

KRYSTYNA MATUSIAK-MIKULIN, ELŻBIETA ZIELIŃSKA, ZBIGNIEW TUKAJ

*Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
Al. Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia
E-mail: krysmat@ug.edu.pl
elazielinska@ug.edu.pl
biozt@ug.edu.pl*

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII – MODELOWY ORGANIZM W BADANIACH CYKLU KOMÓRKOWEGO, CHLOROPLASTOWEGO I MITOCHONDRIALNEGO

WPROWADZENIE

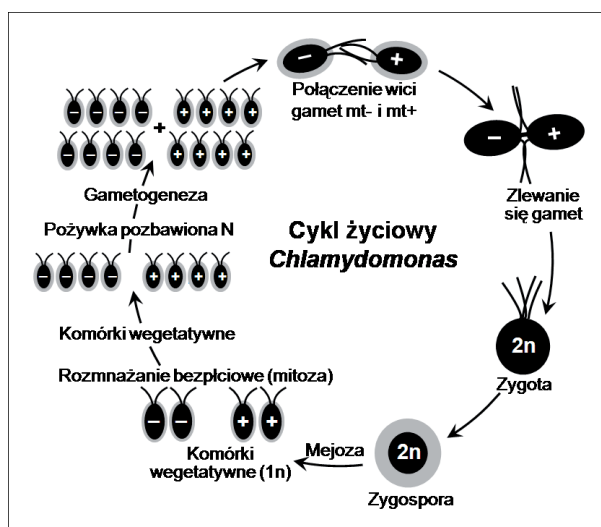
Chlamydomonas reinhardtii jest jednokomórkowym, wodno-glebowym organizmem wielkości około 10 µm, zaopatrzonym w dwie wici służące do poruszania się oraz rozpoznawania gamet. W komórce widoczne jest centralnie położone jądro, liczne drobne mitochondria i pojedynczy duży chloroplast z pirenoidem. *Chlamydomonas* używany jest do badania fotosyntezy organizmów eukariotycznych, ponieważ, w przeciwieństwie do roślin kwiatowych, ma zdolność do wzrostu w ciemności na organicznym podłożu, przy jednoczesnym zachowaniu funkcjonalnego chloroplastu. Możliwe także jest badanie modyfikacji plastydowego genomu u wtórnie

niefotosyntetyzujących taksonów tej zielenicy (VERNON i współaut. 2001). Zaopatrzone w wici szczepy *Chlamydomonas* wykorzystywane są w badaniach mechanizmu ruchu i pływania (MITCHELL 2000). Organizm ten jest również bardzo dobrym modelem do studiowania mechanizmu funkcjonowania eukariotycznych wici i ciała podstawowego oraz patologicznych skutków dysfunkcji tych struktur (PAZOUR i współaut. 2006). Ostatnio prowadzi się intensywne prace w celu wykorzystania *Chlamydomonas* do celów bioremediacji i do produkcji biopaliw (HU i współaut. 2008, HEMSCHMEIER i współaut. 2009).

CYKL ŻYCIOWY CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Cykl życiowy *C. reinhardtii* (Ryc. 1) obejmuje wegetatywną fazę wzrostu komórek dzielących się mitotycznie i fazę płciową, w wyniku której, po izogamii i mejozie postgamicznej, powstają 4 komórki wegetatywne. Komórki wegetatywne to dwójakiego rodzaju haplonty, z genetycznie uwarunkowaną płcią oznaczaną symbolem „plus” (mt+) lub „minus” (mt-). Pozbawione azotu komórki obu typów różnicują się w funkcjonalne gamety. Tworzenie gamet u niektórych szczepów wymaga dodatkowego bodźca w postaci światła niebieskiego. W procesie izogamii, rozpoczynającym się od podłużnego połączenia wici,

uczestniczą płciowo-specyficzne aglutyniny, a inicjuje go szlak sygnałowy zależny od cAMP. Zlewanie się gamet rozpoczyna się od połączenia struktur determinujących płęć, zlokalizowanych w przedniej części komórek, po uprzedniej degradacji ściany komórkowej. Powstająca w wyniku fuzji gamet diploidalna, bezścienna i 4-wiciowa zygota zachowuje przez kilka godzin ruchliwość. Po utracie wici rozpoczyna się trwający 4-6 dni proces przemiany w zygosporę, któremu towarzyszy wytwarzanie grubej ściany komórkowej, zanik chloroplastu, degradacja chlorofilu oraz akumulacja ciał lipidowych. Zygospora w wa-



Ryc. 1. Cykl życiowy *Chlamydomonas reinhardtii* (wg HARRISA 2001).

runkach naturalnych zachowuje żywotność przez wiele lat, ale w korzystnych warunkach laboratoryjnych (azot + światło) dojrzewa do procesu kiełkowania tylko przez kilka dni. Po mejozie uwalniane są zazwyczaj 4 haploidalne zoospory. W pewnych warunkach, po podziale mejotycznym u niektórych szczepów *Chlamydomonas*, przed uwolnieniem zoospor z komórki macierzystej, może wystąpić ich podział mitotyczny, w rezultacie powstaje z zygospory 8 komórek potomnych. Niewielki odsetek połączonych komórek nie przekształca się w zygospore, ale dzieli się mitotycznie tworząc stabilne wegetatywne diploidy (HARRIS 2009b). Komórki wegetatywne dzikiego szczepu *C. reinhardtii* dają się łatwo hodować na mineralnym podłożu

płynnym lub zestalonym agarem, bez dodatku witamin, hormonów czy ekstraktów glebowych. Pewne szczepy, niezdolne do asymilacji azotanu, wymagają zredukowanych form azotu, zazwyczaj chlorku amonowego. Inne rosną jedynie na podłożu z dodatkiem octanu, czego konsekwencją jest ich wzrost także w ciemności, a fotosyntetyczne mutanty szczepów hodowanych na octanie zachowują normalną żywotność. Dzięki szczepom *C. reinhardtii* nie wykorzystują natomiast do wzrostu produktów pośrednich cyklu kwasu cytrynowego, cukrów prostych z grupy pentoz i heksoz, etanolu, glicerolu oraz innych związków organicznych. Najintensywniej rosną komórki hodowane na świetle z dodatkiem octanu w temperaturze 20–25°C i napromieniowaniu PAR 200–400 μmol (fotonów) $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a czas podwojenia populacji w tych warunkach wynosi 68 godzin (HARRIS 2009b). Informacja genetyczna komórek *Chlamydomonas*, podobnie jak u innych roślin, zawarta jest w trzech autonomicznych systemach: jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym. Najwcześniej poznano strukturę i sekwencję mtDNA *C. reinhardtii*, potem zsekwencjonowano genom chloroplastowy i jądrowy. Poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomów *Chlamydomonas reinhardtii* sprawia, że może on być wykorzystany jako organizm modelowy do badań nad rozwojem i funkcjonowaniem komórki. Ponadto, w genomie jądrowym komórek haploidalnych można względnie łatwo indukować mutacje poprzez zastosowanie UV czy mutagenów chemicznych, można także transformować komórki egzogennym DNA.

