

<sup>1</sup>К.В. Квитко, <sup>1</sup>А.В. Мигунова,  
<sup>1</sup>И.Н. Гапонова, <sup>1</sup>К.П. Воробьев,  
<sup>1</sup>М.А. Фирсов, <sup>2</sup>М.С. Раутиан,  
<sup>3</sup>Д.В. Карелов, <sup>4</sup>Е.Е. Андронов

<sup>1</sup>Государственный университет, кафедра микробиологии, Санкт-Петербург; <sup>2</sup>БиНИИ, лаборатория кариологии простейших, Санкт-Петербург; <sup>3</sup>Институт ядерной физики РАН; <sup>4</sup>ВНИИСХ РАСХН, Санкт-Петербург

✿ Изучали тройственную симбиотическую систему (ТСС):

*P. bursaria*–*Chlorella*–*Chlorovirus*. В Евразии мы находили только два типа ТСС, названные нами северными (С) и южными (Ю) экотипами. Они обладали отличающимися фенотипами при температуре 32°C (t<sup>S</sup> или t<sup>J</sup>). В северных местах обитания *P. bursaria*, от Карелии до Камчатки, вблизи Байкала и на юге в горах Армении, мы находили только t<sup>S</sup>-штаммы вируса, в Средней Азии — только t<sup>J</sup>-экотип. Найдены два типа геномов по 18 S РНК-генам. По нашим данным — популяции зоохлорелл *P. bursaria* — два клона облигатных симбионтов.

✿ **Ключевые слова:** симбиоз; тройственная симбиотическая система; *Paramecium bursaria*; *Chlorella* sp.; PBCV-вирус (*Chlorovirus*, *Phycodnaviridae*); южный и северный экотипы зоохлорелл и их вирусов; единобразие протеома и генома штаммов зоохлорелл одного экотипа; продукция мальтозы и глюкозы зоохлореллами.

## ПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ТРОЙСТВЕННОЙ СИМБИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ: *PARAMECIUM BURSARIA*–ЗООХЛОРЕЛЛА–ПОРАЖАЮЩИЕ ЕЕ ВИРУСЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Взаимовыгодное сосуществование участников двух симбиотических систем: водоросль-инфузория *Paramecium bursaria* и зеленая гидра *Hydra viridis*-водоросль начали изучать достаточно давно и довольно подробно [21, 27, 40, 42, 53, 57]. Разнообразие *P. bursaria* недавно обсуждено в диссертации С.И. Фокина [15]. Это один из наиболее древних (около 55 млн лет) таксонов рода *Paramecium*, и изучается этот вид в связи с обитающими в нем симбионтами, в основном бактериями рода *Holospira*, хотя от других видов рода он отличается практически облигатным симбиозом с хлореллоподобными фотосинтетиками. Эти водоросли, *Chlorella* sp. — обитатели клеток инфузорий, разделены на группы по типу питания: штаммы 241–80 и *Pbi*, изолированные из популяции пруда Ботанического сада в г. Геттинген, способны усваивать как аммонийный, так и нитратный азот, а штаммы из американских популяций *NC64A* и *211–6* не используют нитраты [30]. Различны эти штаммы и по экскретируемым ими сахарам [2, 32].

Разнообразие зоохлорелл в коллекциях очень ограничено, так как, при их изоляции, большая часть колоний, пятен, образованных при переносе клетки «зеленой» инфузории на плотные среды, гибнет от присутствующего в этом пятне вируса, названного третьим партнером данного симбиоза. Ранее нами было собрано практически все разнообразие двух групп зоохлорелл (из Европы и из Америки) и показана внутрigrупповая идентичность их по 23 изоэнзимам 7 ферментов, по вирусам, к которым они восприимчивы, по поверхностным антигенам, [11, 36], по УП ПЦР-паттернам ДНК и по реакции каждого члена симбиоза на температуру 32° С, подавляющую размножение у европейских изолятов [10, 34, 35]. На основе последнего признака мы предложили разделить вирусочувствительных симбионтов и их хозяев, *P. bursaria* на два экотипа — северный и южный [13], но подтверждение этого различия для всех популяций *P. bursaria* требует значительно большего числа изученных клонов зоохлорелл. Еще

меньше информации имеется о зоохлореллах, обитающих в зеленой гидре (*Hydra viridis*), так как при попытках выделить эти симбиотические водоросли, удавалось наблюдать их лишь в течение нескольких часов после разрушения тканей гидры. Объяснение этому дано в экспериментах R.H. Meints и J. L. Van Etten [39, 65], в которых вслед за разрушением ткани гидр всегда следовало появление размножившегося вируса, т. е. ситуация тройного симбиоза в семи изученных ими культурах *Hydra viridis* определяла лизис хлорелл, которые будучи вирусочувствительными, не могли быть сохранены в коллекции по причине обязательного присутствия в системе вируса.

Данная ситуация специфична для симбиотических систем, где имеется третий участник — вирус зоохлорелл, оказывающий, на наш взгляд, определяющее воздействие на консолидацию популяции агамного сожителя инфузории, уничтожая все варианты уклонений от типового клона симбиотической водоросли.

#### СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ИНFUЗОРИЕЙ И ХЛОРЕЛЛОЙ

Инфузория *Paramecium bursaria* может содержать несколько сотен клеток зоохлорелл, чувствительных к специфическому вирусу зеленых водорослей рода *Chlorella*. Клетка зоохлореллы окружена индивидуальной периальгальной вакуолью (измененной потенциально «пищевой») таким образом, что вакуоль предохраняет хлореллу от переваривания и от случайного контакта с вирусными частицами, попадающими в пищевые вакуоли. Размножение клеток зоохлорелл и симбиотических инфузурий скоординировано, при освещении культур инфузурий популяция зоохлорелл остается на постоянном уровне. Возможно получение апосимбиотических — «бесцветных» инфузурий [47] — при размножении их клеток в темноте в течение нескольких месяцев. Известны редкие случаи замещения в культурах клонов инфузурий зоохлорелл другими водорослями и дрожжами. [19].

Ранее считалось, что основная связь водоросли и хозяина заключается лишь в том, что фотосинтезирующая клетка зоохлорелл, получая углекислый газ от хозяина в большем количестве, чем могла бы найти в окружающей среде в свободном состоянии, продуцирует с большей интенсивностью кислород, которым она снабжает хозяина — инфузорию [44]. Свободноживущие *Chlorella* sp. в качестве источника азота используют нитраты и аммоний. Водоросли в симбиозе могут использовать глутамин и аммоний, являющийся обычным продуктом обмена у

инфузурий [44]. сейчас показано, что пищевые связи симбионтов богаче, чем обмен  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  и азотом. Показано, что хищник-хозяин (инфузория или гидра) в присутствии симбиотических водорослей становится частично независимым от бактерий, которыми он питается. Водоросли-эндосимбионты характеризуются интенсивной фотосинтетической активностью, продолжающейся даже при слабом освещении. В минеральной питательной среде при недостатке пищи и обилии света зеленые *P. bursaria* растут значительно быстрее особей того же клона, экспериментальным путем лишенных зоохлорелл. Известно, что до 57% всего фиксированного зоохлореллами углерода поступают в организм хозяина в виде сахаров (мальтозы, глюкозы, глюкозо-6-фосфата) [1, 2]. В условиях *in vitro*, коллекционные, освобожденные от клетки-хозяина симбиотические зоохлореллы из *P. bursaria* секретируют в среду относительно большое количество углеводов (до 85%): глюкозы и/или мальтозы, соотношение которых зависит от экотипа водоросли и от значения pH среды [2, 32, 40]. Из работ Вейса [68, 69] было известно, что выделение мальтозы является опознавательным признаком потенциального симбионта для инфузурии в момент образования периальгальной вакуоли и установления симбиотических отношений. Нами изучено выделение углеводов зоохлореллами северного и южного экотипа. В качестве продуктов фотосинтеза в среде с  $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$  были обнаружены: глюкоза, мальтоза и не идентифицированный полимер. Показано [2], что в условиях *in vitro* при pH 6,0 штаммы зоохлорелл южного экотипа синтезируют главным образом мальтозу, а штаммы северного экотипа — мальтозу и глюкозу. Тем самым показано, что три северных штамма из Карельской популяции (ОЧ, ОС-1, ОС-6) ничем не отличаются по данному признаку от штамма 241-80 (Геттинген), а к списку признаков идентичности штаммов северного экотипа добавился еще один — продукция двух сахаров при pH 6,0. Таким образом, установлено, что избыточная продукция углеводов является специфическим, конститутивным признаком зоохлорелл, чувствительных к вирусу.

#### ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ ЗООХЛОРЕЛЛОЙ И ВИРУСОМ

Как было показано в 1978 году супругами Kawakami в работе [28], выполненной в университете г. Хиросима, взаимоотношение вируса и хлореллы в культурах *Paramecium bursaria* определяется их пространственным разделением (рис. 1). Периальгальная вакуоль в цитоплазме хозяина полностью изолирует зоохлореллу от третьего участника

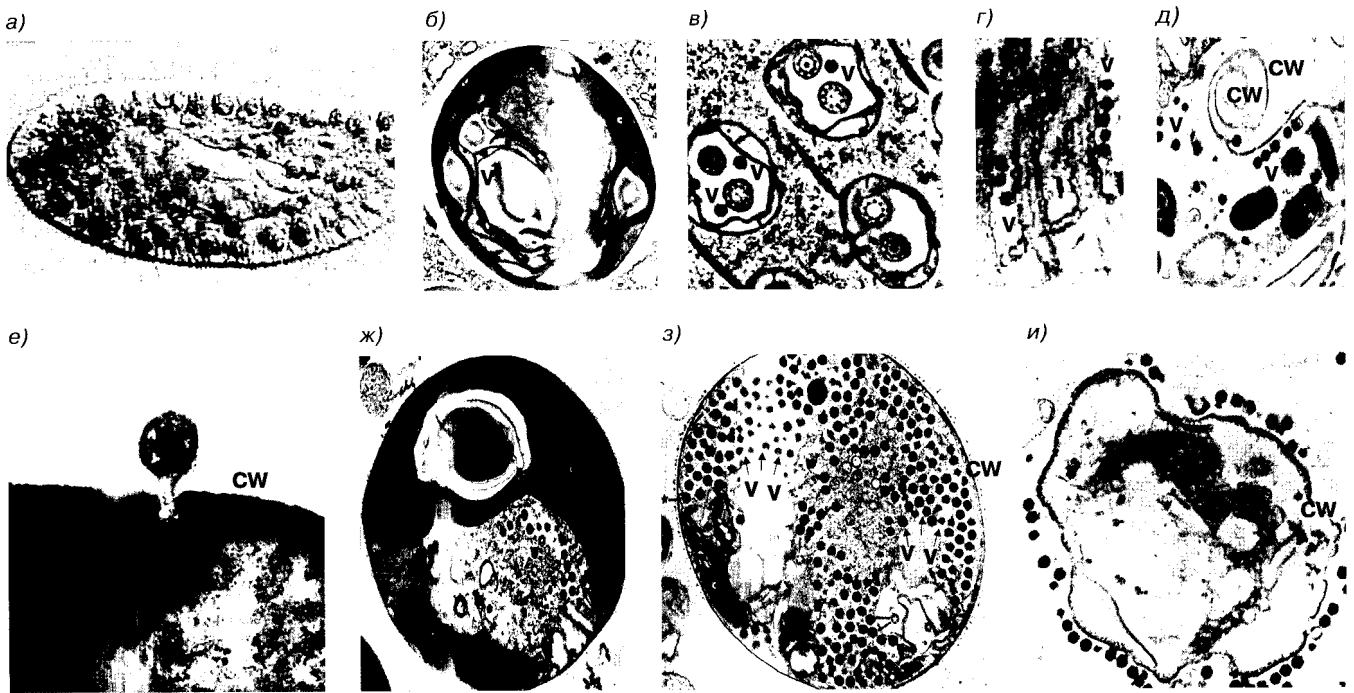


Рис. 1. Вирус зоохлорелл *Paramecium bursaria*: 1а— ориг., 1б-и — фото из работы [28]; V и CW — пояснения в тексте

системы — альгофага (рис. 1а-д) [28] или хлоровируса. Разрушение клеток хозяина — инфузории ведет к вспышке размножения вируса (рис. 1е-и) в клетках водоросли. Верхний ряд (а-д) — это электроннографическое описание тройственной системы *Paramecium bursaria*, зоохлореллы защищены, вирус в изоляции: а — клетка *P. bursaria*, видны симбионты — зоохлореллы. Вокруг клетки — венчик ресничек, прибежище вируса; б — хлорелла в периальгальной вакуоли; в и г — вирус (V) находится в наружных углублениях пелликулы *P. bursaria*, т. е. в каналах ресничек, (вид сверху — в и сбоку — г), а так же в пищевых вакуолях (д), где изредка идет лизис зоохлорелл, зараженных вирусом вне инфузории. От зоохлореллы на срезе пищевой вакуоли осталась оболочка (CW) и несколько частиц вируса (V). Ряд е-и — это события после разрушения инфузорий, с момента контакта зоохлорелл и вируса: е — инфицирование, вирус растворяет стенку жертвы и впрыскивает ДНК; ж — в инфицированной зоохлорелле, началось размножение вируса; з — то же, но через 8 часов, в клетке — сотни вирусов, но лизиса стенки хлореллы и выхода вируса еще нет; и — после лизиса, abortивная сорбция вируса на стенке погибшей зоохлореллы. Таким образом, в этом первом описании тройственной системы основные моменты уже были обозначены. Определяющим условием такого симбиоза является сочетание пространственного разделения и присутствия вируса рядом с потенциальным хозяином.

Работа японских авторов не была замечена в США, R.H. Meints и J.L. Van Etten (университет штата Небраска), изучая водоросли-симбионты семи культур *Hydra viridis*, в 1981–1982 гг. снова обнаружили, что зоохлореллы могут сохраниться интактными лишь только в целых клетках хозяина, точнее, в его периальгальных вакуолях [39, 65]. Через 4–6 час после разрушения гидры вид части клеток зоохлорелл меняется; в клетках появляются вирусы. Через 18 час темп фотосинтеза зоохлорелл в гомогенате клеток *Hydra viridis* падал на два порядка, а через 24 час (в ходе трех циклов реинфекции) полный лизис зоохлорелл осуществляется во всей популяции.

Было найдено три вируса (*HVCV-1, 2 и 3*) и три типа зоохлорелл. Все семь изученных культур гидр оказались вирусоносителями, причем три культуры (из Северной Каролины, из Массачусетса и Небраски) содержали идентичную «безпиреноидную» зоохлореллу и тот же вирус *HVCV-2*. Пары вирус *HVCV-1*–хлорелла также были идентичны в гидрах из Флориды и из коллекции Wards Natural Sci. Supply, Rochester, NY. В двух клонах гидр из Европы (Европейская и Коронейшен) была найдена третья форма зоохлореллы и ее вирус (*HVCV-3*). Сходное вирусоносительство было обнаружено в культуре *Paramecium bursaria*, присланной из Carolina Biological Supply, Burlington, NC. Эти данные были сопоставлены с работой супругов Kawakami и опубликованы [38, 39, 65, 66]. Направление дальнейшей

