

纤毛类原生动物中宿主 - 共生体系统的研究

顾福康 孙 军 何 远 田 沁

(华东师范大学生物系 上海 200062)

摘要 :目前已经在 100 多种纤毛虫中观察到细菌、藻类和其他微生物等共生体。对纤毛虫中宿主 - 共生体系统的研究表明,双小核草履虫中卡巴粒的遗传为细胞质遗传理论提供了例证;含细菌共生体的许多厌氧纤毛虫无线粒体,共生体对宿主代谢有重要作用;尾草履虫 - 钝状全孢螺菌共生作用中,共生菌感染形式的 39kDa、15kDa 周质蛋白可分别与 IF-3-1、IF-3-2 两种单抗反应,其共生体早期感染过程中两种抗原的量发生显著变化,并且共生体生殖形式选择性地合成 63kDa 蛋白质,该蛋白质可能是与共生作用有联系的关键分子;绿草履虫 - 小球藻共生系统中,共生藻中存在葡糖胺硬性壁是其与草履虫发生共生关系的基本条件,其中,共生藻参与宿主代谢,与宿主形成相互受益的专一性关系,并且藻类共生体的作用可能影响了宿主草履虫基因组有关结构,改变了其基因表达。作者推测,探索共生体对宿主基因结构及其表达产物的影响可能是对纤毛虫中共生作用研究的主要趋势,这对于深入了解真核细胞中宿主 - 共生体双方的相互作用、物质交流在分子水平上的调控机理、细胞结构与功能的关系等细胞生命活动规律是有意义的。

关键词 :纤毛类原生动物,细菌共生体,藻类共生体,共生作用

中图分类号 :Q 958 文献标识码 :A 文章编号 :1005 - 0094(2001)01 - 0038 - 06

Studies on the Host-Symbiont System in Ciliates

GU Fu-Kang, SUN Jun, HE Yuan, Tian Qin

Department of Biology, East China Normal University, Shanghai 200062

Abstract : To date, bacterial, algal and other microbial symbionts have been found in more than 100 species of ciliates. The study of the host-symbiont system in ciliates shows that : (1) The inheritance of kappa particles in the cytoplasm of *Paramecium aurelia* is a classic example of the cytoplasmic inheritance theory. (2) Bacterial symbionts in some anerobic ciliates that lack mitochondria play the major role in the host's metabolism. (3) In the *P. caudatum-Holospora obtusa* system, 39- and 15-kDa periplasmic proteins of the infectious *H. obtusa* reacted with IF-3-1 and IF-3-2 monoclonal antibodies respectively. The amounts of both antigens were reduced during the early infection process. The reproductive *H. obtusa* selectively synthesized a 63-kDa protein, which may function as a key molecules in the various symbiotic systems. (4) In the *P. bursaria-Chlorella* system, the precondition of the symbiosis may be the glucosamine composition that exists in the rigid wall of the algae. The symbiotic algae takes part in the host's metabolism, and the specific association between the symbiont and host is mutually beneficial. Some genomic structures in *P. bursaria* may be influenced by the function of the *Chlorella*, so that the host's gene expression may change. A general trend in the research of symbiosis in ciliates is further exploration of the influence of the symbiont on the gene structure and gene expression of the host. The expected results will contribute to a better understanding of the regulatory mechanisms controlling the interaction, the exchange of substances between the host and symbiont at a molecular level, and the pattern of life processes surrounding the relationship between cellular structures and functions in eukaryocytes.

