

HALINA KOŚCIUSZKO i EWA PRZYBOŚ

Zakład Zoologii Doświadczalnej

Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN

Stawkowska 17, 31-016 Kraków

e-mail: kosciuszko@isez.pan.krakow.pl

e-mail: przybos@isez.pan.krakow.pl

ROZMNAŻANIE I ZJAWISKA PŁCIOWE U PIERWOTNIAKÓW

WPROWADZENIE

W świecie jednokomórkowców możliwość rozmnażania się drogą bezpłciową i płciową jest powszechna. Pierwszy sposób może polegać na zwykłym podziale mitotycznym, powstają wtedy dwie komórki potomne o jednakowym genotypie. Podział może być podłużny (np. u wiciowców) lub poprzeczny (np. u orzęsków). U zarodźcowych (ameby) trudno jest mówić o osi podziałowej.

Częstą formą rozmnażania bezpłciowego jest schizogonia (syn. podział rozpadowy) polegająca na wielokrotnym podziale jądra komórkowego, w wyniku którego powstaje wielojądrowy organizm rozpadający się następnie na wiele potomnych komórek jednojądrowych.

Pączkowanie to rozmnażanie polegające na oddzieleniu się od osobnika macierzystego mniejszego organizmu potomnego (albo spory) w postaci pączka. W obrębie pierwotniaków pączkowanie występuje u orzęsków z rodzaju *Astomata*, u kolonijnych *Peritricha* i u sysydla-czków (*Suctoria*).

Innym przykładem rozmnażania bezpłciowego jest palintomia występująca w cyklu rozwojowym gatunków pasożytniczych u niektórych orzęsków (*Apostomata*, histofagi), polegająca na tym, że po ukończeniu żerowania i osiągnięciu odpowiedniej wielkości orzęsek encystuje się i jako nieruchomy tomont dzieli się raz lub wielokrotnie tworząc małe tomity, które po wydostaniu się z cysty zaczynają żerować.

U wielojądrowych pierwotniaków, np. u słonecznicy *Actinosphaerium*, ameby *Pelomyxa* czy opaliny, występuje plazmotomia — podział plazmodium na dwa lub więcej wielojądrowych plazmodiów potomnych, w wyniku czego jądra plazmodium macierzystego zostają mniej więcej

równomiernie rozdzielone do organizmów potomnych.

U sporowców (*Sporozoa*), do których należą wyłącznie pierwotniaki pasożytnicze, pełny cykl obejmuje schizogonię, gametogonię i sporogonię. Po kopulacji gamet zygota otacza się grubą błoną i przemienia w sporę. W sporze pierwszy podział jądra zygotycznego jest redukcyjny wskutek czego wszystkie dalsze stadia są haploidalne, z wyjątkiem diploidalnej zygoty. W dalszych podziałach jąder powstają sporozoity. Proces nosi nazwę sporogonii i jest jeszcze jednym przykładem rozmnażania bezpłciowego.

Warto dodać, że w omówionych sposobach rozmnażania bezpłciowego biorą udział komórki zwane agamontami. Są to organizmy zdolne wyłącznie do rozmnażania z pojedynczych komórek nie będących gametami. Jest to częsty sposób rozmnażania agamogamicznego, obserwowany np. u wielu wiciowców czy korzenionó-żek.

Strategia rozmnażanie bezpłciowego u pierwotniaków prowadzi do szybkiego zwiększania liczby osobników, natomiast jej wadą jest brak zmienności genetycznej.

Dopiero rozród płciowy, bardziej skomplikowany, prowadzi do powstawania nowych kombinacji (rekombinacji) materiału genetycznego. Komórki wchodzące w fazę rozrodu płciowego, mogące same pełnić funkcję gamety bądź przekształcać się w komórki rozrodcze, noszą nazwę gamontów. Podstawowe cechy procesów płciowych to: (1) wytwarzanie gamet (gamogonia); (2) fizjologiczne i/lub morfologiczne zróżnicowanie gamontów/gamet lub genetycznych jąder (pronukleusów); (3) połączenie dwóch haploidalnych jąder o różnych genotypach w pro-

cesie zapłodnienia i powstanie diploidalnej zygoty (jeśli zygota zachowuje zdolność do ruchu nosi nazwę ookinety). Pojawiające się nowe rekombinacje genów, posiadające odpowiednią wartość adaptacyjną, umożliwiają przetrwanie osobnika/populacji oraz pozostawienie potomstwa (CZAPIK 1980).

Redukcja do połowy liczby chromosomów musi nastąpić w określonym czasie i na podstawie tego, kiedy w cyklu życiowym pierwotniaka zachodzi mejoza, dzielimy gatunki na haploidalne i diploidalne.

Gatunki haploidalne, haplonty, przechodzą cykl życiowy, w którym dominuje haplofaza. U tych pierwotniaków, w pewnych warunkach, część osobników, gamontów, spełnia funkcję gamet, bądź przekształca się w komórki rozrodcze i łącząc się ze sobą parami tworzy diploidalne zygoty. Te z kolei, przechodzą mejozę pozapłodnieniową (postgamiczną), prowadzącą do wytworzenia haplontów, które po dojrzewaniu stają się osobnikami troficznymi, trofontami, rozmnażającymi się bezpłciowo.

U diplontów, aby powstały gamety, mejoza musi zajść u osobników troficznym przygotowanych do tego podziału. Powstałe gamety łączą się w procesie zapłodnienia i zygota po dojrze-

niu staje się osobnikiem troficznym dając dalsze generacje trofontów w procesie rozmnażania bezpłciowego. Jest to mejoza przedzapłodnieniowa (pregamiczna), a w cyklu życiowym dominuje diplofaza. Ten model występuje niemal u wszystkich wyższych roślin, wyższych zwierząt i u człowieka.

Inaczej przebiega rozród płciowy u orzęsków, gdzie nie występuje rozmnażanie płciowe połączone ze zwiększaniem się liczebności osobników. Ta grupa pierwotniaków osiąga różnorodność genetyczną w drodze procesu płciowego zwanego koniugacją, który będzie szczegółowo omówiony w dalszych rozdziałach.

Autogamia (proces samozapłodnienia, syn. endomiksja) jest sposobem rozrodu płciowego polegającym na utworzeniu zygoty (synkarion) z połączenia autogamet powstałych w obrębie jednego osobnika, co prowadzi do homozygotyczności we wszystkich parach alleli. Autogamia występuje w zespole gatunków *Paramecium aurelia* i jest cennym narzędziem wykorzystywanym w badaniach genetycznych. Proces ten jest powszechny u zarodnikowców parzydełkowych (Cridosporidia), natomiast bardzo rzadko spotyka się go u niektórych okrzemek, otwornic i słonecznic.

JĄDROWE I GENETYCZNE ASPEKTY ROZMNAŻANIA PODZIAŁ JĄDRA W MITOZIE I W MEJOZIE

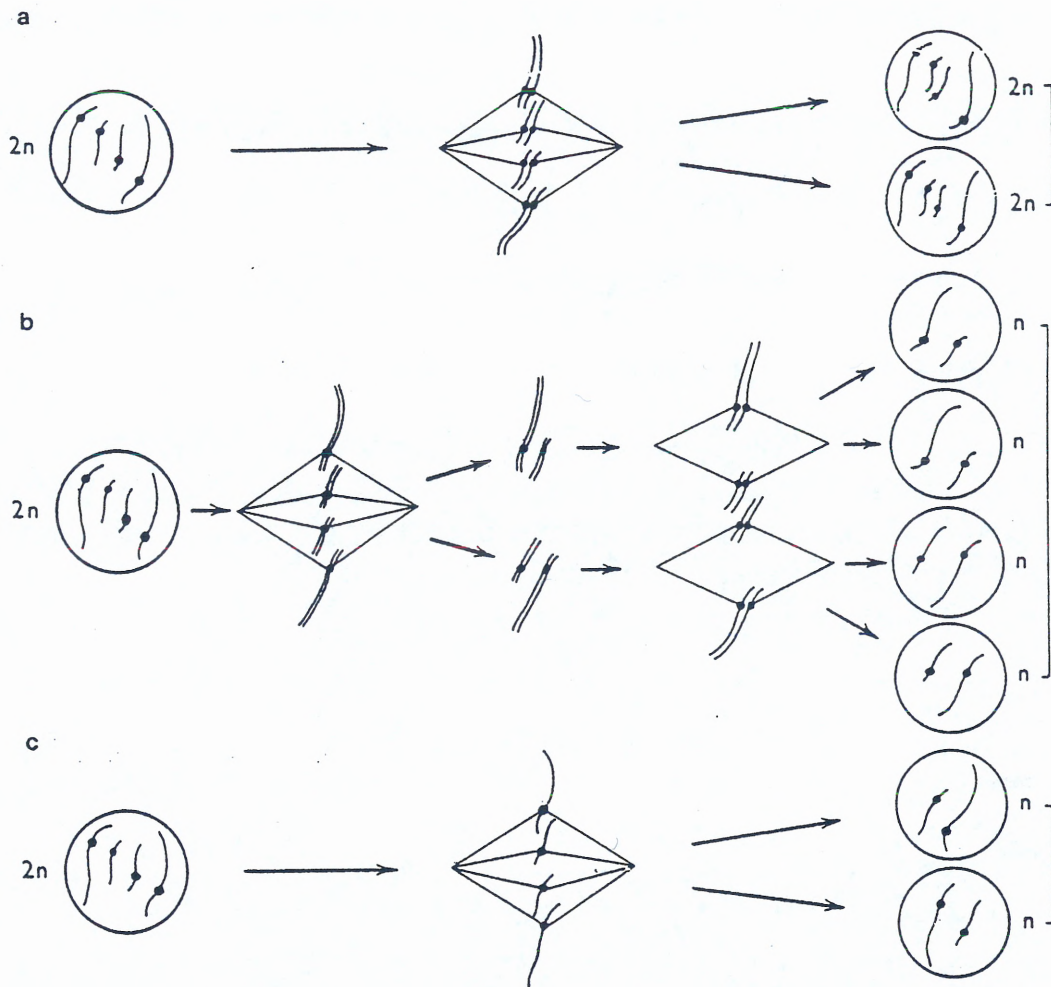
Podział osobnika na dwa potomne może być skomplikowanym procesem, szczególnie u gatunków ze złożoną organizacją, która musi zostać odtworzona, jak np. orzęsków. Podział komórki jest normalnie poprzedzony przez mitotyczny lub mejotyczny podział jądra (RAIKOV 1982). Podwojenie ilości DNA zachodzi w fazie S każdego cyklu komórkowego. Sytuacja jest bardziej złożona podczas serii szybkich podziałów jąder poprzedzających podział wielokrotny — schizogonię, lub w czasie kolejnych podziałów bez wzrostu komórki, jak to ma miejsce przy tworzeniu się spor lub gamet. Może to wymagać puli nukleotydów potrzebnych do szybkiej replikacji DNA lub też może wynikać z depoliploidyzacji poliploidalnego jądra (SLEIGH 1989).