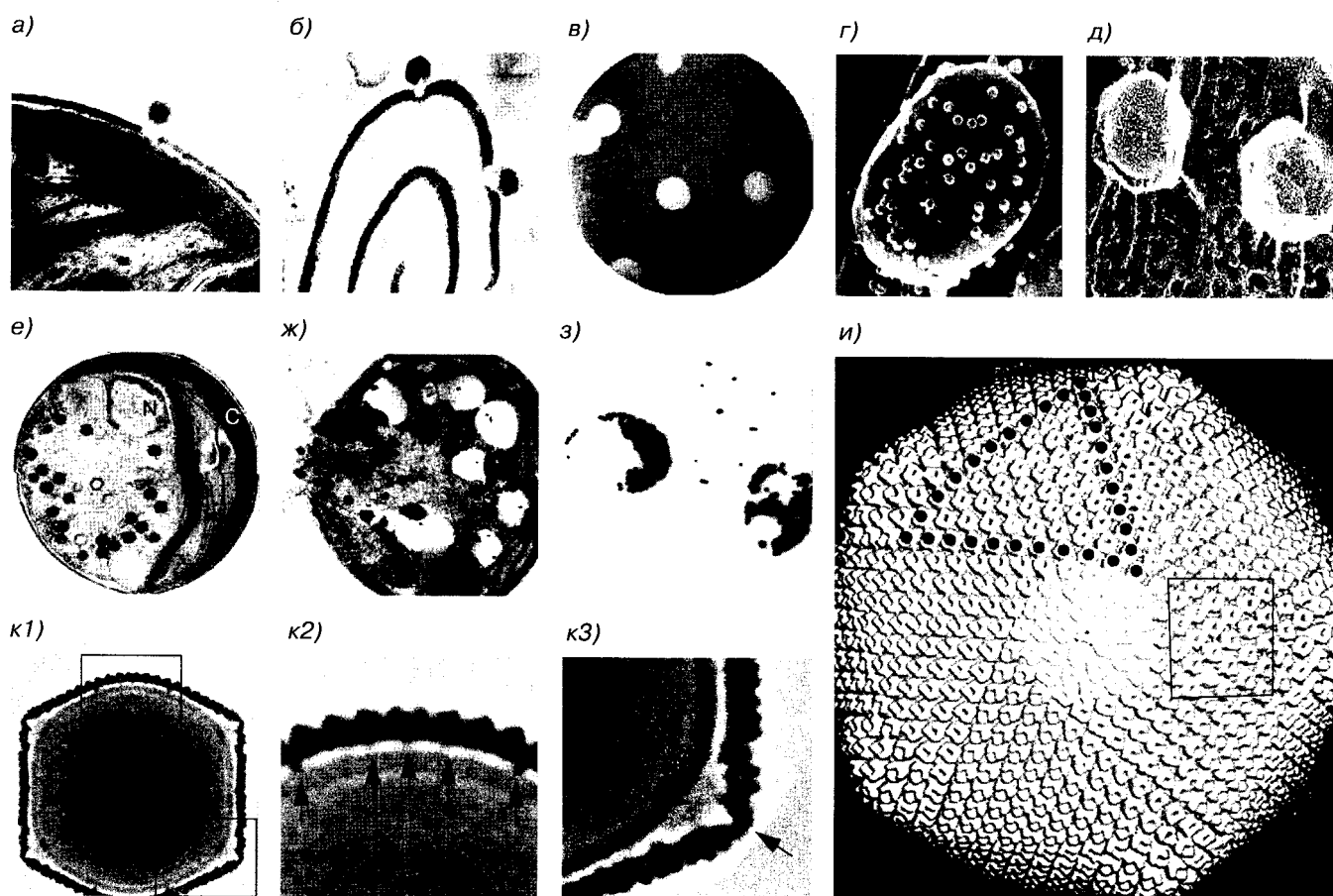


Рис. 2. Вирус PBCV-1 в гомогенатах клеток *P. bursaria* и на газоне NC64A: из работ J.L. Van Etten. (<http://www.plantpath.unl.edu/facilities/virology/index.html>)

работы этой группы было определено тем, что в коллекциях водорослей не удалось найти ни одного штамма, чувствительного к вирусам *HVCV-1*, 2 и 3, а к вирусу *PBCV-1* восприимчивые штаммы NC64A и ATCC30562, зоохлореллы из *P. bursaria*, были найдены [61]. Работа на гидрах была свернута. Позднее никто не проверял уникальный результат этой серии работ — облигатность тройственного симбиоза в трех группах культур *Hydra viridis*, сочетаемая с отсутствием вирусочувствительности у коллекционных изолятов зоохлорелл из гидр. Три лаборатории (Erich Kessler и Volker Huss, Erlangen; Menachem Rahat, Jerusalem; D.C. Smith и Paul McAuley, Oxford, GB), интенсивно изучавшие разнообразие рода *Chlorella*, в том числе, зоохлорелл, не замечали этих работ в течение более десятка лет [25, 26, 29, 30, 31, 33, 37] — работ, доказавших малую вероятность изоляции из культур *Hydra viridis* зоохлорелл вследствие наличия у этого хозяина вирусоносительства. Возможно, поэтому вопрос об истинных культурах симбионтов у зеленых гидр еще не решен. В случае *P. bursaria*, видимо, тройственный симбиоз не столь облигатен, т. е. не каждая

инфузория несет на себе частицы вируса, и поэтому чувствительные к вирусам *PBCV*-культуры зоохлорелл имеются в коллекциях, в чем мы убедились, когда занялись этой проблемой.

С 1982 г. в университете штата Небраска и в ряде других лабораторий США началась работа с вирусом *PBCV-1*, поражающим *Chlorella* sp., NC64A. На этом штамме был возможен учет потомства единичных вирусных частиц по образуемым бляшкам лизиса (рис. 2в), что дало возможность изучать изменчивость вируса, отбирать мутантов и применять стандартные вирусологические методы работы, сочетающиеся с молекулярно-генетическими подходами. Генетик Irvin Tessman получил у вируса *PBCV-1* серию  $t^s$ -мутантов, чувствительных к 32°C. Затем путем смешанной инфекции и отбора гибридов при температуре 32°C, он смог установить сцепление трех  $t^s$ -мутаций [56]. К сожалению, такая работа далее не проводилась. За 20 лет работы Вирусологического центра в штате Небраска было осуществлено более ста работ, завершившихся полным секвенированием генома *PBCV-1* и детальным анализом его структуры и функции, а также описа-

нием полиморфизма вирусов [58, 59, 60]. Часть полученного ими материала представлена на рис. 2. На рис. 2а можно увидеть начало инъекции, т. е. сорбцию и растворение стенки хозяина; фрагмент 2б — это абортивная сорбция, осуществляемая на пустых оболочках зоохлорелл; 2в — образование так называемых бляшек: пятен лизиса на газоне зоохлореллы штамма *NC64A*; 2г — сорбция вирусов на поверхности стенки живой зоохлореллы. Множество их отражает наличие около 5000 мест посадки вируса на клетке хозяина. На фрагменте 2д видны рецепторы вируса, которыми он прикрепляется к рецепторам на клеточной стенке зоохлореллы перед моментом инъекцией ДНК; 2е и 2ж — стадии жизненного цикла вируса (размножение и лизис клетки хозяина); 2з — свечение ДНК, окрашенные ДАПИ частицы вируса в клетках и во взвеси (негатив); 2и — трехмерная реконструкция вириона *PBCV-1* (190 нм), полученная на основе техники «остекления», выделены участки, разные по набору капсомеров — белков поверхности. Рис. 2к1–2к3 — разрез вириона (к1), выделенные участки представлены на к2 и к3; в к2 указаны контакты (↑) капсомеров с мембраной; в к3 видны скопления белков вблизи каналов (←) над двухслойной липидной мембраной. Список публикаций этой группы обновляется на сайте ([www.plantpath.unl.edu](http://www.plantpath.unl.edu)).

Таким образом, в университете штата Небраска детально охарактеризован один из множества штаммов крупного вируса зоохлорелл *PBCV-tuna*,

которым, видимо, предстоит стать модельными вирусами, с линейной, ковалентно замкнутой дсДНК размером около 330 т.п.н, источником множества нужных для биотехнологии генов [70], потенциальным вектором для клеток водорослей и растений. Вирусы зоохлорелл из *P. bursaria* (*PBCV*) и из *Hydra viridis* (*HVCV*) — одни из наиболее крупных среди эукариотических вирусов (около 200 нм). Их двуничатая ДНК, размером 330 тпн, имеет линейную структуру с теломерами. Вирусы отнесены к роду *Chlorovirus* семейства *Phycodnaviridae* [59, 60]. Водоросли — хозяева вирусов семейства *Phycodnaviridae*, очень разнообразны и включают: *Chlorophyta* (*Chlorella* sp. из *H. viridis* и *P. bursaria*), *Prasinophyceae*, (*Micromonas pusilla*), *Prymnesiophyceae* (*Chrysochromulina brevifillum*) и *Phaeophyceae* (*Ectocarpus siliculosus* и семь других видов) [62, 64]. За исключением хозяев рода *Chlorovirus*, все остальные водоросли — свободноживущие формы. Детально изучены вирусы *Micromonas pusilla* и *Ectocarpus siliculosus* [22, 23, 54, 55, 62]; отмечено наличие широкой изменчивости вирусов и их хозяев, но никакой закономерности в этом явлении не наблюдалось.

