

Er avvikende celler av *Prymnesium polylepis* mer motstandsdyktige mot virusangrep enn typiske celler?

Hege Lyngvær Mathisen

Masteroppgave Juni 2014



Universitetet i Oslo

Institutt for biovitenskap

Seksjon for akvatisk biologi og toksikologi

Forord

Denne oppgaven er blitt utført ved seksjon for akvatisk biologi og toksikologi ved Institutt for Biovitenskap ved Universitetet i Oslo.

Takk til Bente Edvardsen, min hovedveileder, for at jeg fikk muligheten til å ta en master i dette spennende fagområdet, og takk for god veiledning og hjelp på lab.

Takk til Wenche Eikrem, min medveileder, som alltid stiller opp og hjelper til når det trengs.

Takk til Ruth-Anne Sandaa, min medveileder ved Universitetet i Bergen, og takk til stipendiat Torill Johannessen ved Universitetet i Bergen, som har hjulpet meg med mine spørsmål om virusdyrkning og virustelling.

Takk til Sissel Brubak for god hjelp på lab og for alt du har lært meg.

Takk til stipendiat Jan-Erik Thrane som har hjulpet meg med statistikk programmet - R.

Takk til alle på EM-labben; Wenche Eikrem som har hjulpet med mikroskopering, takk til Norbert Roos, Antje Hofgaard og Tove Margareth Bakar som har hjulpet til med skyggelegging.

Takk til Andrea Gerech som har instruert meg i CASY.

Takk til Per-Johan Færøvig som har hjulpet meg med flow cytometri.

Og ikke minst vil jeg takke alle medstudenter som har gjort tiden ved Universitetet i Oslo helt uforglemmelig.

Sammendrag

Prymnesium polylepis er en svepeflagellat med to ulike morfologiske flagellatstadier som består av avvikende eller typiske celler. Kulturer med typiske celler er haploide, og kulturer med avvikende celler kan enten være haploide, diploide eller begge deler. Det er ikke blitt observert syngami eller meiose til nå, men det kan tenkes at den haploide avvikende og haploide typiske celletypen smelter sammen ved syngami og danner det diploide avvikende stadiet. Ulike *P. polylepis* stammer ble derfor blandet for å forsøke å oppnå syngami. Det ble også ønsket å teste ut om det er noen forskjell i virusresistens mellom stammene, og mellom det typiske og avvikende stadiet. Det ble gjort en rekke virusforsøk for å teste dette. Det ble ikke observert syngami ved å blande de ulike stammene, men derimot så holdt blandingskulturene seg lengre i live i kultur. Det er derfor rimelig å tro at det har skjedd en genetisk utveksling i blandingskulturene som gjør dem bedre rustet.

I flere av virusforsøkene ble det observert tegn på at *P. polylepis* har blitt lysert av virus. Resultatene fra ett av virusforsøkene kan tyde på at den avvikende celletypen er noe mer resistant/ikke så mottagelig for de virusene som var i viruskonsentratet hentet fra ytre Oslofjord sensommeren 2013. Mellom stammene kan det også være noe ulik resistens, men dette bør bekreftes med flere virusforsøk. Det ble ikke påvist hvorvidt ploidinivå kan ha en effekt på virusresistens. For å estimere virusantall i prøvene ble det brukt en effektiv og rimelig metode som går ut på å farge virus med SYBR green og telle dem i epifluorescensmikroskop. Denne metoden er særledes egnet til store virus, slik som algevirus (*Phycodnaviridae*), da det er lettere å visualisere dem i forhold til mindre virus.

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Sammendrag	5
<u>1. INNLEDNING</u>	9
1.1 Historien bak <i>Prymnesium polylepis</i>	9
1.2 Om svepeflagellater	10
1.3 Morfologi og livssyklus hos <i>Prymnesium polylepis</i>	11
1.4 Virus og miljøpåvirkninger	13
1.5 <i>Phycodnaviridae</i> – De store algevirusene	15
1.6 Målsetninger og problemstillinger	16
<u>2. MATERIALER OG METODER</u>	17
2.1 Algestammer og dyrkingsforhold	17
2.2 Blandingsforsøk	19
2.3 Vekstforsøk	20
2.4 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)	21
2.5 Virusforsøk	22
2.5.1 Virusfiltrering	22
2.5.2 Virusforsøk 1: Eksperiment med Raunefjordvirus (Bergen)	22
2.5.3 Virusforsøk 2: Eksperiment med Oslofjordvirus	23
2.5.4 Fiksering av prøver til flow cytometri	25
2.5.5 Virusforsøk 3: Isolering av virus i fortynningsserier	25
2.5.6 Virusforsøk 4: Dyrkning av virus og alger i agaroseskåler	27
2.6 Flow cytometer	28
2.6.1 Isolering av cellekjerne	29
2.6.2 Metodeutvikling sentrifugering – Oppkonsentrering av celler	29
2.7 Virustelling	30
2.7.1 Kvantifisering av virus fra virusforsøk 2.0 og 2.1	30
2.7.2 Påvisning av virus i stamkulturer til <i>Prymnesium polylepis</i>	31
<u>3. RESULTATER</u>	33
3.1 Blandingsforsøk	33
3.2 Vekstforsøk	34
3.3 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)	37

3.4 Virusforsøk	40
3.4.1 Virusforsøk 1: Eksperiment med Raunefjordvirus (Bergen)	40
3.4.2 Virusforsøk 2: Eksperiment med Oslofjordvirus	40
3.4.3 Algetelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1	41
3.4.4 Virustelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1	43
3.4.5 Virusforsøk 3: Isolering av virus i fortyningsserier	48
3.4.6 Virusforsøk 4: Dyrkning av virus og alger i agaroseskåler	50
3.4.7 Påvisning av virus i stamkulturer til <i>Prymnesium polylepis</i>	50
3.5 Flow cytometer	52
3.5.1 Isolering av cellekjerne	52
3.5.2 Metodeutvikling sentrifugering – Oppkonsentrering av celler	53
3.5.3 Metodeutvikling sentrifugering – Lavere NIB konsentrasjon	54
<u>4. DISKUSJON</u>	56
4.1 Blandingsforsøk	56
4.2 Vekstforsøk	57
4.3 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)	58
4.4 Virusforsøk	59
4.5 Flow cytometer	66
4.6 Konklusjon	68
KILDER	69
APPENDIKS	73
A. IMR ½ og saltholdighet	73
B. Skjellmålinger fra TEM	74
C. Vekstforsøksdata	76
D. Algetelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1	84
E. Virustelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1	87
F. FCM og metodeutvikling	89

1. Innledning

1.1 Historien bak *Prymnesium Polylepis*

Prymnesium polylepis, sammen med andre svepeflagellat-arter er utbredt over hele verden, og er kjent for å danne algeoppblomstringer (Thomson et al. 1994). Fra tid til annen så dannes det giftige algeoppblomstringer. Den mest kjente algeoppblomstringen skjedde i 1988 og bestod av *P. polylepis*. Oppblomstringen varte fra mai til juni og spredte seg ut over store deler av Skagerrak og Kattegat, og drepte en stor andel marint liv, bl.a. oppdrettsfisk (Edwardsen et al. 1988, Underdahl et al. 1989; Johannessen & Gjørseter 1990; Granéli et al. 1993).

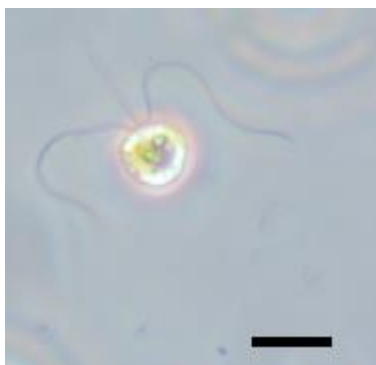
Algetoksinene påvirket cellemembranene til en rekke organismer slik at de mistet den selektive permeabiliteten, og dermed muligheten til å regulere ionisk balanse, og blir slik mottagelig for bl.a. *Prymnesium* toksiner og andre toksiner/patogener i vannet (Skjoldal & Dundas 1991). Algetoksinene viste seg å ha ichthyotoksisk og cytotoxisk aktivitet, lignende på *Prymnesium* toksiner (Underdahl et al. 1989; Edwardsen et al. 1990; Yasumoto et al 1990). Andre arter i *Prymnesium* slekten, slik som *P. parvum*, er også giftige, hovedsakelig for fisk (Edwardsen & Paasche 1998). Før 1988 så hadde ikke *P. polylepis* vært kjent for å danne masseoppblomstringer (Paasche et al. 1990).

Prymnesium polylepis ble i etterkant av algekatastrofen dyrket i laboratorium, men viste da ikke like drastiske effekter (Dahl et al. 1989; Carlsson et al. 1990; Tobiesen 1991), men hva som trigger og regulerer toksisiteten er ikke så velkjent (Edwardsen & Paasche 1998), men det ble demonstrert at fosfor-mangel kan ha en effekt på toksisiteten (Edwardsen et al. 1990). Noen stammer av *P. polylepis* var derimot giftig for *Artemia* larver etter mange år i kultur (Edwardsen 1993). Senere oppblomstringer av *P. polylepis* i 1994 og 1995 gav ikke like drastiske effekter på miljøet og biotaen, selv om disse oppblomstringer skjedde i samme område som i 1988-oppblomstringen (Edwardsen & Paasche 1998).