CYKL KOMÓRKOWY

GENOM JĄDROWY

Genom jądrowy *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank ABCN000000000) tworzy 121 Mbp, w tym aż 64% to pary GC (MERCHANT i współaut. 2007). Jądrowe DNA podzielono na 17 grup, które prawdopodobnie odpowiadają 17 chromosomom (NICKELSEN 2005). Genom *C. reinhardtii* charakteryzuje się w przybliżeniu równomierną gęstością genów, obecnością występujących tandemowo powtarzalnych sekwencji (satelitarne DNA) oraz transpozonów (MERCHANT i współaut. 2007). Na podstawie analizy sekwencji genów oraz bazy sekwencyjnych znaczników ekspresji (ang. expressed sequence tags, EST) udało się zidentyfikować

ponad 15000 genów kodujących białka w jądrze komórkowym *Chlamydomonas* (HARRIS 2009a). Większość genów (92%) posiada introny (MERCHANT i współaut. 2007), które są dłuższe niż u większości organizmów modelowych (YANDELL i współaut. 2006). Około 30% długości intronów stanowią sekwencje powtórzone, co sugeruje, że mogły powstać lub ulec wydłużeniu w wyniku insercji transpozonów (MERCHANT i współaut. 2007). Zarówno długość, jak i liczba sekwencji niekodujących DNA w jądrze *C. reinhardtii* wykazuje większe podobieństwo do organizmów wielokomórkowych niż innych Protista (Tabela 1) (PALENIK 2007). W genomie *C. reinhardtii* występuje 1226 rodzin genów,

Tabela. 1. Analiza statystyczna genomu *Chlamydomonas reinhardtii* i wybranych genomów innych organizmów (wg MERCHANT i współaut. 2007, DERELLE i współaut. 2006, MATSUZAKI i współaut. 2004, THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000).

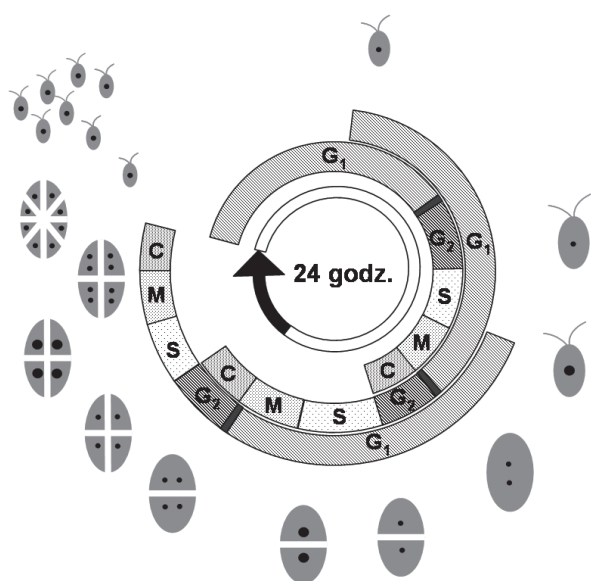
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (zielenica)	<i>Ostreococcus tauri</i> (zielenica)	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> (krasnorost)	<i>Arabidopsis tha- liana</i> (roślina wyższa)
Wielkość genomu (Mpz)	121	12,6	16,5	140,1
Ilość chromosomów	17	20	20	5
Zawartość par GC (%)	64	58	55	36
Zawartość par GC w sekwencjach kodują- cych (%)	68	59	57	44
Ilość genów	15 143	8 166	5 331	26 341
Ilość genów zawiera- jących introny (%)	92	39	0,5	79
Średnia długość intro- nów (pz)	373	103	248	164
Sekwencje kodujące (%)	16,7	81,6	44,9	33,0

z których tylko 26 zawiera 10 lub więcej genów (MERCHANT i współaut. 2007). Prawie 800 rodzin składa się tylko z dwóch genów, a wśród nich ponad jedna trzecia rodzin zbudowana jest z dwóch genów ułożonych tandemowo. Taki układ genów pozwala przypuszczać, że rodziny te powstały w wyniku duplikacji DNA (HARRIS 2009a). W 2007 r. po raz pierwszy pojawiły się doniesienia o znalezieniu mikroRNA (miRNA i siRNA) w komórkach *Chlamydomonas* (MOLNÁR 2007, ZHAO 2007) i był to pierwszy dowód na występowanie tego typu cząsteczek także u jednokomórkowych eukariontów. Analiza sekwencji genomu *C. reinhardtii* potwierdziła obecność białek (*Dicer* i *Agronaute*) uczestniczących w procesie wyciszania genów za pomocą miRNA (SCHRODA 2006).

CHARAKTERYSTYKA CYKLU KOMÓRKOWEGO

Cykl komórkowy glonów z rodzaju *Chlamydomonas* (Ryc. 2) charakteryzują wielokrotne podziały komórkowe (ang. multiple fission). Oznacza to, że z komórki macierzystej uwalnianych jest 2ⁿ komórek potomnych, a w czasie jednego cyklu ma miejsce n replikacji DNA, podziałów jądra i protoplastu. U *Chlamydomonas* faza wzrostu,

podczas której następuje zwielokrotnienie struktur komórkowych, trwa niemal przez cały cykl, natomiast procesy reprodukcyjne ograniczone są do końcowego okresu, dzięki czemu przez większą część cyklu komórki są jednojądrowe i zawierają stałą ilość DNA (COLEMAN 1982). Taki model cyklu komórkowego został opisany jako „the clustered type of multiple fission” lub typ „Chlamydomonas” (ŠETLÍK i ZACHLEDER 1984, ZACHLEDER i współaut. 2002). Wszystkie podziały komórkowe zachodzą w fazie reprodukcyjnej jeden po drugim, niezależnie od dostępności światła bądź też składników mineralnych (HARRIS 2001). Każdą z sekwencji procesów reprodukcyjnych obejmujących replikację DNA, mitozę oraz cytokinezę poprzedza zależna od światła faza wzrostu komórki G₁, w czasie której powstają struktury komórkowe i gromadzona jest rezerwa energetyczna. SPUDICH i SAGER (1980) wyróżnili dwa punkty krytyczne w trakcie cyklu komórkowego *Chlamydomonas*. Pierwszy z nich, „the primary arrest point”, to moment we wczesnej fazie G₁, od którego przejście komórki przez kolejne fazy cyklu zależy od światła. Drugi, „the transition point”, to punkt kontrolny cyklu pod koniec fazy G₁ (punkt G₁/S), po przekroczeniu



Ryc. 2. Cykl komórkowy *Chlamydomonas*.