Niektóre pierwotniaki mają diploidalne jądra zawierające po dwa chromosomy z każdej pary, podobnie jak somatyczne jądra wyższych roślin i zwierząt. Jądra innych są haploidalne z nieparzystymi chromosomami, tak jak gamety wyższych roślin i zwierząt. Poliploidalne jądra z wieloma zestawami chromosomów występują również u pierwotniaków (np. makronukleus u orzęsków). Jądra diploidalne mogą dzielić się mejotycznie dla wytworzenia jąder haploidal-

nych, ale częściej obydwie rodzaje jąder, diploidalne i haploidalne, dzielą się mitotycznie odtwierając jądra potomne, takie jak macierzyste.

Przed rozpoczęciem mitozy każdy gen jest zreplikowany, każdy chromosom istnieje w postaci dwóch chromatyd połączonych centromerem. W czasie podziału dwie chromatydy rozdzielają się i po podziale centromeru jedna chromatyda przechodzi do jednego jądra potomnego, druga do drugiego.

Podstawowa różnica w przebiegu mejozy polega na tym, że podczas pierwszego podziału mejotycznego centromery nie dzielą się i chromosomy, po jednym z każdej pary, wędrują do komórek potomnych — w ten sposób liczba chromosomów zostaje zredukowana do połowy. Najczęściej mejoza jest typowa i obejmuje dwa podziały z rozdzieleniem chromosomów w pierwszym podziale i chromatyd w drugim. Ale u niektórych jednokomórkowców występuje redukcja liczby chromosomów podczas jednego podziału (RAIKOV 1982) i jest wtedy nazywana mejozą jednopodziałową (ang. one-step meiosis). Występuje ona u wszystkich Sporozoa, niektórych kolonijnych wiciowców i przypuszczalnie u bruzdnic (Dinoflagellata) (SLEIGH 1989). CLE-



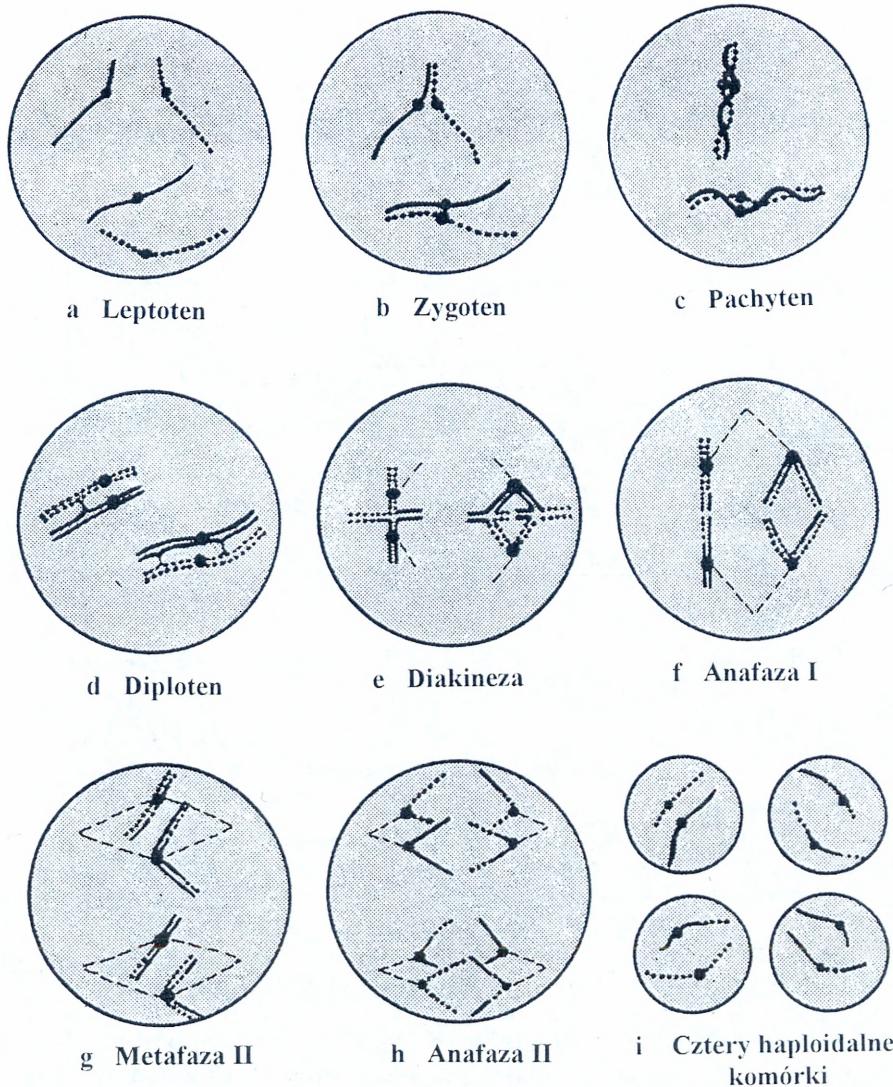
Ryc. 1. Schemat (a) mitozy, (b) mejozy i (c) jednopodziałowej redukcji liczby chromosomów (wg SLEIGH 1989).

VELAND (1950) wykazał, że w jednopodziałowej redukcji chromosomy i centromery ulegają supresji, podczas gdy w mejozie podział centromerów podlega supresji w pierwszym podziale, w wyniku czego rozchodzą się całe chromosomy, po jednym z każdej pary, zaś w drugim podziale następuje rozdzielenie podwojonych przed pierwszym podziałem chromatyd. Redukcja liczby chromosomów odbywająca się podczas jednego podziału jest zdaniem SLEIGH (1989) bardziej prymitywnym procesem mejotycznym. Ryc. 1 ilustruje wszystkie trzy możliwości podziałów.

Mejoza jest procesem bardziej złożonym niż mitozy, chociaż oba te podziały mają wiele cech porównywalnych. Dwa podziały mejotyczne na ogół następują szybko po sobie. W czasie rozciągniętej profazy I chromosomy, występujące w postaci sparowanych chromatyd, łączą się w homologiczne pary, chromatyd oplatają się w obrębie pary tworząc synaptonemalne kompleksy i chromatyd mogą wymieniać się pomiędzy nimi. Proces ten, znany jako „crossing over”, jest

jednym ze źródeł nowych rekombinacji genów. Po dalszym skróceniu chromosomów i przyczepieniu centromerów do mikrotubuli wrzeciona, jeden chromosom pary będzie związany z jednym biegunem wrzeciona, drugi z przeciwnym. Anafazowa wędrówka chromosomów rozdziela dwa chromosomy każdej pary do przeciwległych biegunów — w ten sposób powstają dwie haploidalne grupy i dokonuje się redukcja liczby chromosomów. Wkrótce po tym, każdy zestaw chromosomów tworzy nowe wrzeciono podziałowe metafazy II. Tym razem centromery dzielą się i dwie chromatyd każdego chromosomu rozdzielają się w anafazie II tworząc jądra haploidalne w fazie G1. W końcu telofaza II prowadzi do powstania czterech haploidalnych jąder z jednego wyjściowego — diploidalnego (Ryc. 2). Podział komórki może towarzyszyć każdemu z tych podziałów, a może też wystąpić później.

W jednopodziałowej redukcji, podczas uproszczonej profazy, chromosomy jedynie skupiają się w luźne pary — tworzenie chiasm i „crossing



Ryc. 2. Schemat przebiegu mejozy (wg SLEIGH 1989).

over" nie występuje i wszystkie chromosomy zachowują tę samą konstytucję genetyczną. Tylko dwa haploidalne jądra powstają z każdego

diploidalnego i takie jądra potomne mogą w dalszym ciągu dzielić się mitotycznie.