Key words : ciliate, bacterial symbiont, algal symbiont, symbiosis

在生物分类的五界系统中,原生动物被作为原生生物界中的一个亚界,纤毛类原生动动物则是其中的一个门(Levine et al., 1980)。在已经命名的约 7500 种纤毛虫中,至今已对数百种纤毛虫进行了超微结构观察,发现含有内共生体的已超过 100 种,其共生体包括细菌、藻类和其他微生物,它们位于纤毛虫细胞质(如游离在细胞质或胞质共生泡中,或在内质网包围着的胞质分隔中)和细胞核(大核和小核)中。纤毛虫细胞质和细胞核中普遍含有内共生体很可能是由于以下原因(1)纤毛虫细胞个体大(有几十至几百微米),细胞主要靠吞噬作用取食,能将大量微生物等食料生物吞食到细胞内(2)细胞核有大、小核的分化,大核有高度多倍性的基因组 DNA,并且大、小核采取封闭性分裂的方式(3)细胞以接合进行有性生殖,期间不形成典型的配子,接合体间仅发生有性核原核的交换,因而保持了细胞质结构的连续性(Ossipov et al., 1997)。纤毛虫的这些基本特性是其细胞内共生关系起源的重要条件,也有利于内共生体在细胞内的保持和各种内共生环境(细胞内分隔)的相对稳定。关于纤毛类原生动物的内共生现象,目前仅对少数种类做了较深入的研究,其中涉及内共生体的进入方式和遗传、内共生关系建立过程中双方的相互识别、内共生体在宿主细胞内的生存方式及其协同进化等方面(Corliss, 1990),目前已在超微结构、生化和分子生物学水平上取得了较快进展,所得结果对于进一步揭示真核细胞的结构和功能、细胞内共生关系的起源和细胞的进化及其在基因水平上的控制机理等细胞生命活动规律有重要意义。

1 纤毛虫 - 细菌共生作用

1.1 双小核草履虫的细胞质颗粒的研究

双小核草履虫(*Paramecium aurelia*)细胞内含有多种“细胞质颗粒”。Soldo 等对这些颗粒的感染特性、化学成分和区别特征等做了深入探索,并将颗粒内的 DNA 与其他微生物作了比较。由于这些颗粒形态与细菌相似,且某些能在细菌培养基和复合培养基中做细胞外培养(如卡巴粒、 λ -颗粒),Soldo 等早就认为这些颗粒是起源于细胞外的寄生细菌(Soldo, 1974)。在对草履虫细胞质内卡巴粒遗传的研究中,统计分析表明,经有性生殖实验获得“放毒型草履虫”和“敏感型草履虫”,两者的比例完全符

合孟德尔遗传定律,这一结果为细胞质遗传提供了重要例证(顾福康,邹士法,1984)。后来肯定,卡巴粒实际上是一类细菌(*Caedibacter*),并且与放毒型草履虫有关的卡巴粒折射小体是由该细菌的质粒 DNA 合成的。根据限制性内切酶消化的数据已经构建出卡巴粒中的质粒结构图(Quackenbush et al., 1982)。此外,有人应用细胞培养、显微注射和接合等方法诱导草履虫的细胞质颗粒感染无共生体的草履虫,获得了一系列成功,这些为纤毛虫的遗传学以及现代细胞生物学和分子生物学研究开拓了应用前景(顾福康,1991)。

1.2 厌氧纤毛虫的细菌内共生体及其作用

在分类学上属于毛口目或内毛目的瘤胃纤毛虫,属于异毛目和齿口目的海洋无氧沉积层纤毛虫和污水沉积层纤毛虫大多是厌氧性的,其细胞质内含细菌共生体(Fenchel et al., 1977)。值得注意的是,大多数海洋无氧沉积层纤毛虫无线粒体,污水沉积层纤毛虫则大多数无细胞色素氧化酶活性且无线粒体,这便揭示细菌内共生体可能对厌氧纤毛虫的代谢有影响。由荧光检测显示,有些上述腐殖质栖地的纤毛虫含甲烷细菌共生体。Van Bruggen 首先从条纹扭头虫(*Metopus striatus*)中分离到甲烷细菌共生体,但发现该纤毛虫无线粒体,而含有氢酶体。推测氢酶体可能向细菌共生体传递氢,共生体接受来自纤毛虫的氢以及二氧化碳和乙酸后,还原二氧化碳成为甲烷,这对纤毛虫是有益的(Van Bruggen et al., 1983; 1984)。

1.3 纤毛虫细胞核中的细菌共生体

据报道,尾草履虫(*Paramecium caudatum*)、双小核草履虫、绿草履虫(*Paramecium bursaria*)等纤毛虫可成为全孢螺菌(*Holospora*)的宿主,并发生核内共生作用。但是如果绿草履虫细胞质内先含有藻类共生体时便不能被细菌感染。经观察,这类细菌对草履虫细胞核感染的一般过程是:细菌被摄食后进入到草履虫消化泡中,其感染形式开始向生殖形式分化,此时细菌与消化泡膜紧密接触、反应,在膜保持完整或被破坏的情况下,脱离消化泡。游离在胞质中的细菌向细胞核运动,其中钝状全孢螺菌(*Holospora obtusa*)进入大核,美丽全孢螺菌(*Holospora elegans*)和波状全孢螺菌(*Holospora untulata*)进入小核,然后全部完成生殖形式的分化。此时共生菌进行复分裂,某些分裂产物又生长发育成感染形式,但