#### СЕВЕРНЫЕ И ЮЖНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСОВ ЗООХЛОРЕЛЛ

Вирусы зоохлорелл *Paramecium bursaria*, найденных в США, Японии и в других странах с теплым климатом [28, 60, 65, 66, 71, 72] отличались по серо-

Таблица 1

Наличие вирусов в культурах клонов *Paramecium bursaria* [6, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 34, 35, 41, 42]

Место изоляции клона	Географическая широта	Кол-во клонов в анализе	Кол-во клонов с южным (Ю) типом вируса	Кол-во клонов с северным (С) типом вируса	Концентрация вируса, БОЕ/мл
<i>Северная Америка</i> : Бостон	43°	13	4	0	640
<i>Азия</i> : Япония	45°	8	4	0	159–400
Камчатка	>52°	5	0	3	12–100
Дальний Восток	>49°	18	2	9	–
о. Байкал	>52°	1	0	0	0
Душанбе + Тигровая Балка	39–40°	27	9	0	–
<b>Всего в Азии</b>	<b>39–52°</b>	<b>59</b>	<b>15 (25,4%)</b>	<b>12 (20%)</b>	<b>0,12–400</b>
<i>Европа</i> : Санкт-Петербург	60°	28	0	13	157–94 200
Район Белого моря	>63°	52	0	38	3
Онежское озеро	>63°	1	0	1	–
Куршская коса + Балтика	51–55°	1+4	0	1+4	–
Армения (высокогорье)	>39°	4	0	2	7800
Грузия	>41°	2	0	0	0
Крым	>44°	2	0	0	0
Украина	>46°	1	0	1	50 000
Польша	>52°	1	0	0	0
Франция	>42°	6	0	6	48
Германия	>47°	1	0	1	–
<b>Всего в Европе</b>	<b>39–63°</b>	<b>103</b>	<b>0</b>	<b>67 (65%)</b>	<b>0,1–50 000</b>
Астрахань и Астр. заповедник	40°	79	2 (2,5%)	20 (25%)	–
Клоны без зоохлорелл, от Карелии до Крыма	44–67°	6	0	0	0

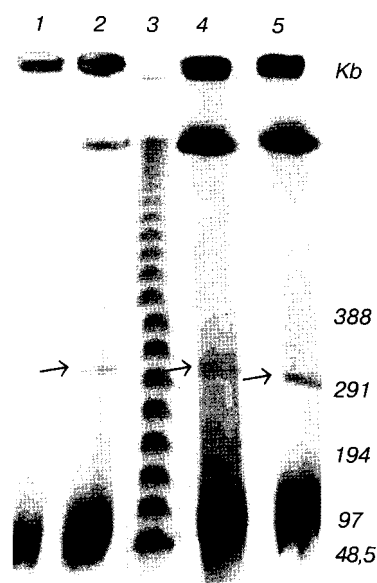


Рис. 3. Разделение суммарной ДНК биомассы клеток 4-х клонов *P. bursaria*, негатив из работ [17, 18, 43]:

полоса 1 — инфузория без симбионтов, «белая»; полоса 3 — конкатамеры ДНК фага  $\lambda$ ; полосы 2, 4, 5 — клоны *P. bursaria*, вирусоносители с зоохлореллами, видна ДНК зоохлорелл и ( $\uparrow$ ) ДНК вирусов. Шкала размера фрагментов в т.п.н. (kb)

логии, по рестрикционным паттернам ДНК, но все эти вирусы имели одного хозяина — штамм *NC64A*, выделенный из южного клона инфузорий.

Наша с Б.В. Громовым работа [6] началась после статьи R.H. Meints и J. L. Van Etten и др., 1983 г. [61] о вирусах зоохлорелл из культуры *P. bursaria*. Наше преимущество было в том, что мы могли изучать неограниченное число культур инфузорий, так как в Биологическом институте СПбГУ Д.В. Осиповым уже была создана коллекция культур инфузорий рода *Paramecium* [14, 15]. В первые же дни работы мы тестировали десяток культур инфузорий на наличие вирусоносительства. Кроме того, в БИНИИ СПбГУ имелись представители мирового разнообразия зоохлорелл в коллекции водорослей CALU [3, 4]. Поэтому мы испытывали искомые вирусы на газонах зоохлорелл, выделенных как из американских культур *P. bursaria*, так и из европейских популяций [9, 13, 41]. Уже в первых опытах 1983 года нам удалось выявить [6, 8] новую группу вирусов, способных поражать клетки штамма 241-80, изолированного Wulf Koch (куратором коллекции водорослей SAG) из клеток клона *P. bursaria*,

Таблица 2

Вирусы зоохлорелл в пресных водах, F — частоты проб с вирусами южного (ю) и северного (с) экотипа

Регион обследования	Число проб	Число проб с вирусами	Экотип вируса	Частота проб с вирусами F
США, данные 1985, [67]	25	13	Ю	0,52
Канада: Торонто, Park Lake	8	1	С	0,125
Бразилия: водопад Парана	3	3	Ю	1,0
Центральная Европа: Варшава	3	3	С	1,0
Амстердам	4	4	С	1,0
Копенгаген	3	3	С	1,0
Прага	6	5	С	0,83
<b>Всего</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>С</b>	<b>0,938</b>
Северо-Запад и центр России: Карелия	169	84	С	0,497
Архангельск	10	7	С	0,7
Вологда	65	33	С	0,507
о. Валаам, 1994 г.	26	16	С	0,62
о. Валаам, 1995 г.	50	42	С	0,84
Ладожское озеро вблизи о. Валаам	47	1	С	0,02
р. Печора	18	9	С	0,5
Реки и пруды Санкт-Петербурга	182	140	С	0,77
Саратов	6	4	С	0,67
Северный Кавказ: Нальчик	7	4	С	0,57
<b>Всего в Европе</b>	<b>500</b>	<b>340</b>	<b>С</b>	<b>0,68</b>
Астрахань и Астраханский заповедник	67	23	2Ю + 21С	0,05 + 0,31
Сибирь: Таймыр	10	0	—	<0,1
Сургут	3	2	С	0,67
Томск	18	14	С	0,78
Реки Байкальского бассейна	12	6	С	0,5
о. Байкал	12	2	С	0,17
<b>Всего в Сибири</b>	<b>55</b>	<b>24</b>	<b>С</b>	<b>0,436</b>
Средняя Азия: Ташкент	4	2	Ю	0,5
Душанбе + Тигровая Балка	7	4	Ю	0,57
Иерусалим	6	1	Ю	0,17
Сев. Китай: р. Черная, Динихе, Вейхе	7	6	Ю	0,86
Антарктида: пруды Оазиса Бангера	42	0	—	<0,023

обитателя пруда Ботанического Сада в Геттингене, Германия. Большая выборка клоновых культур этого вида была изолирована и проанализирована за три года в работе Е.С. Краевой, это были инфузории из пресных водоемов Карелии и Мурманской области [9]. Более половины клонов из 40 мест обитаний оказались вирусносителями. Тогда же ею был выделен клон зоохлореллы ОЧ, аналог штамма 241–80, из популяции инфузорий болота вблизи о. Черливое Лоухского района Карелии [7]. Таким было начало этого исследования, посвященное разнообразию вирусов и зоохлорелл, обитавших в Европе. Вскоре после наших работ появились публикации В. Рейссера, нашедшего вирусы, поражающие штамм *Pbi*, клон зоохлореллы, выделенной одновременно с клоном 241–80 [46–52]. Как наша (табл. 1 и 2), так и геттингенская коллекции вирусов отличались от вирусов, найденных группой Дж. Ван Эттена. Используемые нами зоохлореллы были названы европейскими, а вирусы по их штаммовой специфичности — *NC64A-muna* и *Pbi-muna* [48, 49, 50, 51]. Из табл. 1 следует, что 2/3 клонов в европейских популяциях *P. bursaria* являются носителями вирусов северного экотипа, исключение было найдено лишь для культур инфузорий из вод Волги в районе Астрахани и Астраханского заповедника, где были найдены вирусы 2-х экотипов (из 79 клонов 20 имели вирус северного и 2 — южного экотипа). В Азии вирусносительство обнаружено более чем в 50%, при этом южные популяции инфузорий имеют южные экотипы вирусов, на Камчатке — северные, а культуры с российского Дальнего Востока как и астраханские имеют оба экотипа. Таким образом, исключения встречаются на границе регионов [13] с различиями в климате.