WZORCOWE CYKLE ŻYCIOWE I PROCESY PŁCIOWE U PIERWOTNIAKÓW

GRELL (1967, 1973) dokonał przeglądu procesów płciowych u pierwotniaków i wykazał ich różnorodność. Pomimo, że wiele z tych organizmów nie wykazuje seksualnego stadium w cyklu życiowym, to jednak przyjmuje się, że niektóre z nich ewoluowały z form wykazujących mejozę i zapłodnienie, inne mogą być pierwotnie aseksualne (SLEIGH 1989). Powszechność występowania procesów mejotycznych sugeruje, że mejoza ewoluowała tylko raz u wspólnego przodka wszystkich form seksualnych. Można by oczekiwać, że gatunki pierwotnie aseksualne będą haploidalne, tymczasem wiele z nich jest diploidalnych lub poliploidalnych —

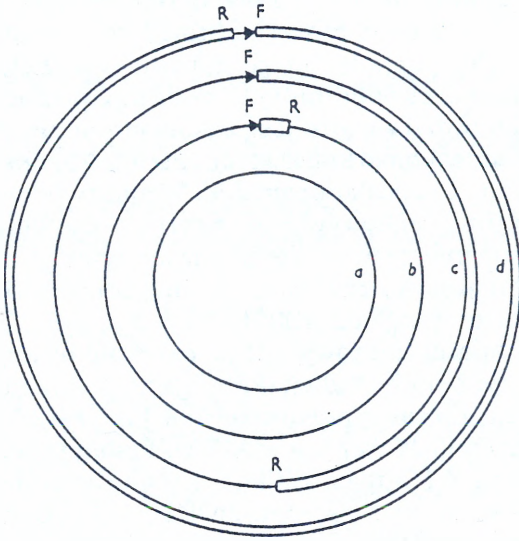
wobec nieobecności mejozy poziom ploidii jest trudny do ustalenia.

SLEIGH (1989) rozważa ewolucyjne ewentualności powstawania różnych wariantów cykli życiowych u Protista i omawia szczegółowo:

— cykl życiowy aseksualnego haploidalnego organizmu (Ryc. 3a);

— pierwsze pojawienie się procesów płciowych, które przypuszczalnie pociągnęło za sobą połączenie się dwóch haploidalnych osobników i następującą po nim mejozę zygoty dla wytworzenia organizmów haploidalnych, które w dalszym ciągu dzieliły się mitotycznie (Ryc. 3b);

— sytuację kiedy diploidalna zygota podlega znacznemu rozrostowi przed podziałem i rozciągnięcie fazy wzrostu z podziałami mitotycznymi może dać cykl życiowy z pośrednio (ang. intermediary) występującą mejozą, z przemiennością faz: haploidalnej i diploidalnej. Zjawisko to spotykane jest u wielu roślin lądowych (Ryc. 3c);



Ryc. 3. Diagram ilustrujący występowanie zapłodnienia (F) i podziału redukcyjnego (R) w czterech różnych wzorcach cyklu życiowego u organizmu

(a) aseksualnego i haploidalnego, (b) haploidalnego z zygotyczną mejozą, (c) haplo-diploidalnego z pośrednią mejozą i (d) diploidalnego z gametyczną mejozą (wg SLEIGH 1989).

— dalsze rozciągnięcie fazy diploidalnej prowadzące do wzorca cyklu życiowego występującego u wyższych zwierząt, u których w wyniku mejozy powstają gamety (Ryc. 3d).

Chociaż istnieje wiele przykładów łączenia się (fuzji) agamicznych komórek u Protozoa (SERAVIN i GOODKOV 1984) mogących wskazywać na możliwość powstawania procesów płciowych, to jednak wszystkie znane procesy seksualne wymagają wystąpienia mejozy w pełnej lub zredukowanej postaci w określonym stadium cyklu życiowego. Prowadzi to do powstania haploidalnych gametycznych jąder (pronukleusów), z których dwa łączą się w procesie zapłodnienia w diploidalny synkarion. Po dopełnieniu tych podstawowych wymagań rozrodu płciowego istnieje jednak duża różnorodność w ich szczegółach. Na przykład pronukleusy znajdują się zwykle, ale nie zawsze, w specjalnych komórkach — gametach. U jednych gatunków gamety nie różnią się morfologicznie tylko fizjologicznie — są to izogamety, u innych mogą różnić się wielkością i budową — to anizogamety. W wielu przypadkach są one określane jako męskie i żeńskie, analogicznie z anizogametami występującymi u Metazoa i wyższych roślin, gdzie żeńską komórką rozrodczą jest komórka jajowa i występuje oogamia, a męską — plemnik. Łączenie się gamontów, jeszcze zanim nastąpiło ich zróżnicowanie w gamety lub jądra gametyczne, występuje w niektórych grupach pierwotniaków. Fuzja gametycznych jąder po ich zróżnicowaniu nosi nazwę gamontogamii, dla odróżnienia od gametogamii, kiedy łączą się dwie gamety. Koniugacja jest procesem, w którym powstaje cytoplazmatyczne połączenie (mostek) pomiędzy dwiema komórkami różnych typów koniugacyjnych. W niektórych przypadkach (orzęski) gametyczne jądra są wymieniane, w innych (niektóre glony i grzyby) — tylko jedno gametyczne jądro wędruje przez mostek i łączy się z drugim. Z kolei autogamia polega na łączeniu się gamet lub gametycznych jąder wytworzonych w tym samym gamoncie.

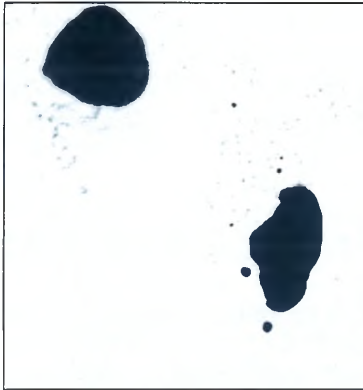
PROCESY PŁCIOWE U ORZĘSKÓW

Różnorodność pierwotniaków, ujawniająca się w ich morfologii i fizjologii, jest też widoczna w procesach płciowych. U niektórych gatunków występują zarówno bezpłciowe, jak i płciowe fazy, podczas gdy inne reprodukują się tylko bezpłciowo (np. ameby). Można obserwować oddzielenie procesów płciowych od reprodukcji (np. u orzęsków najpierw występuje koniugacja, potem podział komórki). Może to być adaptacja pozwalająca na rekombinację genów i wykorzystanie hybrydyzacji, z ominięciem wrażliwych stadiów w czasie podziału komórki (ANDERSON 1987).

Charakterystycznym procesem płciowym orzęsków jest koniugacja, podczas której osobniki uzupełniających się typów koniugacyjnych tworzą pary. W koniugantach zachodzi reorganizacja aparatu jądrowego.

Typowy dla orzęsków aparat jądrowy jest zbudowany z mikrojądra lub mikrojąder i makrojądra lub makrojąder. Jądra te różnią się budową, wielkością i funkcją (Ryc. 4). Jądrowy dualizm jest prawie wyłączną cechą orzęsków (opisany jest też u niektórych otwornic, RAIKOV 1982). Mikrojądro, głównie generatywne, jest zasadniczo diploidalne, uczestniczy w podziale

mejotycznym i mitotycznym z udziałem aparatu podziałowego zbudowanego z mikrotubul. Wykazuje niski poziom transkrypcji lub jej brak.



Ryc. 4. Osobnik *Paramecium jenningsi* w stadium wegetatywnym. Widoczne makrojądro i dwa mikrojądra, x 500 (PRZYBOŚ 1986b).

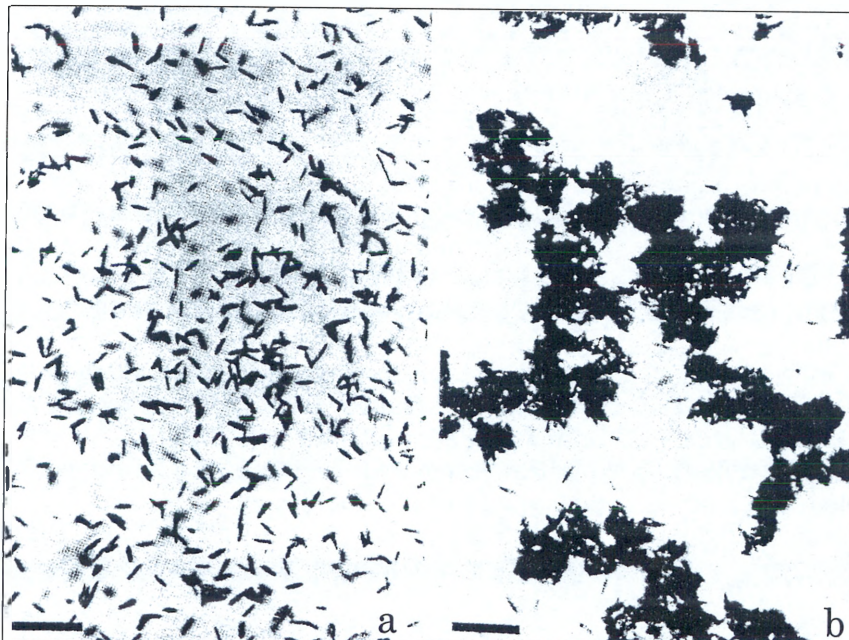
W fazie wegetatywnej cyklu życiowego orzęska może odgrywać istotną rolę w pokoniugacyjnej stomatogenezie, jako centrum organizacyjne dla mikrotubul (NAKAJIMA i MIKAMI 1998) i utrzymuje kortykalną strukturę, głównie aparatu oralnego (HAREMAKI i współaut. 1995). Mogą być różne typy mikrojąder, np. u *Paramecium* są pęcherzykowate, typu chromosomowego lub zbite (FOKIN 1997).

