na jej roli w tworzeniu kompleksu peptydowo-nukleotydowego biorącego udział w syntezie kwasów nukleinowych i nukleo-proteidów.

Należy z dużym prawdopodobieństwem przypuszczać, że rola ta nie ogranicza się jedynie do badanego materiału, o czym świadczą także wyniki badań nad drożdżami, uzyskane przez tych samych autorów. W takim wypadku wartość tych badań i uzyskanych danych nabiera znaczenia bardziej ogólnego.

Katedra Botaniki Wyższej Szkoły Rolniczej w Lublinie

LITERATURA

- Arnon D. J. 1938: Mikroelements in culture solution experiments with higher plants. *Am. J. Bot.* 25, p. 322—325.
- Hase E., Morimura Y., Tamiya H. 1957: Some data of the growth physiology of *Chlorella* studied by the synchronous culture. *Arch. Biochem. Bioph.* 69, p. 149—156.
- Hase E., Morimura Y., Mihara S., Tamiya H. 1958: The Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.* 32, p. 87—95.
- Hase E., Otsuka H., Mihara S., Tamiya H. 1959: Role of sulfur in the cell division of *Chlorella*, studied by the technique of synchronous culture. *Biochim. Bioph. Acta* 35, p. 180—189.
- Hase E., Mihara S., Otsuka H., Tamiya H. 1959 a: New peptide-nucleotide compounds obtained from *Chlorella* and yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 32, p. 298—300.
- Hase E., Mihara S., Otsuka H., Tamiya H. 1959 b: Sulfur containing peptide-nucleotide complex isolated from *Chlorella* and yeast cells. *Arch. Biochem. Bioph.* 83, p. 170—179.
- Hase E., Mihara S., Otsuka H. 1959 c: An additional note on the nature of sulfur-containing peptide-nucleotide complex obtained from *Chlorella* and yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 5, p. 43—50.

- Hase E., Mihara S., Tamiya H. 1960: Role of sulfur in the cell division of *Chlorella* with special reference to the sulfur compounds appearing during the process of cell division. *Plant and Cell Physiol.* 1, p. 131—142.
- Iwamura T., Hase., Morimura Y., Tamiya H. 1955: Life cycle of the green alga *Chlorella* with special reference to the protein and nucleic acid contents of cells in successive formative stage. *Ann. Acad. Scient. Fennice Ser. A, II*, 60, p. 89—103.
- Jaroszyńska T. 1965: Zastosowanie hodowli synchronicznej do badań metabolizmu *Chlorella* Beyer w jej cyklu życiowym. *Wiad. Bot.* 9, 1, p. 15—29.
- Tamiya H., Iwamura T., Shibata K., Hase E., Nihei T. 1953: Correlation between photosynthesis and light independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 12, 1/2, p. 23—40.
- Zurzycki J. 1958: Cykl Tamiya. *Wiad. Bot.* 2, 1, p. 3—13.