宿主细胞核分裂后生殖形式被传递到子核,而感染形式则被释放到外部介质。

对钝状全孢螺菌感染尾草履虫的过程研究得较清楚。共生菌为革兰氏阴性,生命周期中经历短的生殖形式(1.5 ~ 2 μm)和长的感染形式(11 ~ 14 μm)的分化。生殖形式的形态大小与其他革兰氏阴性菌相似,但感染形式的细胞结构则较为特殊,它由周质区(periplasmic region)、胞质区(cytoplasmic region)和识别端(recognition tip)三部分组成。生殖形式在宿主细胞营养生长时于纤毛虫大核内以二分裂生殖,在宿主细胞饥饿时停止分裂,拉长,经由中间形式分化成感染形式,并伴随着宿主细胞的分裂从宿主细胞内释放出来,再通过被吞食的途径,进入纤毛虫细胞质,然后经由识别端进入大核。感染后,共生菌沿其长轴形成几个缢缩,分裂产生几个细胞的感染形式(Gortz et al., 1990)。

在钝状全孢螺菌对尾草履虫感染机理的研究中发现,两种单抗(IF-3-1, IF-3-2)可分别与钝状全孢螺菌感染形式的39kDa和15kDa周质蛋白发生专一性反应。应用免疫印迹和免疫金电镜术检查感染过程中抗原的定量变化显示,两种抗原的量在细菌被吞食到纤毛虫消化泡中1小时内便减少,其中IF-3-2抗原量的减少早于IF-3-1抗原,且前者可降至很低水平,后者则发生少量变化。在细菌生殖形式中则没有检测到抗原(Fujishima et al., 1997)。所得结果提示了细菌感染过程中抗原量降低的正确定时及其抗原的可能作用,这对于深入探索细菌感染机理是有意义的。

此后,Dohra等发现,生殖形式的全孢螺菌共生体选择性地合成63kDa蛋白质,在免疫学特性上,该蛋白质与大肠杆菌的GroEL或HSP60相近。分离生殖形式和感染形式的细菌,做热休克处理,可诱导GroEL同系物及蛋白质的合成。并且每个生殖形式或感染形式的细菌中,这种蛋白质的量是大致恒定的。对编码GroEL同系物的基因进行克隆和测序,在氨基酸水平,该蛋白质有55.2%与大肠杆菌的GroEL相同,基因的开放读框编码的蛋白质有39.6%与大肠杆菌的GroEL相同。Northern blot杂交显示,生殖形式中groEL同源基因高度表达,但在中间形式和感染形式中仅痕量表达(Dohra et al., 1998)。由于在真细菌和真核细胞器中普遍存在GroEL蛋白,且各种生物体中这种蛋白质的结构是

高度保守的,在其他生物体的细胞内共生菌也合成大量的GroEL同系物,Kakeda等认为,内共生体和寄生虫合成的GroEL同系物可能是具有分子伴侣作用的关键分子,用于输入来自宿主细胞的蛋白质及对蛋白质的折叠和装配,对内共生作用行使功能(Kakeda and Ishikawa, 1991)。因此,钝状全孢螺菌中GroEL同系物即63kDa蛋白质的发现对进一步研究草履虫-细菌共生作用机理有重要意义。

2 纤毛虫-藻类共生作用

至今已观察到10多种纤毛虫细胞质内含共生藻类,如绿草履虫、多态喇叭虫(*Stentor polymorphus*)、游仆虫(*Euplotes daidaleos*)、茂爽口虫(*Climacostomum virens*)、三刺榴弹虫(*Coleps hirtus*)等纤毛虫中有共生小球藻(*Chlorella*)、拟游仆虫(*Paraeuplotes tortugensis*)中有虫黄藻(*Zooxanthellae*)、红中缢虫(*Mesodinium rubrum*)中有隐滴虫类(*Cryptomonad*)内共生体等。值得注意的是,纤毛虫-藻类共生系统中宿主与共生体间的关系具有真核细胞-真核细胞间相互作用的特征。其中,对绿草履虫-小球藻共生系统的研究已取得一定进展。