Makrojądro jest jądrem wegetatywnym, poliploidalnym, a właściwie poligenomowym; zawiera dużo RNA, metaboliczne DNA, kieruje przemianą materii w komórce. Stwierdzono (MIKAMI 1996), że mikrojądro dzieli się w każdym stadium koniugacji przy braku makrojądra, ale tylko wtedy, gdy czynnik indukujący jego podział został wytworzony przez makrojądro. W trakcie podziału poprzecznego osobników wege-

tatywnych makrojądro dzieli się amitotycznie. Podział ten jest kombinacją endomitoz i segregacji genomów, nie występują tu wyraźne chromosomy. W podziale uczestniczą mikrotubule (NUMATA i współaut. 1999). Makrojądro może zawierać podjądra haploidalne lub diploidalne, lub zbiorczy chromosom. W interfazie zawiera elementy chromatynowe i jąderka, jest otoczone podwójną otoczką jądrową (PRZYBOŚ 1996).

Według NILSSON (1999a) u *Tetrahymena pyriformis* chromatyna w makrojądrze występuje w postaci podjąder, które są równo rozdzielane do komórek potomnych podczas podziału. Ponadto makrojądro jest zakotwiczone do obu biegunów komórki (NILSSON 1999b). Nie obserwowano u orzęsków centrioli. W makrojądrze w stadium wegetatywnym można obserwować wyrzucanie pewnej ilości chromatyny w celu regulacji ilości zawartego w nim DNA (BODENBENDER i współaut. 1992).

Aparat jądrowy ulega skomplikowanym przemianom w trakcie koniugacji. Koniugacja została opisana u *Paramecium* już w 1786 r. przez O. F. Müllera, a w XIX w. badali ją m.in. Hertwig i Maupas. Składa się ona z szeregu etapów. Rozpoczyna się z chwilą, gdy reaktywne dojrzałe płciowo osobniki uzupełniających się typów koniugacyjnych łączą się ze sobą (SONNEBORN 1937). Przed dojrzałością jest okres niedojrzałości mierzony liczbą podziałów komórkowych (SONNEBORN 1957). Dojrzałe płciowo osobniki ujawniają aktywność płciową tylko w fazie stacjonarnej, w warunkach względnego wygłodzenia (HIWATASHI i KITAMURA 1985) (Ryc. 5 i 6). W każdym z koniugantów mikrojądro przechodzi zwykle trzy podziały pregamiczne (dwa mejotyczne i jeden mitotyczny). W trzecim podziale mitotycznym uczestniczy tylko 1 mikrojądro

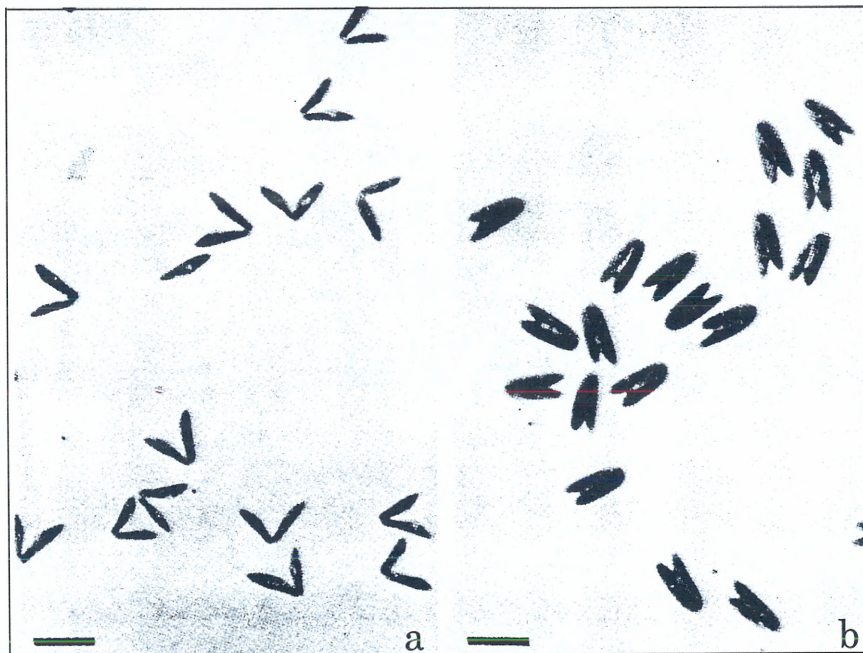


Ryc. 5. Reakcja płciowa u *Paramecium caudatum*.

a. Natychmiast po zmieszaniu reaktywnych uzupełniających się typów koniugacyjnych, b. 1 minutę po zmieszaniu, x 300 (HIWATASHI, KITAMURA 1985).

z obszaru znajdującego się blisko aparatu gębowego. Jest interesujące, że podziały mikrojąder odbywają się z zachowaniem otoczki jądrowej — wewnątrzjądrowo. W wyniku tego podziału powstają pronukleusy: wędrujący, posiada-

potomne z osobnika pokoniugacyjnego dają początek siostrzanym liniom zwanym karionidami. Ponieważ wiele cech jest determinowanych przez geny mieszczące się w makrojądrze, można oczekiwać, że siostrzane karionidy będą



Ryc. 6. Dwa etapy połączeń w koniugacji *Paramecium caudatum*.

a. Połączenie w przedniej części (ang. holfast union), b. Połączenie peristomami (ang. paroral union), x 150. (HIWATASHI i KITAMURA 1985).

