

ミドリゾウリムシ由来クロレラのアメーバ細胞質への感染と その宿主細胞の増殖に及ぼす影響

八島 洋一*, 松政正俊*, 菊池 進*

(受付 2003年10月17日)

Infection of *Chlorella* from *Paramecium bursaria* into the Cytoplasm of
Amoeba proteus and its Influence on the Host Cell Division

Yoichi Yashima, Masatoshi Matsumasa, and Susumu Kikuchi

Amoeba proteus was fed with a symbiotic *Paramecium bursaria* (G cell) harbouring *Chlorella* sp. The processes of food vacuole formation and infection of *Chlorella* into the cytoplasm of *Amoeba proteus* were observed under the light and the electron microscopes. The results showed that some large food vacuoles were formed by taking in an individual G cell and each of them gradually divided into several smaller food vacuoles. In these processes G cells were digested but *Chlorella* was not digested nor excreted. As a result each *Chlorella* cell remained wrapped in a membrane derived from the food vacuoles and the infection of *Chlorella* into the cytoplasm of *Amoeba* was established. These *Chlorella* cells were kept in *Amoeba* at least for a month. We also observed that *Amoeba*, when fed an aposymbiotic *P. bursaria* (W cell) with no *Chlorella*, formed some large food vacuoles. The large food vacuole did not undergo fission but gradually became smaller, with the cell being digested.

In order to examine the influence of the infection of *Chlorella* on the proliferation of *Amoeba*, *Amoeba* with *Chlorella* (G *Amoeba*) and *Amoeba* without *Chlorella* (W *Amoeba*) were cultured in the dark and in two levels of illumination intensity and the proliferation of *Amoeba* was measured. The result showed that the proliferation of W *Amoeba* was inhibited when illumination was intensified but growth number of G *Amoeba* was constant to a certain level of illumination. This fact suggest that the infection of *Chlorella* gave a property of photoresistance to *Amoeba*.

はじめに

原生動物の繊毛虫類では、クロレラ (Karakashian 1975; Reisser 1986) や細菌 (Sonneborn 1959; Preer et al. 1974) と共生している例が数多く知られている。通常は餌と

して取り込まれて消化されるクロレラや細菌が、どのようにして宿主と共生関係を構築してきたのか、興味深いところである。

このような観点から注目される例として、アメーバと桿菌が実験室内で共生関係を成立させ

* 岩手医科大学 教養部 生物

* Department of Biology, School of Liberal Arts and Sciences, Iwate Medical University

たとする報告がある (Jeon 1972, Jeon and Jeon 1976)。それによると, *Amoeba proteus* の培養中に偶然起こった桿菌の感染により, 大部分のアメーバが死滅し, その後生き残った一部の桿菌を含む個体が増殖をはじめ, 両者の間に共生関係が成立したものと推測されている。その後, この桿菌を含むアメーバの核移植実験により, 感染した細胞の核は短時間のうちに変化し, 未感染の細胞に対して致死作用や不適合性を示すことが確かめられた (Lorch and Jeon 1982)。しかし, これは一度偶然に起こった結果の唯一の例であり, その後も同様な報告はなされていない。

クロレラの共生に関しては, 繊毛虫類のミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) が古くから知られており, さらに実験的にクロレラを除去した個体にミドリゾウリムシ由来のクロレラを再感染させることができることも多くの研究者によって報告されている (Karakashian 1975; Reisser et al. 1985)。この再感染実験では, 食胞に取り込まれた大量のクロレラの大部分は消化されるものの, 生き残った数個のクロレラが増殖し再び共生関係を築くことが確認されている (Weis and Ayara 1979)。

一方, アメーバの仲間ではクロレラの共生が見られるのは *Mayorella viridis*, *Amoeba stigmatica* (石井 1999) と *Chaos zoochlorellae* (Willumse 1982) で, *Amoeba proteus* では知られていない。しかし *Amoeba proteus* を含む数種類のアメーバに餌としてミドリゾウリムシを与えると, アメーバ細胞内に取り込まれたミドリゾウリムシ由来のクロレラが, 消化されないで10日間程度細胞内に留まったとの報告がある (Afon'kin and Goodkov 1989)。

クロレラと共生するミドリゾウリムシは恒明条件で恒暗条件よりも良く増殖し, 飢餓状態におかれても数ヶ月間は生存できる。このことから少なくとも恒明条件においてはクロレラが宿主であるミドリゾウリムシの増殖に正の影響を与えている。一方, アメーバでは光や熱によって細胞分裂が阻害されることが知られており

(Chatterjee and Bhattacharjee 1975, 1976), アメーバにおいてもクロレラの感染により光の感受性が変化し, 恒明条件下でも増殖できる可能性を示唆する。

本研究ではこの点を明らかにするため, アメーバの食胞形成過程を形態学的に詳しく調べ, 細胞内へのクロレラの取り込みと感染の過程を明らかにするとともに, 感染したクロレラが照度を変えた条件下でアメーバの細胞分裂に及ぼす影響について調べた。

材料と方法

材料はアメーバ (*Amoeba proteus*) を用い, その餌としては予備培養でテトラヒメナ (*Tetrahymena* sp.) を, 実験群ではミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) を用いた。アメーバは盛岡市にある岩手公園の池から, ミドリゾウリムシとテトラヒメナは同じく嶺山神社の池からそれぞれ採集した。