2.1 绿草履虫-小球藻共生系统的建立及整合机理

据超微结构观察,每个绿草履虫细胞内可容纳600 ~ 1000个共生小球藻。在共生关系建立过程中,小球藻被草履虫吞食后,其细胞壁表面与纤毛虫的吞噬体膜紧密接触,适于共生关系的各个小球藻被伴随着形成的围藻泡包围起来,其他藻类和食物生物则一起被包裹在消化泡内。围藻泡不与溶酶体结合,不表现出任何酸性磷酸酶的活性。消化泡则经历连续的消化过程。围藻泡内的小球藻经分裂繁殖,留在草履虫细胞质内(Karakashian et al., 1968)。由于围藻泡的形成是绿草履虫和小球藻建立共生关系的关键一步,许多研究首先关注在围藻泡形成的机制方面。较一致的意见认为,潜在的共生藻与草履虫的吞噬体膜相互作用,诱导了共生作用专一性小泡的形成,或选择性地运动膜物质,结果导致形成围藻泡(Meier et al., 1984; Reisser et al., 1985)。潜在的共生藻无疑是形成围藻泡的起始因子。有人将共生藻在感染前用植物凝集素处理,或用胞壁降解酶处理,结果使藻类被草履虫摄食后不会形成围藻泡,因此认为藻类表面结构的差异肯定

与形成围藻泡有关(Reisser et al. ,1982)。有人根据细胞壁的化学成分和结构,将小球藻分为两个类群,其中一个类群小球藻其细胞壁硬性壁含葡萄糖-甘露糖组分,胞壁对钌红着色,有各向异性特征;另一类群小球藻有葡糖胺硬性壁,胞壁对钌红不着色,无各向异性特征(Takeda ,1991 ;1996)。前一类群中细胞淀粉核显示一致形态,这表明其种间有较近的亲缘关系,后一类群的种淀粉核有多种形态,可能其种间关系并非密切(Ikeda and Takeda ,1995)。而从绿草履虫中分离的小球藻均有后一类群的细胞壁的特征(Takeda ,1995)。从绿草履虫中分离的小球藻能再次感染绿草履虫,其感染率达 80% ~ 90% ,因此,小球藻硬性壁中存在葡糖胺似乎是绿草履虫和小球藻两者间建立共生关系的基本条件(Nishihara et al. ,1998 ;Takeda et al. ,1998)。

对草履虫-藻类共生系统的物质联系及整合机制的研究证明,共生藻与宿主已形成明显的专一性关系。例如,在围藻泡中的小球藻参与宿主代谢过程,其细胞经光合作用产生氧及分泌麦芽糖向宿主输送,接受由宿主呼吸产生的 CO_2 和氮。绿草履虫与小球藻很可能已整合成一个完善的共生单元:含有共生藻的草履虫在照明光点下汇集在一起,呈现“光聚反应”;而将共生藻从草履虫中分离时双方均不产生这一反应(Lee et al. ,1985)。近年来,又有实验证明,藻类共生体的光合作用产物不但是建立共生作用的重要因子,而且对宿主草履虫的有性生殖反应也起作用。例如,含小球藻的草履虫在光照培养中表现出强交配反应活性,但暗培养时小球藻消失后的草履虫则显示低交配反应活性(Miva et al. ,1996 ;Tanaka and Miwa ,1996)。Miwa 等(1996)发现,含小球藻草履虫在光照下比无小球藻草履虫显示较长的光聚节律(photoaccumulation rhythm)和交配反应节律(mating reactivity rhythm)时间,其时间长短与细胞内共生藻的数量有关,除去共生藻后再感染小球藻的草履虫也显示同样结果。因此认为,光照条件下绿草履虫生理节律的变化是草履虫与共生藻协同作用的结果。