На рис. 3 представлено разделение тотальной ДНК *P. bursaria*, т.е. симбиотической системы [17, 18, 43], осуществленное методом пульс-электрофореза, позволяющим разделять очень большие (до 5 млн п.н.) молекулы ДНК без нарушения их целостности. Видно, что у клонов *Paramecium bursaria*, содержащих симбиотических зоохлорелл, наблюдаются две интенсивные полосы в зоне разделения высокомолекулярных фрагментов (более 2500 т.п.н.). Предполагается, что одну из них (у всех 4-х клонов) образуют хромосомы микронуклеуса *Paramecium bursaria*, а вторую (у симбиотических клонов инфузорий) — хромосомная ДНК зоохлорелл. У трех симбиотических клонов инфузорий выявляется узкая полоса, размер которой составляет 300 т.п.н. Нами [17, 18, 43] было показано присутствие вирусов в тех клонах инфузорий, в ДНК которых была обнаружена полоса 300 т.п.н. Очищенная ДНК вируса давала такую же полосу, около 300 т.п.н.

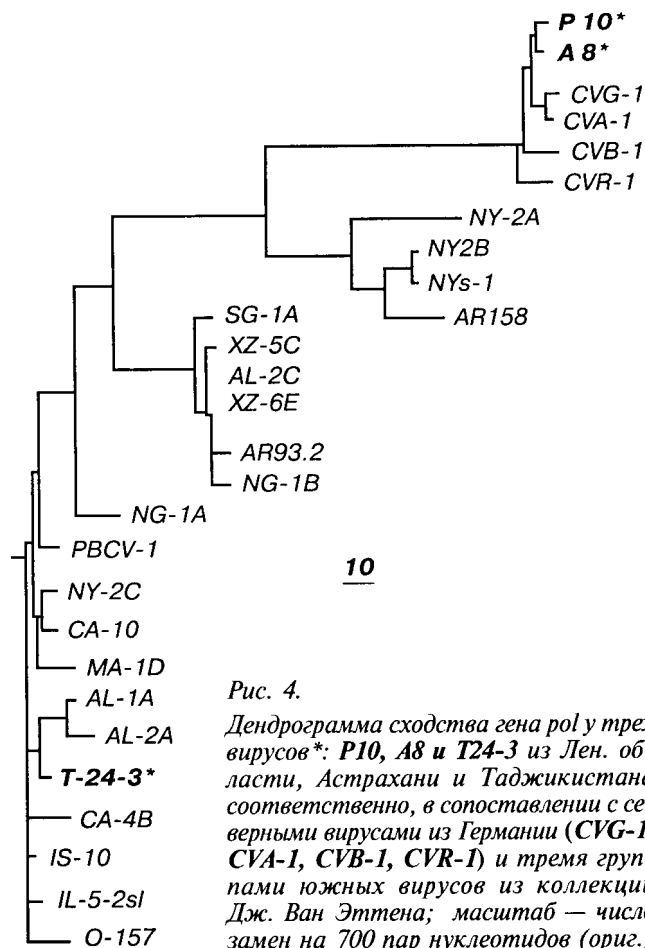


Рис. 4. Дендрограмма сходства гена *pol* у трех вирусов\*: P10, A8 и T24-3 из Лен. области, Астрахани и Таджикистана соответственно, в сопоставлении с северными вирусами из Германии (CVG-1, CVA-1, CVB-1, CVR-1) и тремя группами южных вирусов из коллекции Дж. Ван Эттена; масштаб — число замен на 700 пар нуклеотидов (ориг.)

Для идентификации вирусов северного и южного фенотипа помимо тестирования реакции на температуру в момент культивирования ( $t^S$ - и  $t^T$ -фенотип) и определения круга хозяев, мы осуществляли сиквенирование гена *pol* — гена ДНК-полимеразы.

Длина гена ДНК-полимеразы приблизительно равна 2700 пар нуклеотидов. В составе гена различают два домена: полимеразный и экзонуклеазный. В полимеразном домене имеется достаточно консервативный участок длиной приблизительно в 680 нуклеотидов. К концам этого участка подобраны консервативные праймеры: EGA и YSK; дополнительно был синтезирован консервативный праймер YGD способный отжигаться внутри полимеразного домена (все праймеры названы по первым трем аминокислотам). На рис. 4 приведена родословная, дендрограмма сходств, построенное по доступным в интернете сиквенсам вирусов из лаборатории Ван Эттена с добавлением данных о трех наших изолятах — штаммах вирусов из контрастных климатических зон: P10 — северный из популяции инфузорий Ленинградской области; A8 — северный экотип из Астраханской области, т. е. с границы ареала, где встречаются как северные, так и южные

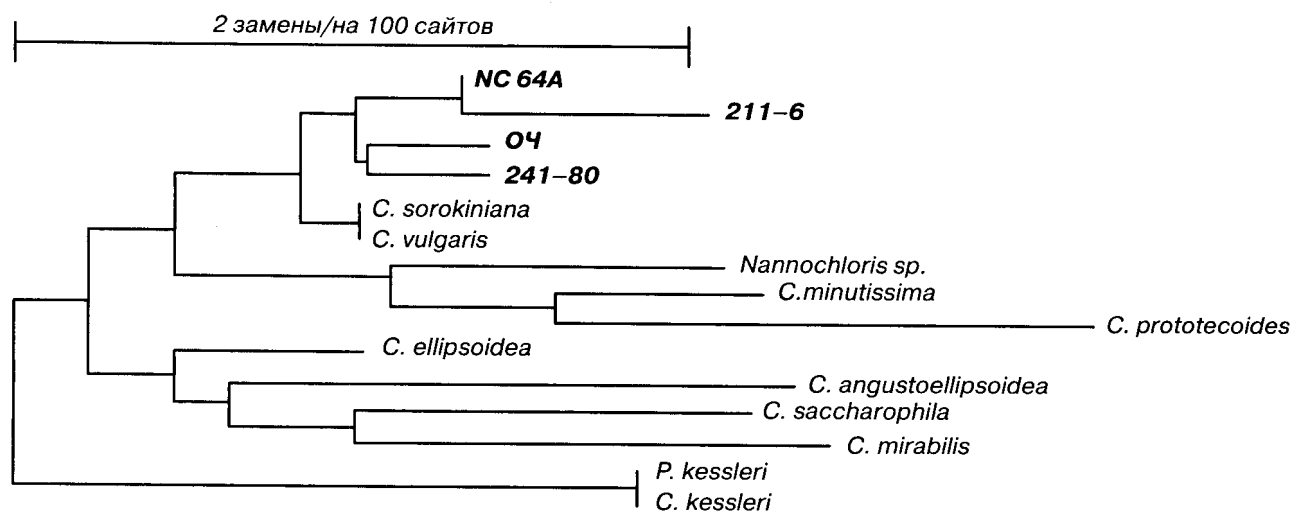


Рис. 5. Дендрограмма генетического родства зоохлорелл (241-80, ОЧ, 211-6 и NC64A) и видов рода *Chlorella*; построена на основании фрагмента 3-296 пн гена 18 S РНК (ориг.); accession numbers даны в приложении С. 37

вирусы; Т24-3 — популяция Тигровой Балки, самой южной точки бывшего СССР, субтропики. Все северные вирусы, как штаммы В. Райссера (*CVG-1*, *CVA-1*, *CVB-1*, *CVR-1*), так и наши (*P10* и *A8*) — очень компактная группа; наиболее близкая к ним группа южных вирусов собрана вблизи Канады, где нами также были найдены северные вирусы. Вирус Т-24 из популяции Таджикистана принадлежит к типу вирусов РBCV1, лучше всего изученных в лаборатории Дж. Ван Эттена в университете штата Небраска США.