Komórka macierzysta dzieli się na osiem autospor przechodząc trzy częściowo nakładające się sekwencje procesów wzrostu (obszary G_1 i G_2) i reprodukcji (obszary S, M, C). G_1 i G_2 – fazy wzrostu, S – synteza DNA, M – mitoz, czarnymi prostokątami zaznaczono punkty kompetencyjne. Wewnętrzne koło przedstawia fotoperiod (kolor biały – ekspozycja komórek na światło, kolor czarny – inkubacja komórek w ciemności) (wg SLANINOVEJ i współaut. 2003).

którego komórka uzyskuje kompetencje do przejścia w fazę reprodukcyjną i ukończenia cyklu niezależnie od dopływu zewnętrznej energii w postaci światła (HIRT 1996). Punkt kontrolny G_1/S , zwany u glonów punktem kompetencyjnym (ang. commitment point), jest funkcjonalnym analogiem punktu START u drożdży lub punktu restrykcyjnego R opisanego u ssaków (JOHN 1984). Wyróżnienie tego punktu kontrolnego stało się podstawą do podzielenia cyklu komórkowego glonów, charakteryzujących się wielokrotnymi podziałami, na okres przedkompetencyjny (ang. pre-commitment period) i pokompetencyjny cyklu (ang. post-commitment period) (DONNAN i JOHN 1983, ZACHLEDER i VAN DEN ENDE 1992). Komórki organizmów dzielących się wielokrotnie, tak jak *Chlamydomonas*, mogą kilkukrotnie podwajać wielkość w czasie kolejnych faz G_1 , w wyniku tego przechodząc więcej niż jednokrotnie punkt kompetencyjny w trakcie jednego cyklu komórkowego. Liczbę podziałów (w konsekwencji ilość uwalnianych autospor) wydaje się determi-

nować, zależna od warunków wzrostu, wielkość komórki macierzystej (CRAIGIE i CAVALLIER-SMITH 1982). Czas, w jakim komórka uzyskuje kompetencje do podziału również zależy od tempa wzrostu i zbiega się z momentem w cyklu, gdy następuje podwojenie jej wielkości (OLDENHOF i współaut. 2007). Zdaje się to potwierdzać istnienie jednego z proponowanych, zależnego od rozmiarów komórki, mechanizmu regulacji cyklu (ang. sizer mechanizm). Oszacowano, że minimalna objętość komórki *C. reinhardtii* konieczna do uzyskania kompetencji do podziału wynosi około $180 \mu m^3$ (UMEN i GOODENOUGH 2001). W świetle ciągłym komórki uzyskują kompetencje do podziału po osiągnięciu wielkości krytycznej będącej 2,2-krotnością wielkości uwolnionej autospory (MATSUMURA i współaut. 2003). Jednak komórki przeniesione do ciemności, zanim osiągną wielkość krytyczną, nadal przechodzą do reprodukcyjnej fazy cyklu, przy czym rozpoczęcie tej fazy jest opóźnione w odniesieniu do komórek o większych rozmiarach. W tym przypadku czynnikiem regulującym przebieg cyklu jest upływ czasu od momentu rozpoczęcia cyklu komórkowego. Zaprezentowane wyniki badań wskazują na nadrzędną rolę zależnego od rozmiarów komórki mechanizmu regulacji cyklu, ale dowodzą też występowania mechanizmu regulacji zależnego od czasu (ang. timer mechanizm). Czas trwania fazy wzrostu (G_1) uzależniony jest od tempa wzrostu, a więc pośrednio od warunków środowiskowych. Szczególne znaczenie ma tutaj nie tylko światło, jego natężenie, barwa oraz czas trwania okresu naświetlania i ciemności, ale także temperatura. Wraz ze wzrostem natężenia światła czas ten ulega skróceniu (ZACHLEDER i VAN DEN ENDE 1992). Światło niebieskie, a także światło białe powodują opóźnienie uzyskania przez komórki kompetencji do podziałów oraz zwiększenie minimalnej wymaganej do podziału masy komórki (MÜNZNER i VOIGT 1992). Przyczyną opóźnienia jest przesunięcie w czasie maksymalnej aktywności cyklinozależnej kinazy, biorącej udział w kaskadzie sygnałowej regulacji cyklu (OLDENHOF i współaut. 2004a). Światło czerwone, daleka czerwień oraz ciemność powodują natomiast przyspieszenie podziałów i zmniejszenie krytycznej wielkości komórki wymaganej do indukcji podziału. Stwierdzono również, że światło czerwone znosi efekty działania światła niebieskiego (OLDENHOF i współaut. 2004b, 2006). Czas rozpoczęcia podziałów komórkowych w trakcie cyklu jest

stały i nie zależy od warunków wzrostu oraz momentu uzyskania przez komórkę kompetencji do podziału. Czas trwania procesów reprodukcyjnych zależy natomiast od temperatury (OLDENHOF i współaut. 2007). Wraz ze wzrostem temperatury następuje skrócenie fazy reprodukcyjnej cyklu. Rozpoczęcie mitozy uwarunkowane jest przekroczeniem przez komórkę kolejnego punktu kontrolnego cyklu – G_2/M , a inicjacja podziału mitotycznego zależna jest od kompletnej syntezy DNA (HARPER i JOHN 1986). Postęp cytokinezy jest regulowany niezależnie od mitozy. W komórce, w której nie dochodzi do podziału jądra, nadal tworzy się fykoplaster i bruzda podziałowa. Nie dochodzi jednak do pełnego podziału komórki (HARPER i JOHN 1986). Po zakończeniu wszystkich zainicjowanych podziałów, komórki potomne uwalniane są z macierzystej ściany komórkowej jednocze-

śnie. W hodowlach synchronizowanych, poprzez stosowanie fotoperiodu, ma to zwykle miejsce na krótko przed zakończeniem okresu ciemności (HARRIS 2009c). Enzym lityczny umożliwiający rozerwanie macierzystej ściany komórkowej (ang. sporangin), jest syntetyzowany po podziałach mitotycznych i akumulowany w wiciach komórkach potomnych (KUBO i współaut. 2009). W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania dotyczące genetycznych podstaw regulacji przebiegu cyklu komórkowego *Chlamydomonas*. Genom *Chlamydomonas reinhardtii*, poza genami kodującymi homologi głównych roślinnych cyklino-zależnych kinaz (CDK A-E) i cyklin (cykliny A-E), zawiera cztery dodatkowe CDK (G1, G2, H1, I1) i dwie cykliny (CYCAB1 i CYCM1), których nie znaleziono u roślin wyższych, grzybów ani u zwierząt (BIŠOVÁ i współaut. 2005).

