

海洋藻类病毒与赤潮防治*

柏仕杰^{1,2} 王 慧^{1,2} 郑天凌^{1,2**}

(¹滨海湿地生态系统教育部重点实验室(厦门大学), 生命科学学院 厦门 361005)

(²近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学) 厦门 361005)

摘 要 病毒是海洋中丰度最高的生物, 全球海洋中大约有 10^{30} 个病毒, 海洋病毒的宿主包括从细菌到大型海洋生物等几乎所有的海洋生物. 海洋病毒在调控种群结构及生物地球化学循环中起着至关重要的作用, 并且, 病毒可以通过水平基因转移来操控宿主的代谢活动. 藻类病毒能够通过裂解藻类从而起到控制赤潮的作用. 随着藻类病毒研究的不断发展, 人们已经分离到大量的藻类病毒, 包括双链或单链的DNA病毒及RNA病毒, 其分布于细胞质或细胞核中. 本文简要概述了海洋病毒研究方面的发展现状, 及海洋病毒在生态环境中的重要作用. 集中综述了藻类病毒(包括原核藻类病毒和真核藻类病毒)的研究进展, 讨论了海洋藻类病毒与赤潮生物的关系. 介绍了藻类病毒在赤潮控制方面所取得的一些成果, 展望了藻类病毒调控赤潮的前景. 我国在藻类病毒方面的探索研究还只是刚刚起步, 研究藻类病毒的前景十分广阔. 图1 表1 参 97

关键词 海洋病毒; 藻类病毒; 赤潮; 生态环境

CLC Q939.4 : X55

Marine Algal Viruses and Their Application in Red-tide Control*

BAI Shijie^{1,2}, WANG Hui^{1,2} & ZHENG Tianling^{1,2**}

(¹Key Laboratory of Ministry of Education for Coast and Wetland Ecosystems, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

(²State Key Laboratory of Marine Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract Viruses are the most abundant biological entities in the oceans, and in the global oceans there are about 10^{30} viruses, whose hosts included almost all marine organisms, from bacteria to large marine animals. Marine viruses play a critical role in controlling community composition and impacting global biogeochemical cycles, and in addition, viruses can manipulate the metabolism of their hosts through horizontal gene transfer (HGT). Algal viruses can control red-tide by lysing algae. With the continuous development of algal virus research, a large of algal viruses were isolated, including the double-stranded or single-stranded DNA viruses and RNA viruses, and these algal viruses distribute in the cytoplasm or nuclei. The current development in the research of marine viruses and the ecological importance of marine viruses were summarized in this paper. Algal viruses were focused, including the prokaryotic algal viruses, the eukaryotic algal viruses, and the biological relationship between marine algal viruses and red-tide. Some achievements obtained by using algal viruses to control red-tide in the interaction between alga and algal viruses were introduced. The prospect of application of algal viruses in controlling red tide was forecasted. In China, the study on algal viruses has just started and will attract more and more attention in the near future.

Fig 1, Tab 1, Ref 97

Keywords marine virus; algal virus; red-tide; ecological environment

CLC Q939.4 : X55

早在1955年, 人们分离到了第一株海洋病毒^[1]. 直到1989

年, Bergh等人在*Nature*首次报道病毒是海洋中丰度最高的生物, 人们对病毒的认识有了更深的了解. 一般来说病毒在海水中的数量大约为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL, 而细菌通常为 10^6 个/mL, 病毒的数量往往高于细菌1~2个数量级别^[2]. 随着新的分子生物学技术的应用, 已经可以在不需要培养微生物的情况下研究总的微生物群落关系, 利用这些技术, 人们发现海洋中病毒丰度和多样性都非常高. 因此, 病毒在海洋生态系统中所起到的作用可能是十分重要的^[3].

收稿日期: 2012-06-07 接受日期: 2012-07-12

*国家自然科学基金项目 (Nos. 40930847, 40876061, 31070442)、“海洋生物地球化学过程与机制”创新研究群体基金 (No. 41121091) 和近海海洋环境科学国家重点实验室自主研究项目资助 Supported by the Natural Science Foundation of China (Nos. 40930847, 40876061, 31070442), the Foundation of “Marine Biogeochemical Process and Mechanism” Innovation Research Group (No. 41121091), and the Independent Research Project of State Key Laboratory of Marine Environmental Sciences of China

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: microzh@xmu.edu.cn)

据估计,海洋微生物所产生的可利用的氧占据了地球上总氧量的一半^[4],这些海洋微生物在海洋生态系统中占据了95%的生物量^[3]。而海洋病毒每天裂解大约50%的微生物生物量^[5],在生物地球化学循环中起到了非常重要的作用^[6],每秒钟大约有 10^{23} 个微生物被病毒所感染。当宿主细胞被裂解后,营养被释放到周围的环境中,因此,海洋病毒在海洋环境中的碳和氮等营养循环也起到了非常重要的作用^[4,6]。并且,病毒还可以利用它裂解宿主的能力,使食物网和能量流动变得更加复杂,病毒将宿主细胞溶解,释放出营养物质,以颗粒有机物(POM)和溶解有机物(DOM)的形式返回到最低营养级,从而对海洋微食物环中的C、N流具有显著的影响^[7-8]。不仅如此,海洋病毒还可以促进种间遗传物质的交换^[6,9-10],病毒介导的海洋生物物种间的基因交换和转导是一种十分重要的基因水平转移机制,对于海洋生物的生物多样性和生物进化有着十分重要的作用^[6]。

海洋病毒可以感染细菌、蓝藻、古细菌和其它一些大型生物(如浮游植物、浮游动物、海草、甲壳类动物、鱼类和其它的水生生物)等。海洋病毒可以裂解浮游植物从而释放细胞中的二甲基硫化物(DMS),该物质在大气中的氧化产物与酸雨的形成、全球气候变化等密切相关。但是,海洋病毒也不总是起着负面作用,病毒的“Kill the winner”原则对于海洋生物的种群结构的调节起着非常重要的作用^[4]。“Kill the winner”原则主要指的是当宿主生物在适宜的条件下大量增殖而占据其它生物的生态位时,其相应的病毒也会随着宿主的增殖而大量增加,病毒通过裂解宿主生物使其种群数量下降,从而使其它生物种群数量增加,而群落的总生物量基本维持恒定。因此,海洋病毒可以对海洋生态系统的群落结构演替起到重要的作用,由于病毒直接影响宿主细胞群体的丰度和多样性,随着基因不断交换,最终导致病毒和宿主演替的进化。

赤潮(Red-tide)是指在一定环境条件下,海水中某种浮游植物、原生动物或细菌在短时间内突发性繁殖或高度聚集而引发的一种生态异常现象,使海水变色并造成危害。由于经济的快速发展和环境的不断恶化,再加上全球气候变化,赤潮发生呈现出新的趋势^[11]:发生的次数越来越频繁,影响的区域面积越来越大,引发赤潮的藻种越来越多,有毒赤潮种的比例不断攀升。有害赤潮危害程度日益增加,赤潮问题已经在全球范围内严重威胁着沿海海洋经济的持续发展和社会的安定,因此,寻找合理有效的赤潮治理方法显得越来越迫切。

目前控制藻类赤潮的主要技术有:物理方法、化学方法和生物方法。物理方法主要有隔离法、超声波法、微滤机除藻、活性炭吸附及气浮法等。由于物理方法对于低密度或底层藻类的灭杀效果不好、费用又高,因此难于大面积使用,

通常只是一种应急措施。化学方法是采用化学药品来杀灭和去除赤潮藻或者用凝聚剂来沉淀赤潮藻,化学方法治理赤潮具有操作简单、见效快等优点,但是化学药品可能带来二次污染并且可能对其它非赤潮生物也会带来一定的不利影响,还可以通过食物链中的生物放大作用积累,给人带来危害。由于物理方法和化学方法治理赤潮往往是治标不治本,因此,人们开始关注用生物方法来治理赤潮。