Проще и продуктивнее оказался анализ проб вод пресных водоемов на предмет наличия вирусов на газонах двух типов зоохлорелл: северных и южных (табл. 2). Аналогичные данные опубликованы: по водам США [67] и для водоемов Японии [71, 72]. Частоты (F) проб с вирусами близки к 50% и выше. Полное отсутствие вирусов наблюдалось в водах Таймыра и Антарктики ( $F < 0,1$  и  $F < 0,023$ ). Низкая частота встречаемости вирусов была характерна для проб из открытой части вод Ладоги и Байкала ( $F = 0,021$  и  $F = 0,17$ ). В целом, высокие титры РBCV-вирусов характерны для эвтрофированных вод, но без токсичных загрязнений. Когда в эвтрофированные воды попадает примесь техногенных загрязнений, титр вируса понижается, подобно индексу лихноиндикации состояний воздуха вблизи источника задымления. Мы назвали этот признак вод (титр вируса зоохлорелл) «симбиотическим индексом». Обследование вод в окрестностях полигона Красный Бор в Лен. области показало четкую связь этого индекса с уровнем самоочистки вод [5]. Загрязнения вод Cd, Cu, Zn отрицательно коррелировало с числом бляшкообразующих единиц ( $R = -0,8$ ), но в чистых водах, на острове Валаам, эта связь была

слабой ( $R_{cu} = -0,36$ ). Более того, там была найдена положительная корреляция ( $R = 0,73$ ) титра вируса зоохлорелл с количеством гумусовых примесей в воде и общим уровнем эвтрофирования [5].

#### ПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗООХЛОРЕЛЛ

Разнообразие зоохлорелл очень ограничено. Нами была показана внутривидовая идентичность по изоэнзимам 7 ферментов [36], по чувствительности к температуре 32° С, по поверхностным антигенам и по UP PCR-патернам [10, 11, 24, 35], что позволило разделить их на две группы — северного (*ОЧ*, *ОС-1*, *ОС-6*, *241-80*, *Pbi*) и южного (*NC-64-A*, *NIA*, *211-6*) экотипов.

В недавней публикации японских авторов [20] утверждается, что *211-6* и *NC64A* — разные виды и приводятся данные о различии их кариотипов. По нашему мнению, для рода *Chlorella* это различие не видового ранга, т.к. кариотип хлорелл изменчив, особенно легко меняются размеры мелких хромосом, например, для этого, по данным той же лаборатории Т. Yamada [73], достаточно облучить клетки пучком электронов.

Для оценки степени их родства нами проведено риботипирование на ДНК этих штаммов. Была просеквенирована последовательность гена 18S РНК, первых 420 нуклеотидов, у трех штаммов зоохлорелл — *241-80*, *ОЧ* и *NC64A*, а для штамма *211-6* — последовательность в 294 нуклеотида. Большая часть гена изучена методом рестрикции. Компьютерную обработку полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ: Vector NTI 8, TotalLab v2.01, Mega2, ClustalX (1. 81). Сравнение последовательностей с банком генов



GenBank осуществляли через компьютерную сеть — [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) — с использованием программы BLAST (Altschul et. al., 1990). На концевом участке гена 18S РНК (1275–1766) нами был выявлен интрон размером около 500 пн в ДНК 3-х штаммов зоохлорелл южного экотипа (*NC64A*, *NIA*, *211-6*), отсутствующий у 3-х штаммов северного экотипа (*ОЧ*, *241-80*, *Pbi*) и 2-х штаммов свободноживущих *C. vulgaris* (*CALU-183*, *CALU-57*). На другом участке гена 18S РНК (86–1315) таких различий между зоохлореллами двух экотипов не наблюдалось, и у всех зоохлорелл была выявлена вставка около 300 пн, отсутствующая у двух штаммов *C. vulgaris*. Фрагменты были подвергнуты рестрикции 3-мя рестриктазами: *Msp* I, *Hae* III, *Alu* I. В каждом случае наблюдалось сходство штаммов внутри экотипов и различия между группами. По результатам секвенирования построена дендрограмма генетического родства (рис. 5). Показано, что штаммы не принадлежат ни одному из известных видов *Chlorella*, но попарно сходны и оба экотипа ближе всего к кластеру видов *C. vulgaris*—*C. sorokiniana*.

Сейчас мы не можем окончательно определить ранг различий выявленных нами двух экотипов зоохлорелл, но загадка единообразия протеома и геномных признаков в каждой из групп требует объяснения, и мы видим это объяснение в совпадении признаков вирусочувствительности и продукции сахаров, возможно, связанных с единством мест рецепции и мест транспорта сахаров на поверхности клеток зоохлорелл. Подобная ситуация может сложиться в том случае, когда белки транспорта сахаров принимают участие в рецепции вирусов.

Возможно, что длительное размножение эндосимбионтов под контролем специфичного вируса, постоянно присутствующего в популяциях *P. bursaria* снизило изменчивость зоохлорелл. Произошло резкое ограничение экологической ниши обитания этих водорослей, сузившее разнообразие клонов вирусочувствительных продуцентов сахаров для инфузорий. Таким образом, именно тесное взаимодействие всех трех компонентов симбиотической системы может быть причиной «консервативности» зоохлорелл, ограничивает ее изменчивость, заставляя продуцировать сахара и не покидать хозяина — инфузорию.

Работа поддержана грантами РФФИ № 98-04-49842 и 02-04-49676.

#### Приложение:

Accession numbers:

1. *C. angustoeilipsoidea* — AV006047
2. *C. kessleri* — X56105
3. *C. sorokiniana* — X62441
4. *C. vulgaris* — AVQ80308
5. *C. minutissima* — AV006046

6. *C. mirabilis* — X74000
7. *Nannochloris* — AJ131691
8. *C. ellipsoidea* — X63520
9. *C. saccharophilla* — X63505
10. *C. prototecooides* — AJ439399
11. *Chlorella* sp. — SAG 211-6—AY876290
12. *Chlorella* sp. — SAG 241-80—AY876291
13. *Chlorella* sp. — NC64A—AY876294
14. *Chlorella* sp. — OCH—AY876295

#### Литература

1. Гапонова И.Н., Мигунова А.В., Квитко К.В. Исследование секрети сахаров «северными» зоохлореллами — симбионта и *Paramecium bursaria* в условиях *in vivo* и *in vitro* // Тезисы докладов на V научной сессии МБС СПбГУ., 6 февр. 2004. — С. 65–66.
2. Гапонова И.Н., Мигунова А.В., Квитко К.В. Исследование секрети сахаров «северными» зоохлореллами — симбионтами *Paramecium bursaria* в условиях *in vivo* и *in vitro* // Вестник СПбГУ., 2004. В печати.
3. Громов Б.В., Титова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. — Л., 1983. — С. 3–27.
4. Громов Б.В., Титова Н.Н. CALU — коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Санкт-Петербургского университета // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. — М., 1991. — С. 76–125.
5. Квитко К.В., Войцеховский Е.В., Мигунова А.В., Пиох Д., Линц Б. Симбиотический индекс, как оценка состояния водных экосистем на примере водоемов полигона Красный Бор и его окрестности // Вопросы экологии и охраны природы. — СПб.: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 1994. — Вып. 4. — С. 47–57.
6. Квитко К.В., Громов Б.В. Новые находки титруемого инфекционного вируса хлореллы // Докл. АН СССР. — 1984. — Т. 279, № 4. — С. 998–999.
7. Квитко К.В., Краева Е.С., Чернышева А.В. Генетическая маркировка зоохлорелл — хозяев вирусов PBCV // Вестник ЛГУ. — Сер. 3. — Вып. 1. — 1988. — С. 120–124.
8. Квитко К.В., Скобло И.И., Краева Е.С., Сквородина Е.В., Воронина Т.А. Изменчивость вирусов и чувствительных к ним зоохлорелл из *Paramecium bursaria* // Тез. VII съезда ВМО. — Алма-Ата, 1985. — Т. 6. — С. 32.
9. Краева Е.С. Изучение тройственности симбиоза *Paramecium bursaria*—*Chlorella*—вирус // Дипл. раб. каф. микробиологии ЛГУ. — Л., 1986. — С. 47.
10. Мигунова А.В. Исследование водорослей в симбиотической системе: *Paramecium bursaria*—*Chlorella* sp.—вирус PBCV (сем. Phycodnaviridae): Дис. ... канд. биол. наук. — СПб., 2002. — 123 с.
11. Мигунова А.В., Квитко К.В., Князева Н.В. Изменчивость серологических характеристик маркированных штаммов зоохлорелл — симбионтов *Paramecium bursaria*, чувствительных к вирусу // Альгология. — 1992. — Т. 2, № 3. — С. 43–48.
12. Мигунова А.В., Квитко К.В., Прокошева М.Ю., Литвинов Д.Б. Влияние температуры на размножение *P. bursaria*—*Chlorella*—PBCV-1-вирусов в системе тройного симбиоза // Вестник СПбГУ. — 2000. — Сер. 3. — Вып. 1. — С. 65–75.
13. Мигунова А.В., Квитко К.В., Скобло И.И. и др. Экология симбиотической системы *P. bursaria*—*Chlorella*—вирус // Вест. СПбГУ. — 1999. — Сер. 3. — Вып. 3. — №. 17. — С. 131–144.
14. Скобло И.И. Распространение сингенов инфузории *Paramecium bursaria* на территории Советского Союза // В сб. Экология морских и пресноводных простейших. — Ярославль, 1989. — С. 63.
15. Фокин С.И. 2002. Ревизия рода *Paramecium* O.F. Muller, 1773: сравнительно-биологический анализ, систематика и