CYKL CHLOROPLASTOWY

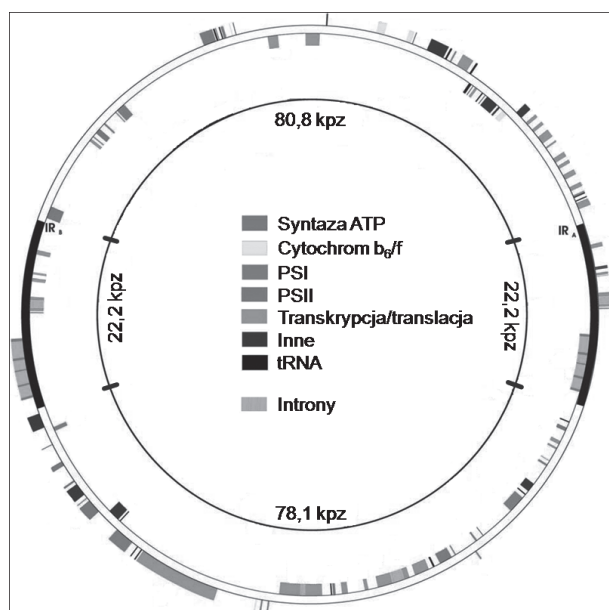
GENOM CHLOROPLASTOWY

Genom chloroplastowy *Chlamydomonas reinhardtii* (GenBank BK000554) wykazuje największe podobieństwo do genomów chloroplastowych roślin lądowych. Zbudowany on jest z 203 828 pz i zawiera zaledwie 99 genów o znanej lub przewidywanej funkcji (HIGGS 2009). Chromosom chloroplastowy (Ryc. 3) podzielony jest przez powtórzone odwrócenia (ang. inverted repeats, IR) (~21 kpz) na dwa podobnej wielkości (~80 kpz) regiony o unikatowej sekwencji. Występowanie sekwencji obecnej w dwóch identycznych odwróconych kopiach jest podstawową właściwością chloroplastowego DNA zarówno wyższych, jak i prostych eukariontów (SIMPSON i STERN 2002, POMBERT i współaut. 2006). W genomie chloroplastowym *Chlamydomonas* zawartość par GC stanowi 35% i jest porównywalna z zawartością tych zasad zarówno u *Chlorella* (32%), jak i *Arabidopsis* (36%) (WAKASUGI i współaut. 1997, SATO i współaut. 1999). Cechą charakterystyczną *Chlamydomonas* jest obecność powtórzonych sekwencji DNA, które stanowią ponad 20% genomu chloroplastowego. W regionach niekodujących zidentyfikowano prawie 20 000 krótkich powtarzalnych sekwencji (ang. short dispersed repeats, SDRs), których długość wynosi ok. 30 pz (MAUL i współaut. 2002). Obecność podobnych sekwencji zaobserwowano tylko w genomie chloroplasto-

wym *Chlorella vulgaris* (WAKASUGI i współaut. 1997), co może świadczyć o wspólnym przodku tych dwóch gatunków. Mechanizm powstania i funkcja SDRs nie są jeszcze poznane, ale przypuszcza się, że mogą one uczestniczyć w rekombinacyjnej naprawie uszkodzeń obu nici DNA (ODOM i współaut. 2008). W genomie chloroplastowym *C. reinhardtii* znajdują się 64 geny kodujące białka, 29 genów tRNA, 6 genów rRNA oraz 8 otwartych ramek odczytu (MAUL i współaut. 2002). Biorąc pod uwagę pełnioną funkcję, 39 białek uczestniczy w fotosyntezie oraz powstawaniu ATP, a 24 związanych jest z ekspresją genów (transkrypcja, translacja, potranslacyjna obróbka białka). Większość genów chloroplastowych *Chlamydomonas* ma budowę typową dla organizmów prokariotycznych, tylko niektóre z nich posiadają introny (HIGGS 2009). Poznanie sekwencji genomu chloroplastowego *Chlamydomonas reinhardtii* oraz możliwość jego transformacji może pomóc w odpowiedzi na pytania dotyczące funkcjonowania i ewolucji chloroplastów.

CHARAKTERYSTYKA CYKLU CHLOROPLASTOWEGO

W cyklu komórkowym *Chlamydomonas* nowe chloroplasty powstają wyłącznie w wyniku podziałów, a nie różnicowania się z proplastydów bądź etioplastów. Ponad-



Ryc. 3. Chromosom chloroplastowy *Chlamydomonas reinhardtii*.

Na zewnętrznym kole zaznaczono geny o znanej lub przewidywanej na podstawie sekwencji funkcji. Kolory jakimi zaznaczone są sekwencje kodujące odpowiadają określonej funkcji (legenda w środkowej części rysunku). Wewnętrzne koło przedstawia wielkości poszczególnych odcinków DNA. IR_A i IR_B – powtórzone odwrócenia (wg MAUL i współaut. 2002, zmieniona).

to, w przeciwieństwie do roślin wyższych, rozwój pojedynczego chloroplastu glonów z rodzaju *Chlamydomonas* wydaje się być, przynajmniej częściowo, zsynchronizowany z przebiegiem cyklu komórkowego. Podział chloroplastu u tego organizmu zachodzi podczas drugiego i trzeciego podziału komórki, w wyniku których powstaje odpowiednio 4 lub 8 autospor (HARPER i JOHN 1986). U *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzono podobny do roślin wyższych mechanizm podziału chloroplastu. Organizm ten posiada kodowane przez genom jądrowy homologi białek wykrytych u *Arabidopsis*: CrMinD1 (odpowiadający AtMinD1) oraz CrMinE1 i CrMinE2 (odpowiadające AtMinE1), a także homologi białek AtFtsZ1-1 i AtFtsZ2-1, odpowiednio CrtFtsZ3 i CrFtsZ2. Białka CrMinE1 i CrMinD1 biorą udział w regulacji przyłączania białek CrFtsZ w miejscu przyszłego podziału chloroplastu (ADAMS i współaut. 2008). Pojedynczy chloroplast w komórce, obecność homologów białek będących komponentami molekularnego mechanizmu podziału chloroplastu u roślin wyższych oraz możliwość