利用生物方法来治理赤潮最主要的优点是不会给生态环境带来负面影响,利用生物治理赤潮的方法,人们最早想到的是直接利用浮游动物或一些贝类等赤潮生物的天敌,利用食物链的关系直接摄食赤潮藻。此种方法操作简单,适合于在养殖水域中使用,如果水体中藻密度过大,水体中溶解氧很低,动物不能生长的情况下就不是很适合,同时由于食物链的传递和积累的作用,将会对人类的健康产生影响,特别是一些产毒素的有毒赤潮藻。随着对微生物认识的逐渐加深,人们已经开始利用微生物来治理赤潮。郑天凌等阐述了海洋微生物在赤潮生消中所起到的作用,特别强调细菌与藻类之间的关系,一方面细菌吸收藻类产生的有机物质,并为藻类的生长提供营养盐和必要的生长因子,从而调节藻类的生长;另一方面细菌也可以通过直接或者间接的作用来抑制藻类的生长,甚至裂解藻细胞,不仅具有杀藻作用,而且对一些产毒藻的产毒表现出抑制作用^[12]。作者所在实验室的研究人员在这方面做了大量的研究,取得了一些积极成果^[13-14]。

海洋病毒在海洋生态系统中扮演着十分重要的角色。而且,病毒能够对大部分的海洋生物产生作用,因此,藻类病毒一经分离报道,就引起了全球广泛关注,人们寄希望于利用藻类病毒来控制赤潮藻的数量来防治赤潮。国外对藻类病毒的研究开始得较早,而且技术比较成熟。藻类病毒可分为原核藻类病毒(即蓝藻病毒)和真核藻类病毒。但是国内这方面的研究还处在初级阶段,原核藻类病毒方面,赵以军等对淡水中噬蓝藻体做了较多的工作^[15-16];真核藻类病毒方面,除了小球藻病毒的分离工作外,未见更多报道^[17-18]。我国海洋中的赤潮藻绝大部分是真核藻类,而且部分藻类会释放出毒素,如麻痹性贝类毒素(Paralytic Shellfish Poison, PSP)、腹泻性贝类毒素(Diarrhetic Shellfish Poison, DSP)、失忆性贝类毒素(Amnesic Shellfish Poison, ASP)和神经毒性贝类毒素(Neurotoxic Shellfish Poison, NSP)等,对海洋生物造成毒害,并且可以通过食物链的传递和生物积累作用对人类造成威胁。随着越来越多的藻类病毒被分离和报道,藻类病毒的研究逐渐深入,因此有必要对藻类病毒,特别是真核藻类病毒的研究进展进行一次总结,并对藻类病毒与赤潮的关系进行概述。

1 原核藻类病毒

原核藻类病毒是指蓝藻病毒, 由于蓝藻(蓝细菌)(*Cyanobacterium*)是原核生物, 类似于细菌, 再加上蓝藻病毒与噬菌体相似, 因此, 通常又将蓝藻病毒称为噬藻体(*Cyanophage*)。以前将这类病毒称为BGAV^[19], 蓝藻病毒的最先发现者是Safferman和Morris, 他们是在做蓝藻降解试验中发现了这种能同时感染鞘丝藻(*Lynbya*)、席藻(*Phormidium*)和织线藻(*Plectonema*)的病毒, 并将这些病毒命名为“LPP”病毒^[20]。随着越来越多的蓝藻病毒被发现, 其宿主主要包括两类蓝藻: 丝状蓝藻, 如颤藻(*Oscillatoria*)、项圈藻(*Anabaenopsis*)、筒胞藻(*Cylindrospermum*)、鱼腥藻(*Anabaena*)、念珠藻(*Nostoc*)和单细胞蓝藻, 如微囊藻(*Microcystis*)、组囊藻(*Anacystis*)和聚球藻(*Synechococcus*)。现在研究较多的有LPP病毒、聚球藻病毒和原绿球藻(*Prochlorococcus*)病毒等。蓝藻病毒的命名是根据宿主的名称即取宿主的拉丁文的第一个字母, 如宿主为*Anabaena*(鱼腥藻)的病毒, 简称“A”病毒, 感染*Nostoc*(念珠藻)的“N”病毒等。一般来说, 作为专一性寄生生物, 蓝藻病毒有其特异性宿主, 它们只对特异的藻细胞起裂解作用, 这也将大大限制人们对病毒的利用。不过有的病毒能够感染“共专一宿主”(Cospecific host), 如上述的“LPP”病毒, 能同时感染*Anacystis*(组囊藻)和*Synechococcus*(聚球藻)的病毒被命名为“AS”病毒, 还有能同时侵染*Synechococcus*(聚球藻)和*Microcystis*(微囊藻)的“SM”病毒; 若有发现不同血清学亚型的, 则在字母后加上阿拉伯数字来表示, 如“LPP”系列、SM-1及SM-2等。根据蓝藻病毒形态的不同, 国际病毒学分类委员会(ICTV)细菌病毒分会参照噬菌体的分类方式, 将蓝藻病毒分为3个科^[19]:

(1) Myoviridae(肌病毒科), 特征是还有一条中央管和能伸缩的尾巴, 常见的有AS-1、N-1、A-2等; (2) Siphoviridae(长尾病毒科), 特征是含有长的、不能伸缩的尾巴, 常见的有S-1、S-2L、SM-2等; (3) Podoviridae(短尾病毒科), 顾名思义, 其特点就是尾巴较短, 常见的有LPP-1、LPP-2、SM-1、AC-1等。上面提到蓝藻有丝状和单细胞两种基本形态, 相应的蓝藻病毒通常也有两类, 即丝状蓝藻病毒和单细胞蓝藻病毒, 它们在蓝藻细胞中的感染和复制明显不同, 这是因为两类蓝藻细胞的新陈代谢差异很大。病毒对丝状蓝藻的感染最明显的影响就是抑制宿主细胞的CO₂固定。感染后, 丝状宿主细胞很快产生一种由类囊体内陷形成的所谓的“病毒生长基质空间”(Virogenic stroma space), 病毒在此繁殖, 宿主DNA被降解, CO₂的固定也被彻底封锁, 内含物渗出细胞。而单细胞蓝藻中, 病毒的复制是在核质中完成的^[21]。此外, 丝状病毒的一般在3~5 h内完成感染并释放出大量的病毒粒子, 而