1) ミドリゾウリムシの予備培養と緑色および白色細胞クローンの作製

採集したミドリゾウリムシを単離・増殖し, 1個体由来のクローンを作製した。培養液としては, ゾウリムシ用の0.3% Wheat Grass Powder (Pines International 社) 浸出液に1ℓあたり $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1g と β -シトステロール 0.4mg を加え, これにバクテリア (*Klebsiella pneumoniae*) を接種して24時間経過したものをを用いた。予備培養した同一クローン由来のミドリゾウリムシを二分し, 25℃ で恒明条件 (24時間照明) と恒暗条件 (24時間黒い袋で遮光) に置き, 前者からはクロレラの共生している緑色細胞 (G細胞, 図2) 群を, 後者からはクロレラを失った白色細胞 (W細胞, 図12) 群を得た。アメーバの餌としては, これらの培養の定常期にある細胞を用いた。

2) アメーバのクローン作製と予備培養

採集したアメーバ1個体を100倍に希釈した KCM 塩類溶液 (石井1999, 以下 KCM と略す)

20mlを入れた9 cm プラスチックシャーレ（ヌンク社製）に単離し，小麦粒数個とあらかじめ培養しておいたテトラヒメナを加えて22℃で培養した（図1）。これを増殖させて1個体由来のクローンを作製した。これより20個体ずつのアメーバを2 mlのKCMを含む4 cm シャーレ2個に移した。次に，約50mlの培養液で培養したミドリゾウリムシのG細胞とW細胞を手回し遠心機で分離・濃縮し，KCMで2回洗浄を行って同程度の密度に調整した後，それぞれのシャーレに餌として加えて室内の明暗条件下で予備培養を行った。

3) 光学顕微鏡による食胞形成過程とクロレラの感染過程の観察

アメーバにミドリゾウリムシを与えてから1時間以内に実体顕微鏡で観察し，2-3個体のG細胞またはW細胞を食胞として取り込んだアメーバをスライドガラス上のKCMを満たした微生物観察リング（中村理科製）の中に移した。これらにカバーガラスを乗せてプレパラートを作成し，光学顕微鏡を用いて食胞内でのミドリゾウリムシの消化とクロレラ単独からなる食胞が形成されていく過程を追跡した。

4) 電子顕微鏡による観察

食胞形成過程の各時期にあるアメーバを実体顕微鏡で観察して数個体ずつ少量のKCMの入ったデプレッションスライドガラスに移し，0.05Mのリン酸緩衝液（pH7.4）で調整した3%グルタルアルデヒド1 mlをその容器に直接加え，室温で1時間の前固定を行った。これをリン酸緩衝液で3回洗浄した後，同緩衝液で調整した1%四酸化オスミウムで，0℃で1時間の後固定を行った。

固定後，上昇エタノール系列で脱水し，QY-2を通してSpurr樹脂による2回の置換と包埋を行い，これを60℃で2日間重合させて透過型電子顕微鏡（以下電顕と略す）用試料とした。この試料から超薄切片を作成して酢酸ウランとクエン酸鉛による電子染色を行い，透過型

電子顕微鏡（日立H-7100）で観察・撮影した。

5) クロレラ感染アメーバと非感染アメーバの増殖に対する照度の影響

ミドリゾウリムシのG細胞を餌として培養を続けるとアメーバにクロレラが感染して細胞が緑色に見えるようになるが，W細胞を餌として培養したアメーバは細胞が白色に見える。そこでこれらのアメーバを緑色アメーバ，白色アメーバと呼んで区別し，それぞれGアメーバ・Wアメーバと略称する。

NUNC社製のマルチデッシュ48ウェルの16個のウェルにKCM 0.4mlを注入し，それぞれにGあるいはWアメーバ1個体に移した。これらに，あらかじめKCMで2回洗浄して同密度になるように濃縮・調整した餌のミドリゾウリムシ（G細胞あるいはW細胞のいずれか）をパスツールピペットで各3滴滴下した。培養時の照度は蛍光灯を光源として0，750，1300 lxの3段階とした。この12通り（アメーバ2株，ミドリゾウリムシ2株，照度3段階の組み合わせ）の実験群を21℃で1週間培養した後，各ウェルの細胞数を実体顕微鏡で計測した。