synchronizacji wzrostu i podziałów komórkowych sprawiają, że organizm ten jest bardzo dobrym materiałem do badań rozwoju i podziału chloroplastu. Chloroplast posiada pewną autonomię genetyczną wynikającą z obecności w jego obszarze zorganizowanych kompleksów zawierających swoisty DNA (chDNA), wszystkie enzymy konieczne w transkrypcji i replikacji, czynniki transkrypcyjne oraz białka strukturalne wiążące DNA (SAKAI 2001). Kompleksy te nazwane zostały nukleoidami (KUROIWA i współaut. 1981) lub jądrami chloroplastowymi (NEMOTO i współaut. 1991). Autonomia ta determinuje ograniczoną niezależność rozwojową chloroplastów w czasie trwania cyklu komórkowego, jednak kompleksy błon tylakoidów, Rubisco oraz plastydowe rybosomy zawierają w swojej strukturze produkty zarówno genów plastydowych, jak i genów jądrowych (BARKAN i GOLDSCHMIDT-CLERMONT 2000). Tempo syntezy białek kodowanych przez geny plastydowe zmienia się w zależności od fazy rozwoju chloroplastu i warunków środowiskowych, ale także regulowane jest poprzez czynniki kodowane przez geny jądrowe. Czynniki te wpływają na ekspresję genów plastydowych na różnych jej etapach, zarówno w czasie transkrypcji, potranskrypcyjnych przemian RNA, jak i translacji (BARKAN i GOLDSCHMIDT-CLERMONT 2000, BELIGNI i współaut. 2004). Jednocześnie ekspresja genów jądrowych, których produkty stanowią elementy aparatu fotosyntetycznego, podlega regulacji przez sygnały plastydowe takie jak: prekursorzy metaboliczne chlorofilu, stan redoks plastochinonu, tioredoksyny i glutationu oraz transporter fosfoenolopirogronianu (ROCHAIX 2007). W młodych autosporach znajduje się około 10 chloroplastowych nukleoidów o średnicy 0,2 μm (HIRAMATSU i współaut. 2006). Liczba nukleoidów chloroplastowych w komórkach mt⁺ i mt⁻ jest jednakowa i maleje w podobny sposób podczas gametogenezy (BIRKY i współaut. 1984). W czasie wegetatywnego cyklu komórkowego wielkość, ilość i kształt nukleoidów chloroplastowych zmienia się, podobnie jak w przypadku nukleoidów mitochondrialnych (HIRAMATSU i współaut. 2006). W degenerujących komórkach starzejących się hodowli można natomiast zaobserwować łączenie się nukleoidów chloroplastowych w jedną dużą strukturę, która po przeniesieniu komórek do świeżej pożywki ponownie dzieli się na pojedyncze, równomiernie rozproszone w chloroplaście nukleoidy (NAKAMURA i współaut. 1986).

CYKL MITOCHONDRIALNY

GENOM MITOCHONDRIALNY

Kompletną sekwencję genomu mitochondrialnego *C. reinhardtii* (Ryc. 4) (GenBank U03843) poznano już w latach 90. XX w. i jest to jeden z najmniejszych, roślinnych mtDNA poznanych do tej pory. Jego długość wynosi około 16 kpz, i co zaskakujące, występuje w komórce w formie liniowej, dwuniciowej cząsteczki. Genom mitochondrialny charakteryzuje się niewielką ilością sekwencji niekodujących, a geny w nim występujące nie posiadają intronów (CARDOL i REMACLE 2009). Na końcach genomu znajdują się odwrócone sekwencje graniczne długości 531 lub 532 pz, zawierające identyczne fragmenty jednoniciowego DNA, utworzone z ok. 40 nukleotydów (VAHRENHOLZ i współaut. 1993). W genomie mitochondrialnym *C. reinhardtii* zidentyfikowano 30 genów, wśród których znajdują się geny kodujące składniki mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów oraz geny kodujące rRNA i tRNA. Osiem genów mtDNA koduje białka wchodzące w skład kompleksów enzymatycznych łańcucha oddechowego (I, III i IV) oraz białko podobne do odwrotnej transkryptazy. Pozostałe geny kodują cząsteczki RNA (NICKELSEN 2005). U roślin wyższych znanych jest zaledwie kilka mutacji w genach mitochondrialnych kodujących składniki łańcucha transportu elektronów (PINEAU i współaut. 2005). Mutanty takie często wykazują mniejsze tempo wzrostu, różnego rodzaju nieprawidłowości morfologiczne oraz nie mogą być utrzymywane w czystych liniach homoplazmatycznych. *Chlamydomonas reinhardtii* stanowi dogodny model do badania funkcji mitochondrium w organizmach fotosyntetyzujących, ponieważ mutacje mtDNA są homoplazmatyczne, a mutanty z uszkodzonym łańcuchem oddechowym mogą przeżyć w warunkach autotroficznych

(CARDOL i REMACLE 2009). Dużym ułatwieniem w badaniach biogenezy mitochondrium jest niewątpliwie możliwość biolistycznej transformacji genomu mitochondrialnego (REMACLE i współaut. 2006).

CHARAKTERYSTYKA CYKLU MITOCHONDRIALNEGO

Podobnie jak chloroplasty, mitochondria także zawierają własne DNA powiązane ze specyficznymi białkami, zorganizowane w struktury zwane nukleoidami (KUROIWA 1982). Aby badać zależności pomiędzy genomem jądrowym i genomami tych organelli, a także funkcje nukleoidów organelli w komórce, konieczne jest poznanie zmian zachodzących w mitochondriach i chloroplastach oraz ich nukleoidach w trakcie cyklu komórkowego. Na podstawie obserwacji prowadzonych w mikroskopie fluorescencyjnym EHARA i współaut. (1995) wyróżnili 5 typów morfologicznych mitochondriów występujących podczas cyklu komórkowego *Chlamydomonas reinhardtii*: (A) pojedyncze, dużych rozmiarów mitochondrium, z dużą ilością matriks i peryferycznie zlokalizowanymi grzebieniami, z których część jest w bliskim kontakcie z jądrem komórkowym, (B) rozgałęzione mitochondrium, z grubymi sznurowatymi rozgałęzieniami, spośród których część jest w kontakcie z jądrem, (C) formy z cienkimi, nielicznymi rozgałęzieniami, (D) grudkowate formy rozsiane w cytoplazmie, (E) formy sznurowate z rozgałęzieniami rozciągniętymi w cytoplazmie. Autorzy stwierdzili, że w pierwszej połowie cyklu komórkowego mitochondria zmieniały się przechodząc przez poszczególne formy w kolejności C→B→C→D, a następnie w późniejszej części cyklu odwrotnie. Ponadto typ B czasowo przekształcał się w typ A. Wszystkie badania zmian zachodzących w mitochondriach podczas cyklu komórkowego



Ryc. 4. Genom mitochondrialny *Chlamydomonas reinhardtii*.