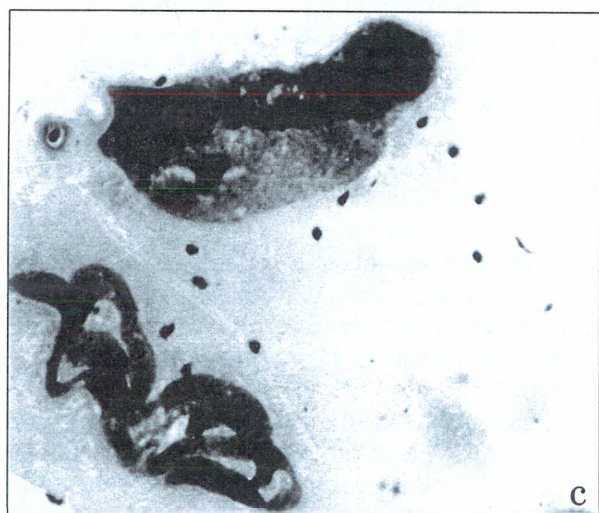
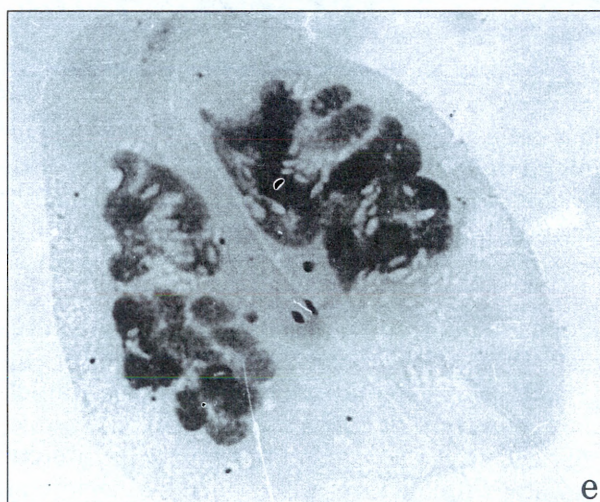
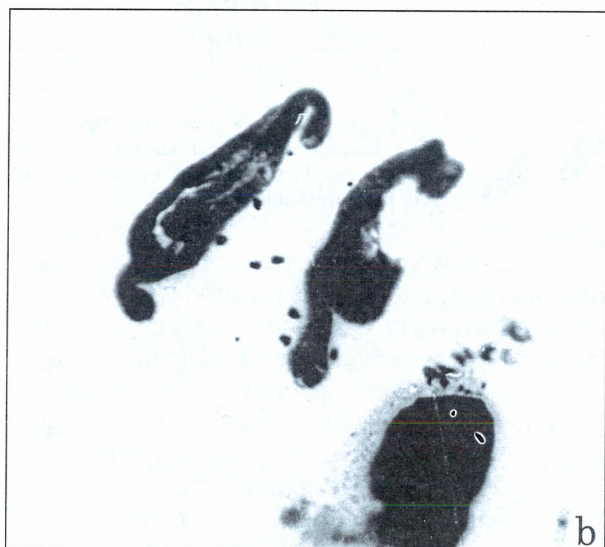
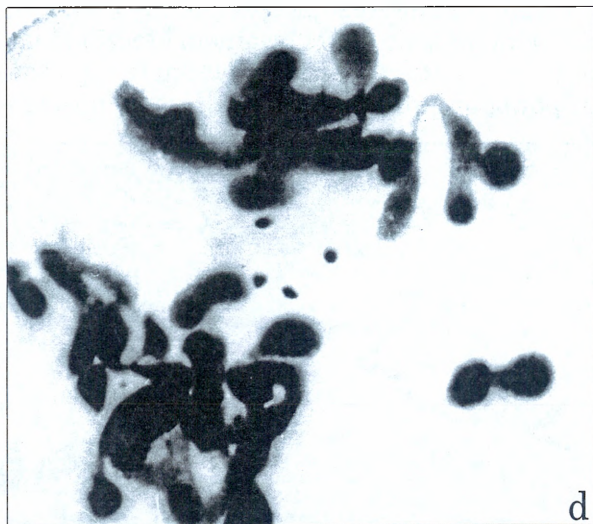
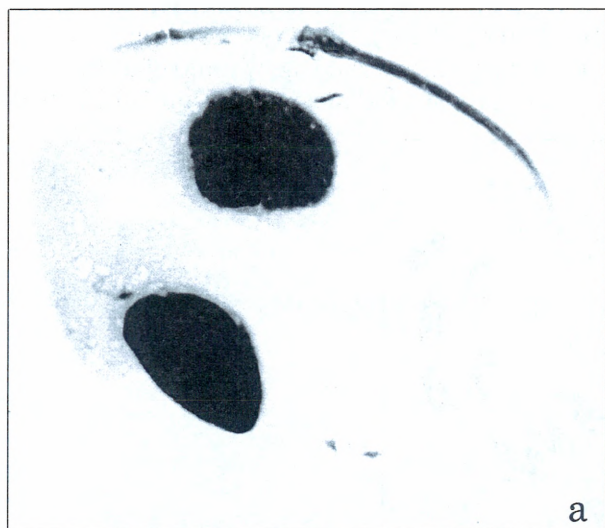
jący mikrotubule i stacjonarny. Następuje wymiana wędrujących pronukleusów między partnerami. Istotną rolę odgrywa tu białko — fenestryna, zlokalizowane pod epiplazmą, uczestniczące w przejściu wędrującego pronukleusa, jak też zakotwiczeniu stacjonarnego pronukleusa w miejscu połączenia partnerów koniugacji (NELSEN i współaut. 1994). Kolejnym etapem jest kariogamia, to jest zlanie się haploidalnych pronukleusów, stacjonarnego i wymienianego wędrującego, w każdym z partnerów. Powstaje diploidalne jądro zwane synkarionem. Po utworzeniu synkarionu partnerzy koniugacji oddzielają się. Po upływie około godziny zachodzi regeneracja rzęsek i trichocyst, które uległy degeneracji w czasie koniugacji. Z kolei, następują pozygotyczne podziały synkarionu, różnicowanie się jąder na mikro- i makrojądra, poprzez stadium zawiązków makrojąder (Ryc. 7, 8). Liczba powstających zawiązków makrojąder jest zmienna i może być cechą diagnostyczną. Różnicowanie się jąder pozostaje pod wpływem cytoplazmy i jest zależne od położenia jąder w przedniej lub tylnej części komórki (AUFDERHEIDE i współaut. 1983, YANG i TAKAHASHI 1999).

W zespole gatunków *Paramecium aurelia* przy końcu koniugacji występuje stadium, w którym każdy z partnerów ma 2 nowe mikrojądra i 2 nowe makrojądra. Nowe makrojądra zawsze segregują bez podziału przy pierwszym podziale pokoniugacyjnym. Powstałe komórki

identyczne. W czasie rozwoju nowego makrojądra następuje determinacja typów koniugacyjnych, które będą ujawniane w wegetatywnych komórkach po ich dojrzewaniu (ORIAS 1986). W grupie A gatunków, np. u *Paramecium primaurelia*, nowe makrojądro determinuje typ koniugacyjny niezależnie od macierzystej cytoplazmy i typu makrojądra. W grupie B gatunków, np. u *P. tetraurelia*, macierzysty typ płciowy i cytoplazma wpływają na nowotworzone makrojądro w ten sposób, że komórki potomne są tego samego typu co komórka wyjściowa (PREER 1989). Ekspresja typów koniugacyjnych jest kontrolowana przez allele występujące w locus typu koniugacyjnego. Typy parzyste są determinowane przez dominujący allel, nieparzyste — przez recesywny. W gatunkach zespołu *Paramecium aurelia* występują po dwa typy koniugacyjne, natomiast u *Euplotes* są one liczne. Poszczególne gatunki czy rodzaje orzęsków różnią się typem kojarzenia, mogą przejawiać kojarzenie krewniacze (ang. inbreeding) lub kojarzenie niekrewniacze (ang. outbreeding) (SONNEBORN 1957, PRZYBOŚ 1986a).

W trakcie koniugacji w gatunkach rodzaju *Paramecium* stare makrojądro ulega rozpadowi; wyjątkiem jest *P. bursaria*, u którego rozpadu nie obserwuje się.

Postać mikrojąder w profazie pierwszego podziału meiotycznego w koniugacji jest charakterystyczna dla orzęsków. Mikrojądra mogą



Ryc. 7. Osobniki *Paramecium triaurelia* w koniugacji, wszystkie fotografie x 600 (PRZYBOS i współaut. 1979).

Dwa występujące tu mikrojądra w czasie podziałów: a. profazy I mejozy, stadium półksiężyca, b. po pierwszym podziale mejotycznym, rozpad makrojądra, c. w drugim podziale mejotycznym, dalszy rozpad makrojądra, d. pronukleusy widoczne w obu partnerach, e. wymiana wędrujących pronukleusów.

występować jako półksiężyc (ang. crescent), np. u *Paramecium aurelia* spp. czy *Tetrahymena*, lub jako stadium spadochronowe u wielu rodzajów orzęsków. Stadia te odpowiadają zygo-

tenowi (z biwalentami) i pachytenowi (z tetradami) klasycznych etapów profazy I mejozy. W kolejnym stadium — diakinezie, ma miejsce skracanie się mikrojądra. Przed profazą mikro-

jądro odsuwa się od makrojądra, powiększa i słabo się wybarwia. Profaza jest poprzedzona przez premejotyczną replikację DNA (RAIKOV 1995). Chromosomy są widoczne jako biwalenty w profazie lub w metafazie mejozy. W profazie, w zygotenie i pachytenie, można obserwować kompleksy synaptonemalne z chiazmami (RAIKOV 1995, KOVALEVA i współaut. 1997). W wyniku mejozy powstają jądra gametyczne.



Ryc. 8. Aparat jądrowy zreorganizowany po koniugacji, *Paramecium jenningsi*. Widoczne zawiązki makrojąder (A), mikrojądra (mi), fragmenty starego makrojądra (SM), x 500 (PRZYBOS 1986b).

Podział jąder zachodzi u orzęsków z zachowaniem otoczki jądrowej i jest podziałem acentrycznym. Otoczka jądrowa spełnia istotną rolę u orzęsków, gdyż może być centrum organizacyjnym dla mikrotubul, kontroluje ich liczbę, orientację, ułożenie przestrzenne i biegunowość. Centrosomy natomiast, mogą być rozproszone (chromosomy holocentryczne) (PRZYBOS 1986a).

Przejsie orzęsków ze stadium wegetatywnego w fazę płciową koniugacji jest wynikiem procesu, który trwa jakiś czas i ma miejsce w fazie G cyklu życiowego komórek (LUPORINI i MICELI 1985). W czasie fazy przedkoniugacyjnej zachodzą procesy przygotowawcze; u wszystkich orzęsków wzrasta synteza białka, u *Paramecium* mikrojądra odsuwają się od makrojądra, a u *Tetrahymena* zachodzi przekształcenie końców komórek. Jak wiadomo, partnerzy

wych. U *Paramecium* po zmieszaniu osobników uzupełniających się typów koniugacyjnych zachodzi aglutynacja (ang. mating reaction). Osobniki kontaktują się rzęskami znajdującymi się po stronie brzusznej. Następnie ma miejsce połączenie się osobników przednimi końcami, po ich brzusznej stronie (ang. holdfast union). Kontakt rozszerza się wraz z degeneracją rzęsek, osiąga cytostom i następuje zlanie się osob-

ników w tym obszarze (ang. paroral union) (Ryc. 6). Degeneracja rzęsek posuwa się ku tyłowi wraz z degeneracją trichocyst. Osobniki koniugujące przylegają do siebie błonami komórkowymi. Powstaje pewna liczba punktowych fuzji błon, a w konsekwencji małe otworki w błonach i cytoplazmatyczne powiązania partnerów (HIWATASHI i KITAMURA 1985), które umożliwiają wymianę materiału genetycznego — wędrujących pronukleusów. Po powstaniu połączenia w okolicy cytostomu, mikrojądra wchodzą w fazę S przedmejotycznej syntezy DNA, powiększają się, po czym zachodzą ich podziały, jak wspomniano wyżej.