I noen *P. polylepis* kulturer isolert fra algeoppblomstringen i 1988 fant man også en annen celletype, som ble kalt for avvikende celler (Paasche et al. 1990). Den avvikende celletypen hadde organiske skjell som avviket fra originalbeskrivelsen av *Prymnesium polylepis* (Manton & Park 1962), og ble først trodd å være en ubeskrevet *Chrysochromulina* art (nå: *Prymnesium*). En rekke isoleringer gjort av Edvardsen og Paasche (1992) og senere genetiske analyser av de to celletypene (Edvardsen & Medlin 1998) bekreftet at begge celletypene tilhørte arten *Prymnesium polylepis*.

Typiske celler visste seg å være haploide, mens avvikende celler kunne enten være haploide eller diploide, og det ble tenkt at de haploide cellene fungerte som ulike gameter som smeltet sammen og førte til dannelsen av det diploide avvikende stadiet, det vil si at *Prymnesium polylepis* har en haplo-diploid livssyklus (Edvardsen & Vaultot 1996).

1.2 Om svepeflagellater



Figur 1: *Prymnesium polylepis* UIO038 ved 40x forstørrelse med et Nikon microphot FX kamera og med Nikon blitz PSM-3. Bilde tatt med Nikon D5200. Skala=10µm. Foto av Hege Mathisen.

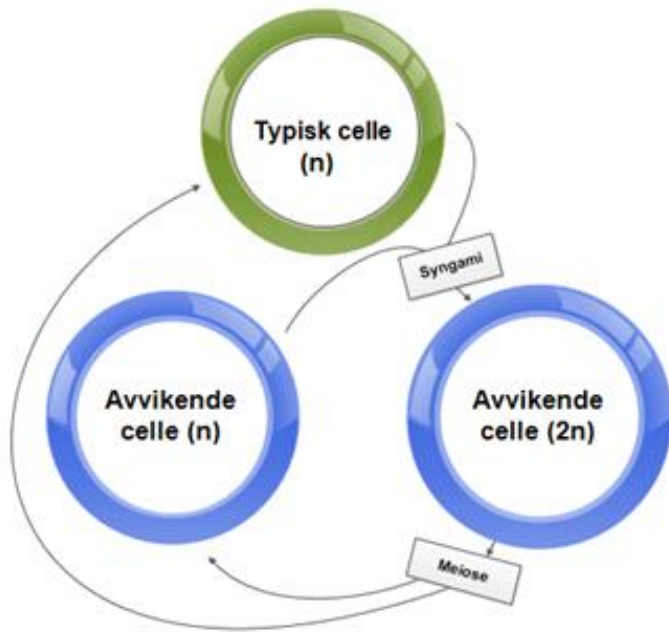
Innenfor Svepeflagellatene er de fleste artene planktoniske enceller som enten er flagellater eller produserer flagellatstadier i en del av livssyklusen, men vi finner også amøboide og palmelloide stadier, kokkoide celler, ikke-bevegelige og bevegelige kolonier, og grenete kolonier eller filamentøse former (oversiktsartikkel av Hibberd 1980, Green et al. 1990). Park et al. (1955; 1956) fant også *Chrysochromulina* arter med amøboide stadier som gav opphav til 4 datterceller. Manton og Park (1962) fant også ved et tilfelle et pseudofilament i en *Prymnesium polylepis* kultur. Skjellmorfologien til svepeflagellater har også stor diversitet (Manton &

Leadbeater 1974; Hibberd 1980; Green et al. 1989) og er i stor grad artsspesifikt. Detaljene man ser på er hovedsakelig mikroskopiske og det er som oftest nødvendig med elektronmikroskopi eller molekylære metoder for sikker artsbestemmelse (Edvardsen & Paasche 1998). Et karaktertrekk som kjennetegner svepeflagellatene er to flageller pluss et tredje vedheng kalt haptonema (Fig. 1). Det ble først beskrevet som en tredje flagell (Lackey

1939), men Parke et al. (1958) gav det betegnelsen haptonema, da det tydelig skiller seg fra flagellene, både i morfologi og bruksmåte. Senere ble det oppdaget at haptonemaet inneholder 6-7 mikrotubuli omringet av 3 konsentriske membraner i motsetning til flageller som har 9 par perifere mikrotubuli og 2 single mikrotubuli i midten (Leadbeater & Manton 1971). Haptonemaet kan kveile seg sammen til en spiral og det kan også bøye seg sideveis (Leadbeater 1971). Lengden på haptonemaet kan også variere stort, ordenen *Isochrysidales* har f.eks. redusert haptonema (Green & Hori 1991), mens *Chrysochromulina* arter har lange haptonemaer (Park et al. 1955, Park et al. 1956; Manton 1967). Funksjonen til haptonemaet har vært mye debattert opp igjennom årene. Kawatchi et al. (1991) observerte derimot fagotrofi ved bruk av haptonemaet hos *Chrysochromulina hirta*.

1.3 Morfologi og livssyklus hos *Prymnesium polylepis*

Prymnesium polylepis har en haplo-diploid livssyklus hvor den diploide avvikende celletypen er tenkt å være et resultat av syngami mellom den haploide avvikende og typiske cellen (Fig. 2.) De avvikende og typiske cellene kan skilles lett fra hverandre i et elektronmikroskop ved at de har ulike typer organiske skjell. De avvikende haploide og diploide cellene er også noe større enn den haploide typiske cellen (Edwardsen & Vulot 1996). For å bestemme ploidinivå er det nødvendig å ta i bruk f.eks et flow cytometer.

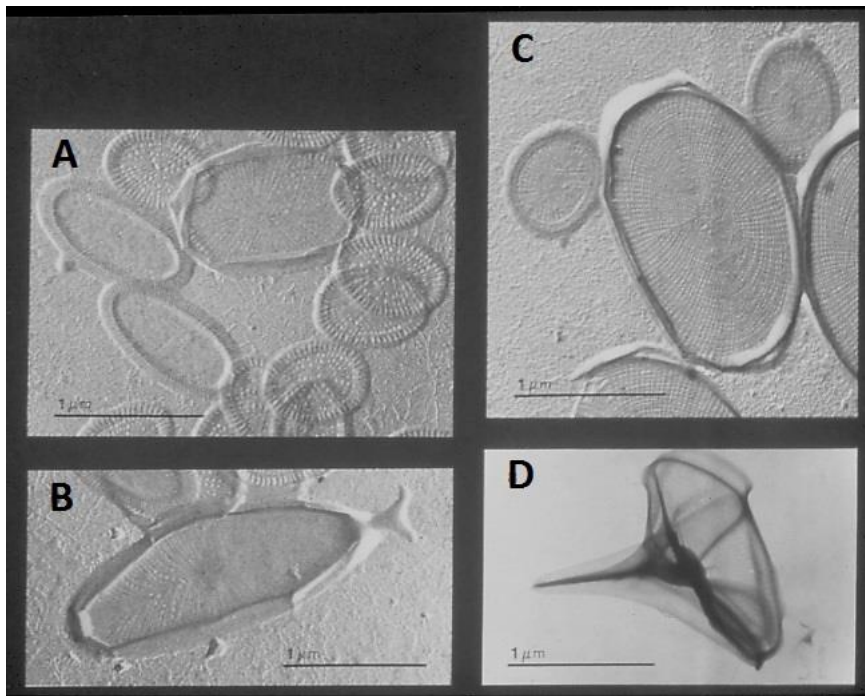


Figur 2: Hypotetisk livssyklus til *Prymnesium polylepis*. Modifisert etter Edvardsen og Vulot (1996). Edvardsen og Vulot foreslår at den avvikende diploide cellen ($2n$) er et resultat av syngami mellom den haploide avvikende(n) og haploide typiske cellen (n).

Den typiske celletypen har fire typer ulike organiske skjell; lite rundt, stort rundt, lite avlangt og stort avlangt (snegleskjell). Den avvikende celletypen har tre ulike organiske skjell; lite rundt, stort rundt og et spisst skjell (Tabell 1 og Fig.3).

Tabell 1: Viser de ulike skallene til den typiske og avvikende celletypen hos *Prymnesium polylepis*. Tilnærmet skall størrelse (μm) av den lengste akse. Tabell modifisert etter Paasche et al. (1990).

Typiske skjell	Størrelse	Avvikende skjell	Størrelse
Lite rundt	$\approx 0.7\mu\text{m}$	Lite rundt	$\approx 0.7\mu\text{m}$
Stort rundt	$\approx 1.4\mu\text{m}$	Stort rundt	$\approx 2.0\mu\text{m}$
Lite avlangt	$\approx 1.2\mu\text{m}$	Spisst skjell	$\approx 2.0\mu\text{m}$
Stort avlangt/Snegleskjell	$\approx 2.5\mu\text{m}$		



Figur 3: *Prymnesium polylepis* skjell. A) Lite og stort typisk skjell øverst til høyre. Lite avlangt typisk skjell til venstre. B) Stort avlangt typisk skjell (snegleskjell). C) Lite og stort avvikende skjell. D) Spisst skjell fra en avvikende celle. Skjellet er sett fra siden, jf. med Fig.14. Elektronmikroskopi bilder tatt av Bente Edvardsen.

1.4 Virus og miljøpåvirkninger

Virus og virus liknende partikler (VLPs) er vel utbredt over hele verden og spiller en stor rolle i marine økosystem, de kan både hindre og terminere algeoppblomstringer (Sandaa 2001). Thyrhaug et al. (2003) viste at mikroalger og deres respektive virus sameksisterer i marine økosystem, og at algenes fenotypiske plastisitet gjør denne vert-virus sameksistensen mulig.