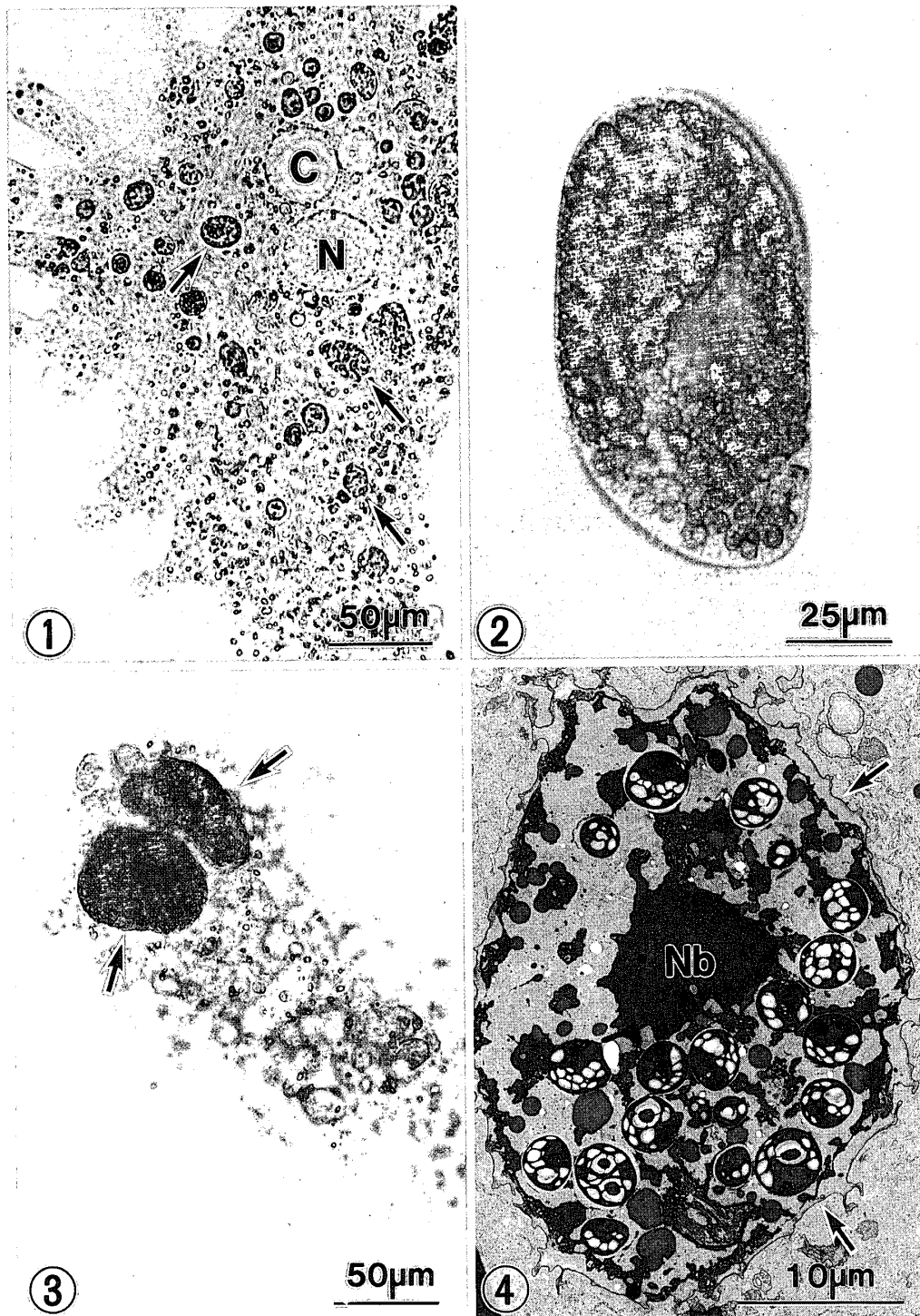
6) 各条件における細胞数の平均値と統計処理

各条件における培養後の細胞数についてKolmogorov-Smirnovの1試料検定法を用いて調べたところ，変数変換をしても正規性は確保できなかった。そこで，各群の独立2試料（アメーバの株間および餌の株間）の観察値はMann-WhitneyのU-検定法で，独立多試料（照度3段階）についてはKruskal-Wallisの検定法を用いて比較・検討した。なお，有意差は5%の危険率で判定した。

結果

1) 食胞形成過程とクロレラの感染

アメーバは，給餌1時間以内にミドリゾウリムシのG細胞を取り込んだ大きな食胞（大食胞）2-3個を形成し，それぞれの食胞にはG細胞が1個体ずつ含まれていた（図3）。電顕



- 図1. テトラヒメナを餌にして培養したアメーバの光学顕微鏡写真。細胞内には、食胞に取り込まれて消化される過程のテトラヒメナが認められる(矢印)。C:収縮胞, N:核。
- 図2. ミドリゾウリムシ。細胞内にクロレラが共生しているので、全体が緑色に見える(G細胞)。
- 図3. ミドリゾウリムシのG細胞を食胞に取り込んで間もないアメーバ。食胞内のミドリゾウリムシは、まだ消化されていない(矢印)。
- 図4. 図3と同じ時期の食胞部分を拡大した透過型電子顕微鏡写真。食胞膜(矢印)に囲まれたミドリゾウリムシは、核(Nb)やクロレラを含めて全体がほぼ原型をとどめている。

