

DIFEKTITA AŬTOTROFO DE MUTACIITA *CHLAMYDOMONAS*¹

RALPH A. LEWIN²

*Osborn Botanika Laboratorio, Yale Universitato,
New Haven, Connecticut*

KAJ

ALBERT W. FRENKEL

*Departemento de Botaniko, Universitato de
Minnesota, Minneapolis, Minnesota*

(Ricevita la 8an de Aŭgusto, 1960)

A mutant of *Chlamydomonas moewusii* is described which, though capable of CO₂-fixation and O₂-evolution in light, was unable to grow at appreciable rates in the absence of an organic substrate. Growth of the mutant approached that of the wild type in citrate media; fumarate, succinate or malate stimulated growth less effectively.

Atakoj al la problemoj de biokemiaj katenoj de fotosintezo per la enkonduko de metabolismaj blokadoj ankoraŭ ne multe sukcesis. Ĉe certaj mutaciitaj *Chlorella* sp. ekzistas metabolisma malfunkcio, ŝajne en la oksigenon produktanta sistemo (1); tamen, genetikaj studoj estas neblaj, ĉar oni neniam eltrovis seksan reproduktadon ĉe tiu genro. Specioj de *Chlamydomonas* pli taŭgas por tiaj studoj, ĉar ties reproduktado enhavas seksan fazon. Plue, ĉar *C. reinhardi* estas laŭcirkonstace heterotrofa, estas eble krei vivpovajn mutaciitojn, kapablajn kreski nur per organika nutrado, ĉu en lumo ĉu en mallumo (2). Kvankam *C. moewusii*, kontraŭe, estas absolute foto-aŭtotrofa (3), kaj tial malpli taŭga tiurilate, estas izolita mutaciito de tiu specio kiu ne kreskis sole per fotosintezo. Sube ni priskribas iujn ecojn de tiu klono.

MATERIALOJ KAJ METODOJ

En 1948 D-ro L. PROVASOLI izolis la patran klonparon, nome *Chlamy-*

¹ Tiu mutaciito estas trovita de R. A. L. dum studado por tezo prezentita en 1950 kiel parta plenumo de la doktoriĝa diplomo en Yale Universitato.

² Nuna adreso: Scripps Instituto de Oceanografio, Universitato de California, La Jolla, California, Usono.

domonas moewusii GERLOFF. La mutaciito, M.151, estas izolita post ultravioleta radiigado de ĉeloj de la minusa sekso (4). Por la postaj esploroj, la ĉeloj estas kreskigitaj sub lumo de 4,500 metrokandeloj, en ĉambreto je temperaturo de 23°. (Pri ceteraj detaloj, vidu LEWIN (4).) Organikaj kombinaĵoj, je koncentro de 7 mM, estas aldonitaj kiel montras la skizoj. Por acidoj, estas uzitaj la neŭtralaj saloj de kalio aŭ de natrio. Aŭtoklave estas sterilizitaj la medioj enhavantaj organikan kombinaĵon, escepte de izo-citrato aŭ α -ketoglutarato kiu estas aparte sterilizita per Seitz-filtrilo. Dum ilia kresko, la ĉelujoj, inklinitaj provtuboj, estas malforte ŝancelitaj maŝine por aerumi la suspendon. La relativa kresko estas mezurita ĉiutage laŭ optika denseco per KLETT-SUMMERSON kolorimetro, kun ruĝa lumfiltrilo maksimume tralasanta je 660 m μ . (Unuo=150 \times 10⁹ ĉeloj/ml=2.0 \times 10⁻⁶ g sekpezo/ml, proksimume.)