Emiliana huxleyi, den meste utbredte svepeflagellaten, har en effekt på klimaet ved at kokkolittene reflekterer sollys og senker dermed jordas albedo. Mange svepeflagellater, bl.a. *Emiliana huxleyi* og *Phaeocystis pouchetii* slipper også ut DMS (dimetylsulfid) som påvirker skydannelse og dermed har en positiv effekt ved at skyene også reflekterer sollys og dermed

har en negativ effekt på global oppvarming (Malin et al. 1992, Bopp et al. 2003, Rohwer & Thurber 2009).

Viruslysning kan terminere algeoppblomstringer og dermed indirekte påvirke klimaet på jorda ved at DMS utslippet øker. Ved å lysere både fytoplankton og bakterier så omgjør virus karbon og næringsstoffer til DOM (dissolved organic matter) og POM (particulate organic matter) som bl.a. heterotrofe prokaryoter og andre nedbrytere nyttiggjør seg av (Fuhrman 1999, Suttle 2005). Løse kokkolitter, som består av kalsiumkarbonat, er også en stor drivkraft bak den biologiske pumpen som fjerner karbondioksid fra atmosfæren og samler dette på havbunnen og slik fjerner karbon fra kretsløpet (Rohwer & Thurber 2009). Virus endrer også effektiviteten til den biologiske pumpen ved å lysere fytoplankton og bakterier. POM og DOM frigjøres fra lyserte celler, dette blir hovedsakelig værende i overflatelaget i havet, i motsetning til naturlige døde celler som synker ned til havbunnen og bringer med seg karbon til havdypet (Suttle 2005). Virus har dermed en stor effekt på klima og kretsløp av næringsstoffer.

Hos *Emiliana huxleyi* som også har en haplo-diploid livssyklus, er det kun det «nakne» haploide stadiet som er resistent mot virusangrep, i motsetning til de diploide cellene som har kalsifiserte kokkolitter. Tilførsel av virus til diploide *E. huxleyi* celler induserer dannelsen av haploide celler, så en kjønnnet formering viser seg å kunne være en strategi for å «overleve» virusangrep hos denne arten. Denne modellen kalles for «Cheshire cat» som går ut på at algecellene blir «usynlig» for virusene, og slik unnslipper virusinfeksjon og kollaps. («Cheshire cat» er en betegnelse hentet fra Alice i Eventyrland hvor Cheshire-katten blir usynlig og slik unnslipper henrettelse av dronningen) (Frada et al. 2008).

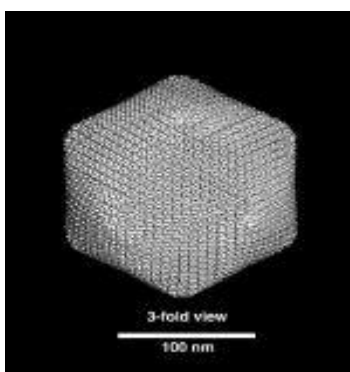
Schroeder et al. (2003) fant ut at det var flere virusgenotyper i starten av en *E. huxleyi* oppblomstring, men det var kun noen få virusgenotyper som gikk videre og terminerte oppblomstringen. For å karakterisere virus så bruker man gjerne major capsid protein (MCP) markører i fylogenetiske undersøkelser (Rowe et al. 2011).

1.5 Phycodnaviridae – De store algevirusene

Familien *Phycodnaviridae* er en monofyletisk gruppe virus bestående av 6 slekter til dags dato; Coccolithovirus, Chlorovirus, Phaeovirus, Prasinovirus, Raphidovirus og Prymnesiovirus. De har alle store dobbeltrådet DNA (dsDNA) genom som varierer fra 160 til 560 kb som er innesluttet i en icosahedral proteinkappe (Fig. 4)

Phycodnaviridae har også evolusjonære røtter som forbinder dem til andre store DNA virus, som til sammen utgjør gruppen «nucleocytoplasmic large DNA viruses» (NCLDV). Fylogenetiske analyser av NCLDV har datert denne gruppen så langt som 1,2 til 2 milliarder år tilbake. Mange av genene og proteinene til Phycodnavirusene er nye for vitenskapen og har ingen likheter med gener så langt kartlagt i databaser. Phycodnavirusene som er genom sekvensert til nå deler bare 9 gener med hverandre, noe som gjenspeiles i den lange evolusjonære tiden som har gått siden gruppene skilte lag. Genetiske analyser viser også at Phycodnavirusene er nærmere beslektet med hverandre enn andre virus. (Dunigan et al. 2006, Van Etten et al. 2002).

Derimot så viser det seg at DNA polymerasen til enkelte av phycodnavirusene er nærmere beslektet med Mimivirus (enn annen gruppe virus i NCLDV) enn til andre phycodnavirus. Dette viser virus har utvekslet gener seg imellom på tvers av grupper/familier i lang tid (Van Etten 2011). Til dags dato er det kun Phaeovirus, som infiserer *Ectocarpus siliculosus*, som er lysogenisk og inkorporer virusDNA inn i vertens genom, mikroalgevirusene har derimot en lytisk livssyklus. (Van Etten 2011). Denne tendensen kan derimot endre seg da dette er et relativt nytt område innenfor forskning, og nye virus kan bli oppdaget og klassifisert.



Figur 4: Rekonstruksjon av et phycodnavirus: *Paramecium bursaria chlorella virus 1 (PBCV-1)*.
Bilde lånt fra www.virology.net

1.6 Målsetning og problemstillinger

Målet med denne undersøkelsen var å øke vår forståelse for betydningen av virus og en seksuell livssyklus for oppblomstringsdynamikken til den fiskegiftige marine algen *Prymnesium polylepis*. Er det diploide eller avvikende stadiet en strategi for å motstå virusangrep? Eller er begge celletyper like resistente/mottagelige for virus? I motsetning til *Emiliana huxleyi*, er det gjort lite eller ingen forskning på hvilket livssyklusstadium hos *Prymnesium polylepis* som er mest resistent mot virusangrep, og om virusinfeksjon hos *Prymnesium polylepis* kan terminere masseoppblomstringer.

Følgende spørsmål ble stilt:

- Hvilken betydning har livssyklus-stadium eller celletype for motstandsdyktigheten mot virusangrep hos *Prymnesium polylepis*? Er det (diploide) avvikende stadiet i livssyklus til *Prymnesium polylepis* mer eller mindre resistent enn det haploide typiske stadiet?
- Er det forskjeller mellom ulike *Prymnesium polylepis*-stammer i følsomhet for virus, dvs. hvor spesifikke er viruset/virusene?
- Kan vi indusere dannelsen av diploide celler (dvs. syngami) ved å blande ulike haploide stammer av *Prymnesium polylepis*?
- Er det noen forskjell i vekstrate mellom de ulike *Prymnesium polylepis* stammene?

Nullypoteser:

- Avvikende og typiske celler av *Prymnesium Polylepis* er like motstandsdyktige for virusangrep.
- Alle *Prymnesium polylepis* stammene er like mottagelig/resistens mot virus.
- Blanding av kulturer vil ikke føre til syngami (i.e. diploide celler).
- Kulturer med avvikende og typiske celler vokser like fort.

2. Materialer og metoder

2.1 Algestammer og dyrkingsforhold

Algestammer

I denne oppgaven har jeg brukt seks ulike stammer av *Prymnesium polylepis* (Manton et. Park) Edvardsen, Eikrem & Probert, isolert fra Skagerrak i ytre Oslofjorden og den svenske vestkyst i 1988. Opprinnelsen til stammene er beskrevet i Tabell 2.

Tabell 2: Stammer av *Prymnesium polylepis*. Celletyper i denne tabellen (avvikende og typisk) er basert på tidligere observasjoner av bl.a. Bente Edvardsen, Wenche Eikrem og Eystein Paasche.

Stammekode	Gammel stammekode	Celletype	Lokalitet	Isoleringsdato	Isolator	Lengde & breddegrad
UIO036	B11	Avvikende	Torbjørnskjær	29.05.1988	B. Edvardsen	59N, 10.75E
UIO037	B1511	Typisk	Torbjørnskjær	29.05.1988	B. Edvardsen	59N, 10.75E
UIO038	K	Typisk	Risør	06.06.1988	D. Klaveness	58.5N, 9.5E
UIO039	S	Typisk	Risør	06.06.1988	S. Johansen	58.5N, 9.5E
UIO040	W	Typisk	Risør	06.06.1988	W. Eikrem	58.5N, 9.5E
UIO041	CCMP287	Typisk	Skagerrak	08.05.1988	L. Edler	64.7500N, 21.3333W

Algemedium

Algene ble dyrket i IMR½ algemedium (Eppley et al. 1967). Sjøvannet ble hentet fra Drøbak ved ca. 30 m dyp eller fra Solbergstrand ved ca. 40 m dyp, og hadde en saltholdighet på ca. 34 PSU. Sjøvannet ble lagret i 30 liters polyetylenbeholdere og ble filtrert gjennom glassfiberfilter (Whatman GF/C). Sjøvannet ble så fortynnet til 30PSU ved å ta 90% sjøvann og 10% dH₂O. IMR ½ er et halvdefinert medium som består av naturlig sjøvann som er tilsatt nærings saltene nitrat og fosfat, sammen med en spormetalløsning og en vitaminløsning. Ved

dyrkning av haptofytter bruker man å tilsette ekstra selenitt (Dahl et al. 1988), og utelate silikat og saltsyre som bare brukes ved dyrkning av diatomeer.