单细胞蓝藻病毒的复制时间要长得多^[22], 因此, 在一般情况下, 丝状病毒比单细胞病毒有更快的生产速度, 其感染率也就更大。

海洋蓝绿藻(又叫原绿球藻*Prochlorococcus*)和聚球藻(*Synechococcus*)是研究蓝藻病毒中使用较多的宿主藻, 它们都是海洋中重要的初级生产力生产者^[23, 24], 其中的原绿球藻是已知最小的光合自养生物, 并且对全球光合作用的贡献巨大^[25], 在蓝藻存在的环境中, 人们发现了蓝藻病毒的存在。Proctor和Fuhrman报道了有1.5%的聚球藻细胞中有成熟的噬菌体颗粒^[26]。蓝藻病毒在海水中的含量在10³~10⁴ VLPs mL⁻¹之间, 噬藻体并无法将宿主藻类全部裂解, 某些藻类细胞会对这些噬藻体产生所谓的“抵抗力”, 而与噬藻体共存^[27]。由于噬藻体与噬菌体相似, 蓝藻又称为蓝细菌, 因此, 分离噬藻体的难度并不是很大。上世纪90年代, 人们以聚球藻为宿主藻得到了大量的蓝藻病毒^[27-30], 并且在蓝藻病毒的3个科中均有分布, Wilson等利用聚球藻在百慕大群岛、美国马萨诸塞州的伍兹霍尔港和英吉利海峡的近海中共分离出5株蓝藻病毒, 分属于肌病毒科和长尾病毒科, 肌病毒科的基因组大小为80~85 kb, 长尾病毒科的基因组大小为90~100 kb, 用Southern杂交后, 发现这些病毒的同源性非常低^[28]。用SDS-PAGE分析这些病毒的多肽后发现, 虽然这两类病毒的结构蛋白大小均为53~54 kD, 但是它们的多肽结构和氨基酸组成却大不相同。Suttle和Chan利用聚球藻分离得到了7株蓝藻病毒, 都具有二十面体的头部, 分属于肌病毒科、长尾病毒科和短尾病毒科, 这些病毒有着不同的宿主范围, 对其中的一株长尾病毒科的噬藻体——SBBS1进行了吸附动力学和病毒的裂解周期实验, 在加入病毒后的15、30、45和60 min时, 没有吸附到宿主上的病毒的平均值分别为46.9%、22.0%、18.5%和11.3%, 在病毒的一步生长实验中, 病毒的数量在感染后第9个小时开始明显增加, 第17个小时后, 病毒的数量保持稳定, 说明这株病毒在17个小时完成了它的一个裂解周期, 在这个循环中, 每个宿主细胞中大约有250个子代病毒被释放出来^[29]。2003年, Sullivand等报道了一株以原绿球藻为宿主的噬藻体, 随后, 她又以原绿球藻为宿主分离得到了3株噬藻体, 一株属于短尾病毒科(P-SSP7), 两株属于肌病毒科(P-SSM2和P-SSM4), 从形态学上看, 它们分别与T7噬菌体和T4噬菌体相似, 基因序列分析发现, P-SSP7有58%的核心基因序列与T7噬菌体相同, P-SSM2和P-SSM4分别有57%和56%的核心基因序列与T4噬菌体相同^[30]。不仅如此, 这些噬藻体中还含有某些宿主的功能基因, 如: 光合作用基因, 醛缩酶基因和整合酶基因^[31], 这些信息提示我们, 噬藻体可能可以使宿主更好的适应环境, 并随着宿主共同进化。

虽然限制性酶切有助于蓝藻病毒的基因分型, 但是并不是所有的DNA都能被酶切。Wilson等指出用*Bam*HI和*Eco*RV

比其它的一些限制性内切酶要好^[28], Lu等人认为 *AccI* 和 *EcoRV* 能够对大部分的蓝藻病毒DNA起作用, 推测可能是由于DNA甲基化所致. 蓝藻病毒“P60”是一种感染海洋聚球藻-WH7803品系的原核藻类病毒, 它的基因组大小为47 872 bp, 有80个潜在的开放阅读框 (Open reading frame ORF)^[32]. 随着蓝藻病毒“P60”的全基因组的报道^[33], 人们开始将目光投向蓝藻病毒的系统发育分析上^[34], 这对于研究噬藻体的遗传多样性以及噬藻体与蓝藻之间的系统进化关系有着十分重要的含义.

由于蓝藻是一类重要的初级生产者, 噬藻体对蓝藻的种群调节和蓝藻进化方向起到十分重要的作用. 并且, 由于噬藻体裂解蓝藻, 造成蓝藻大量死亡和初级生产力的下降, 因此, 噬藻体在微食物环和物质能量循环中所扮演的角色也不应该被忽视.

2 真核藻类病毒

2.1 真核藻类病毒概述

真核藻类病毒一般被称为病毒或者是病毒类粒子 (Virus like particles, VLPs), 到目前为止, 大约有来自真核藻类12个纲的50个种的真核藻类病毒被发现^[35-37]. 上个世纪70年代, Lee报道过在红藻门中的细连珠藻 (*Sirodotia tenuissima*) 的体细胞中发现有一种多角体粒子 (Polyhedral particles)^[38]. 1972年, Pickett-Heaps在绿藻门鞘藻目枝鞘藻属中的幼体藻细胞中发现了大约直径为240 nm的多角体粒子^[39]. 同年, Toth 和 Wilce也报道了褐藻门的通氏绳藻 (*Chorda tomentosa*) 孢子中含有直径为170 nm 左右的多角体粒子^[40]. Mattox等也于1972年在4类丝状绿藻中发现类似于病毒的粒子^[41]. 随后, Kawakami等在草履虫与绿藻的共生体系 (Symbiont of *Paramecium bursaria*) 中发现二十面体, 直径120~180 nm的病毒类粒子^[42]. 在绿藻与水螅的共生体系 (Symbiont of *Hydra viridis*) 中, Meints等分离到直径为185 nm的病毒类粒子^[43]. Van Etten等从绿藻与草履虫共生体系中分离到了两株双链DNA藻类病毒, 分别命名为HVCV-1和HVCV-2. 从绿藻与水螅共生体系中分离到的一株双链DNA藻类病毒命名为PBCV-1^[44], 这些藻类病毒被称为小球藻病毒, 有HVCV和PBCV两种类型, 到了上世纪80年代末90年代初, PBCV-1已经被描述得十分详细了, 包括其化学组成、基因组结构、复制情况等^[36, 45], 1997年, Li等发表了有关PBCV-1真核藻类病毒全基因组序列的文章^[46]. 如今, 已知PBCV-1是一类直径190 nm、多面体、线性、330 740 bp的双链DNA真核藻类病毒. Mayer和Taylor分离到海洋中的微单胞藻病毒 (*Micromonas pusilla virus*), 命名为MPV, 它是一种双链DNA病毒^[47], Waters和Chan对MPV有过较为详细的描述^[48], MPV的裂解周期为14 h, 每个宿主细胞平均释放出72

个具有感染性的成熟病毒粒子. Muller等最早从褐藻水云属长囊水云 (*Ectocarpus siliculosus*) 中分离得到藻类病毒, 命名为EsV^[49]. 随后, 他又发现了几株感染费氏藻 (*Feldmannia* sp.) 的真核藻类病毒^[50], 并对这些病毒进行了大量的后续研究^[51-52]. 另外, Klein等对EsV的衣壳蛋白进行了较为深入的研究^[53]. 2001年, Delaroque等报道了EsV-1的全序列基因组^[54]. 随后, 人们又发现了第一株甲藻——圆鳞异囊藻 (*Heterocapsa circularisquama*) 病毒HcV^[55]、球石藻 (*Emiliania huxleyi*) 病毒EhV^[56-57]. Wilson等2005年报道了EhV的全基因组序列^[58]. 21世纪之前, 人们分离到的藻类病毒只有dsDNA病毒. 1995年, 国际病毒学分类委员会 (ICTV) 第六次会议把这些病毒归为一个名为藻类DNA病毒的家族 (Phycodnaviridae)^[59], 5年后, 在国际病毒学分类委员会第七次大会上, 将这个病毒家族分为4大类^[60], 2005年的第八次大会上又添加了两类^[61], 现在, 这个病毒家族包括了6个病毒属, 如绿藻病毒属 (*Chlorovirus*)、寄生藻病毒属 (*Prasinovirus*)、金藻病毒属 (*Prymnesiovirus*)、褐藻病毒属 (*Phaeovirus*)、颗石藻类病毒属 (*Coccolitovirus*)、针晶藻病毒属 (*Raphidovirus*). 进入21世纪以来, 人们又不断发现新的感染不同真核藻类的藻类病毒, 如ssDNA^[62]、ssRNA^[63]和dsRNA^[35]等真核藻类病毒.