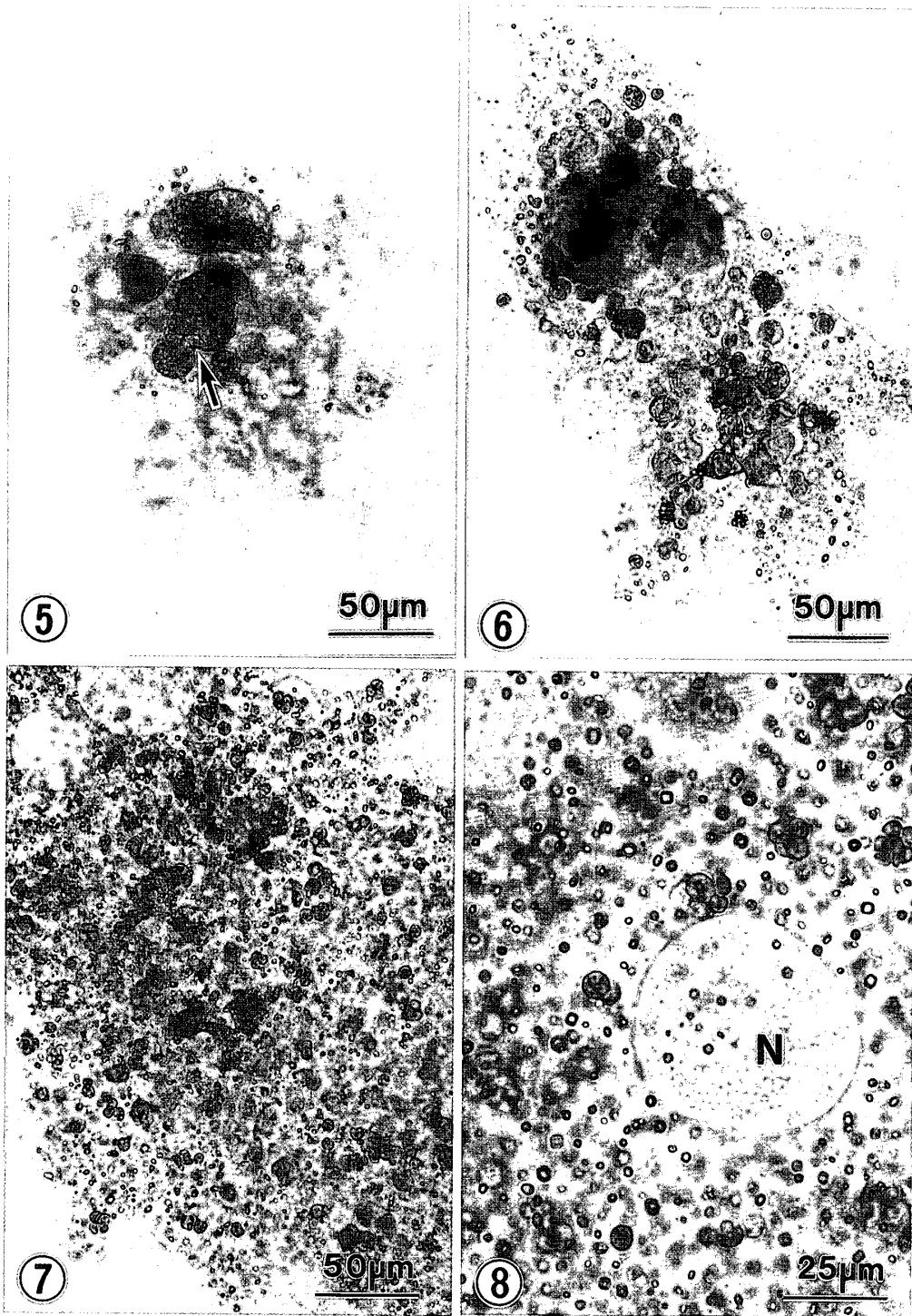


図5. 図3と同様のアメーバ。食胞がちぎれていく様子が見られる (矢印)。
図6. 図5と同様のアメーバ。右下の部分のように、時間経過とともに食胞が小型化していく。
図7. さらに時間が経つと、食胞の小型化が顕著になる。
図8. 図7と同じ時期の核 (N) 周囲部の拡大写真。一個だけのクロレラを含む食胞が多く認められる。