Algemediumet ble autoklavert i 16ml borosilikatrør (Bellco glass inc., NJ, USA) i en autoklav av typen HS 6610 EC-1 (Getinge group, Sverige) og oppbevart på 14°C kjølerom inntil senere bruk.

Lys og temperatur

Stamkulturene ble dyrket på 16°C klimarom, mens foreldre- og evt.

besteforeldregenerasjoner ble holdt på 13°C klimarom for å oppnå en langsommere vekst på kulturene. Stamkulturene ble dyrket under 12 t lys: 12 t mørke og under lysstoffrør av typen L36W 830 Warm white og L36W 840 Cool white Lumilux® (Osram, Tyskland) som ga lysintensitet på ca. 33 og ca. 77 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$, for henholdsvis 13°C og 16°C klimarom. Lyset ble målt rett over kulturrørene og ca. midt under lysarmaturen med lysmåleren QSL-100 (Biospherical instruments inc, CA, USA).

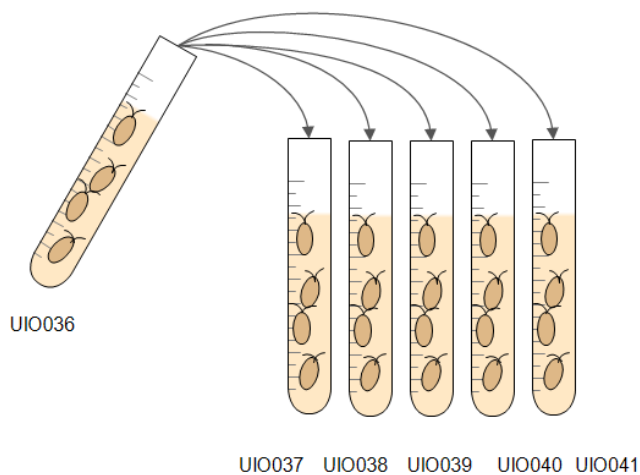
Overføring av stamkulturer

Overføring av stamkulturer ble gjort ca. hver 10-14 dag, og avhengig av hvor tett kulturene var så ble det overført ca. 8 dråper til nye kulturrør med algemedium. Ved lav celletetthet og dårlig vekst, så ble det brukt opp mot 10-15 dråper. Ved dårlig vekst over lengre tid, ble det også overført parallell rør for å hindre at algestammene ikke døde. Overføring ble gjort med sterilteknikk ved å brenne av tuppen av alle rør/flaske med en integra firebody plus (Biosciences AG, Sveits). Sterilrommet er også opplyst med UV-lys når rommet ikke er i bruk som hindrer vekst av andre mikroorganismer.

Prøveuttaking av videre eksperimenter ble også utført ved sterilteknikk, hvis dette lot seg gjøre.

2.2 Blandingsforsøk

Kulturer av *Prymnesium polylepis* består av avvikende og/eller typiske celler (Fig.3 og Tabell 1) (Paasche 1990, Edvardsen og Paasche 1992). De haploide (n) typiske og haploide (n) avvikende celletypene kan muligens fungere som gameter i livssyklusen til *P. polylepis*, og ved å blande disse celletypene kan man prøve å oppdrive diploide celler (2n) ved syngami. *Prymnesium polylepis* UIO036 har tidligere vist seg å ha haploide (n) avvikende celler (Edvardsen upublisert) og derfor ble denne stammen blandet med de andre stammene av *Prymnesium polylepis* UIO037-UIO041 (Fig. 5 og Tabell 3) som tidligere har vist seg å inneholde haploide (n) typiske celler (Edvardsen & Vaultot 1996).



Figur 5: Viser prinsippet bak blandingsforsøket. *Prymnesium polylepis* UIO036 ble blandet med de andre stammene UIO037-UIO041.

Tabell 2: Oversikt over blandingskombinasjonene av *Prymnesium polylepis* stammer brukt i blandingsforsøket.

Blandingskombinasjoner
UIO036 x UIO037
UIO036 x UIO038
UIO036 x UIO039
UIO036 x UIO040
UIO036 x UIO041

Blandingsforsøket ble gjennomført ved å ta 4 dråper av *P. polylepis* UIO036 og blande denne med 4 dråper av de andre kulturrene UIO037-UIO041 i 5 nye borosilikatrør med 16ml algemedium. Kulturrene ble satt til videre dyrkning på 16° klimarom. Blandingene ble observert i lysmikroskop rett etter blanding (5-15min etter blanding), 3 dager etter blanding, og observasjoner over lengre tid av blandingsrørene. Det ble også laget transmisjonselektronmikroskopi (TEM) preparater av blandingskulturene på ulike tidspunkt for å studere om kulturene endret skjellmorfologi.

2.3 Vekstforsøk

Det ble gjennomført to vekstforsøk for å studere og sammenligne vekstraten til de ulike stammene (Tabell 1) av *Prymnesium polylepis*. Algene ble dyrket i 400ml borosilikatglass i vekstforsøk 1, og i 160ml nunclon celledyrkningsflasker (thermo scientific, Danmark) i vekstforsøk 2. Algene ble dyrket på 19°C klimarom med ca. 95 $\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Forsøket ble fulgt over 10 dager med 3 replikater for hver stamme. Hver dag på ca. samme tidspunkt ble det tatt ut prøver x-antall ml prøve som ble tilsatt x-antall ml steril filtrert sjøvann 30PSU (Corning incorporation, NY, USA) slik at det totale volumet ble 10ml.

Dette ble gjennomført med steril teknikk på sterilrommet for å unngå kontaminering. Det var viktig at den fortynnede prøven som skulle telles ikke oversteg 20.000 celler ml^{-1} , da den elektroniske partikkeltelleren, CASY, ikke tillater tettere konsentrasjon enn dette. Prøvene ble deretter målt 3 ganger hver med CASY (cell counter + analyser system, Schärfe system gmbH, Tyskland) på program 15-PRYM, som måler partikler fra 5 μm – 19,95 μm . Medianverdien (midtre verdi) av de tre målingene ble brukt videre i analyser.

I tillegg til å oppgi antall partikler, oppgir også CASY størrelsesfordelingen til cellene ved å beregne ekvivalent sfærisk diameter (ESD) ut ifra det elektriske signalet cellene gir når de passerer åpningen i dysen. Dette er basert på at det elektriske signalet er proporsjonalt med volumet til en celle og at cellene er tilnærmet sfæriske.

Den spesifikke vekstraten til en populasjon er gitt ved μ (som også er lik λ , stigningstallet til den rette linje på ln-skala). I min oppgave har jeg valgt å bruke delingskonstanten k som verdi for vekstrate, som gir celledelinger pr dag/fordoblinger pr dag. Omregningen mellom disse konstantene er (Edwardsen et al. 2007):

$$\mu = (\ln 2) * k$$

2.4 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)

TEM-preparater ble laget av stamkulturer *Prymnesium polylepis* UIO036-041 og av blandingskulturer UIO036xUIO040 og UIO036xUIO041 (kun disse blandingskulturene som hadde overlevd til da) på ulike tidspunkt for å studere skjellmorfologi og eventuelle endringer hos blandingskulturene, og for å fastslå hvilke typer skjell stamkulturene hadde. Det ble brukt 150 mesh kobbergridder (electron microscopy sciences, PA, USA) med formvarhinne og pådampet karbon. Åtte µl algekultur ble lagt på hver grid. En glasspetriskål med 3 dråper OsO₄ 1% (VWR International A/S) ble hvelvet over griddene i 1 minutt slik at osmiumsyren fordampet ned på gridene. Preparatene ble tørket i ca. 1 time slik at de fikserte cellene kunne synke ned på gridene. Deretter ble gridene skylt godt i en skål med dH₂O, en skål for hver algestamme for å unngå krysskontaminering av celler/skjell, og senere lufttørket.

Skyggelegging – gull-palladium og platina: Noen av TEM-preparatene ble skyggelagt med gull- paladium eller platina med 30 ° vinkel i en Edwards high vacuum LTD, Speedivac coating unit (Manor Royal, Crawley, Sussex, England).

Skyggelegging – farging: Andre TEM-preparater ble farget med uranylacetat (mettet løsning i H₂O) (Sigma-Aldrich, USA). En liten dråpe (10µl) med uranylacetat ble lagt på en glasspetriskål som var dekket med parafilm. Griden med den matte siden (prøvesiden) ble lagt ned på dråpen med uranylacetat i 15 min. Overflødig uranylacetat på gridene ble tørket forsiktig bort med filterpapir før griddene ble skylt godt med dH₂O og senere lufttørket.

Mikroskopering ble gjennomført med hjelp fra Wenche Eikrem på et Philips CM100 transmisjonselektronmikroskop på EM-labben ved Universitetet i Oslo.

2.5 Virusforsøk

De ulike *Prymnesium polylepis* stammene (Tabell 2) ble blandet med virus i flere ulike virusforsøk for å sjekke om det var noen forskjell i virusresistens mellom dem. I det første virusforsøket ble *P. polylepis* blandet med virus fra Raunefjorden i Bergen, i de andre virusforsøkene ble *P. polylepis* blandet med virus fra Ytre Oslofjord.