2.2 绿草履虫-小球藻共生系统的酶学及基因组 DNA 的研究

作者及合作者应用电镜酶细胞化学方法,对光培养下含藻类共生体的绿草履虫和经暗培养后除去小球藻的绿草履虫的胞器以标志酶定位,并应用聚

丙烯酰胺凝胶电泳检测几种同工酶。结果表明,暗培养下无小球藻的绿草履虫其细胞膜、线粒体、溶酶体和内质网的标志酶,即 ATP 酶、琥珀酸脱氢酶、酸性磷酸酶和葡萄糖-6-磷酸酶显示较强的反应活性,并且同种培养下无藻类的绿草履虫中酯酶、酸性磷酸酶和苹果酸脱氢酶的同工酶图谱其蛋白质条带显示较高的含量,甚至有的酶谱含较多的电泳条带。这些现象提示,小球藻共生体的存在改变了宿主的代谢:一方面共生体和宿主发生相互受益的共生关系;另一方面,共生体在向宿主输送营养物质的同时则可能对宿主的生命活动产生影响,有可能削弱甚至抑制宿主细胞器和细胞结构的功能活动。其中,共生藻或许改变了宿主草履虫中上述细胞结构标志酶的活性和分布,并改变了其中有关同工酶的组分及含量。而归根结底,很可能共生体改变了宿主细胞的基因表达^①。此外,作者等应用随机扩增多态 DNA 方法,检测分析了 20 种随机引物扩增的含共生藻草履虫和无共生藻草履虫两者的基因组 DNA 扩增产物电泳图谱,其中 7 种随机引物扩增产物有相同的条带。经计算,两者的共享度为 0.756,这表明了所述草履虫两者在基因组结构水平有较大的相似性。但有 5 种随机引物扩增产物电泳图谱在无共生藻草履虫样品中多出 6 条条带,这一现象也提示,很可能藻类共生体的作用改变了宿主草履虫基因组有关结构(孙军,顾福康,2000)。

3 展望

原生动物是一个多系类群,而不是一个自然类群,因此它所显示的多样性特征与其他生物类群无法相比的。在细胞内共生作用研究中,原生动物成为当然的理想材料。多年来,以细菌、藻类为内共生体的原生动物共生系统一直被作为研究的重点。其中,对原生动物-细菌共生系统的研究则较为深入,至今已取得较多发现。例如,除纤毛虫-细菌共生系统外,在变形虫-细菌共生系统中,共生体影响宿主细胞基因,对其基因缺陷产生互补作用;对灰胞藻类鞭毛虫细胞质中含有的蓝色体的研究表明,叶绿体起源于一种原始的蓝细菌;锥体亚目鞭毛虫细胞内的双心体(diplosome)共生体可能是由来自波豆亚

^① 张许枚,顾福康,2001. 光培养和暗培养绿草履虫中同工酶的比较研究. 华东师范大学学报(自然科学版)(待发表)

目的锥体类鞭毛虫遗传的(顾福康等,1999)。对纤毛虫-藻类共生系统的了解则相对滞后,在生物化学和分子生物学水平的工作才刚开始。在原有结果的基础上,探索宿主-共生体系统形成和建立过程中双方的相互作用,物质交流及其共生体对宿主基因结构、基因表达产物的影响可能是对纤毛虫中的共生作用研究的主要趋势。由于原生动物-真核细胞的共生作用中两者的生命活动特征在许多方面可能是不一样的,继续研究纤毛虫-藻类共生系统,有可能深入了解共生系统中宿主-共生体双方细胞间的相互作用在基因结构水平的调节控制机理,并从遗传精细结构和代谢调节方面进一步阐明共生系统的起源及其物质基础,细胞结构与功能的关系等细胞生命活动规律。