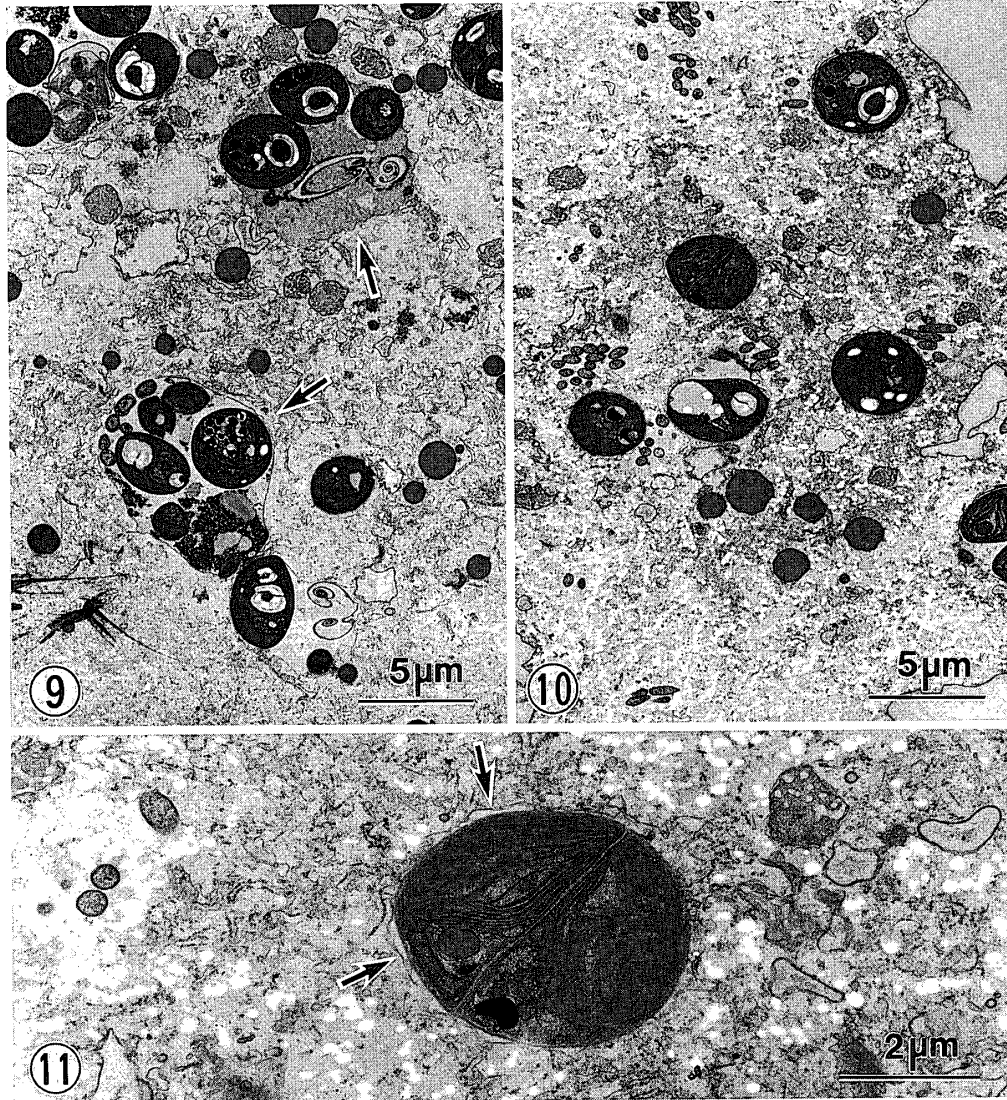


図9. 食胞が小型化し始めた時期の透過型電子顕微鏡写真。一つの食胞内に数個のクロレラが含まれている（矢印）。

図10. 時間経過とともに、細胞内には単一のクロレラを含む食胞が多くなる。

図11. 図10の部分拡大。食胞膜に囲まれたこのクロレラでは、葉緑体中のラメラ構造などが正常に見える。

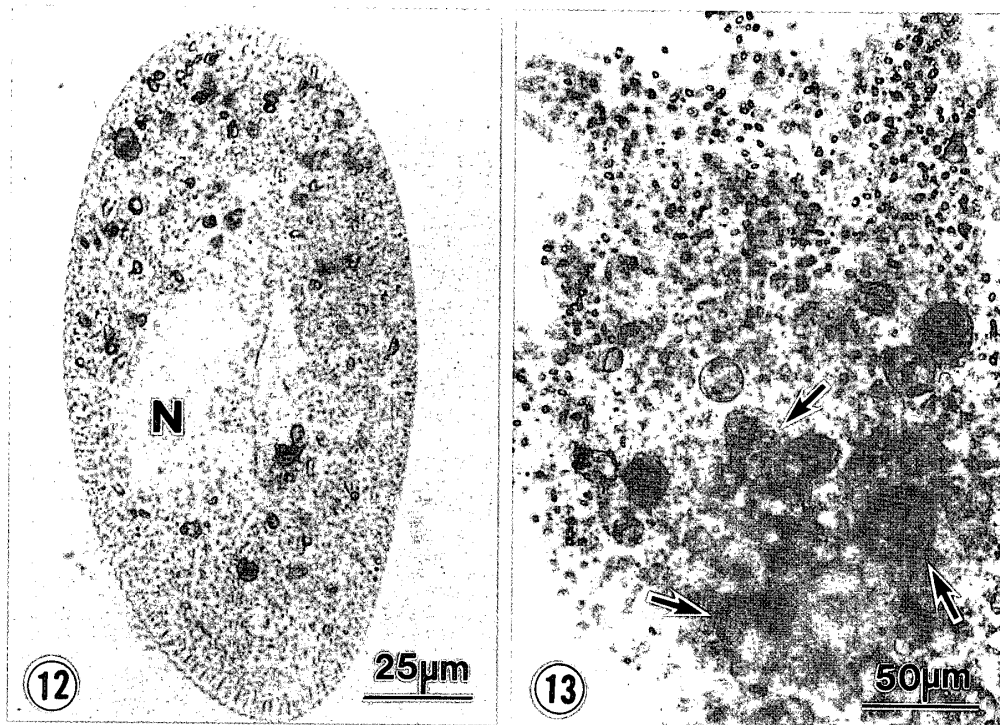


図12. 図2と同種であるが、共生していたクロレラを失ったミドリゾウリムシ (W細胞) の光学顕微鏡写真。

図13. ミドリゾウリムシのW細胞を食胞に取り込んで時間が経過したアメーバ。種々の消化段階にある食胞が見られる (矢印)。

では、取り込まれた細胞の周囲が1枚の食胞膜で囲まれている様子が観察された(図4)。食胞内に取り込まれたG細胞では、大核の他に共生していたクロレラが多数見られたが、G細胞の周囲にある繊毛、表層のトリコシスト、細胞質中のミトコンドリアなどは観察されなかった。また、G細胞内で見られたクロレラを包む膜は不明瞭になっていた。

G細胞給餌後2-3時間のアメーバを観察すると、大食胞の一部が突出してちぎれていく過程が認められ(図5)、5時間後には、食胞は大小いろいろなサイズになっていた(図6)。電顕観察では、比較的大きな食胞内に数個のクロレラと消化されたG細胞の一部が認められたが、クロレラを包んでいたG細胞の食胞膜に由来する膜は失われていた(図9)。

G細胞を給餌後2-3日のアメーバを観察すると、すでにG細胞は消化され、細胞内には単

独か数個からなるクロレラが多数存在していた(図7, 8)。これらのクロレラを電顕で観察すると、細胞の周囲は一枚のアメーバ由来の食胞膜に包まれ、薄い細胞壁や細胞膜、そして細胞の大部分を占める葉緑体と核が存在し、ミドリゾウリムシの細胞内にあるものと構造がほとんど変わらなかった。また、この食胞の周囲にはリソソームは見られなかった(図10, 11)。