Viruskonsentrat fra Bergen ble samlet inn fra Raunefjorden (60.267222N, 5.201389E) utenfor Bergen og ble oppdrevet av Torill Johannessen ved Universitetet i Bergen, og deretter brakt til avdeling for marinbiologi, Universitetet i Oslo. Viruskonsentrat fra ytre Oslofjorden ble samlet inn 22/8-13 fra stasjon OF2 (59.186668 N, 10.691667 E) og ble oppdrevet av Elianne Sinærs Egge ved Universitetet i Oslo.

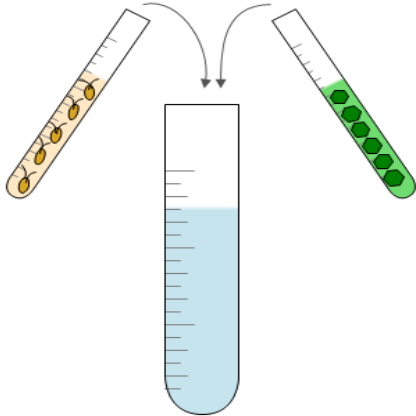
2.5.1 Virusfiltrering

Viruskonsentrat ble fremstilt fra 20L sjøvann samlet inn fra 1m dyp. Ombord på båt ble vannet filtrert gjennom en sil med porestørrelse 200µm, deretter gjennom et filter med porestørrelse 0,45µm (low-protein-binding Durapore membrane filters, 142mm diameter, Millipore) ved bruk av et tripod stativ (Millipore) og peristaltisk pumpe (Masterflex L/S). Ved ankomst til laboratoriet ble vannet oppkonsentrert via tangentiell filtrering med en Quixstand™ benchtop system (model QSM-02S, Amersham biosciences corp., NA, USA). Filteret har en porestørrelse på 100.000 NMWC (nomial molecular weights cutoff) som tilsvarer 100 kDa. Sjøvann større enn dette ble resirkulert tilbake og filtrert på nytt slik at man ender opp med et viruskonsentrat på ~50ml. Viruskonsentratet ble oppbevart i kjøleskap ved 4°C inntil videre bruk.

2.5.2 Virusforsøk 1: Eksperiment med Raunefjordvirus (Bergen)

Virusforsøk 1 (Pilotforsøk): I dette forsøket ble stammer av *Prymnesium polylepis* og alle blandingskulturer av *P. polylepis* (Tabell 2 og 5) tilført virus i borosilikatrør (vanlige 16ml kulturrør) for å observere om kulturene ble lysert. Én ml av hver *P. polylepis* stamme ble blandet med 1ml viruskonsentrat sammen med 10ml algemedium (Fig. 6).

Algeblandingskulturer ble blandet direkte i kulturrørene ved å ta 0,5ml av *P. polylepis* UIO036 og blande denne med 0,5ml av UIO037-UIO041 sammen med 1ml viruskonsentrat og 10ml medium. Forsøket ble gjennomført med 2 replikater for hver kombinasjon. Algerørene m/virus ble satt til dyrkning på 16°C klimarom.



Figur 6: Alle *Prymnesium polylepis* stammer UIO036-UIO041 og blandingskulturer (se Tabell 5 for blandingskombinasjoner) ble blandet med viruskonsentrat fra Raunefjorden.

2.5.3 Virusforsøk 2: Eksperiment med Oslofjordvirus

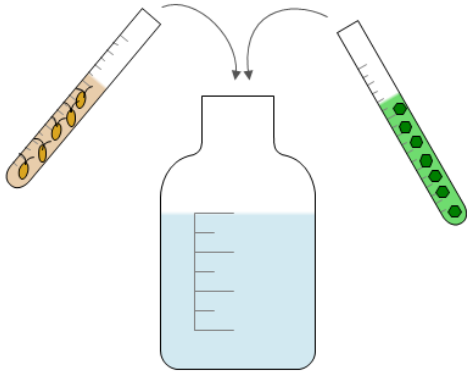
Dette virusforsøket består av to deler, virusforsøk 2.0 og 2.1, og hensikten med forsøket var å blande *Prymnesium polylepis* kulturer (UIO036-UIO041) med viruskonsentrat fra OF2 for å observere om kulturene ble lysert.

Virusforsøk 2.0:

I dette forsøket ble det brukt 40mL nunclon celledyrkningsflasker (thermo scientific, Danmark) som ble tilsatt 20ml algemedium, 1ml algekultur av *P. polylepis* (UIO036-UIO041) og 2 ml viruskonsentrat fra OF2 (Fig. 7).

Forsøket ble gjennomført med 2 replikater av hver stamme i tillegg til 6 negative kontroller uten viruskonsentrat. Flaskene ble satt til dyrkning på 16°C klimarom. Det ble tatt ut prøver

ved dag 0, 7, 11 og 14 fra hver kulturflaske m/ virus som senere ble fiksert (se 2.5.4). Prøvematerialet skulle senere brukes til å estimere celleantall og ploidinivå ved bruk av flow cytometer og estimere virusantall ved bruk av epifluorescensmikroskop.



Figur 7: *Prymnesium polylepis* stammer UIO036-UIO041 ble blandet med viruskonsentrat fra Ytre Oslofjord, stasjon OF2.

Ved dag 11 i forsøket ble det tatt ut 1,5mlx2 prøve fra hver kulturflaske av *P. polylepis* (UIO036-UIO041). Hensikten var å ta ut virus fra virusforsøk 2.0 og tilsette disse virusene til det nye forsøket, virusforsøk 2.1. Prøvene ble sentrifugert (for å bli kvitt alger og større partikler) i 10 min med en kjølesentrifuge (eppendorf centrifuge 5415R, Tyskland) i 15 min ved 6000rpm (3300 rcf), hvor så 1ml av supernatanten ble overført til nye eppendorfrør. Virussupernatanten antas å inneholde mer virus spesifikk for *P. polylepis* ettersom det spesifikke viruset har økt i konsentrasjon i løpet av virusforsøk 2.0 (gitt at *P. polylepis* har et/flere virus). Derfor ville man forvente at viruslysningene er kraftigere i virusforsøk 2.1 enn i 2.0.

Virusforsøk 2.1:

I dette forsøket ble det brukt 40mL nunclon celledyrkningsflasker (thermo scientific, Danmark) som ble tilsatt 20ml algemedium (Fig. 7), 1ml algekultur av *Prymnesium polylepis* (UIO036-UIO041) og 1ml virussupernatant (se virusforsøk 2.0).

Virussupernatant tatt fra kultur UIO036 i virusforsøk 2.0 ble tilsatt til en UIO036 kultur i virusforsøk 2.0, tilsvarende med de resterende stammene. Dette ble gjort for å sikre at eventuelle intraspesifikke virus ble tilført til stamme i virusforsøk 2.1, og at man slik kan sammenligne resistens mellom de ulike stammene. Forsøket ble gjennomført med 2 replikater av hver stamme i tillegg til 6 negative kontroller uten virus. Flaskene ble satt til dyrkning på 16°C klimarom. Det ble tatt ut prøver ved dag 0, 7, 11 og 15 fra hver kulturflaske m/ virus som senere ble fiksert (se 2.5.4). Prøvematerialet skulle senere brukes til å estimere celleantall ved bruk av flow cytometri og estimere virusantall ved bruk av epifluorescensmikroskop.

2.5.4 Fiksering av prøver for flow cytometri

Prøver fra virusforsøk 2.0 og 2.1 ble fiksert og frosset ned for senere analyser. Fra hver kulturflaske m/virus ble det tatt ut 1,8ml x 2 prøve (ved dag 0, 7, 11 og 14/15) som ble fiksert med glutaraldehyde (GLA) 25% Grade 1 (Sigma-Aldrich, USA) eller glutaraldehyde 50% EM grade (Electron microscopy sciences, PA, USA) henholdsvis 72µl eller 36µl, slik at endelig konsentrasjon ble 1% GLA. Prøvene ble oppbevart i cryorør (Sarstedt, Tyskland) og inkubert i romtemperatur i 30min før de ble lagt i flytende nitrogen i 1min og deretter oppbevart i -80°C fryser inntil videre analyser.

Siden det var mangel på virusfiltre, ble viruskonsentratet fra OF2 fiksert og frosset ned før det ble blandet med algekulturene i virusforsøk 2.0. Dette gjorde det mulig å estimere start konsentrasjon for virus for alle stammene med kun 1 filter (ettersom alle algestammene ble startet med tilnærmet likt virus inokulum).