在Nagasaki^[64]和Brussaard^[65]的基础上, 笔者参考了一些其它文献, 总结了感染真核藻类的病毒 (表1). 以前, 人们对为什么只有大的dsDNA藻类病毒被发现而感到疑惑, 因为植物病毒中ssRNA病毒是占大多数的. 不过随着第一株感染赤潮异湾藻的ssRNA真核藻类病毒 (HaRNAV) 的发现^[66], 人们分离得到了越来越多的类似的真核藻类病毒. 现在, 人们知道了真核藻类病毒在形态大小上从25 nm到大于220 nm不等, 在基因类型上可分为dsDNA、ssDNA、dsRNA、ssRNA四个类型, 不同的基因结构如线状、环状及片段状. 基因组的大小可以从4.4 kb到超过500 kb. 其中大部分的病毒是大型dsDNA病毒, 属于藻类DNA病毒家族, 例如: MpV^[47]、EhV^[56]、HaV^[67]、PpV^[68]、CeV^[69]、PoV^[69]和AaV^[70]病毒. 3株主要感染有害针胞藻、硅藻和甲藻的ssRNA, 分别为HaRNAV^[66]、RsRNAV^[71]和HcRNAV^[72]病毒. 两株感染硅藻的ssDNA病毒为CsNIV^[73]和CdebDNAV^[62]病毒. 还有一株感染葱绿藻纲微单胞菌属 *Pusilla* 藻的dsRNA病毒, 命名为MpRV^[35]病毒. 最近, Nagasaki科研小组针对海洋中重要的初级生产力——硅藻分离得到大量的硅藻病毒^[74], 并首次发现两株不同核酸类别的羽纹目硅藻病毒^[75]. 由于海洋中病毒的数量如此巨大, 可以认为海洋中的藻类普遍暴露在各种各样的病毒攻击下, 因此, 可以预见还会有大量的新的藻类病毒被发现.

2.2 真核藻类病毒的分离

虽然真核藻类病毒的研究在国外已经开展了多年. 但是, 迄今为止, 在中国除了小球藻病毒的分离工作外, 未见其

表1 真核藻类病毒
Table 1 Viruses infecting eukaryotic algae

病毒名称 Virus	宿主名称 Host	大小 Size (d/nm)	基因组 Genome	病毒在细胞中的分布 Virus distribution in cell
单细胞藻类病毒 Unicellular algal viruses				
AaV (BtV)	褐潮藻 <i>Aureococcus anophagefferens</i>	140	dsDNA	细胞质 Cytoplasm
CbV	<i>Chrysochromolina brevifilum</i>	145~170	dsDNA	细胞质 Cytoplasm
CdebDNAV	柔软角刺藻 <i>Chaetoceros debilis</i>	30	ssDNA	细胞质 Cytoplasm
CeV	<i>Chrysochromolina ericina</i>	160	dsDNA, 510 kb	细胞质 Cytoplasm
小球藻病毒 (ex. ATCV-1, ATCV-2)	小球藻 <i>Chlorella</i> SAG 3.83 (刺胞虫共生体系 Symbiont of <i>Acanthocystis turfacea</i>)	140~190	dsDNA, 288 kb	细胞质 Cytoplasm
小球藻病毒 (ex. PBCV-1, NY-2A)	小球藻 <i>Chlorella</i> NC64A (草履虫共生体系 Symbiont of <i>Paramecium bursaria</i>)	150~190	dsDNA, 331~369 kb	细胞质 Cytoplasm
小球藻病毒 (ex. MT325, FR483)	小球藻 <i>Chlorella</i> Pbi (草履虫共生体系 Symbiont of <i>Paramecium bursaria</i>)	140~150	dsDNA, 314~321 kb	细胞质 Cytoplasm
小球藻病毒 (ex. HVCV)	类小球藻 <i>Chlorella</i> -like alga (水螅共生体系 Symbiont of <i>Hydra viridia</i>)	170~180	dsDNA, ~200 kb	细胞质 Cytoplasm
CtenRNAV	角毛藻 <i>Chaetoceros tenuissimus</i>	31	ssRNA	细胞质 Cytoplasm
CsNIV	角毛藻 <i>Chaetoceros salsugineum</i>	38	(ss+ds) DNA, 6.0 kb	细胞核 Nuclei
CspNIV	角毛藻 <i>Chaetoceros cf. gracilis</i>	25	-	细胞核 Nuclei
CsfrRNAV	聚生角毛藻 <i>Chaetoceros socialis f. radians</i>	30	ssRNA	细胞质 Cytoplasm
ClorDNAV	洛氏角毛藻 <i>Chaetoceros lorenzianus</i>	34	ssDNA	细胞核 Nuclei
AglaRNAV	冰河拟星杆藻 <i>Asterionellopsis glacialis</i>	31	ssRNA, 9.5 kb	细胞质 Cytoplasm
TnitDNAV	菱形海线藻 <i>Thalassionema nitzschioides</i>	35	ssDNA, 5.5 kb	细胞核 Nuclei
EhV	球石藻 <i>Emiliania huxleyi</i>	170~200	dsDNA, 410~415 kb	细胞质 Cytoplasm
HaNIV	赤潮异湾藻 <i>Heterosigma akashiwo</i>	30	-	细胞核 Nuclei
HaV	赤潮异湾藻 <i>Heterosigma akashiwo</i>	202	dsDNA, 294 kb	细胞核 Nuclei
HaRNAV	赤潮异湾藻 <i>Heterosigma akashiwo</i>	25	ssRNA, 9.1 kb	细胞质 Cytoplasm
HcRNAV	圆鳞异囊藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i>	30	ssRNA, 4.4 kb	细胞质 Cytoplasm
HcV	圆鳞异囊藻 <i>Heterocapsa circularisquama</i>	197	dsDNA, 356 kb	细胞质 Cytoplasm
MpRV	微单胞菌属 <i>Micromonas pusilla</i>	50~60	dsRNA, 24.6 kb	细胞质 Cytoplasm
MpV	微单胞菌属 <i>Micromonas pusilla</i>	115	dsDNA, 200 kb	细胞质 Cytoplasm
MpVN1	微单胞菌属 <i>Micromonas pusilla</i>	110~130	dsDNA	细胞质 Cytoplasm
MpVN2	微单胞菌属 <i>Micromonas pusilla</i>	110~130	dsDNA	细胞质 Cytoplasm
OlsI	赤潮异湾藻 <i>Heterosigma akashiwo</i>	30	dsDNA, 20 kb	细胞质 Cytoplasm
PgV-102P	球形棕囊藻 <i>Phaeocystis globosa</i>	98	dsDNA, 176 kb	细胞质 Cytoplasm
PgV Goup I	球形棕囊藻 <i>Phaeocystis globosa</i>	150	dsDNA, 466 kb	细胞质 Cytoplasm
PgV Goup II	球形棕囊藻 <i>Phaeocystis globosa</i>	100	dsDNA, 177 kb	细胞质 Cytoplasm
PoV	塔胞藻 <i>Pyramimonas orientalis</i>	180~220	dsDNA, 560 kb	细胞质 Cytoplasm
PpV	褐囊藻 <i>Phaeocystis pouchetii</i>	130~160	dsDNA, 485 kb	细胞质 Cytoplasm
RsRNAV	刚毛根管藻 <i>Rhizosolenia setigera</i>	32	ssRNA, 11.2 kb	细胞质 Cytoplasm
多细胞藻类病毒 Multicellular algal virus				
EsV	长囊水云 <i>Ectocarpus siliculosus</i>	130~150	dsDNA, 336 kb	细胞核 Nuclei
EfasV	水云属 <i>Ectocarpus fasciculatus</i>	135~140	dsDNA, 340 kb	细胞核 Nuclei
FlexV	费氏藻 <i>Feldmannia simplex</i>	120~150	dsDNA, 170 kb	细胞核 Nuclei
FirrV	费氏藻 <i>Feldmannia irregularis</i>	140~170	dsDNA, 180 kb	细胞核 Nuclei
FsV	费氏藻 <i>Feldmannia species</i>	150	dsDNA, 158 & 178 kb	细胞核 Nuclei
HincV	褐茸藻 <i>Hincksia hinckiae</i>	140~170	dsDNA, 220 kb	细胞核 Nuclei
MclaV	棍状毛丝藻 <i>Myrionotrichia claviformis</i>	170~180	dsDNA, 340 kb	细胞核 Nuclei
PlitV	褐藻 <i>Pilayella littoralis</i>	161	dsDNA, 280 kb	细胞核 Nuclei