参考文献

- 顾福康,1991. 原生动物学概论. 北京:高等教育出版社,308~321
- 顾福康,隋淑光,杨振云,1999. 肉足鞭毛虫类原生动物中宿主-共生体系统的研究. 生物多样性,7:303~307
- 顾福康,邹士法,1984. 双小核草履虫在遗传学研究中的应用. 生物学通报,4:5~6
- 孙军,顾福康,2000. 含小球藻和无小球藻绿草履虫的基因组DNA多态性的研究. 动物学研究,21:257~261
- Corliss J O,1990. Endosymbionts of protozoa. *Zoological Science*,7(suppl.):167~177
- Dohra H, Fujishima M and Ishikawa H,1998. Structure and expression of a *GroE*-homologous operon of a macronucleus-specific symbiont *Holospira obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*,45:71~79
- Fenchel T, Perry T and Thane A,1977. Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *Journal of Protozoology*,24:154~163
- Fujishima M, Dohra H and Kawai M,1997. Quantitative changes in periplasmic proteins of the macronucleus-specific bacterium *Holospira obtusa* in the infection process of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*,44:636~642
- Gortz H -D, Lellig S and Miosga O,1990. Changes in fine structure and polypeptide pattern during the development of *Holospira obtusa* a bacterium infecting the macronucleus of *Paramecium caudatum*. *Journal of Bacteriology*,172:5664~5669
- Ikeda T and Takeda H,1995. Species-specific differences of pyrenoides in *Chlorella*(Chlorophyta). *Journal of Phycology*,31:813~818
- Kakeda K and Ishikawa H,1991. Molecular chaperon produced by an intracellular symbiont. *Journal of Biochemistry*,110:583~587
- Karakashian J S, Karakashian M W and Rudzinska M A,1968. Electron microscopic observations on the symbiosis of *Paramecium bursaria* and its intracellular algae. *Journal of Protozoology*,15:113~128
- Lee J J, Soldo A T, Reisser W, Lee M J, Jeon K W, and Gortz H -D,1985. The extent of algal and bacterial endosymbioses in protozoa. *Journal of Protozoology*,32:391~403
- Levine N D, Corliss J O, Cox F E G, Deroux G, Grain J, Honigberg B M, Leedale G F, Loeblich A R, Lom III J, Lynn D, Merinfeld E G, Page F C, Poljansky G, Sprague V, Vavra J and Wallace F G,1980. A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* 27:37~58
- Meier R, Lefort-Tran M, Pouphe M and Wiessner W,1984. Comparative freeze-fracture study of perialgal and digestive vacuoles in *Paramecium bursaria*. *Journal of Cell Science*,73:121~140
- Miva I, Izumo T and Sonoda T,1996. Cytoplasm rescues an arrhythmic mutant on the circadian rhythm of mating reactivity in *Paramecium bursaria*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*,43:231~236
- Miwa I, Fujimori N and Tanake M,1996. Effect of symbiotic *Chlorella* on the period length and the phase shift of circadian rhythms in *Paramecium bursaria*. *European Journal of Protistology*,32(suppl. I):102~107
- Nishihara V, Horiike S, Takahashi T, Kosaka T, Shigenaka Y and Hosoya H,1998. Cloning and characterization of endosymbiotic algae isolated from *Paramecium bursaria*. *Protoplasma*,203:91~99
- Ossipov D P, Karpov S A, Smirnov A V and Rautian S,1997. Peculiarities of the symbiotic systems of protists with diverse patterns of cellular organization. *Acta Protozoologica*,36:3~21
- Quackenbush R L, Dilts S A and Maser R L,1982. Physical map of a plasmid from *Caedibacter taeniospiralis* 51. *Journal of Bacteriology*,152:939~942
- Reisser W, Meier R and Gortz H -D,1985. Establishment, maintenance, and integration mechanisms of endosymbionts in protozoa. *Journal of Protozoology*,32:383~390
- Reisser W, Radunz A and Wiessner W,1982. The participation of algal surface structures in the cell recognition process during infection of aposymbiotic *Paramecium bursaria* with symbiotic chlorellae. *Cytobiosis*,33:39~50
- Soldo A T,1974. Intracellular particles in *Paramecium*. In :

- van Wagtenonk W J, (eds.), *Paramecium* :A Current Survey. Amsterdam :Elsevier Scientific Publishing Company ,377 ~ 442
- Takeda H ,1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella*(Chlorophyta). *Journal of Phycology* , **27** :224 ~ 232
- Takeda H ,1996. Diversity of cell-wall chemical composition and the taxonomy of algae. In : Chaudhary B R , Agrawal S B (eds.) , *Cytology , Genetics and Molecular Biology of Algae*. Amsterdam :SPB Academic Publishing ,291 ~ 300
- Takeda H ,1995. Cell wall composition and taxonomy of symbiotic *Chlorella* from *Paramecium* and *Acanthocystis*. *Phytochemistry* ,**40** :457 ~ 459
- Takeda H , Sekiguchi T , Nunokawa S and Usuki I ,1998. Species-specificity of *Chlorella* for establishment of symbiotic association with *Paramecium bursaria* ——does infectivity depend upon sugar components of the cell wall. *European Journal of Protistology* ,**34** :133 ~ 137
- Tanaka M and Miwa I ,1996. Significance of photosynthetic products of symbiotic *Chlorella* to establish the endosymbiosis and to express the mating reactivity rhythm in *Paramecium bursaria*. *Zoological Science* ,**13** :685 ~ 692
- Van Bruggen J J A , Stumm C K and Vogels G D ,1983. Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology* ,**136** :89 ~ 96
- Van Bruggen J J A , Zwart K B and Von Assema R M ,1984. *Methanobacterium formicicum* , an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrion. *Archives of Microbiology* ,**139** :1 ~ 7

(责任编辑 :闫文杰)