2.5.5 Virusforsøk 3: Isolering av virus i fortynningsserier.

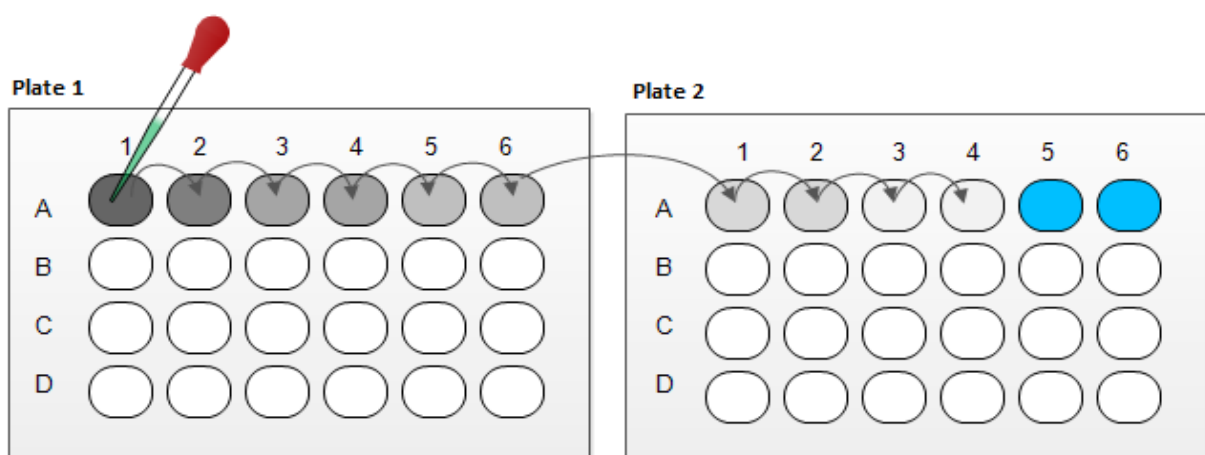
Det ble også gjort et virusforsøk i multibrønnplater for å prøve å isolere virus som infiserer *Prymnesium polylepis*. Dette gjøres ved å fortynne viruskonsentrasjonen x10 i minst 10 brønner bortover, og så gå videre med den brønnen med lavest viruskonsentrasjon som har tegn på lysering, og så starte et nytt eksperiment med disse virusene og tilsette dem til nye multibrønnplater, og slik fortsette 2-3 ganger. Man skal da i teorien tilslutt sitte igjen med kun det viruset/de virusene som lyserer *P. polylepis*. I dette forsøket ble det kun brukt *P.*

polylepis UIO037 i to forskjellige algekonsentrasjoner og to ulike viruskonsentrat; viruskonsentrat fra OF2 og virussupernatant tatt fra en UIO037 flaske fra virusforsøk 2.0. (Virussupernatanten kommer også opprinnelig fra OF2, men skal i teorien inneholde mere spesifikke *P. polylepis* virus).

Det ble brukt totalt 8 stykk 24-multibrønnsplater (Costar, Corning incorporation, NY, USA). I hver brønn ble det tilsatt 1ml algekultur (enten 50% alger og 50% medium, eller 25% alger og 75% medium). I brønnene merket 1 på multibrønnplate nr 1, 3, 5 og 7 ble det tilsatt 200µl virus og fortynnet 10 brønner bortover (dvs. 10^{10}) ved å ta 3 dråper (~100µl) fra brønn 1 til brønn 2 osv. Forsøket ble gjennomført med 4 replikater (A-D) pluss 2 kontrollbrønner uten virus på hver multibrønnplate (Fig. 8). Se Tabell 4 for de ulike kombinasjonene av alger og virus. Multibrønnplatene ble satt til dyrkning på 17°C klimarom i plastbokser med fuktige kluter under for å holde på fuktigheten.

Tabell 4: Oversikt over hvilken algekonsentrasjon og virusløsning de ulike multibrønnplatene hadde i virusforsøk 3.

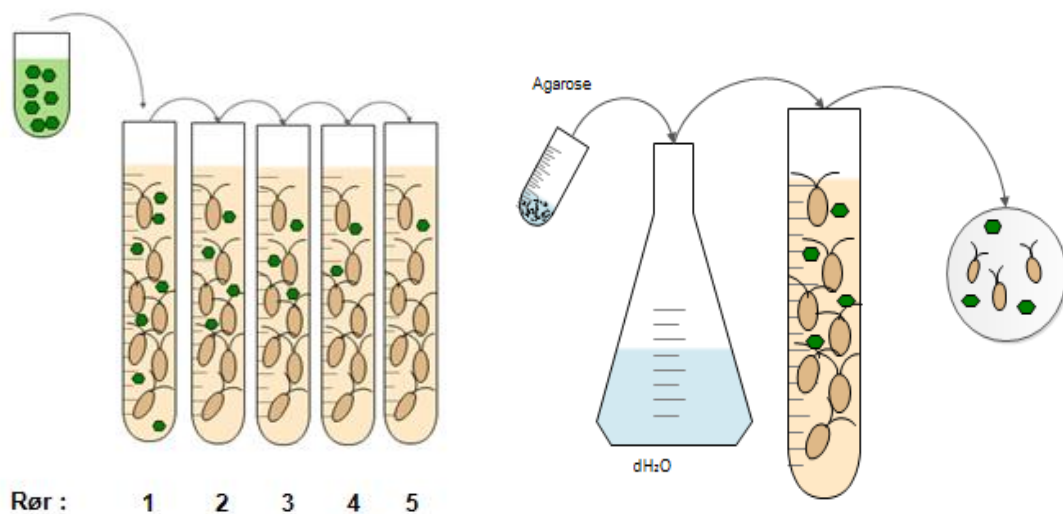
Multibrønnplate	Type virus	Prosent alger til medium
1 + 2	Viruskonsentrat	50% alger
3 + 4	Virussupernatant	50% alger
5 + 6	Viruskonsentrat	25% alger
7 + 8	Virussupernatant	25% alger



Figur 8: Viser prinsippet bak isolering av virus i virusforsøk 3. Virus ble fortynnet x10 bortover i 10brønner, markert i forskjellig grå-nyanser som angir relativ viruskonsentrasjon. Mørkere farge indikerer høyere viruskonsentrasjon. Kontrollbrønner uten virus er markert blå.

2.5.6. Virusforsøk 4: Dyrkning av virus og alger i agarosekåler

Det ble også utført et virusforsøk hvor målet var å dyrke *Prymnesium polylepis* sammen med virus direkte i agarosekåler. Det er tidligere blitt utført et forsøk hvor *Ostreococcus* spp. ble dyrket direkte i agarosekåler og lyserte celler m/virus kunne plukkes direkte ut fra agarosen (Derelle et al. 2008). Dette er en effektiv måte å isolere virus på da cellene som er lysert vil ligge fast i agarosen, og det er lett å plukke ut det viruset man er på jakt etter. I dette forsøket ble det kun brukt *P. polylepis* UIO037 og to ulike viruskonsentrat; viruskonsentrat fra OF2 og virussupernatant fra en UIO037 flaske fra virusforsøk 2.0. (Virussupernatanten kommer opprinnelig også fra OF2, men skal i teorien inneholde mere spesifikke *P. polylepis* virus).



Figur 9: *Prymnesium polylepis* UIO037 ble tilsatt virus, deretter fortynnet x10 bortover i 5 rør. Etterpå ble agarose tilsatt i algerørene m/virus, og deretter helt over i petriskåler.

Det ble brukt totalt 5 glassrør for hver type viruskonsentrat. I hvert rør ble det tilsatt 5ml algekultur, og i rør 1 ble det tilsatt 0,5ml virus som ble fortynnet x10 bortover i 5 rør ved å ta 0,5ml fra rør 1 til rør 2 osv. (Fig. 9). Rør 1 skal da ha høyest viruskonsentrasjon og rør 5 lavest viruskonsentrasjon. Forsøket ble utført med 2 negative kontroller uten viruskonsentrat. Alle rørene stod kaldt i ca. 30 minutter slik at virusene fikk mulighet til å feste seg til algene før de ble tilsatt agarose.

En agarosegelé (Seakem LE agarose) med konsentrasjon 1,5% ble laget og blandet med hvert av algerørene, slik at endelig agarosekonsentrasjon ble 0,15%, og deretter helt over i små nunclon petriskåler på 35mm (thermoscientific, Danmark). Agaroseskålene ble satt til dyrkning på 17°C klimarom i en plastboks med fuktig klut under for å holde på fuktigheten.

2.6 Flow cytometer (FCM)

Dette forsøket bygger videre på virusforsøk 2.0 og 2.1 (se punkt 2.5.3). Målet var å undersøke hvilket ploidinivå *Prymnesium polylepis* stammene har ved dag 0 i virusforsøkene, og om ploidinivået endrer seg i løpet av forsøket. Størrelsen på cellekjernene kan estimeres ved å bruke hønsblodceller som intern standard (hønsblod celler er genomsekvensert). Det er også mulig å estimere cellekjernestørrelse ved å bruke 0,5µm røde fluoriserende kuler (polysciences inc., PA, USA) og kalibrere dette mot en kjent standard. Celleantallet kan estimeres ved å bruke en pakke med et nøyaktig antall kuler (BD trucount tubes, BD sciences, CA, USA).

Flow cytometeret ved UiO er ikke er stilt inn på å detektere små partikler som virus, derfor må dette telles/kvantifiseres på en annen måte, se punkt 2.7. Prøver ble analysert med en FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA). Dataene ble behandlet med programmet Cell Quest Pro.

2.6.1 Isolering av cellekjerner

For å kunne detektere cellekjerner og estimere kjernestørrelse med flow cytometer, må kjernen skilles fra resten av cellen. I tillegg må RNA må fjernes slik at ikke fargestoffet propidium iodide også fester seg til RNA-et og dermed forstyrrer signalene fra selve cellekjernen. Prøvene (0,5ml) ble blandet med 0,5ml NIB buffer (nuclei isolation buffer) (30 mM MgCl₂, 20 mM sodium citrate, 120 mM sorbitol, 55 mM HEPES, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) (Marie et al. 2000). Prøvene ble deretter tilsatt 5µl RNase A (pure link, CA, USA) som fikk virke mørkt i 10-15min, deretter ble cellekjernene farget med 50µl propidium iodide (1,0 mg/ml i vann) (molecular probes, OR, USA) som fikk virke mørkt og på is i 15-45min.