Na schemacie zaznaczono kolorami czerwonym i pomarańczowym geny kodujące odpowiednio białka oraz strukturalne RNA. Na końcach liniowej cząsteczki kolorem czarnym zaznaczono odwrócone sekwencje graniczne (IR) (wg SMITHA i LEE 2008, zmieniona).

wego dotyczyły jednak komórek utrwalonych. Obserwacje prowadzone przez HIRAMATSU i współaut. (2006) na żywych komórkach *C. reinhardtii* nie wykazały obecności tych organeli w typie: A, B i D. W trakcie cyklu komórkowego mitochondria występowały w formie cienkich, krętych struktur rozciągających się w cytoplazmie. W czasie mitozy były widoczne mitochondria typu E, tzn. sznurowate z rozgałęzieniami rozciągającymi się w cytoplazmie. Młode autospory będące na początku fazy G_1 cyklu posiadają około 30 nukleoidów mitochondrialnych o średnicy 0,1 μm (HIRAMATSU i

współaut. 2006). W czasie fazy G_1 i na początku fazy S cyklu komórkowego nukleoidy tworzą krótkie nitkowate bądź grudkowate formy. W fazie S jednocześnie z syntezą DNA przebiega podział nukleoidów, w wyniku czego zwiększa się ich liczba, a ich rozmiary i ilość DNA w pojedynczym nukleoidzie maleje. Komórki w fazie S i M cyklu zawierają największe ilości nukleoidów, natomiast po przeniesieniu hodowli do ciemności ponownie tworzą formy nitkowate bądź grudkowate, a na skutek łączenia się ich liczba maleje.

ZAKOŃCZENIE

Bibliografia oraz adresy baz danych dotyczących *Chlamydomonas reinhardtii* zebrane są na stronie Chlamydomonas Center (www.chlamy.org). Chlamy Center dysponuje też ogromną kolekcją zarówno dzikich szczepów, jak i licznych mutantów tej zieleńnicy. Od 1983 r. cyklicznie odbywają się

konferencje (The International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas) umożliwiające wymianę poglądów oraz prezentację najnowszych wyników badań prowadzonych na glonach z rodzaju *Chlamydomonas*.

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII – MODELOWY ORGANIZM W BADANIACH CYKLU KOMÓRKOWEGO, CHLORPLASTOWEGO I MITOCHONDRIALNEGO

Streszczenie

Względna łatwość hodowli, krótki cykl komórkowy, znana sekwencja genomu, a także duża ilość różnego rodzaju mutantów czynią z *Chlamydomonas reinhardtii* atrakcyjny organizm modelowy w badaniach dotyczących rozwoju i funkcjonowania komórki. Struktura genomu jądrowego i chloroplastowego *C. reinhardtii* wykazuje więcej cech wspólnych z genomami roślin wyższych niż prostych eukariontów. Genom mitochondrialny tego organizmu jest jednym

z najmniejszych dotychczas poznanych u roślin i występuje w postaci liniowej, dwuniciowej cząsteczki. Zsekwencjonowanie genomu *Chlamydomonas reinhardtii* oraz możliwość ich względnie łatwej transformacji stwarza dogodne podstawy do badania molekularnych uwarunkowań przebiegu cyklu komórkowego i zależności pomiędzy cyklem komórkowym, chloroplastowym i mitochondrialnym.

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII – A MODEL ORGANISM IN RESEARCH OF CELL, MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST CYCLE

Summary

The relative ease of culture, a short cell cycle, known whole genome sequence and a large number of different types of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants, make this unicellular green alga a very attractive model organism for studies of the development and functioning of cell. The structure of nuclear and chloroplast genome of *C. reinhardtii* is more resembling genomes of vascular plants than simple eukaryotes. Mitochondrial

genome of this organism is one of the smallest in plants and occurs as a linear, double-stranded molecule. Known whole genome sequence and the possibility of their transformation have allowed *Chlamydomonas reinhardtii* to become a highly valuable model for molecular approaches of cell cycle regulation and relationship between the cell, mitochondrial and chloroplast cycle.

LITERATURA

ADAMS S., MAPLE J., MÖLLER S. G., 2008. *Functional conservation of the MIN plastid division homo-*

logues of Chlamydomonas reinhardtii. *Planta* 227, 1199–1211.