なお対照群として、W細胞を餌として与えたアメーバにおける食胞の形成と消化過程も観察したところ、最初にG細胞の場合と同様に大食胞を形成し、徐々に食胞内のW細胞が消化を受けて食胞が縮小していくが、クロレラを含む小胞に当たる小胞構造は認められなかった(図13)。

2) 各照度におけるGアメーバとWアメーバの増殖

a. 餌としてW細胞を用いた場合(図14)

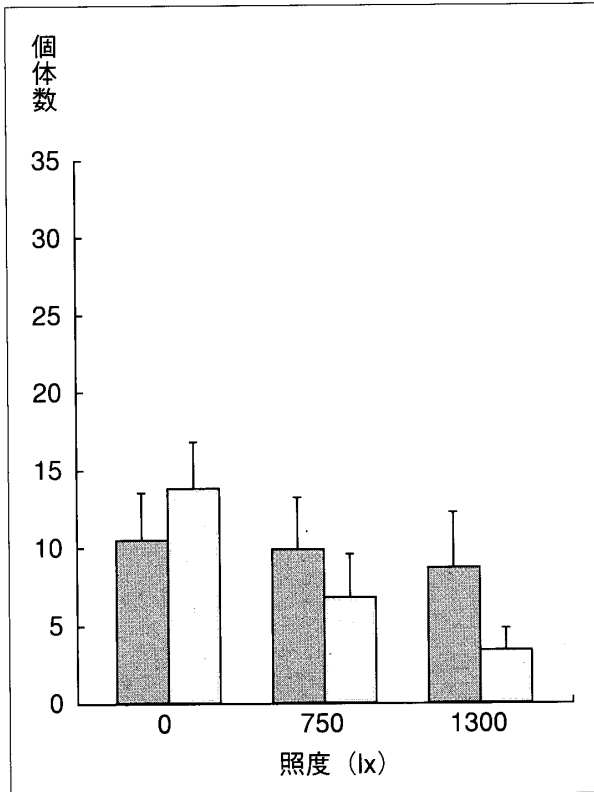


図14. W細胞で培養した場合の各照度におけるGアメーバ(黒棒)とWアメーバ(灰棒)の増殖個体数の平均値の比較。グラフのバーは標準偏差を示す。

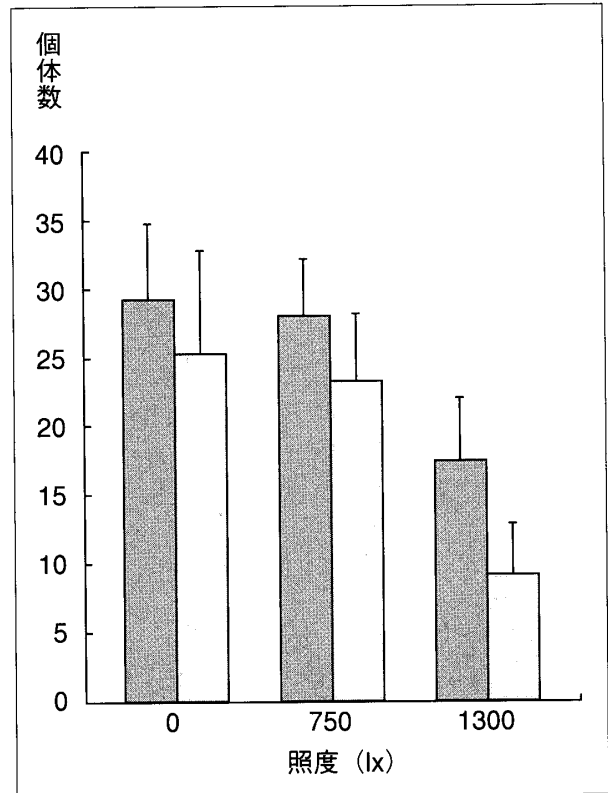


図15. G細胞で培養した場合の各照度におけるGアメーバ(黒棒)とWアメーバ(灰棒)の増殖個体数の平均値の比較。グラフのバーは標準偏差を示す。

Wアメーバ個体数の平均値は、0 lxで13.9, 750 lxで6.9, 1300 lxで3.4となり、照度が高くなるにつれて増殖個体数が減少する傾向が見られた。これに対しGアメーバでは、それぞれ10.5, 9.9, 8.7となり、照度が高くなるにつれて増殖個体数が減少する傾向が若干見られたが、Wアメーバほど顕著ではなかった。

b. 餌としてG細胞を用いた場合 (図15)

Wアメーバ個体数の平均値は、0 lxで25.3, 750 lxで23.3, 1300 lxで9.1となり、0 lxと750 lxでは平均値にあまり差がなかったが、1300 lxでは増殖が悪くなる傾向が見られた。一方、Gアメーバでは、それぞれ29.4, 28.2, 17.5でWアメーバと同様な傾向を示し、0と750 lxでは平均値に差がなく、それらに較べて1300 lxでは増殖が悪い傾向が見られた。