2.6.2 Metodeutvikling Sentrifugering – Oppkonsentrering av celler

Ved flow cytometri analyser er det ønskelig å ha tilstrekkelig høyt nok antall celler i prøven for å oppnå et godt resultat. FACScalibur maskinen er stilt inn på å telle opp til 10.000 partikler og ved for mye bakgrunnsstøy/debris og lite celler/kjerner i prøven så går dette ut over resultatet. Derfor er det ønskelig å oppkonsentrere celler hvis cellekonsentrasjonen i prøvene er lav. Jeg ønsket å sjekke hvor godt man fikk oppkonsentrert celler, både på levende og fikserte celler, og på ulike sentrifugeringshastigheter.

Fra et pilotstudie (ikke vist her) kom jeg fram til følgende sentrifugeringshastigheter som jeg ønsket å teste; 1000, 2000 og 4400 rpm i 15 minutter og ved 9°C. Nevnte rpm hastigheter tilsvarer 0,2, 0,6 og 3,0 rcf.

Prøvene ble sentrifugert med en kjølesentrifuge (eppendorf centrifuge 5702R, Tyskland). Cellekonsentrasjon ble målt før og etter sentrifugering (3 replikater av hver hastighet og med 3 målinger av hver replikat) med CASY. Etter sentrifugering av prøvene (1000µl) ble 900µl tatt bort av det øverste laget, slik at kun 100µl ligger igjen, og man kan da forvente at man har oppkonsentrert prøven x10 ganger. Fikserte prøver ble fiksert med 25% GLA til en endelig konsentrasjon på 1% og fikk virke i minimum 30 min før prøvene ble analysert.

2.7 Virustelling

2.7.1 Kvantifisering av virus fra virusforsøk 2.0 og 2.1

I henhold til metode hentet fra Nobel og Fuhrman (1998) ble virusene fra virusforsøk 2.0 og 2.1 (se punkt 2.5.4) filtrert, farget og telt. Prøvematerialet fra disse to virusforsøkene ble tint opp i romtemperatur og spunnet ned med en kjølesentrifuge (eppendorf centrifuge 5415R, Tyskland) for å bli kvitt alger og større partikler slik at kun virusene ligger igjen på toppen av prøven. Det ble så tatt av ønsket mengde supernatant som ble tilsatt sterilfiltret dH₂O (filtrert gjennom 0,02µm) slik at totalvolumet ble 5mL. Prøvene ble filtrert gjennom et Anodisc 0,02µm filter, og filtrene ble deretter tørket i ca. 30-60min. Filtrene ble farget med 100µL SYBR Green 1 (1:400 fortykning) i 15-20min før de ble tørket videre i ca. 30-60 min.

Alt arbeid ble gjennomført på et mørkt sted. Filtrene ble montert på objektglass med 30µl Citifluor (Citifluor Ltd, London, England) under dekkglasset. Citifluor reduserer bleking av fluorescensen, slik at preparatene kan observeres lengre under mikroskop før filteret blekner. Preparatene kunne fryses ned ved -20°C hvis de ikke skulle observeres samme dag. Mikroskopering ble gjennomført med et fluorescerende Zeiss Axio scope A1 mikroskop (Carl Zeiss, MicroImaging GmbH, Tyskland) under blått lys (eksitering 450-490nm, emittering over 515nm) på 100x forstørrelse. SYBR green 1 bundet til dsDNA har en maksimal eksitering på ~488 nm (Nobel & Fuhrman 1998). Etter metode fra Nobel og Fuhrman (1998) ble minimum 10 tilfeldige synsfelt telt, og opptil minimum 200> virus.

2.7.2 Påvisning av virus i stamkulturer til *Prymnesium polylepis*

Prymnesium polylepis, spesielt stammene UIO036 og UIO037, har vært mistenkt for å inneholde virus i stamkulturene, da disse kulturene vokser generelt dårligere til tider enn de andre stammene (personlige observasjoner) og kan falle sammen mye fortere. Det skal ikke utelukkes at de andre stammene UIO038-UIO041 også kan inneholde virus. 1,5mL prøve x2 replikater ble tatt ut fra *P. polylepis* UIO036 og UIO037, algene i disse rørene hadde brutt ned fortere enn *P. polylepis* UIO038-041 fra samme dato. Prøvene ble sentrifugert i en kjølesentrifuge (eppendorf centrifuge 5415R, Tyskland) i 15min på 6000 rpm, hvor deretter 1mL supernatant fra hvert rør ble overført til nye eppendorfrør.

Virussupernatantene ble fortynnet 1:10 og 1:100 med steril filtrert dH₂O slik at totalvolum ble 5mL. Prøvene ble fiksert med glutaraldehyde til en endelig sluttkonsentrasjon på 1%. Dette stod kaldt og fikk virke i 10min før prøvene ble filtrert. Filtrering og farging av prøvene ble utført etter samme metode som i punkt 2.7.1.

Ettersom SYBR Green 1 raskt bleknet under mikroskopet så ble kun ¼ av synsfeltet telt, og deretter ganget med 4 for å oppnå total mengde viruspartikler i et synsfelt. Totalt 5 synsfelt ble telt for hvert filter. Dette var kun ment som en kvalitativ observasjon, ikke en kvantitativ.

3. Resultater

3.1 Blandingsforsøk

Etter blanding av *Prymnesium polylepis* kulturer ble det i kulturer UIO036xUIO038, UIO036xUIO039, UIO036xUIO040 oppdaget (etter 5-15min) opptil flere ganger to celler som hang fast i hverandre i opptil 3-5 minutter, før de ble livløse under varmen fra lysmikroskopet. Forsiktig banking på objektglasset førte heller ikke til at cellene løsnet fra hverandre (Fig. 10A). I blandingskultur UIO036xUIO037 ble det ved et tilfelle oppdaget to celler som hang fast i hverandre med en slags tykk stilk (Fig. 10B). Denne stilken var mye tykkere enn et haptonema, så hva dette er for noe er vanskelig å si. Ved å fokusere inn og ut på denne stilken kunne man mulig skimte noe som lyste opp, i motsetning til haptonema og flageller som er mørke. Etter 2-3 minutter var denne stilken kraftig bøyd (Fig. 10C), før cellene ble livløse under mikroskopet. Ved blanding av kulturer på et senere tidspunkt ble det ikke observert samme hendelse.

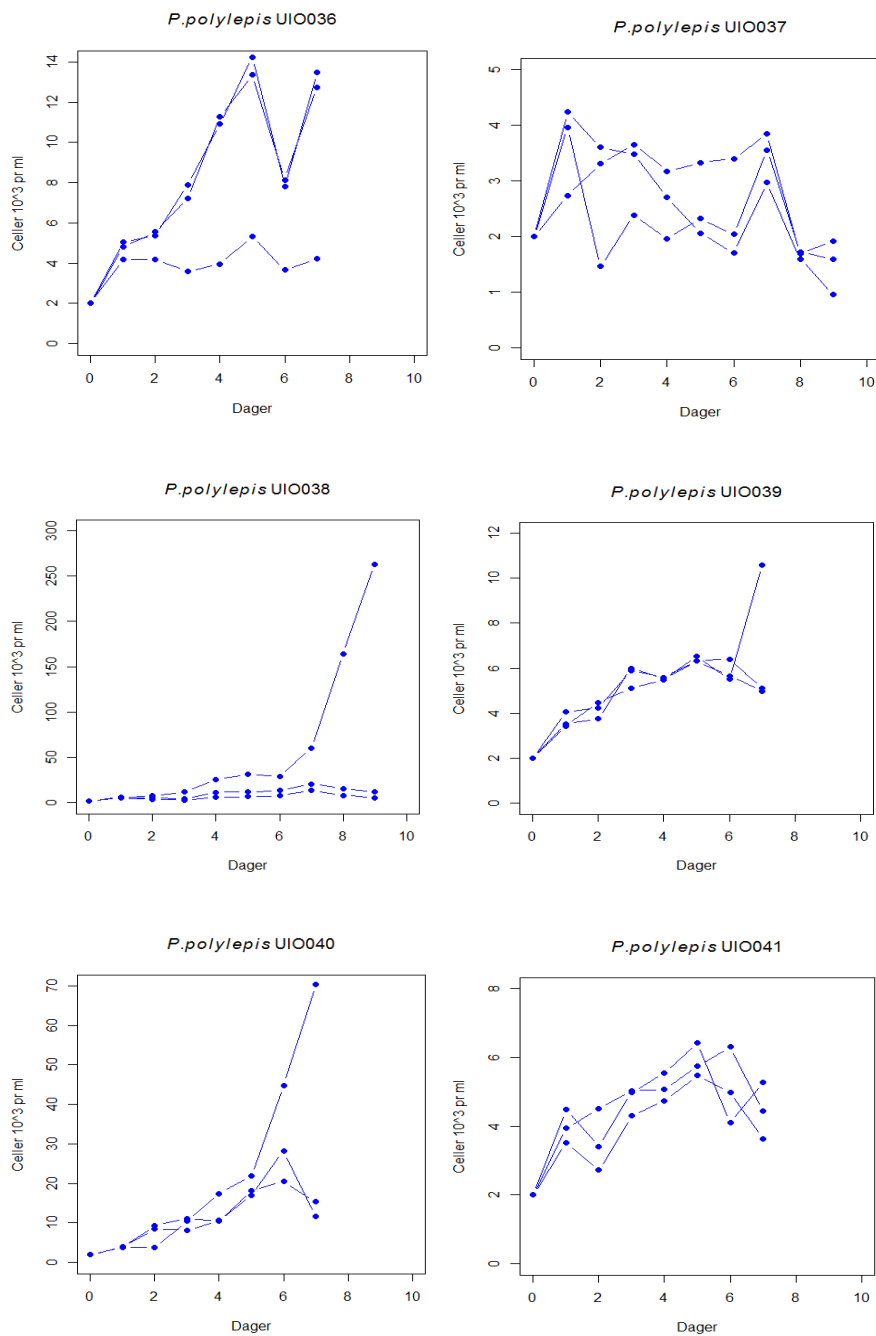


Figur 10: Skisse over observasjoner av blandingsforsøk. A) I blandingskulturer *Prymnesium polylepis* UIO036xUIO038, UIO036xUIO040 og UIO036xUIO041 ble det oppdaget to celler som hang tydelig fast i hverandre i opptil 5 minutter (før de ble livløse pga. varmen fra lysmikroskopet). B og C) I blandingskulturer *Prymnesium polylepis* UIO036xUIO037 ble det oppdaget engang to celler som var koblet sammen med en stilk. C) Etter 2-3 min var denne stilken kraftig bøyd. Haptonemaer er ikke tegnet inn i skissene, da disse ikke var synlig i lysmikroskopet. Blandingene ble observert i et Leica DMLS mikroskop (leica microsystems, GmbH, Tyskland).