- филогенетические связи: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — 32 с.
16. Фирсов М.А., Карелов Д.Б., Квитко К.В. Сравнительный анализ генов *pol* вирусов семейства *Phycodnaviridae* // Тезисы III съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. — М., 6–12 июня 2004. — С. 448.
  17. Яценко В.В., Мигунова А.В., Потехин А.А. и др. Исследование механизма протекции симбиотических зоохлорелл из *Paramecium bursaria* от литического действия вируса *PBCV* // Тезисы III съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. — М., 6–12 июня 2004. — С. 433.
  18. Яценко В.В., Потехин А.А., Мигунова А.В., Раутиан М.С. Электрокаротипирование системы тройного симбиоза *Paramecium bursaria*—*Chlorella* sp.—*PBCV* (*Paramecium bursaria*, *Chlorella* virus, сем. *Phycodnaviridae*) из разных географических точек // Аничковский вест., матер. конф. Молодые биологи Ст.-Петербурга — 300-летию города. — СПб. — 2003. — № 33. — С. 52–53.
  19. Bomford R. Infection of alga-free *P. bursaria* with strains of *Chlorella*, *Scenedesmus*, and a Yeast // *J. Protozool.* — 1965. — Vol. 12. — P. 221–224.
  20. Chuchird N., Hiramatsu S., Sugimoto I. et al. Digestion of *Chlorella* Cells by Chlorovirus-encoded Polysaccharide Degrading Enzymes // *Microbes and Environments.* — 2001. — Vol. 16, N 4. — P. 206–212.
  21. Clayton B.C. Metabolic interchange in algae invertebrate symbiosis // *Internal review of Cytology.* — 1983. — Vol. 14. — P. 117–210.
  22. Cottrell M.T., Suttle C.A. Wide spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan, eukariotic marine phytoplankter, *Micromonas pusilla* // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* — 1991. — Vol. 78. — P. 1–9.
  23. Cottrell M.T., Suttle C.A. Genetic diversity of viruses of algal viruses which lyses the photosynthetic picoflagellate *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) // *Appl. Environm. Microbiol.* — 1994. — Vol. 61. — P. 3088–3091.
  24. Gaponova I.N., Migunova A.V., Andronov E.E., Kvitko K.V. Genomic dactyloscopy of «northern» *Chlorella* strains, symbionts of *Paramecium bursaria* // *Schedule and Abstracts of 4-th International Symbiosis Congress Halifax.* Nova Scotia, Canada. Aug. 17–23. — 2003. — P. 143–144.
  25. Huss V.A.R., Frank C., Hartmann E.C. et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) // *J. Phycol.* — 1999. — Vol. 35. — P. 587–598.
  26. Huss V.A.R., Huss G. and Kessler E. Deoxyribonucleic acid reassociation and interspecies relationship of the genus *Chlorella* (Chlorophyceae) // *Plant Syst. Evol.* — 1989. — Vol. 168. — P. 71–82.
  27. Karakashian M.W. Symbiosis in *Paramecium bursaria* // *Symp. Soc. Exp. Biol.* — 1975. — Vol. 29. — P. 145–173.
  28. Kawakami H., Kawakami N. Behavior of a virus in a symbiotic system *Paramecium bursaria*–*Zoochlorella* // *Protozool.* — 1978. — Vol. 25. — P. 217–225.
  29. Kessler E. *Chlorella* — biochemische Taxonomie einer für Forschung und Biotechnologie wichtigen Gattung einzelliger Grünalgen // *Naturwissenschaften.* — 1992. — Bd. 79. — S. 260–265.
  30. Kessler E. and Huss V.A.R. Biochemical taxonomy of symbiotic *Chlorella* strains from *Paramecium* and *Acanthocystis* // *Bot. Acta.* — 1990. — Vol. 103. — P. 140–142.
  31. Kessler E. and Huss V.A.R. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin // *J. Phycol.* — 1992. — Vol. 28. — P. 550–553.
  32. Kessler E., Kauer G. and Rahat M. Excretion of the sugar by *Chlorella* species capable and incapable of symbiosis with *Hydra viridis* // *Bot. Acta.* — 1991. — Vol. 104. — P. 58–63.
  33. Kessler E., Huss V.A.R., Rahat M. Species-specific ability of *Chlorella* strains (Chlorophyceae) to form stable symbioses with *Hydra viridis* // *Pl. Syst. Evol.* — 1988. — Vol. 160. — P. 241–246.
  34. Kvitko K.V., Migunova A.V., Gaponova I.N., Zelennicova O.A. and Rautian M.S. Symbiosis system: *Paramecium bursaria*, *Chlorella*, *PBC* Viruses in southern and northern populations // *Schedule and Abstracts of 4-th International Symbiosis Congress Halifax.* Nova Scotia, Canada. Aug. 17–23. — 2003. — P. 143–139.
  35. Kvitko K.V., Migunova A.V., Karelov D.B., Prokosheva M.Ju. Molecular taxonomy of virus-sensitive *Chlorella* sp. — symbionts of *Paramecium bursaria* // *Protistology.* — 2001. — Vol. 2, N 2. — P. 96–104.
  36. Linz B., Linz A., Migunova A.V., Kvitko K.V. Correlation between virus-sensitivity and isoenzyme spectrum in symbiotic *Chlorella*-like algae // *Protistology.* — 1999. — Vol. 1, N 2. — P. 76–81.
  37. McAuley P.J. The cell cycle of symbiotic *Chlorella*. I. The effect of host feeding and starvation // *J. Cell Sci.* — 1985. — Vol. 77. — P. 241–253.
  38. Meints R.H., Lee K., Burbank D.E., Van Etten J.L. Infection of a *Chlorella*-like alga with the virus, *PBCV-1*: ultrastructural studies // *Virology.* — 1984. — Vol. 138. — P. 341–346.
  39. Meints R.H., Van Etten J.L., Kuczarski D., Lee K. and Ang B. Viral infection of the symbiotic *Chlorella*-like alga present in *Hydra viridis* // *Virology.* — 1981. — Vol. 113. — P. 698–703.
  40. Muskatine L. Symbiosis of hydra and algae. III Extracellular products of the algae // *Comp. Biochem. Physiol.* — 1965. — Vol. 16. — P. 77–92.
  41. Migunova A.V., Scoblo I., Kraeva E., et al. *Zoochlorella* viruses carrier status of *P. bursaria* // *Abstracts of X-th International Congress of Virology.* Aug. 11–16. Jerusalem. Israel. — 1996. — P. 251.
  42. Pardy R.L. The morphology of green *Hydra* endosymbionts as influenced by host strain and host environment // *J. Cell Sci.* — 1976. — Vol. 30. — P. 655–669.
  43. Rautian M.S., Yaschenko W., Potekhin A. et al. Triple symbiotic system of *P. bursaria*–*Chlorella*–*Chlorella* viruses: study by means of pulsed field gel electrophoresis // *Program and Abstracts of 4-th European Congress of Protistology and 10-th European Conference on Ciliat Biology San Benedetto del Tronto (AP) Italy.* Aug. 31–Sept. 5. — 2003. — P. 52.
  44. Reisser W. Die stoffwechselfysiologischen Berichugen zwischen *P. bursaria* Ehrbg. und *Chlorella* sp. in der *P. bursaria* — symbiose // *Arch. Microbiol.* — 1976. — Vol. 107. — P. 357–360.
  45. Reisser W. The metabolic interaction between *P. bursaria* Ehrbg. and *Chlorella* sp. in the *P. bursaria* symbiosis // *Arch. Microbiol.* — 1980. — Vol. 125. — P. 291–293.
  46. Reisser W. Viruses and virus-like particles of freshwater and marine eukaryotic algae — a Review // *Arch. Protistenkd.* — 1993. — Bd. 123. — S. 257–265.
  47. Reisser W. ed. *Algae and symbiosis.* Bristol, UK: Biopress. — 1990. — 746 pp.
  48. Reisser W., Becker B., Klein T. Studies on ultrastructure and host range of a *Chlorella* attacking virus // *Protoplasma.* — 1986. — Vol. 135. — P. 162–165.
  49. Reisser W., Burbank D.E., Meints R.H. et al. Viruses distinguish symbiotic *Chlorella* spp. of *P. bursaria* // *Endocytobiosis and Cell Res.* — 1991. — Vol. 7. — P. 245–251.
  50. Reisser W., Burbank D.E., Meints R.H., et al. A comparison of viruses infecting two different *Chlorella*-like green algae // *Virology.* — 1988a. — Vol. 167. — P. 143–149.
  51. Reisser W., Klein T. and Becker B. Studies on phycoviruses I. On the ecology of viruses attacking *Chlorella* exsymbiotic from an European strain of *P. bursaria* // *Arch. Hydrobiol.* — 1988b. — Vol. 111. — P. 575–586.
  52. Reisser W., Vietze S. and Widowski M. Taxonomic studies on endocytobiotic Chlorophyceae algae isolated from different American and European strains of *Paramecium bursaria* // *Symbiosis.* — 1988c. — Vol. 6. — P. 253–270.
  53. Smith D.C., Muskatine L. and Levis D.H. Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis // *Biological Reviews.* — 1969. — Vol. 44. — P. 17–70.
  54. Suttle C.A., Chan A.M., Cottrell M.T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity // *Nature (London).* — 1990. — Vol. 347. — P. 467–469.
  55. Suttle C.A., Chen F., Chan A.M. 1992. Marine viruses: Decay rates, diversity and ecological implications. pp. 153–163 in *International Marine Biotechnology Conference «IMBC-9»*