Przedkoniugacyjne oddziaływania u orzęsków badano u *Paramecium* i *Euplotes*, gatunków ewolucyjnie zaawansowanych i u prymitywnego orzęska *Blepharisma*, a także, jednak



Ryc. 9. Kolejne stadia tworzenia się koniugujących par u *Euplotes octocarinatus*. SEM, x 200 (GÖRTZ i współaut. 1999).

koniugacji należący do uzupełniających się typów koniugacyjnych są podobni morfologicznie, ale różni fizjologicznie. Interesującym problemem jest powstanie kontaktu między partnerami koniugacji i koordynacja zjawisk płcio-

mniej intensywnie, w rodzajach *Dileptus* i *Tetrahymena* (GÖRTZ i współaut. 1999). Łączenie się reaktywnych osobników w parki jest specjalną formą rozpoznawania komórkowego i powoduje kolejne zmiany. Zetknięcie się osobników o uzu-

pełniających się typach koniugacyjnych u *Paramecium* spp. nie jest powodowane przez cząsteczki sygnałowe, to jest feromony lub gamony, znane u innych orzęsków. Istotną rolę odgrywa tu stan jonowy błon (MORCHIO i CRIPPA FRANCE-SCHI 1996). Po osiągnięciu przez komórki dojrzałości, syntetyzowane jest białko zwane „mating”, które migruje (z grupami naładowanymi dodatkowo) w kierunku błon strony brzusznej, potem rozprzestrzenia się na rząski. Aktywność tych substancji ujawnia się wtedy, gdy komórki są w okresie dojrzałości płciowej cyklu klonalnego i w fazie stacjonarnej klonu. Ujawnienie się aktywności substancji prowadzących do płciowej reakcji jest związane z pojawieniem się hydrofobowości na końcu brzusznych rzęsek (HIWATASHI i KITAMURA 1985). TRIELLI i współaut. (1997) uważają, że u *Paramecium primaurelia* cząsteczki pokrewne systemowi cholinergicznemu, obecne na powierzchni komórek dojrzałych do koniugacji, odgrywają rolę w tworzeniu par. U *Paramecium* współdziałanie komórkowe jest widoczne jako wspomniana już aglutynacja osobników.

U *Tetrahymena* jedna z lektyn (konkana-walina A) hamuje tworzenie par, wiążąc się z powierzchnią komórek tworzących parki przez receptory znajdujące się na powierzchni i skupione wokół połączenia koniugacyjnego (CASCİ i HUFNAGEL 1988). W tym rodzaju dla zaistnienia koniugacji w kolejnych jej fazach muszą być spełnione określone warunki. Komórki będące w logarytmicznej fazie wzrostu muszą być głodzone, aby nastąpiły zmiany potrzebne do zaistnienia procesu płciowego. Fizyczny kontakt osobników reprezentujących uzupełniające się typy koniugacyjne (u.t.k.), prowadzi do stadium stymulacji i do tworzenia par. Z kolei, następują zmiany w górnej części komórki (wyginają się, są wydłużone i stępione). Komórki u.t.k. tworzą parki luźno połączone przednimi końcami. Potem powstaje połączenie koniugacyjne (BRUNS i BRUSSARD 1974).

Związki sygnałowe, feromony, istnieją u innych orzęsków, np. u *Euplotes*. U *Euplotes octocarinatus*, mającego 10 typów koniugacyjnych, feromony nie tylko indukują koniugację, ale również funkcjonują jako chemoatraktanty (KUHLMANN i współaut. 1997) przed rozpoczęciem koniugacji (Ryc. 9). Dojrzałe komórki dziesięciu typów koniugacyjnych odpowiadają na wszystkie feromony z wyjątkiem tych, które same wydzielają. Mają receptory feromonowe nie reagujące na własny feromon danego typu koniugacyjnego. Pierwszym orzęskiem, u którego wyizolowano feromony, była *Blepharisma japonicum* (HONDA i MIYAKE 1975), a potem wyizolowano je u *Euplotes raikovi* (LUPORINI i współaut.

1983). Ostatnio wykazano, że feromony u orzęsków mogą funkcjonować jako specyficzne dla typu koniugacyjnego sygnały, służące dla rozpoznawania komórkowego. Feromony *Euplotes raikovi* determinowane są przez serię alleli w pojedynczym locus (LUPORINI 1999). U *Blepharisma* i *Euplotes* proces aglutynacji reaktywnych osobników jest poprzedzony okresem oczekiwania.

Należy podkreślić, że koniugacja występuje u wszystkich orzęsków, nawet u najbardziej prymitywnych, co sugeruje, że proces ten jest tak stary jak same orzęski. Koniugacja zapewnia tworzenie nowych rekombinacji, zwiększenie zmienności i żywotności populacji, powstanie przewagi selekcyjnej. Zaczyna też nowy cykl życiowy osobników. Jej rolą jest odmłodzenie populacji przez reorganizację aparatu jądrowego, bo stare makrojądro ulegające rozpadowi akumuluje zmutowane geny. Gatunki *Paramecium* starzeją się i giną, jeśli nie przejdą autogamii lub koniugacji (PREER 1986).

Innym procesem płciowym występującym u orzęsków jest autogamia. W jej trakcie rekonstrukcja aparatu jądrowego zachodzi w pojedynczym osobniku. Mają miejsce dwa podziały mejotyczne i jeden mitotyczny mikrojąder, a powstałe dwa pronukleusy zlewają się. Z kolei, zachodzą podziały powstałego jądra diploidalnego i różnicowanie produktów podziału jąder na makrojądra i mikrojądra. Autogamia prowadzi do homozygotyczności we wszystkich parach alleli (por. PRAJER i KOŚCIUSZKO 1998).

U orzęsków może zachodzić także cytogamia, która jest autogamią występującą u partnerów koniugacji. Nie ma wtedy wzajemnej wymiany pronukleusów wędrujących, a proces ten, podobnie jak autogamia, prowadzi do homozygotyczności. W przebiegu koniugacji zdarzają się zaburzenia polegające na braku zlania się nowoprzybyłego pronukleusa wędrującego z pronukleusem stacjonarnym.

Innym procesem jest regeneracja makrojądra, kiedy to jest ono odtwarzane z fragmentów starego. Czasem wskutek zaburzenia koniugacji nie rozwija się nowe makrojądro, a wtedy stare nadal funkcjonuje.

Istnieje też proces koniugacji w obrębie klonu zwarty „selfing”. Odmienne są mechanizmy tego procesu u *Paramecium* i *Tetrahymena*. U *Paramecium* polega on na zmianie kontroli transkrypcji w odpowiednim locus w stadium wegetatywnym. Zachodzi represja międzyalleliczna, to jest represja i odblokowanie allelu. U *Tetrahymena* zachodzi natomiast swobodne sortowanie alleli w trakcie podziału, a „selfing” ma miejsce przed ukończeniem tego procesu (NANNEY 1980).

Proces dojrzewania makrojąder po procesach płciowych, czyli rozwój poliploidalnych somatycznych jąder, jest skomplikowany i może być przykładem swoistej inżynierii genetycznej, zwłaszcza u *Euplotes*, *Stylonychia* i *Oxytricha* należących do Polyhymenophorea (gromada), Spirotrichia (podgromada). Po wymianie pronukleusów i utworzeniu synkarionu, w trakcie rozwoju zawiązków makrojąder, powstają chromosomy politeniczne. Następuje eliminacja dużej części chromatyny i druga poliploidyzacja. W ich dojrzałym makrojądrze występują chromosomy o wymiarach genów. Powstają one w wyniku fragmentacji chromosomów i eliminacji z nich około 95% DNA oraz po dodaniu telomerów (telomery są kompleksami złożonymi z białka i DNA, stabilizują końce chromosomów) z charakterystycznymi powtórkami C4A4 i G4T4 (PRESCOTT 1993). Powstałe krótkie chromosomy przechodzą liczne replikacje, np. u *Oxytricha nova* występuje 1000 kopii 2000 różnych genów. Delecje i destrukcje niekodującego DNA są tak intensywne, że powstają tysiące krótkich cząsteczek DNA mających pojedyncze geny lub jednostki transkrypcji (PRESCOTT 1996). Makrojądro *Paramecium* czy *Tetrahymena*, należących do Oligohymenophorea (gromada), przechodzi mniejsze zmiany w trakcie swego rozwoju. Mają tu miejsce wycięcia niekodujących sekwencji, które dzielą mikrojądrowe chromosomy, oraz dodawanie telomerów z charakterystycznymi powtórkami C4A2 i G4T2 (GALL 1984). U *Paramecium aurelia* spp. w czasie dojrzewania makrojądra zachodzi amplifikacja (zwielokrotnienie) i przetasowanie mikrojądrowego genomu, z fragmentacją chromosomów (MEYER i DUHARCOURT 1996).