- BARKAN A., GOLDSCHMIDT-CLERMONT M., 2000. *Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression*. Biochimie 8, 559–572.
- BELIGNI M. V., YAMAGUCHI K., MAYFIELD S. P., 2004. *The translational apparatus of Chlamydomonas reinhardtii chloroplast*. Photosynth. Res. 82, 315–325.
- BIRKY C. W., KATO P., LORENS M., 1984. *Cytological demonstration of chloroplast DNA behavior during gametogenesis and zygote formation in Chlamydomonas reinhardtii*. Curr. Genet. 8, 1–7.
- BIŠOVÁ K., KRYLOV D. M., UMEN J. G., 2005. *Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 137, 475–491.
- CARDOL P., REMACLE C., 2009. *The mitochondrial genome*. [W:] *The Chlamydomonas Sourcebook. Volume 2: Organellar and Metabolic Processes*. HARRIS E. H. (red.). Elsevier, Oxford UK, 445–467.
- COLEMAN A. W., 1982. *The nuclear cell cycle in Chlamydomonas (Chlorophyceae)*. J. Phycol. 18, 192–195.
- CRAIGIE R. A., CAVALIER-SMITH T., 1982. *Cell volume and the control of the Chlamydomonas cell cycle*. J. Cell Sci. 54, 173–191.
- DERELLE E., FERRAZ C., ROMBAUTS S., ROUZÉ P., WORDEN A. Z., ROBBENS S., PARTENSKY F., DEGROEVE S., ECHEYNIÉ S., COOKE R., SAEYS Y., WUYTS J., JABBARI K., BOWLER C., PANAUD O., PIÉGU B., BALL S. G., RAL J.-P., BOUGET F.-Y., PIGANEAU G., DE BAETS B., PICARD A., DELSENY M., DEMAILLE J., VAN DE PEER Y., MOREAU H., 2006. *Genome analysis of the smallest free-living eukaryote Ostreococcus tauri unveils many unique features*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 11647–11652.
- DONNAN L., JOHN P. C. L., 1983. *Cell cycle control by timer and sizer in Chlamydomonas*. Nature 304, 630–633.
- EHARA T., OSAFUNE T., HASE E., 1995. *Behavior of mitochondria in synchronized cells of Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyta)*. J. Cell Sci. 108, 499–507.
- HARPER J. D. I., JOHN P. C. L., 1986. *Coordination of division events in the Chlamydomonas cell cycle*. Protoplasma 131, 118–130.
- HARRIS E. H., 2001. *Chlamydomonas as a model organism*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 363–406.
- HARRIS E. H., 2009a. *The life of an acetate flagellate*. [W:] *The Chlamydomonas Sourcebook, Volume 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. HARRIS E. H. (red.). Elsevier, Oxford UK, 159–210.
- HARRIS E. H., 2009b. *The sexual cycle*. [W:] *The Chlamydomonas Sourcebook, Volume 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. HARRIS E. H. (red.). Elsevier, Oxford UK, 119–157.
- HARRIS E. H., 2009c. *Cell division*. [W:] *The Chlamydomonas Sourcebook, Volume 1: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*. HARRIS E. H. (red.). Elsevier, Oxford UK, 65–87.
- HEMSCHMEIER A., MELIS A., HAPPE T., 2009. *Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green alga*. Photosynth. Res. 102, 523–540.
- HIGGS D. C., 2009. *The chloroplast genome*. [W:] *The Chlamydomonas Sourcebook, Volume 2: Organellar and Metabolic Processes*. HARRIS E. H. (red.). Elsevier, Oxford UK, 871–891.
- HIRAMATSU T., NAKAMURA S., MISUMI O., KUROIWA T., 2006. *Morphological changes in mitochondrial and chloroplast nucleoids and mitochondria during the Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae) cell cycle*. J. Phycol. 42, 1048–1058.
- HIRT H., 1996. *In and out of the plant cell cycle*. Plant Mol. Biol. 31, 459–464.
- HU Q., SOMMERFELD M., JARVIS E., GHIRARDI M., POSEWITZ M., SEIBERT M., DARZINS A., 2008. *Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances*. Plant J. 54, 621–639.
- JOHN P. C. L., 1984. *Control of the cell division cycle in Chlamydomonas*. Microbiol. Sci. 1, 96–101.
- KUBO T., KAIDA S., ABE J., SAITO T., FUKUZAWA H., MATSUDA Y., 2009. *The Chlamydomonas hatching enzyme, sporangin, is expressed in specific phases of the cell cycle and is localized to the flagella of daughter cells within the sporangial cell wall*. Plant Cell Physiol. 50, 572–583.
- KUROIWA T., OGAWA K., KAWANO S., 1981. *The chloroplast nucleus: distribution, number, size and shape, and a model for the multiplication of the chloroplast genome during chloroplast development*. Plant Cell Physiol. 22, 381–396.
- KUROIWA T., 1982. *Mitochondrial nuclei*. Int. Rev. Cytol. 75, 1–59.
- MATSUMURA K., YAGI T., YASUDA K., 2003. *Role of timer and sizer in regulation of Chlamydomonas cell cycle*. Biochem. Biophys. Res. Com. 306, 1042–1049.
- MATSUZAKI M., MISUMI O., SHIN-I T., MARUYAMA S., TAKAHARA M., MIYAGISHIMA S., MORI T., NISHIDA K., YAGISAWA F., NISHIDA K., YOSHIDA Y., NISHIMURA Y., NAKAO S., KOBAYASHI T., MOMOYAMA Y., HIGASHIYAMA T., MINODA A., SANO M., NOMOTO H., OISHI K., HAYASHI H., OHTA F., NISHIZAKA S., HAGA S., MIURA S., MORISHITA T., KABEYA Y., TERASAWA K., SUZUKI Y., ISHII Y., ASAKAWA S., TAKANO H., OHTA N., KUROIWA H., TANAKA K., SHIMIZU N., SUGANO S., SATO N., NOZAKI H., OGASAWARA N., KOHARA Y., KUROIWA T., 2004. *Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae 10D*. Nature 428, 653–657.
- MAUL J. E., LILLY J. W., CUI L., DEPAMPHILIS C. W., MILLER W., HARRIS E. H., STERN D. B., 2002. *The Chlamydomonas reinhardtii plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats*. Plant Cell 14, 2659–2679.
- MERCHANT S. S., PROCHNIK S. E., VALLON O., HARRIS E. H., KARPOWICZ S. J., WITMAN G. B., TERRY A., SALAMOV A., FRITZ-LAYLIN L. K., MARÉCHAL-DROUARD L., MARSHALL W. F., QU L.-H., NIELSEN D. R., SANDERFOOT A. A., SPALDING M. H., KAPITONOV V. V., REN Q., FERRIS P., LINDQUIST E., SHAPIRO H., LUCAS S. M., GRIMWOOD J., SCHMUTZ J., CHLAMYDOMONAS ANNOTATION TEAM, J. G. I. ANNOTATION TEAM, GRIGORIEV I. V., ROKHSAR D. S., GROSSMAN A. R., 2007. *The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant function*. Science 318, 245–251.
- MITCHELL D. R., 2000. *Chlamydomonas flagella*. J. Phycol. 36, 261–273.
- MOLNÁR A., SCHWACH F., STUDHOLME D. J., THUENEMANN E. C., BAULCOMBE D. C., 2007. *miRNAs control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii*. Nature 447, 1126–1129.
- MÜNZNER P., VOIGT J., 1992. *Blue light regulation of cell division in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 99, 1370–1375.
- NAKAMURA S., ITOH S., KUROIWA T., 1986. *Behavior of chloroplast nucleus during chloroplast development and degeneration in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Physiol. 27, 775–84.
- NEMOTO Y., NAGATA T., KUROIWA T., 1991. *Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in Nicotiana tabacum L. IV. Association of chloroplast-DNA with pro-*