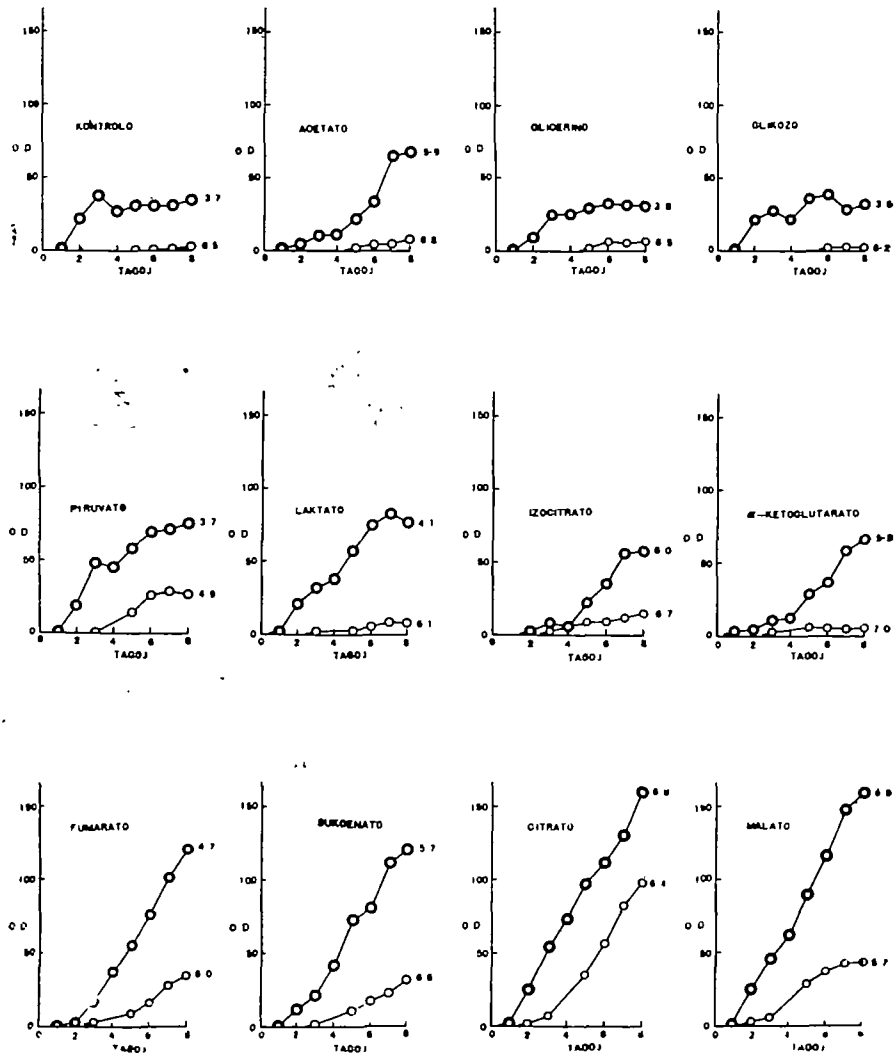
Por manometrado, la ĉeloj estas kreskigitaj en la solvaĵo de BEIJERINCK, kun aldono de acetato aŭ citrato. Ili estas lavitaj en malvarmigita centrifugilo je 5°; tiam resuspendigitaj en bufro je pH 5.5 (0.2 M fosfato de kalio); kaj ekvilibrigitaj per 5% CO₂ en aero. La rapideco de fotosintezo estas mezurita per la du-ujja metodo de WARBURG (UMBREIT kaj aliaj 5), kun du flakonetoj de malsama grandeco enhavantaj egalan volumenon de ĉelsuspendo je egala denseco. La flakonetojn lumigis vico de inkandeskaj lampoj, kies intenseco estis ŝanĝebla per intermeto de dratoretoj (FRENKEL kaj LEWIN 6).

REZULTOJ

Kvankam la mutaciitaj ĉeloj aspektis tute normale en rilato al formo, grandeco, kaj koloro, ili diferencis de normalaj ĉeloj pro la fakto ke ili ne kreskis en aerumitaj mineralaj solvaĵoj, eĉ dum kelkaj semajnoj post la inokulado. La aldono de 0.1% ekstrakto de gisto (Bacto-Difco) stimulis ilian kreskon. Tamen, ni rekonis ke la efekton ne kaŭzis ties enhavo de vitaminoj, ĉar biotino, folia acido, niacino, *para*-aminobenzoika acido, pantotena acido, piridoksino, riboflavino, kaj tiamino, ĉu sole ĉu kune, ne ebligis la kreskon. Aldono de hidrolizato de normalaj ĉeloj (varmigita kun 1.0 N HCl ĉe 120° dum 30 minutoj, poste filtrita kaj neŭtraligita) sufiĉe bone kreskigis la mutaciitajn ĉelojn. Tamen, ni ne serĉis specifan komponenton en ĝi, ĉar similan kreskigon kaŭzis la aldono de iuj simplaj organikaj acidoj. La skizoj montras la influon de kelkaj substancoj sur la kresko de mutaciitaj kaj de normalaj ĉeloj.