GアメーバにG細胞を餌として培養した場合

とW細胞の場合の増殖を同照度において比較すると、前者の餌の方が良い傾向が、また、Wアメーバにおいても同様の傾向が得られた (図14, 15)。

3) アメーバの増殖に対する照度および餌の影響

W細胞を餌として培養した場合のWとGアメーバの増殖に対する照度の影響を検討したところ、Wアメーバでは有意であった (Kruskal-Wallisの順位検定法, $P < 0.05$) が、Gアメーバの増殖に対しては有意ではなかった ($P > 0.05$)。さらに、同照度におけるGアメーバとWアメーバの増殖個体数の平均値について比較すると、0 lxではWアメーバの、750および1300 lxではGアメーバの平均値が高かった (Mann-WhitneyのU検定法, $P < 0.01$)。

一方、G細胞を餌として培養した場合のWとGアメーバの増殖に対する照度の影響は、Wと

表1. W細胞を餌として培養した場合の各照度におけるアメーバの増殖個体数の差の検定。

アメーバ	照度 (1 X)	平均増殖個体数	判定 (5%)
G	0	10.5	有意差有
W	0	13.88	
G	750	9.88	有意差有
W	750	6.88	
G	1300	8.69	有意差有
W	1300	3.44	

アメーバのGとWはあらかじめクロレラを共生しているG細胞, クロレラを除去したW細胞でそれぞれ培養したものである。

表2. G細胞を餌として培養した場合の各照度におけるアメーバの増殖個体数の差の検定。

アメーバ	照度 (1 X)	平均増殖個体数	判定 (5%)
G	0	29.44	有意差無
W	0	25.31	
G	750	28.19	有意差有
W	750	23.25	
G	1300	17.5	有意差有
W	1300	9.13	

アメーバのGとWは表1に同じ。

Gアメーバともに有意であった ($P < 0.05$)。また, 同照度におけるGアメーバとWアメーバの増殖個体数の比較では, 750 lxと1300 lxで有意な差が認められたものの ($P < 0.05$, 表2, 図15), 0 lxでは有意な差が認められなかった ($P > 0.05$, 表2, 図15)。

考察

1) アメーバへのクロレラの感染

ミドリゾウリムシの細胞内には数百個のクロレラが共生しているので, 細胞は緑色 (G細胞) をしている。しかしこの細胞を恒暗条件で培養すると, 宿主細胞は分裂を繰り返すが, 共生体であるクロレラは増殖できないので徐々に細胞あたりの数が減り, やがてクロレラのない白色の細胞 (W細胞) ができる。このようにして作製されたW細胞を用いたクロレラの再感染実験は古くから多くの研究者によって行われて

きた。

それらの結果によると, G細胞から取り出し精製したクロレラを, W細胞に大量に与えることにより容易に再感染させることできる。この時, 食胞に取り込まれた大部分のクロレラは消化されるが, これを免れた一部のクロレラが細胞質に取り込まれる。このゾウリムシを恒明条件下で培養すると細胞質内のクロレラが増殖を開始して再感染が起こり, 再び共生関係が成立する。

この他にも繊毛虫類とクロレラの共生は多数知られているが, アメーバ類では *Amoeba stigmatica* と *Mayorella viridis* の2種のみで, 本実験で用いた *Amoeba proteus* では細菌の共生が報告されているだけである。

われわれは本実験で, アメーバの餌にミドリゾウリムシのG細胞を与えて培養すると, 食胞経由で簡単にクロレラを感染させることができ

て、アメーバの細胞も緑色になることを確認した。食胞に取り込まれたG細胞の消化される過程とクロレラの感染過程を、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡で観察した結果、G細胞は消化されるがクロレラだけは消化されないで細胞質にとりこまれ、排出もされないで細胞内に留まることが明らかになった。また、アメーバの細胞内に取り込まれたクロレラの構造は、細胞壁、細胞膜、葉緑体、核、クロレラの周囲を包む膜など、いずれもミドリゾウリムシの細胞内にある状態と同様であり、その周囲にリソソームの融合も認められなかった。このことより、これらのクロレラはアメーバの食胞内で消化を受けていないものと考えられる。

Amoeba proteus は雑食性で単細胞藻類も餌としているが、これらが細胞質内にそのまま留まっている例は知られていない。しかし、ミドリゾウリムシ由来のクロレラは消化されなかった。このことは、ミドリゾウリムシの細胞質内で獲得したクロレラの表層成分の変化等が、アメーバ内でも消化を防いでいる可能性を示唆する。

前述のミドリゾウリムシに対するクロレラの再感染では、食胞内で大部分のクロレラが消化され、これを免れた少数のクロレラが増殖して再感染が起こっている。これに対し本実験のアメーバでは、ミドリゾウリムシを丸ごと取り込んだ食胞の中でゾウリムシ成分は消化されたが、その中の大量のクロレラは消化されず、小胞に包まれて細胞質中に大量に残っていた。

このように最初に形成された大きな食胞が分裂し、多数の小胞を形成して感染が成立していくが、この過程もミドリゾウリムシに共生しているクロレラが引き起こしたものかどうかは不明である。今後W細胞を餌とした場合とも比較し、さらに検討の必要があろう。