它真核藻类病毒的报道。笔者认为在真核藻类病毒的研究中,最重要的和最困难的就是藻类病毒的分离,虽然有些真核藻类可以生长在固体培养基上,如蓝藻和小球藻。但是,大部分的真核藻类是无法在固体培养基上生长的,对于那些可以在固体培养基上生长的藻类,可以利用双层平板法来分离它们的病毒,而对于那些无法用固体培养基培养的藻类,就

需要用其它的一些方法来分离它们的病毒。

笔者在参考文献的基础上,总结了国外分离真核藻类病毒的一些基本方法:① 水样的处理。首先,先通过连续流动离心法或者用切向流超滤系统对水样进行浓缩。然后有两种处理方法,一种是直接过滤,另外一种是在过滤之前,先在紫外线下暴露一段时间,然后放入黑暗中,4℃保存备用。

这样做的好处是可以使一些潜伏性的病毒被诱导从而重新具有感染力。② 共培养. 将处理过的水样直接加入到指数生长期的藻液中共同培养, 加入水样和藻液的比例不是太一致, 从2%~50% (体积比) 不等, 有的在共同培养的过程中还不时添加一些营养盐, 来增加藻类病毒分离的可能性。③ 藻细胞裂解的检测. 有两种检测方法, 一种是光学显微镜下, 直接观测藻细胞是否被裂解. 另一种是利用叶绿素荧光检测仪, 来检测实验组与对照组中叶绿素的变化. 将检测结果与对照组进行比对。④ 重复. 将发生裂解的实验组中的液体经0.22 μm 的滤膜过滤后, 将滤液进行稀释, 类似于最大可能数法 (MPN), 得出能使藻细胞裂解的最大稀释倍数, 重复几次可以得到纯的藻类病毒。⑤ 验证. 得到的藻类病毒可以用流式细胞仪检测验证. 也可以经一些染料, 如DAPI、SYBR Green、SYBR Gold染色后, 用荧光显微镜经常检测验证. 或者直接用透射电镜进行检测验证。

2.3 藻类病毒与赤潮的关系

藻类病毒与赤潮关系的报道很多, 以我国南海赤潮多发种——球形棕囊藻 (*Phaeocystis globosa*) 为例, 人们发现棕囊藻病毒所导致的藻细胞裂解是球形棕囊藻赤潮消亡的主要原因^[76-78]。在自然界中, 赤潮发生时往往伴随着藻类病毒感染藻细胞概率的增加^[79], 病毒可能是藻类死亡的主要原因。在最近的球形棕囊藻实验当中, Brussaard等发现藻类病毒不仅可以控制藻类的种群动态变化^[80], 而且可以通过裂解藻类从而间接的影响微生物食物网的结构和功能^[81] (图1)。Nagasaki和Tomaru等在日本的Ago海湾对圆鳞异囊藻 (*Heterocapsa circularisquama*) 和它的病毒 (HcRNAV) 进行了长期的监控^[82-83], 他们发现圆鳞异囊藻形成的赤潮往往伴随着病毒裂解而造成病毒丰度的增加. 通过这些调查, 病毒对圆鳞异囊藻的影响不仅体现在数量上 (对宿主赤潮的调控), 而且还体现在性质上 (对环境中藻类种群结构的调节). 病毒感染被认为在赤潮爆发的时间和范围方面起到非常重要的调节作用^[83]。随着圆鳞异囊藻造成的赤潮的消退, 水体中HcRNAV病毒的丰度也快速地下降。

病毒的感染依靠于宿主细胞与可感染病毒颗粒的相遇, 当赤潮暴发时候, 藻细胞的数量急剧增加, 因此, 大大提高了藻类病毒与宿主藻细胞相遇的几率, 从而提高了病毒的感染与增殖. 特定的赤潮藻病毒能够在赤潮暴发的过程中快速地增长, 在球石藻 (*Emiliania huxleyi*) 赤潮消退的过程中, 在电镜的观察下, 有多达50%的球石藻细胞被病毒所感染^[84]。在褐潮藻 (*Aureococcus anophagefferens*) 赤潮结束的时候, 有38%的褐潮藻细胞含有病毒类粒子 (VLP)^[85]。在圆鳞异囊藻 (*Heterocapsa circularisquama*) 赤潮的高峰期时, 有近88%的藻细胞含有小的病毒类粒子 (VLP)^[82]。

藻类病毒不仅会导致藻细胞的死亡, 而且还能加速藻

细胞的沉降^[86]。因此, 一些藻类病毒会被一些被感染后的宿主细胞, 由于沉降作用而被带入到沉积物中去. Tomaru等发现藻类病毒在沉积物中的浓度大小与其宿主藻类所暴发赤潮的程度有重要的相关性^[83]。沉积物对病毒有着一定的保护作用, 能够长时间保持病毒的活性, Lawrence等发现在沉积物与水体的交界面以下40 cm的赤潮异湾藻 (*Heterosigma akashiwo*) 病毒仍然具有感染赤潮异湾藻的活性^[87]。

先前有关于浮游植物的报道认为, 营养元素匮乏和生理胁迫 (Physiological stress) 对于藻细胞的细胞凋亡影响要大于病毒感染对它的影响. 人们在被病毒感染的赤潮异湾藻中发现细胞凋亡的特征^[88], 并且, 在球石藻病毒中发现了有关细胞凋亡的基因^[58]。最近, Bidle等证实了病毒感染对球石藻细胞凋亡之间的联系, 他们将感染病毒的球石藻细胞与非感染病毒的球石藻进行比较, 发现病毒的感染对球石藻 metacaspase基因的表达有促进作用^[89]。

有些时候, 藻类可以采用一些方法来逃避病毒的感染, 以棕囊藻 (*Phaeocystis*) 为例, 棕囊藻是一种多生活形态的浮游藻类, 可以形成群体胶质囊这样一种由大量单细胞相互嵌合而成的群体, 这种生活类型的棕囊藻能够逃避棕囊藻病毒的感染^[90-91]。不过, 当水体中营养元素降低时, 这些藻细胞就会逐渐分开, 然后变得较容易被病毒所感染, 这时, 棕囊藻病毒的感染就加快了棕囊藻赤潮的消退^[90, 92]。另一个有关藻类逃避病毒感染的报道来自于Thyrhaug和他的同事们在实验室所做的工作, 他们发现藻类病毒能与其宿主共存并不是因为宿主对病毒的抵抗, 认为当宿主被裂解后释放了某种物质, 从而导致了病毒对同种藻类感染几率的减少^[93]。在球石藻及其病毒共存体系当中, 即使再次加入病毒液, 这个体系也依然稳定. 同样的现象在噬菌体与其宿主的共存体系当中也有发现^[94-95], 他认为这种现象是由缺损性干扰病毒颗粒 (Defective interfering particles DI) 造成的, 缺损性干扰病毒颗粒是一种只含有部分基因组的病毒颗粒, 由于它只含有野生型病毒的部分基因组, 因此, 其基因组片段分子量较小, 与野生型病毒基因组片段比较起来, 复制更快, 从而导致它与原基因组竞争聚合酶. 另外, 由于它们缺少某些基因, 可能不能编码功能性蛋白质, 从而要与原基因组竞争衣壳蛋白, 因此会对野生型病毒基因片段正常复制和衣壳蛋白的正常包裹造成干扰, 最终影响到野生型病毒一些正常功能的发挥。