- teins at several specific sites in isolated chloroplast-nuclei. *Plant Cell Physiol.* 32, 131–141.
- NICKELSEN J., 2005. *The green alga Chlamydomonas reinhardtii – a genetic model organism.* [W:] *Progress in Botany vol. 66.* ESSER K., LÜTTGE U. E., BEYSCHLAG W., MURATA J. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 68–89.
- ODOM O. W., BAEK K.-H., DANI R. N., HERRIN D. L., 2008. *Chlamydomonas chloroplasts can use short dispersed repeats and multiple pathways to repair a double-strand break in the genome.* *Plant J.* 53, 842–853.
- OLDENHOF H., BIŠOVÁ K., VAN DEN ENDE H., ZACHLEDER V., 2004a. *Effect of red and blue light on the timing of cyclin-dependent kinase activity and the timing of cell division in Chlamydomonas reinhardtii.* *Plant Physiol. Biochem.* 42, 341–348.
- OLDENHOF H., ZACHLEDER V., VAN DEN ENDE H., 2004b. *Blue light delays commitment to cell division in Chlamydomonas reinhardtii.* *Plant Biol.* 6, 689–695.
- OLDENHOF H., ZACHLEDER V., VAN DEN ENDE H., 2006. *Blue- and red-light regulation of the cell cycle in Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyta).* *Eur. J. Phycol.* 41, 313–320.
- OLDENHOF H., ZACHLEDER V., VAN DEN ENDE H., 2007. *The cell cycle of Chlamydomonas reinhardtii: the role of the commitment point.* *Folia Microbiol.* 52, 53–60.
- PALENIK B., GRIMWOOD J., AERTS A., ROUZÉ P., SALAMOV A., PUTNAM N., DUPONT C., JORGENSEN R., DERELLE E., ROMBAUTS S., ZHOU K., OTILLAR R., MERCHANT S. S., PODELL S., GAASTERLAND T., NAPOLI C., GENDLER K., MANUELL A., TAI V., VALLON O., PIGANEAU G., JANCEK S., HEIJDE M., JABBARI K., BOWLER C., LOHR M., ROBBENS S., WERNER G., DUBCHAK I., PAZOUR G. J., REN Q., PAULSEN I., DELWICHE C., SCHMUTZ J., ROKHSAR D., VAN DE PEER Y., MOREAU H., GRIGORIEV I. V., 2007. *The tiny eukaryote Ostreococcus provides genomic insights into the paradox of plankton speciation.* *PNAS* 104, 7705–7710.
- PAZOUR G. J., AGRIN N., WALKER B. L., WITMAN G. B., 2006. *Identification of predicted human outer dynein arm genes: candidates for primary ciliary dyskinesia genes.* *J. Med. Genet.* 43, 62–73.
- PINEAU B., MATHIEU C., GÉRARD-HIRNE C., DE PAEPE R., CHÉTRIT P., 2005. *Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the Nicotiana sylvestris CMS II mutant lacking nad7.* *J. Biol. Chem.* 280, 25994–26001.
- POMBERT J.-F., LEMIEUX C., TURMEL M., 2006. *The complete chloroplast DNA sequence of the green alga Oltmannsiellopsis viridis reveals a distinctive quadripartite architecture in the chloroplast genome of early diverging ulvophytes.* *BMC Biology* 4, 3.
- REMACLE C., CARDOL P., COOSEMANS N., GAISNE M., BONNEFOY N., 2006. *High-efficiency biolistic transformation of Chlamydomonas mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes.* *PNAS* 103, 4771–4776.
- ROCHAIX J. D., 2007. *The Role of nucleus- and chloroplast-encoded factors in the synthesis of the photosynthetic apparatus.* [W:] *The Structure and Function of Plastids.* WISE R. R., HOOBER J. K. (red.). Springer, Dordrecht, 145–165.
- SAKAI A., 2001. *In vitro transcription/DNA synthesis using isolated organelle-nuclei: Application to the analysis of the mechanisms that regulate organelle genome function.* *J. Plant Res.* 114, 199–211.
- SATO S., NAKAMURA Y., KANEKO T., ASAMIZU E., TABATA S., 1999. *Complete structure of the chloroplast genome of Arabidopsis thaliana.* *DNA Res.* 6, 283–290.
- SCHRODA M., 2006. *RNA silencing in Chlamydomonas: mechanisms and tools.* *Curr. Genet.* 49, 69–84.
- ŠETLÍK I., ZACHLEDER V., 1984. *The multiple fission cell reproductive patterns in algae.* [W:] *The Microbial Cell Cycle.* NURSE P., STREIBLOVÁ E. (red.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 253–270.
- SIMPSON C. L., STERN D. B., 2002. *The treasure trove of algal chloroplast genomes. Surprises in architecture and gene content, and their functional implications.* *Plant Physiol.* 129, 957–966.
- SLANINOVÁ M., NAGYOVÁ B., GÁLOVÁ E., HENDRYCHOVÁ J., BIŠOVÁ K., ZACHLEDER V., VLČEK D., 2003. *The alga Chlamydomonas reinhardtii UVS11 gene is responsible for cell division delay and temporal decrease in histone H1 kinase activity caused by UV irradiation.* *DNA Repair* 2, 737–750.
- SMITH D. R., LEE R. W., 2008. *Nucleotide diversity in the mitochondrial and nuclear compartments of Chlamydomonas reinhardtii: investigating the origins of genome architecture.* *BMC Evolutionary Biology* 8, 156.
- SPUDICH J. L., SAGER R., 1980. *Regulation of the Chlamydomonas cell cycle by light and dark.* *J. Cell Biol.* 85, 136–145.
- THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000. *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana.* *Nature* 408, 796–815.
- UMEN J. G., GOODENOUGH U. W., 2001. *Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in Chlamydomonas.* *Genes Dev.* 15, 1652–1661.
- VAHRENHOLZ C., RIEMEN G., PRATJE E., DUJON B., MICHAELIS G., 1993. *Mitochondrial DNA of Chlamydomonas reinhardtii: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication.* *Curr. Genet.* 24, 241–247.
- VERNON D., GUTELL R. R., CANNONE J. J., RUMPF R. W., BIRKY C. W. J. R., 2001. *Accelerated evolution of functional plastid rRNA and elongation factor genes due to reduced protein synthetic load after the loss of photosynthesis in the chlorophyte alga Polytoma.* *Mol. Biol. Evol.* 18, 1810–1822.
- WAKASUGI T., NAGAI T., KAPOOR M., SUGITA M., ITO M., ITO S., TSUDZUKI J., NAKASHIMA K., TSUDZUKI T., SUZUKI Y., HAMADA A., OHTA T., INAMURA A., YOSHINAGA K., SUGIURA M., 1997. *Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga Chlorella vulgaris: The existence of genes possibly involved in chloroplast division.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5967–5972.
- YANDELL M., MUNGALL C. J., SMITH C., PROCHNIK S., KAMINKER J., HARTZELL G., LEWIS S., RUBIN G. M., 2006. *Large-scale trends in the evolution of gene structures within 11 animal genomes.* *PLoS Comput. Biol.* 2, e15.
- ZACHLEDER V., VAN DEN ENDE H., 1992. *Cell cycle events in the green alga Chlamydomonas eugametos and their control by environmental factors.* *J. Cell Sci.* 102, 469–474.
- ZACHLEDER V., BIŠOVÁ K., VÍTOVÁ M., KUBÍN Š., HENDRYCHOVÁ J., 2002. *Variety of cell cycle patterns in the alga Scenedesmus quadricauda (Chlorophyta) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors.* *Eur. J. Phycol.* 37, 361–371.
- ZHAO T., LI G., MI S., LI S., HANNON G. J., WANG X.-J., QI Y., 2007. *A complex system of small RNAs in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii.* *Genes Dev.* 21, 1190–1203.