2) 感染したクロレラがアメーバの増殖に及ぼす影響

アメーバは一般に光によって細胞分裂が阻害されるので、暗所で培養すると良い結果が得られることが良く知られている(石井 1999)。

GアメーバとWアメーバに餌としてW細胞を与えた場合、Gアメーバは各照度において増殖個体数にあまり差がなく照度の影響は認められなかった。それに対し、Wアメーバでは照度が上がるにつれて増殖が悪くなり、照度の影響が認められた。すなわち、Wアメーバは照度が高いと細胞分裂が阻害され、光に対して感受性があることが認められた。このことからクロレラの取り込みはアメーバに光に対する抵抗性をもたらし、恒明条件ではクロレラがアメーバに対して何らかの作用をしているものと考えられる。

一方、両者に餌としてG細胞を与えた場合、恒暗条件での増殖に両者間には有意な差が見られなかったが、恒明条件ではGアメーバの方がWアメーバよりも有意に増殖が良かった。これは、Gアメーバは培養開始時からクロレラを持っているため光の阻害をあまり受けませんが、Wアメーバは培養開始には光の影響で細胞分裂が抑えられており、細胞内にクロレラが取り込まれた後に細胞分裂が回復したことを示唆する。つまり、培養開始時から細胞内にクロレラが存在すると光に対する抵抗性が大きいので、恒明条件でも細胞分裂が可能になるものと推定される。このようなことから細胞内に取り込まれたミドリゾウリムシ由来のクロレラは、ある程度アメーバ細胞内でも機能しているものと考えられるが、その仕組みの解明は今後の課題である。

要約

クロレラが共生しているミドリゾウリムシ(G細胞)を餌としてアメーバの培養を行い、アメーバの食胞形成からクロレラの感染に至る過程を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、G細胞1個体を取り込んで形成された大きな食胞(大食胞)は、時間とともに次々と分裂して小さな食胞(小食胞)になった。これらの食胞内で、ミドリゾウリムシの細胞は消化されたが、排出も消化もされなかったクロレラは食胞膜由来の一枚の膜で包まれて細胞質に多数残った。このような過程を経てクロレラのアメーバへの感染が成立し、これらのクロレラ

はアメーバの細胞内に1ヶ月程度維持された。

一方、クロレラを持たない細胞(W細胞)を餌とした場合、1個体を取り込んだアメーバはG細胞の場合と同様に大食胞を形成した。しかし、その食胞内で細胞が消化されて大食胞のサイズは徐々に縮小して小食胞になったが、G細胞の場合とは異なり、食胞の分裂は起こらなかった。

アメーバの増殖に及ぼすクロレラの影響を調べるために、クロレラを細胞内に取り込んだアメーバ(Gアメーバ)と持たないもの(Wアメーバ)を恒明条件下で照度を変えて培養し、増殖個体数を測定した。その結果、Wアメーバの増殖は照度があがるにつれて阻害されたが、Gアメーバではある照度までは恒暗条件と変わらなかった。このことから細胞内に取り込まれたクロレラは、アメーバに光に対する抵抗性を与えたことが確認された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、図版を作成していただいた本教室の技術員伊藤京子さんと英文を校閲していただいた本学英語科講師中野好先生に感謝致します。また、電子顕微鏡技術に御助言と御指導をいただいた本学電子顕微鏡室の皆様にもお礼を申し上げます。

参考文献

- Afon'kin S. Yu. and Goodkov A. V. (1989)
Survival of chlorella-like endosymbionts of *Paramecium bursaria* in the cytoplasm of free living amoebae. *Tsitologiya* 31 : 976 - 980
- Chatterjee S. and Bhattacharjee S. K. (1975)
Effect of near ultraviolet and visible light on *Amoeba*. *J. Cell Sci.* 19 : 117-126
- Chatterjee S. and Bhattacharjee S. K. (1976)
Differential response of cells grown in light and dark to near-ultraviolet light. *Nature* 259 : 676 - 677
- 石井 圭一著, 堀上英紀・木原章編 (1999)

アメーバ図鑑. 金原出版

- Jeon K. W. (1972) Development of cellular dependence in infective organisms : micro-surgical studies in amoeba. *Science* 176 : 1122 - 1123
- Jeon K. W. and Jeon M. S. (1976) Endosymbiosis in amoebae: Recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J. Cell Physiol.* 89 : 337 - 344
- Karakashian M. W. (1975) Symbiosis in *Paramecium bursaria*, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29 : 145 - 173
- Lorch I. J. and Jeon K. W. (1982) Nuclear lethal effect and nucleoplasmic incompatibility induced by endosymbionts in *Amoeba proteus*. *J. Protozool.* 29 : 468 - 470
- Preer J. R. Jr., Preer L. B. and Jurand A. (1974) Kappa and other endosymbionts in *Paramecium aurelia*, *Bacterial Rev.* 38 : 113-163
- Reisser W., Meier R., Gortz H-D. and Jeon K. W. (1985) Establishment, maintenance and integration mechanism of endosymbionts in protozoa. *J. Protozool.* 32 : 383 - 390
- Reisser W. (1986) Endosymbiotic association of freshwater protozoa and algae. *Progr. Protistol* 1 : 195 - 214
- Sonneborn T. M. (1959) Kappa and related particles in *Paramecium*. *Adv. Virus Res.* 6 : 229 - 338
- Weis D. S. and Ayala A. (1979) Effect of exposure period and algal concentration on the frequency of infection of aposymbiotic ciliates by algae from *Paramecium Bursaria*. *J. Protozool.* 26 : 245 - 248
- Willumsen N. B. S. (1982) *Chaos zoochlorellae* sp. nov. (Gymnamoebia, Amoebidae) from a Danish freshwater pond. *J. Nat. Hist.* 16 : 803 - 813