Oni vidas ke, kun citrato, la rapideco de kresko de la mutaciitaj similis al tiu de normalaj, kvankam la malakcela fazo estis pli longa—eble pro pli malgranda inokulo. La mutaciitoj sufiĉe bone kreskis kun piruvato, fumarato, sukcenato, aŭ malato, kvankam malpli rapide. Aliaj provitaj organikaj substancoj, ne malfavoraj al la kresko de normalaj ĉeloj, ne kreskigis la mutaciitajn.

La rapideco de fotosintezo je saturiga lumintenseco estis 100–120 $\mu\text{l O}_2$ /horo/*mg* sekpezo de mutaciitaj ĉeloj, kaj 200–250 $\mu\text{l O}_2$ /horo/*mg* de normalaj. Tamen, ĉar la mutaciitaj ĉeloj kreskis malpli rapide ol la normalaj, en la kulturajoj pristuditaj ili ne havis la saman fiziologian aĝon,



Kreskado de *Chlamydomonas moewusii*, normala klono (©) kaj mutaciita klonoj M.151 (○), en nutra solvaĵo kun organikaj aldonoj (7 mM) kiel montritaj. O.D. = optika denseco. Komencita pH, 7.1; fina pH, indikita sur la skizoj.

kaj en tiu rilato iom malsimilis unu al la alia. La fotosintezkvociento kaj de mutaciitaj kaj de normalaj ĉeloj estis 1.00 ± 0.05 . Ankaŭ la spira

kvociento de ambaŭ tipoj alproksimis al 1.0. Tamen, la spirado de la mutaciitaj estis pli rapida ol tiu de normalaj ĉeloj, eble ĉar sole la mutaciitoj estas nutritaj per organikaj substancoj. La kalkulita kvociento:

$$\left\{ \frac{\text{Liberigo de oksigeno je saturiga lumintenseco}}{\text{Uzo de oksigeno en mallumo}} \right\} \text{ por la mutaciitaj ĉeloj ne superis 3.0, sed por la normalaj atingis ĝis 15.}$$

DISKUTO

La nekapablo de la mutaciitaj ĉeloj kreski aŭtotrofe, per fotosintezo, eble kaŭziĝis pro ties relative malrapida akumulo de fiksita karbono, t.e., la rapideco de fotosintezo *minus* la rapideco de spirado. Dua ebleco estas, ke ties metabolisma blokado troviĝis ne en la fotosinteza sistemo mem, sed en la kateno de uzo de iu fotosinteza produktaĵo, kiu supozeble akumulus aŭ en aŭ ekster la ĉeloj. Tria ebleco estas, ke la mutaciitoj ne povis normale efektiviĝi fotosintezan fosforiligadon, tial bezonantaj la oksidadon de kateneroj el la citrikacida ciklo por sintezo de plua "alt-energia" fosfato. Eble pro tio, la kresko kun fumarato, sukcenato, aŭ malato estis sufiĉe bona; kaj kun citrato la mutaciitaj ĉeloj kreskis tiel rapide kiel la normalaj. Laŭ certaj ecoj, tiu mutaciita *Chlamydomonas* similis al la bluverda algo *Synechococcus cedrorum*, kiu bezonas acetaton aŭ alian organikan kombinaĵon por kreski en la lumo, sed kiu ŝajne ne povas uzi tian nutraĵon heterotrofe (ALLEN 8).

(Ni sendis kulturajojn de tiu mutaciita klono al 6 aliaj laboratorioj, sed en neniu ĝi plu vivas; tial pli detala studo estas nebla.)

Financa subteno al A. W. F. estas provizita de la Diplomita Lernejo, Universitato de Minnesota.

REFERENCOJ

- (1) E. A. DAVIS. 1952. Photosynthetic *Chlorella* mutants. *Amer. J. Bot.*, 39, 535-539.
- (2) R. SAGER. 1955. Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 40, 476-489.
- (3) J. C. LEWIN. 1950. Obligate autotrophy in *Chlamydomonas moewusii*. *Science*, 112, 652-653.
- (4) R. A. LEWIN. 1952. Ultraviolet-induced mutations in *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. *J. gen. Microbiol.*, 6, 233-248.
- (5) W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS kaj J. F. STAUFFER. 1949. Manometric techniques and tissue metabolism. Burgess Publishing Co. Minneapolis.
- (6) A. M. FRENKEL kaj R. A. LEWIN. 1954. Photoreduction by *Chlamydomonas*. *Amer. J. Bot.*, 41, 586-589.
- (7) M. B. ALLEN. 1952. The cultivation of Myxophyceae. *Arch. Mikrobiol.*, 17, 34-53.