藻类病毒往往具有种内特异性, Nagasaki和Tomaru曾报道了藻病毒HcRNAV在水体中具有2个类型^[72, 82], 推测是它们的衣壳蛋白表面的纳米结构有所不同, 导致了宿主的种内特异性. 因此, 这个病毒受体上纳米级结构差异, 决定了宿主的敏感范围, 如HcRNAV的两个类型裂解两株不同属的 *H.circularisquama* 藻 (A和B)。虽然病毒受体还没有被鉴定, 但相似的关系在硅藻及其病毒的相互关系中也被发现, 例如

RsRNAV^[71]、CdebDNAV^[62]。这些有关探讨病毒和宿主之间关系的研究是十分重要的。

目前报道的藻类病毒的氨基酸序列和基因数据库对藻类病毒的BLAST分析和系统进化分析是远远不足的。也就是说,目前发现的藻类病毒之间的亲缘关系是十分疏远的。Lang等曾经提议将一种感染赤潮异弯藻的ssRNA病毒(HaRNAV)归为一个名叫Marnaviridae的病毒家族^[96],这个病毒家族只有这一株病毒。但是,对任何一个目前报道的ssRNA藻类病毒通过系统发育分析的结果和ORFs数量的多少分析得出,这些新报道的ssRNA藻类病毒都不属于Marnaviridae病毒家族,如HaRNAV病毒只含有一个ORF, RsRNAV病毒和HcRNAV病毒含有2个ORFs。并且,系统发育分析显示HcRNAV病毒和HaRNAV、RsRNAV、SssRNAV病毒之间的亲缘关系非常远^[97]。因此,增加各种不同的藻类病毒的相关数据,对于以后的研究十分有意义。

3 展望

藻类病毒在海洋中有着非常高的丰度和多样性,随着人们分离到越来越多的藻类病毒,可以预见,对藻类病毒进行进一步的分类工作十分必要。对于已经分离得到的藻类病毒进行全基因组测序也是十分必要的,因为这对于病毒之间的比对和藻类病毒系统发育的分析十分重要。研究藻类病毒与藻类之间的关系,特别是研究藻类病毒裂解藻类的机制可以为藻类病毒早日应用于赤潮防治打下坚实的基础,而这恰恰是藻类病毒研究的薄弱环节,未来结合蛋白质组学技术可能可以阐明藻类病毒裂解藻类的机制。虽然人们对具有感染性的藻类病毒在生态系统中所起的作用有了较深入的理解,如在生物地球化学循环、种群结构的调节及微食物环中的作用等,但对于浮游植物中潜伏的病毒在整个生态系统中所起到的作用和地位了解较少,而这些潜伏的病毒在整个生态系统基因流动方面所起到的作用将是十分巨大的。对于藻类病毒的研究,国外已经进行得相当深入了,而我国还处在起步阶段。我国的海岸线十分漫长,赤潮发生较为频繁,如何将藻

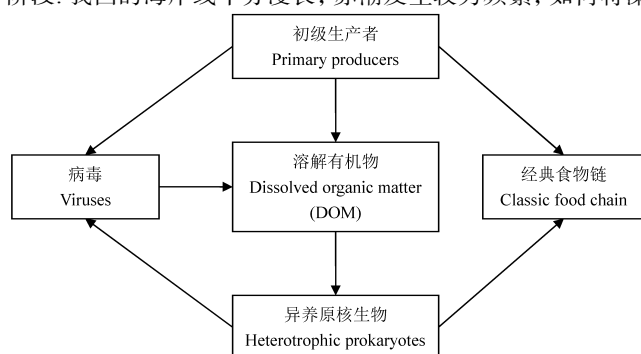


图1 病毒介入的海洋微生物食物环

Fig. 1 Viruses involved in the marine microbial food web

类病毒应用到对赤潮的长期调控上,以及有关藻类病毒裂解藻类的机制和与藻类病毒相关的生态学方面的研究将十分必要和意义重大。有理由相信,我国藻类病毒研究和利用的前景将十分广阔。

References

- 1 Spencer R. A marine bacteriophage. *Nature*, 1955, **175**: 690~691
- 2 Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Haldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 1989, **340**: 467~468
- 3 Suttle CA. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5** (10): 801~812
- 4 Suttle CA. Viruses in the sea. *Nature*, 2005, **437**: 356~360
- 5 Weinbauer MG, Rassoulzadegan F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ Microbiol*, 2004, **6** (1): 1~11
- 6 Fuhrman JA. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 1999, **399** (6736): 541~548
- 7 Yang XR (杨小茹), Zheng TL (郑天凌), Su JQ (苏建强), Yu ZM (俞志明), Song XX (宋秀贤). Marine Viruses - a new and promising tool for red-tide control. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (5): 651~656
- 8 Wang F (王斐), Zheng TL (郑天凌), Hong HS (洪华生). The important role of marine viruses in microbial loop. *Mar Sci* (海洋科学), 1998, **4**: 41~43
- 9 Mann NH, Cook A, Millard A, Bailey S, Clokie M. Marine ecosystems: bacterial photosynthesis genes in a virus. *Nature*, 2003, **424** (6950): 741
- 10 Lindell D, Jaffe JD, Coleman ML, Futschik ME, Axmann IM, Rector T, Kettler G, Sullivan MB, Steen R, Hess WR, Church GM, Chisholm SW. Genome-wide expression dynamics of a marine virus and host reveal features of co-evolution. *Nature*, 2007, **449** (7158): 83~86
- 11 Wu RZ (吴瑞贞), Ma Y (马毅). Analysis on spatial and temporal distribution and cause of red tides over past 20 years in South China Sea. *Mar Environ Sci* (海洋环境科学), 2008, **27** (1): 30~32
- 12 Zheng TL (郑天凌), Su JQ (苏建强). The role of marine microorganism in the occurrence and declination of red-tide. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2003, **27** (3): 291~295
- 13 Zheng TL, Su JQ, Maskaoui K, Yu ZM, Hu Z, Xu JS, Hong HS. Microbial modulation in the biomass and toxin production of a red-tide causing alga. *Mar Pollut Bull*, 2005, **51** (8~12): 1018~1025
- 14 Bai SJ, Huang LP, Su JQ, Tian Y, Zheng TL. Algicidal effects of a novel marine actinomycete on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Curr Microbiol*, 2011, **62** (6): 1774~1781
- 15 Zhao YJ (赵以军), Cheng K (程凯), Shi ZL (石正丽), Guo YX (郭亚新), Zhu HY (祝海燕), Zhang JH (张建红), Liu YD (刘永定). 我国首株噬藻体(蓝藻病毒)的分离与鉴定. *自然科学进展*, 2002, **12** (9): 923~927