U wszystkich zbadanych orzęsków, w czasie przekształcenia mikrojądra w makrojądro po koniugacji, pewne fragmenty mikrojądrowych chromosomów są wycinane, inne zachowywane, jednak z pewnymi przetasowaniami i zmianami. Ten proces może być powiązany z wyjątkowymi cechami makrojąder orzęsków, które aktywnie transkrybują i dzielą się bez kondensacji chromosomów (YAO 1996). Zawsze są dodawane telomery (PREER 1989). Mikrojądrowy genom zawiera niekodujące sekwencje, usuwane w czasie rozwoju mikrojądra w makrojądro po koniugacji (PRESCOTT 1996). Powstałe „chromosomy” makrojądra segregują losowo w czasie wegetatywnego wzrostu; u *Tetrahymena* makrojądro przejawia ploidalność 45C (45-cio krotność haploidalnego genomu), u *Paramecium* zawartość makrojądra odpowiada 800 haploidalnym genomom mikrojądra. W rodzaju *Paramecium* genomy makrojądrowe zawierają fragmenty DNA różnej długości, np. u *P. bursa-*

ria — do 300 par zasad, *P. caudatum* — do 750 par zasad, a w zespole gatunków *P. aurelia*, *P. multimicronucleatum* i *P. jenningsi* zawierają cząsteczki DNA o długości 1400 do 2000 par zasad (POTEKHIN i RAUTIAN 1999). Makrojądro *Tetrahymena* zawiera peryferyjnie zlokalizowane jąderka, które mają 18000 kopii genów na duże i małe rybosomalne RNA, istniejące jako pozachromosomowe palindromowe cząsteczki (YAO 1996). W mikrojądrze *Tetrahymena thermophila* w chromosomie występuje pojedyncza kopia genu rRNA (Yao i Gall 1977, cyt. za GOROVSKY 1986); mikrojądro nie zawiera też jąderrek ani pozachromosomowych zwielokrotnionych kopii (YAO 1996).

DNA w mikro- i makrojądrze orzęsków jest zorganizowane w nukleosomy w powiązaniu z pięcioma typami histonów (GOROVSKY 1986). Geny tych organizmów, podobnie jak innych organizmów eukariotycznych, są podzielone na eksony i introny. Po transkrypcji takich podzielonych genów musi zajść samoskładanie, czyli wycięcie intronów z transkryptu. Introny przerywające pre-mRNA, występujące w jądrze organizmów eukariotycznych, są usuwane przez kompleks rybonukleinowo-białkowy, zwany „spliceosome”. Inne introny, zwane grupami I i II, zawierają konserwatywne wtórne struktury RNA, które mają aktywne miejsca dla swego własnego składania. Cząsteczki RNA działające jak enzymy, zostały nazwane rybozymami (BARINGA 1993). W rybozymach intronów I i II grupy, RNA funkcjonuje zarówno w katalizie, jak i dla zachowania informacji. Takie samowycinające się introny mogą być „żywymi skamielinami”. Grupa I intronów o takich specyficznych właściwościach, występuje u Protista, a wśród nich u orzęsków w jądrowym rRNA (BHATTACHARYA 1998).

Bardzo interesującym procesem jest „samoskładanie” pre-rRNA u *Tetrahymena thermophila*. CECH (1987) odkrył, że wycinanie intronów rRNA zachodzi u tego gatunku *in vivo* bez udziału białek enzymatycznych i źródła energii z zewnątrz. Funkcję enzymu pełni intron, reszta guanozyny jest przyłączana do granicy ekson/intron. Intron, z kolei, jest uwalniany jako kolistą cząsteczką; eksony są połączone. Następuje seria trans-estryfikacji i dlatego nie jest potrzebna energia z zewnątrz, np. z ATP. Guanozyna spełnia rolę akceptora fosforanu w pierwszej transestryfikacji. Intron jest centrum katalitycznym, a jego aktywność wynika z II-go i III-cio rzędowej struktury (MCCONNELL i współaut. 1993).

Locus rRNA znajdujący się w mikrojądrze *Tetrahymena thermophila*, podczas przekształcania mikrojądra w makrojądro po koniugacji,

przechodzi skomplikowane przemiany. Jest on cięty na 200 odcinków, do nich dodawane są telomery, a sekwencje flankujące i zewnętrzne są wycinane. Następuje zwielokrotnienie tych odcinków do 10000 kopii (KAPLER 1993), które mają formę wolnych, izolowanych palindromów. Nie ulega amplifikacji tRNA i 5S rRNA (YAO i współaut. 1978). U *Paramecium* zachodzą podobne zmiany w locus rRNA w mikrojądrze przekształcanym po koniugacji w makrojądro — ma miejsce dodawanie telomerów (GILLEY i współaut. 1988).

Uniwersalne kodony „stop” organizmów eukariotycznych u orzęsków pełnią inną rolę. U *Paramecium*, *Tetrahymena*, *Stylonychia* i *Oxytricha* kodony UAA i UAG są używane do translacji glutaminy, a jedynym kodonem „stop” jest kodon UGA. Jednak u *Euplotes* kodon UGA używany jest do kodowania cysteiny, a kodonem „stop” u *Euplotes* i *Blepharisma* jest UAA. Te różnice w znaczeniu kodonów mogą odzwierciedlać ewolucyjne powiązania orzęsków (LIANG i HECKMANN 1993).

Pierwotniaki, ze względu na wielkie bogactwo form, są dobrym materiałem do badań nad ewolucją i różnorodnością zjawisk płciowych.

Można u nich obserwować różne stadia ewolucji mitozy, mejozy, poliploidyzacji i politenizacji chromosomów. Niektóre cechy podziałów, mitotycznego i mejotycznego, są typowe tylko dla orzęsków np. wrzeczono wewnątrzpodziałowe. Pierwotniaki mogą być cennym materiałem w wielu dziedzinach badań biologicznych.

Autorki pragną podziękować wszystkim, którzy umożliwili wykorzystanie zamieszczonych ilustracji oraz wydawnictwom, które zezwoliły na ich reprodukcję:

— dr M. A. Sleight, ryciny 1-3 pochodzą z książki „Protozoa and Other Protists”, wydanej w 1989 r. przez Cambridge University Press;

— dr dr K. Hiwitashi i A. Kitamura, fotografie 5 i 6a, b pochodzą z artykułu „Fertilization in *Paramecium*” zamieszczonego w książce *Biology of Fertilization*, tom 1, str. 57-85, wydanej w 1985 r. przez Academic Press, Inc.

— dr H.-W. Kuhlmannowi za fotografię nr 9 pochodzącą z artykułu H.-D. Görtza i współaut. „Intra- and intercellular communication systems in Ciliates” opublikowanego w *Naturwissenschaften*, tom 86, str. 422-434, 1999, wydany przez Springer-Verlag GmbH & Co. KG.

REPRODUCTION AND SEXUAL PHENOMENA IN PROTOZOA

Summary

In ciliates, conjugation in which individuals representing complementary mating types compose pair, is a very characteristic sexual process. Fertilization and later reorganization of nuclear apparatus take place in partners of conjugation. The nuclear apparatus of ciliates is composed of a diploid micronucleus and a polyploid macronucleus. During conjugation the micronucleus passes through meiotic and mitotic divisions, whilst the macronucleus disintegrates and a new one is formed from the products of synkaryon divisions. During cell fission, the micronucleus divides mitotically, whereas the macronucleus passes parallelly through amitosis. The process of conjugation is a long chain of reactions started by the initial cell to cell interactions, called the preconjugant interaction. This process induces cell union and in turn, the united cells

undergo the conjugant interaction which initiates nuclear changes. Maturation of the macronucleus proceeds in a different manner in different orders of ciliates; especially interesting is the development of a new macronucleus in subclass Spirotrichia, connected with the elimination of a large part of the micronuclear genome. A very interesting process is „self-splicing” of the pre rRNA, i.e. removal of introns observed in *Tetrahymena thermophila*. Protists are a good material for the studies concerning evolution and variability of sexual phenomena. For instance, different stages of evolution of mitosis, meiosis, polyploidization, polytenization of chromosomes can be observed in various ciliate species. Some of the features of meiotic and mitotic divisions are typical only for ciliates (e.g. acentric divisions involving the intranuclear spindle).

LITERATURA

- ANDERSON O. R., 1987. *Reproduction*. [W:] *Comparative protozoology. Ecology, Physiology, Life History*. Spinger-Verlag, Berlin, str. 375-392.
- AUFDERHEIDE K. J., DAGGETT P.-M., NERAD T. A., 1983. *Paramecium sonneborni* n. sp., a new member of the *Paramecium aurelia* species complex. *J. Protozool.* 30, 128-131.
- BARINGA M., 1993. *Ribozymes: killing the messenger*. *Science* 262, 1512-1514.
- BHATTACHARYA D., 1998. *The origin and evolution of Protist group I introns*. *Protist* 149, 113-122.
- BODENBENDER J., PROHASKA A., JANKER F., HIPKE H., CLEFFMANN G., 1992. *DNA elimination and its relation to quantities in the macronucleus of Tetrahymena*. *Development. Genetics* 13, 103-110.
- BRUNS P. J., BRUSSARD T. B., 1974. *Positive selection for mating with functional heterokaryons in Tetrahymena pyriformis*. *Genetics* 78, 831-841.
- CASCI R. J., HUFNAGEL L. A., 1988. *Cell pairing during mating in Tetrahymena: I. Does phagocytosis or a cell surface receptor participate in Con A block?* *J. Protozool.* 35, 424-430.
- CECH T. R., 1987. *The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes*. *Science* 236, 1532-1539.
- CLEVELAND L. R., 1950. *Hormone-induced sexual cycles of flagellates. II. Gametogenesis, fertilization and one-division meiosis in Oxymonas*. *J. Morphol.* 86, 185-214.
- CZAPIK A., 1980. *Podstawy Protozoologii*. PWN, Warszawa.
- FOKIN S., 1997. *Morphological diversity of the micronuclei in Paramecium*. *Arch. Protistenkd.* 148, 375-387.