- Short Communications of the Invited Lectures, C.C. Nash II (ed.), Developments in Microbiology Series, W. Brown Co., Dubuque.
56. *Tessman I.* Genetic recombination of the DNA plant virus PBCV-1 in a Chlorella like alga // *Virology*. — 1984. — Vol. 145. — P. 319–322.
  57. *Trench R.K.* The cell biology of plant-animal symbiosis // *Ann. Rev. Plant Physiol.* — 1979. — Vol. 30. — P. 485–531.
  58. *Van Etten J.L.* Minireview: Giant chlorella viruses // *Moll. Cells*. — 1995. — Vol. 5. — P. 99–106.
  59. *Van Etten J.L.* Phycodnaviridae. In M.H.V. Van Regenmortel, Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carsten E.B., Esters M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B. (eds.) / *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh Reports* Academic Press, San Diego, C. A. — 2000. — P. 183–193.
  60. *Van Etten J.L.* Unusual life style of giant Chlorella viruses // *Ann. Rev. Genet.* — 2003. — Vol. 37. — P. 153–195.
  61. *Van Etten J.L., Burbank D.E., Kuczmarski D. and Meints R.H.* Virus infection of culturable Chlorella-like algae and development of a plaque assay // *Science*. — 1983. — Vol. 219. — P. 994–996.
  62. *Van Etten J.L., Graves M.V., Muller D.G., Boland W., Delaroque N.* Phycodnaviridae — large DNA algal viruses // *Arch. Virol.* — 2002. — Vol. 147. — P. 1479–1516.
  63. *Van Etten J.L., Lane L.C., Meints R.H.* Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae // *Microbiol. Rev.* — 1991. — Vol. 55, N 4. — P. 586–620.
  64. *Van Etten J.L., Meints R.H.* Giant viruses infecting algae // *Annu. Rev. Microbiol.* — 1999. — Vol. 53. — P. 447–494.
  65. *Van Etten J.L., Meints R.H., Burbank D.E.* Virus of symbiotic Chlorella-like algae isolated from *P. bursaria* and *Hydra viridis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1982. — Vol. 79. — P. 3867–3871.
  66. *Van Etten J.L., Meints R.H., Burbank D.E. et al.* Isolation and characterization of a virus from the intracellular green alga symbiotic with *Hydra viridis* // *Virology*. — 1981. — Vol. 113. — P. 704–711.
  67. *Van Etten J.L., van Etten R.H.C.H., Johnson J.K., Burbank D.E.* A survey for viruses from fresh water that infect a eucaryotic Chlorella-like green alga // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1985. — Vol. 49, N 5. — P. 1326–1328.
  68. *Weis D.S.* Correlation of sugar release and concanavanin-A agglutinability with infectivity of symbiotic algae from *P. bursaria* for aposymbiotic *P. bursaria* // *J. Protozoology*. — 1979. — Vol. 26, N 1. — P. 117–119.
  69. *Weis D.S.* Infection in *P. bursaria* as an inductive process // *Endocytobiology*. — 1983. — Vol. 11. — P. 523–532.
  70. *Yamada T., Chuchird N., Kawasaki T., Nishida K., et al.* Chlorella Viruses as a Source of Novel Enzymes // *J. of Bioscience and Bioengineering*. — 1999. — Vol. 88(4). — P. 353–361.
  71. *Yamada T., Higashiyama T., Fukuda T.* Screening of Natural Waters for viruses which infect Chlorella cells // *Applied and Environmental Microbiology*. — Dec.1991. — P. 3433–3437.
  72. *Yamada T., Shimomae A., Furukawa S. et al.* Widespread distribution of Chlorella viruses in Japan // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 1993. — Vol. 57. — P. 733.
  73. *Yamada T., Fujimoto T., Yamamoto Y., et al.* Minichromosome formation in Chlorella cells irradiated with electron beams // *J. Biosci. Bioenginir.* — 2003. — Vol. 95, N 6. — P. 501–607.
- Population variability of triple symbiotic system: Paramecium bursaria-zoochlorella-and algophages**  
<sup>1</sup>Kvitko K.V., <sup>1</sup>Migunova A.V., <sup>1</sup>Gaponova I.N., <sup>1</sup>Vorobjev K.P., <sup>1</sup>Firsov M.A., <sup>2</sup>Rautian M.S., <sup>3</sup>Karelov D.V., <sup>4</sup>Andronov E.E.  
<sup>2</sup>Kariology of Protists Laboratory, Biology Institute, St.-Petersburg University; <sup>3</sup>Department of Molecular & Radiation Biophysics, Institute of Nuclear Physics RAS, Gatchina, St.-Petersburg; <sup>4</sup>Genetics dep. of Russian Science Research Institute of Agricultural Microbiology, RAAN Chair of microbiology of St.-Petersburg University
- ☼ **SUMMARY:** The triple symbiotic system (TSS): *P. bur- saria*–*Chlorella*–*Chlorovirus*, was studied. In Eurasia we found only 2 forms TSS, named N, northern and S, southern ecotypes. Each ecotype manifested at 32°C t<sup>S</sup> (N)- or t<sup>F</sup> (S)-phenotypes. In northeren parts of *P. bursaria* areals, from Karelia up to Kamchatka, near Baikal and in Armenia highlands, we find only t<sup>S</sup>-viruses, in Central Asia — only t<sup>F</sup>-types. Two types of genome characters were shown by PCR of 18 S RNA-genes. According all this characters populations of zoochlorella in *P. bursaria* – 2 clones of obligate symbionts
- ☼ **KEY WORDS:** symbiosis; triple symbiotic system; *P. bur- saria*; zoochlorella; algophage (*Chlorovirus*, Phycodnaviridae), northern and southern ecotypes of zoochlorella and algophage); uniformity of proteom and genome among zoochlorella strains of each ecotypes; sugar (maltose, glucose)-zoochlorella producers.