- 16 Hou K (候昆), Cheng K (程凯), Xu M (许敏), Zhao YJ (赵以军). The genetic diversity of PP-like cyanophage in Donghu Lake of Wuhan. *J Huazhong Norm Univ Nat Sci* (华中师范大学学报自然科学版), 2008, **42** (1): 93~96
- 17 Zhang YP, Burbank DE, Van Etten JL. Chlorella viruses isolated in China. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54** (9): 2170~2173
- 18 Zhang YZ (张远征), Wang SY (王苏燕), Sheng G (盛刚), Yie Y (叶寅), Tian B (田波). Chlorella virus is first isolated in China. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 1996, **36** (1): 67~68
- 19 Safferman RS, Cannon RE, Desjardins PR, Gromov BV, Haselkorn R, Sherman LA, Shilo M. Classification and nomenclature of viruses of cyanobacteria. *Intervirology*, 1983, **19** (2): 61~66
- 20 Safferman RS, Morris ME. Algal virus: isolation. *Science*, 1963, **140**: 679~680
- 21 Sherman LA, Connelly M. Isolation and characterization of a cyanophage infecting the unicellular blue-green algae *A. nidulans* and *S. cedrorum*. *Virology*, 1976, **72** (2): 540~544
- 22 Adolph KW, Haselkom R. Isolation and characterization of a virus infecting the blue-green alga of the genus *Synechococcus*. *Virology*, 1973, **54** (1): 230~236
- 23 Li WK, Rao DV, Harrison WG, Smith JC, Cullen JJ, Irwin B, Platt T. Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science*, 1983, **219** (4582): 292~295
- 24 Partensky F, Hess WR, Vaulot D. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63** (1): 106~127
- 25 Liu H, Campbell L, Landry MR, Nolla HA, Brown SL, Constantinou J. *Prochlorococcus* and *Synechococcus* growth rates and contributions to production in the Arabian Sea during the 1995 southwest and northeast monsoons. *Deep-Sea Res II*, 1998, **45** (10~11): 2327~2352
- 26 Proctor LM, Fuhrman JA. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 1990, **343**: 60~62
- 27 Waterbury JB, Valois FW. Resistance to co-occurring phages enables marine *synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (10): 3393~3399
- 28 Wilson WH, Joint IR, Carr NG, Mann NH. Isolation and molecular characterization of five marine cyanophages propagated on *Synechococcus* sp. strain WH7803. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (11): 3736~3743
- 29 Suttle CA, Chan AM. Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, **92**: 99~109
- 30 Sullivan MB, Waterbury JB, Chisholm SW. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Nature*, **424** (6952): 1047~1051
- 31 Sullivan MB, Coleman ML, Weigle P, Rohwer F, Chisholm SW. Three *Prochlorococcus* cyanophage genomes: signature features and ecological interpretations. *PLoS Biol*, 2005, **3** (5): e144
- 32 Lu J, Chen F, Hodson RE. Distribution, isolation, host specificity, and diversity of cyanophages infecting marine *Synechococcus* spp. in river estuaries. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (7): 3285~3290
- 33 Chen F, Lu J. Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (5): 2589~2594
- 34 Zhong Y, Chen F, Wilhelm SW, Poorvin L, Hodson RE. Phylogenetic diversity of marine cyanophage isolates and natural virus communities as revealed by sequences of viral capsid assembly protein gene g20. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (4): 1576~1584
- 35 Brussaard CP, Noordeloos AA, Sandaa RA, Haldal M, Bratbak G. Discovery of a dsRNA virus infecting the marine photosynthetic protist *Micromonas pusilla*. *Virology*, 2004, **319** (2): 280~291
- 36 Van Etten JL, Lane LC, Meints RH. Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. *Microbiol Rev*, 1991, **55** (4): 586~620
- 37 Zingone A, Casotti R, d'Alcalà MR, Scardi M, Marino D. 'St Martin's Summer': the case of an autumn phytoplankton bloom in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *J Plankton Res*, 1995, **17** (3): 575~593
- 38 Lee RE. Systemic viral material in the cells of the freshwater red alga *Sirodotia tenuissima* (Holden) Skuja. *J Cell Sci*, 1971, **8** (3): 623~631
- 39 Pickett-Heaps JD. A possible virus infection in the green alga *Oedogonium*. *J Phycol*, 1972, **8** (1): 44~47
- 40 Toth R, Wilce RT. Viruslike particles in the marine alga chorda *Tomentosa lyngbye* (Phaeophyceae). *J Phycol*, 1972, **8** (1): 126~130
- 41 Mattox KR, Stewart KD. Probably virus infections in four genera of green algae. *Can J Microbiol*, 1972, **18** (10): 1620~1621
- 42 Kawakami H, Kawakami N. Behavior of a virus in a symbiotic system, *Paramecium bursaria*-zoochlorella. *J Eukaryotic Microbiol*, 1978, **25** (2): 217~225
- 43 Meints RH, Van Etten JL, Kuczmarski D, Lee K, Ang B. Viral infection of the symbiotic chlorella-like alga present in *Hydra viridis*. *Virology*, 1981, **113** (2): 698~703
- 44 Van Etten JL, Meints RH, Kuczmarski D, Burbank DE, Lee K. Viruses of symbiotic chlorella-like algae isolated from *Paramecium bursaria* and *Hydra viridis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79** (12): 3867~3871
- 45 Rohozinski J, Girtan LE, Van Etten JL. *Chlorella* viruses contain linear nonpermuted double-stranded DNA genomes with covalently closed hairpin ends. *Virology*, 1989, **168** (2): 363~369
- 46 Li Y, Lu Z, Sun L, Ropp S, Kutish GF, Rock DL, Van Etten JL. Analysis of 74 kb of DNA located at the right end of the 330-kb chlorella virus

- PBCV-1 genome. *Virology*, 1997, **237** (2): 360~377
- 47 Mayer JA, Taylor FJR. A virus which lyses the marine nanoflagellate *Micromonas pusilla*. *Nature*, 1979, **281**: 299~301
 - 48 Waters RE, Chan AT. *Micromonas pusilla* virus: the virus growth cycle and associated physiological events within the host cell; host range mutation. *J gen Virol*, 1982, **63**: 199~206
 - 49 Müller DG. Mendelian segregation of a virus genome during host meiosis in the marine brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *J Plant Physiol*, 1991, **137**: 739~743
 - 50 Müller DG, Frenzer K. Virus infecting in three marine brown algae: *Feldmannia irregularis*, *F. simplex*, and *Ectocarpus siliculosus*. *Hydrobiologia*, 1993, **260/261**: 37~44
 - 51 Müller DG, Sengco M, Wolf S, Bräutigam M, Schmid CE, Kapp M, Knippers R. Comparison of two DNA viruses infecting the marine brown algae *Ectocarpus siliculosus* and *E. fasciculatus*. *J Gen Virol*, 1996, **77** (Pt 9): 2329~2333
 - 52 Delaroque N, Maier I, Knippers R, Müller DG. Persistent virus integration into the genome of its algal host, *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *J Gen Virol*, 1999, **80** (Pt 6): 1367~1370
 - 53 Klein M, Lanka ST, Knippers R, Müller DG. Coat protein of the *Ectocarpus siliculosus* virus. *Virology*, 1995, **206** (1): 520~526
 - 54 Delaroque N, Müller DG, Bothe G, Pohl T, Knippers R, Boland W. The complete DNA sequence of the *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 genome. *Virology*, 2001, **287** (1): 112~132
 - 55 Tarutani K, Nagasaki K, Itakura S. Isolation of virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat Microb Ecol*, 2001, **23**: 103~111
 - 56 Castberg T, Thyrhaug R, Larsen A, Sandaa RA, Heldal M, Van Etten JL, Bratbak G. Isolation and characterization of a virus that infects *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae). *J Phycol*, 2002, **38** (4): 767~774
 - 57 Wilson WH, Tarran GA, Schroeder D, Cox M, Oke J, Malin G. Isolation of viruses responsible for the demise of an *Emiliania huxleyi* bloom in the English Channel. *J Mar Biol Assoc UK*, 2002, **82**: 369~377
 - 58 Wilson WH, Schroeder DC, Allen MJ, Holden MT, Parkhill J, Barrell BG, Churcher C, Hamlin N, Mungall K, Norbertczak H, Quail MA, Price C, Rabinowitsch E, Walker D, Craigmiles M, Roy D, Ghazal P. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a *Coccolithovirus*. *Science*, 2005, **309** (5737): 1090~1092
 - 59 Van Etten JL. Phycodnaviridae. In: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD eds. *Virus Taxonomy*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vienna & New York: Springer-Verlag, 1995. 100~103
 - 60 Van Etten JL. Family Phycodnaviridae. In: Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner PB eds. *Virus Taxonomy*. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Calif, USA: Academic Press, 2000. 183~193
 - 61 Wilson WH, Van Etten JL, Schroeder DC, Nagasaki K, Brussaard CPD, Delaroque N, Bratbak G, Suttle CA. Phycodnaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA eds. *Virus Taxonomy*. 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Calif, USA: Elsevier Academic Press, 2005. 163~175.
 - 62 Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Koike K, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* grunow. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77** (15): 5285~5293
 - 63 Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Chaetoceros socialis*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75** (8): 2375~2381
 - 64 Nagasaki K. Dinoflagellates, diatoms, and their viruses. *J Microbiol*, 2008, **46** (3): 235~243
 - 65 Brussaard CPD, Martinez JM. Algal Bloom Viruses. *Plant Viruses, Global Sci Books*, 2008, **2** (1): 1~13
 - 66 Tai V, Lawrence JE, Lang AS, Chan AM, Culley AI, Suttle CA. Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J Phycol*, 2003, **39** (2): 343~352
 - 67 Nagasaki K, Yamaguchi M. Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Aquat Microb Ecol*, 1997, **13**: 135~140
 - 68 Jacobsen A, Bratbak G, Heldal M. Isolation and characterization of a virus infecting *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *J Phycol*, 1996, **32**: 923~927
 - 69 Sandaa RA, Heldal M, Castberg T, Thyrhaug R, Bratbak G. Isolation and characterization of two viruses with large genome size infecting *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae) and *Pyramimonas orientalis* (Prasinophyceae). *Virology*, 2001, **290** (2): 272~280
 - 70 Garry RT, Hearing P, Cosper EM. Characterization of lytic virus infectious to the bloom-forming microalga *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *J Phycol*, 1998, **34**: 616~621
 - 71 Nagasaki K, Tomaru Y, Katanozaka N, Shirai Y, Nishida K, Itakura S, Yamaguchi M. Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70** (2): 704~711
 - 72 Tomaru Y, Katanozaka N, Nishida K, Shirai Y, Tarutani K, Yamaguchi M, Nagasaki K. Isolation and characterization of two distinct types of

- HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquat Microb Ecol*, 2004, **34**: 207~218
- 73 Nagasaki K, Tomaru Y, Takao Y, Nishida K, Shirai Y, Suzuki H, Nagumo T. Previously unknown virus infects marine diatom. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (7): 3528~3535
- 74 Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Koike K, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77** (15): 5285~5293
- 75 Tomaru Y, Toyoda K, Kimura K, Hata N, Yoshida M, Nagasaki K. First evidence for the existence of pennate diatom viruses. *ISME J*, 2012, doi: 10.1038/ismej.2011.207
- 76 Brussaard CPD, Riegman R, Noordeloos AAM, Cadée GC, Witte H, Kop AJ, Nieuwland G, van Duyl FC, Bak RPM. Effects of grazing, sedimentation and phytoplankton cell lysis on the structure of a coastal pelagic food web. *Mar Ecol Progr Ser*, 1995, **123**: 259~271
- 77 Brussaard CPD, Gast GJ, Van Duyl FC, Riegman R. Impact of phytoplankton bloom magnitude on a pelagic microbial food web. *Mar Ecol Progr Ser*, 1996, **144**: 211~221
- 78 Van Boekel WHM, Hansen FC, Riegman R, Bak RPM. Lysis induced decline of a *Phaeocystis* spring bloom and coupling with the microbial food web. *Mar Ecol Progr Ser*, 1992, **81**: 269~276
- 79 Brussaard CPD, Short SM, Frederickson CM, Suttle CA. Isolation and phylogenetic analysis of novel viruses infecting the phytoplankton *Phaeocystis globosa* (prymnesiophyceae). *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**: 3700~3705
- 80 Brussaard CPD, Kuipers B, Veldhuis MJW. A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics: I. Regulatory role of viruses in bloom control. *Harmful Algae*, 2005, **4**: 859~874
- 81 Brussaard CPD, Mari X, Van Bleijswijk JDL, Veldhuis MJW. A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* (prymnesiophyceae) population dynamics: II. Significance for the microbial community. *Harmful Algae*, 2005, **4**: 875~893
- 82 Nagasaki K, Tomaru Y, Nakanishi K, Hata N, Katanozaka N, Yamaguchi M. Dynamics of *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) and its viruses in ago bay, Japan. *Aquat Microb Ecol*, 2004, **34**: 219~226
- 83 Tomaru Y, Hata N, Masuda T, Tsuji M, Igata K, Masuda Y, Yamatogi T, Sakaguchi M, Nagasaki K. Ecological dynamics of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* and its infectious viruses in different locations of western Japan. *Environ Microbiol*, 2007, **9** (6): 1376~1383
- 84 Brussaard CPD, Kempers RS, Kop AJ, Riegman R, Haldal M. Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliania huxleyi* in the North Sea. *Aquat Microb Ecol*, 1996, **10**: 105~113
- 85 Gobler CJ, Deonaraine S, Leigh-Bell J, Gastrich MD, Anderson OR, Wilhelm SW. Ecology of phytoplankton communities dominated by *Aureococcus anophagefferens*: the role of viruses, nutrients, and microzooplankton grazing. *Harmful Algae*, 2004, **3** (4): 471~483
- 86 Lawrence JE, Suttle CA. Effect of viral infection on sinking rates of *Heterosigma akashiwo* and its implications for bloom termination. *Aquat Microb Ecol*, 2004, **37**: 1~7
- 87 Lawrence JE, Chan AM, Suttle CA. Viruses causing lysis of the toxic bloom forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae) are widespread in coastal sediments of British Columbia, Canada. *Limnol & Oceanogr*, 2002, **47**: 545~550
- 88 Lawrence JE, Chan AM, Suttle CA. A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J Phycol*, 2001, **37**: 216~222
- 89 Bidle KD, Haramaty L, Barcelose Ramos J, Falkowski P. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104** (14): 6049~6054
- 90 Ruardij P, Veldhuis MJW, Brussaard CPD. Modeling the bloom dynamics of the polymorphic phytoplankter *Phaeocystis globosa*: impact of grazers and viruses. *Harmful Algae*, 2005, **4**: 941~963
- 91 Jacobsen A, Larsen A, Martínez-Martínez J, Verity PG, Frischer ME. Susceptibility of colonies and colonial cells of *Phaeocystis pouchetii* (Haptophyta) to viral infection. *Aquat Microb Ecol*, 2007, **48**: 105~112
- 92 Baudoux AC, Noordeloos AAM, Veldhuis MJW, Brussaard CPD. Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during a spring bloom in temperate coastal waters. *Aquat Microb Ecol*, 2006, **44**: 207~217
- 93 Thyrhaug R, Larsen A, Thingstad F T, Bratbak G. Stable coexistence in marine algal host-virus systems. *Mar Ecol Progr Ser*, 2003, **254**: 27~35
- 94 Wolf A, Zheng TL, Witzel KP, Jost G. Impact of initial phage/host ratio and nutrient addition on coexistence in a phage-host system. *Aquat Microb Ecol*, 2004, **35**: 131~139
- 95 Cai W, Wang H, Tian Y, Chen F, Zheng T. Influence of a bacteriophage on the population dynamics of toxic dinoflagellates by lysis of algicidal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2011, **77**(21): 7837~7840
- 96 Lang AS, Culley AI, Suttle CA. Genome sequence and characterization of a virus (HaRNAV) related to picorna-like viruses that infects the marine toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. *Virology*, 2004, **320**: 206~217
- 97 Shirai Y, Takao Y, Mizumoto H, Tomaru Y, Honda D, Nagasaki K. Genomic and phylogenetic analysis of a single stranded RNA virus infecting *Rhizosolenia setigera* (Stramenopiles: Bacillariophyceae). *J Mar Biol Assoc UK*, 2006, **86**: 475~483