- GALL G. T., 1984. *Ciliates come of age*. Nature 310, 453–454.
- GILLEY D., PREER J. R., AUFDERHEIDE K. J., POLISKY B., 1988. Autonomous replication and addition of telomere-like sequences to DNA microinjected into *Paramecium tetraurelia* micronuclei. Mol. Cell. Biol. 8, 4765–4772.
- GOROVSKY M. A., 1986. *Ciliate chromatin and histones*. [W:] *The molecular biology of ciliated protozoa*. GALL G. T. (red.). Academic Press, Orlando, str. 227–261.
- GÖRTZ H.-D., KUHLMANN H.-W., MOLLENBECK M., TIEDTKE A., KUSCH J., SCHMIDT H. J., MIYAKE A., 1999. Intra- and intercellular communication systems in Ciliates. Naturwissenschaften 86, 422–434.
- GRELL K. G., 1967. Sexual reproduction in Protozoa. [W:] *Research in Protozoology*. T. T. CHEN (red.) Pergamon Press, Oxford, 2, 147–213.
- GRELL K. G., 1973. *Protozoology*. Springer-Verlag, Berlin.
- HAREMAKI T., SUGAI T., TAKAHASHI M., 1995. The vegetative micronucleus has a critical role in maintenance of cortical structure in *Tetrahymena thermophila*. Cell Structure and Function 20, 239–244.
- HIWATASHI K., KITAMURA A., 1985. Fertilization in *Paramecium*. [W:] *Biology of fertilization*. METZ C.B., MONROY A. (red.). Academic Press, New York, str. 57–85.
- HONDA H., MIYAKE A., 1975. Taxis to a conjugation-inducing substance in the ciliate *Blepharisma*. Nature 257, 678–679.
- KAPLER G. H., 1993. Developmentally regulated precessing and replication of the *Tetrahymena* rRNA minichromosome. Current Opinion in Genetics and Development 3, 730–735.
- KOVALEVA V. G., RAIKOV J. B., MIYAKE A., 1997. Fine structure of conjugation of the ciliate *Blepharisma japonicum*. II Changes of meiotic and ameiotic micronuclei and development of meiotic and ameiotic macronuclear anlagen. Arch. Protistenkd. 148, 351–363.
- KUHLMANN H.-W., BRUNEN-NIEWELER C., HECKMANN K., 1997. Pheromones of the ciliate *Euplotes octocarinatus* not only induce conjugation but also function as chemoattractants. J. Exp. Zool. 277, 38–48.
- LIANG A., HECKMANN K., 1993. *Blepharisma* uses UAA as a termination codon. Naturwissenschaften 80, 22–226.
- LUPORINI P., 1999. Signalling in *Euplotes raikovi*. [W:] *Book of Abstracts of 3rd European Congress of Protistology, 9th European Conference on Ciliate Biology, Helsingor*. HANSEN P. J., FENCHEL T. (red.). str. 44.
- LUPORINI P., MICELI C., 1985. Mating pheromones. [W:] *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*. GALL J.G. (red.). Academic Press, Orlando, str. 263–299.
- LUPORINI P., MICELI C., ORTENZI C., 1983. Evidence that the ciliate *Euplotes raikovi* releases mating inducing factors (gamones). J. Exp. Zool. 226, 1–9.
- MCCONNELL T. S., CECI T. R., HERSCHLAG D., 1993. Guanosine binding to the *Tetrahymena* ribozyme: thermodynamic coupling with Oligonucleotide binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8362–8366.
- MEYER E., DUHARCOURT S., 1996. Epigenetic regulation of programmed genomic rearrangements in *Paramecium aurelia*. J. Eukaryot. Microbiol. 43, 453–461.
- MIKAMI K., 1996. Repetitive micronuclear divisions in the absence of the macronucleus during conjugation of *Paramecium caudatum*. 43, 43–48.
- MORCHIO R., CRIPPA FRANCESCHI T., 1996. Interactions between complementary mating types of *Paramecium aurelia*: a molecular model. Rivista di Biologia/ Biology Forum 89, 109–124.
- NAKAJIMA Y., MIKAMI K., 1998. Indispensable function of the germ nucleus for postconjugational stomatogenesis in *Paramecium caudatum*: evidence against its genic function shown by hypohaploid micronuclei. Developmental Genetics 23, 142–150.
- NANNEY D. L., 1980. *Experimental Ciliatology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- NELSEN E. M., WILLIAMS N. E., YI H., KUSAK J., FRANKEL J., 1994. „Fenestrin” and conjugation in *Tetrahymena thermophila*. J. Eukaryot. Microbiol. 41, 483–495.
- NILSSON J. R., 1999a. On macronuclear „subnuclei” and „amitosis” in *Tetrahymena pyriformis* GL. [W:] *Book of Abstracts of 3rd European Congress of Protistology, 9th European Conference on Ciliate Biology, Helsingor*. HANSEN P. J., FENCHEL T. (red.). str. 55.
- NILSSON J. R., 1999b. On macronuclear division in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Book of Abstracts of 3rd European Congress of Protistology, 9th European Conference on Ciliate Biology, Helsingor*. HANSEN P. J., FENCHEL T. (red.). str. 55.
- NUMATA O., FUJII K., GONDA K., 1999. Macronuclear division and cytokinesis in *Tetrahymena*. [W:] *Book of Abstracts of 3rd European Congress of Protistology, 9th European Conference on Ciliate Biology, Helsingor*. HANSEN P. J., FENCHEL T. (red.). str. 56.
- ORIAS E., 1986. Ciliate conjugation. [W:] *The Molecular Biology of Protozoa*. GALL J.G. (red.). Academic Press, Orlando, str. 45–83.
- POTEKHIN A., RAUTIAN M., 1999. Molecular composition of the macronuclear genome of six *Paramecium* species. [W:] *Book of Abstracts of 3rd European Congress of Protistology, 9th European Conference on Ciliate Biology, Helsingor*. HANSEN P. J., FENCHEL T. (red.). str. 61.
- PRAJER M., KOŚCIUSZKO H. 1998. The role of nuclear and cytoplasmic factors in the regulation of the interautogamous interval (IAI) in the *Paramecium aurelia* species complex. Folia biol. (Kraków) 46, 1–6.
- PREER J. R. Jr., 1986. Surface antigens of *Paramecium*. [W:] *The molecular Biology of Ciliated Protozoa*. GALL J.G. (red.). Academic Press, Orlando, str. 301–339.
- PREER J.R. Jr., 1989. Update on the molecular genetics of *Paramecium*. J. Protozool. 36, 182–184.
- PRESCOTT D. M., 1993. Restructuring of DNA sequence in the germline genome of *Oxytricha*. Current Opinion in Genetics and Development 3, 725–729.
- PRESCOTT T.M., 1996. Ciliate Genome Rearrangement Symposium- Introductory remarks. J. Eukaryot. Microbiol. 43, 431.
- PRZYBOS E., 1986a. Species structure in Ciliates. Folia biol. (Kraków) 34, 103–132.
- PRZYBOS E., 1986b. Chromosomes in *Paramecium jenningsi* (Diller and Earl, 1958): A serial section study. Folia biol. (Kraków) 34, 133–160.
- PRZYBOS E., KOMALA Z., KOŚCIUSZKO H., 1979. Karyological studies of strain 324 of *Paramecium triaurelia*. Folia biol. (Kraków) 27, 355–359.
- PRZYBOS E., 1996. Orzęski jako modelowe organizmy w badaniach specjalnych, genetycznych i biologii komórki. Kosmos 45, 25–42.
- RAIKOV I. B., 1982. *The Protozoan Nucleus: Morphology and Evolution*. Springer Verlag, New York.
- RAIKOV I. B., 1995. Meiosis in Protists: Recent advances and persisting problems. Europ. J. Protistol. 31, 1–7.
- SERAVIN L. N., GOODKOV A., 1984. The main types and forms of agamic cell fusion in protozoa. Citologia 26, 123–132.
- SLEIGH M. A., 1989. *Reproduction and sex*. [W:] *Protozoa and Other Protists*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 70–96.
- SONNEBORN T. M., 1937. Sex, sex inheritance, and sex determination in *Paramecium aurelia*. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 23, 378–395.
- SONNEBORN T. M. 1957. Breeding systems, reproductive methods, and species problems in Protozoa. [W:] *The Species Problem*. MAYR E. (red.). AAAS. Washington, str. 155–324.
- TRIELLI F., POLITI H., FALUGI C., DELMONTE CORRADO M. U., 1997. Presence of molecules related to the cholinergic system in *Paramecium primaurelia* (Protista, Ciliophora)

- and possible role in mating pair formation: an experimental study. *J. Exp. Zool.*, 279, 633–638.
- YANG X., TAKAHASHI M., 1999. Disturbance of the determination of germinal and somatic nuclei by heat shock in *Paramecium caudatum*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 49–55.
- YAO M.-C., 1996. Programmed DNA deletions in *Tetrahymena*: mechanisms and implications. *Trends Genet.* 12, 26–30.
- YAO M.-C., BLACKBURN E., GALL J.G., 1978. Amplification of the rRNA genes in *Tetrahymena*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43, 1293–12.