Etter at kulturer av *P. polylepis* ble blandet ble de overført på samme vis som stamkulturene (se 2.1), men dog ikke like ofte. Noen eldre overføringer av blandingskulturene UIO036xUIO037, UIO036xUIO038, UIO036xUIO040 og UIO036xUIO041 hadde klart seg i 3 måneder på 13°C klimarom uten å falle sammen i motsetning til ca. 2 uker som er normalt for denne arten. Kulturrørene hadde dog en merkbart bakterievekst med blakket farge. Etter overføring til nytt friskt medium så var det kun blandingskultur UIO036xUIO040 og UIO036xUIO041 som var i live 1 måned senere.

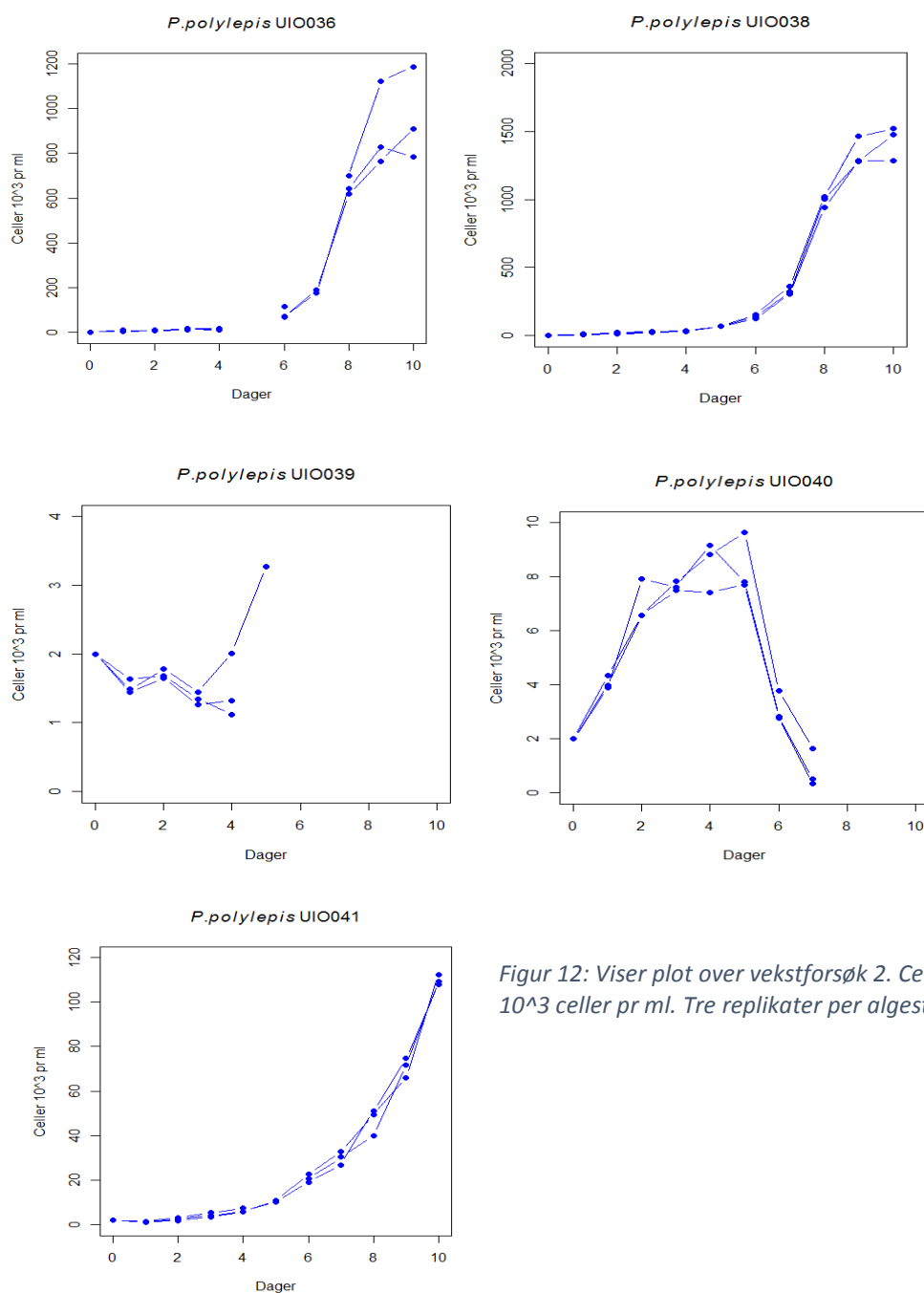
3.2 Vekstforsøk

Det første vekstforsøket som ble utført var ikke vellykket. Kulturene vokste generelt dårlig, og noen av kulturene kom ikke over i den eksponentielle fasen i det hele tatt før kulturene falt sammen (Fig. 11). Et av replikatene til *Prymnesium polylepis* UIO038 kom opp i ca. 250.000 celler pr ml, dette var den høyeste verdien registrert hos alle stammene. Det var ikke mulig å sammenligne vekstratene på dette grunnlag, derfor ble det startet et nytt vekstforsøk (Fig. 12).



Figur 11: Vekstforsøk 1. Celleantall er oppgitt i 10^3 celler pr ml. Tre replikater per algestamme.

I det nye vekstforsøket så var det kun *Prymnesium polylepis* UIO036, UI038 og UIO041 som vokste fint og har en typisk s-kurve (Fig. 12). Inokulumet til *P. polylepis* UIO037 hadde ikke vokst opp i forkant av forsøket og det var derfor ikke mulig å starte et nytt vekstforsøk med denne stammen. *Prymnesium polylepis* UI0039 vokste omtrent ikke i det hele tatt, og den ble av den grunn tatt ut av forsøket etter bare 5 dager. *Prymnesium polylepis* UIO040 vokste sakte de 5 første dagene, før den ved dag 6 omtrent faller ned over natten, og ble etter dette tatt ut av forsøket.



Figur 12: Viser plot over vekstforsøk 2. Celleantall er oppgitt i 10³ celler pr ml. Tre replikater per algestamme.

Ved utregning av vekstraten k , fokuserte jeg kun på de stammene/replikatene som hadde en fin eksponentiell vekst over flere dager (>3dager minimum).

Den høyeste vekstraten ble målt til $k=1,23$ hos *P.polylepis* UIO038 i vekstforsøk 2, ellers varierer målingene fra 0,56-1,22 (Tabell C4 i appendiks C).

Ser man på begge vekstforsøkene samlet på de stammene som ble målt (se Tabell C4 og Fig. C3 i appendiks C), så var det en signifikant forskjell i vekstrate mellom stammene, og også mellom forsøkene er det en signifikant forskjell i vekstratene ($P<0,05$).

Ser man på vekstforsøkene hver for seg, så var det en signifikant forskjell i vekstrate mellom stammene ($P<0,001$ og $P<0,05$ for henholdsvis vekstforsøk 1 og 2).

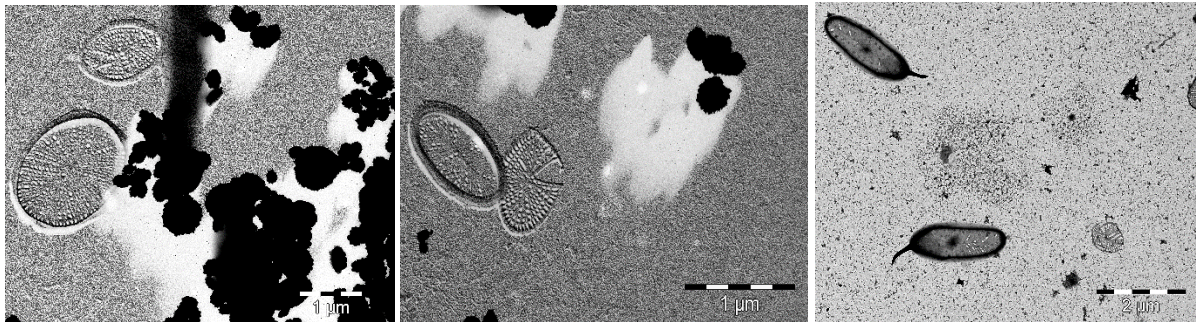
Sammenligner man stammene enkeltvis i begge forsøkene, så var det kun UIO38 som hadde en signifikant forskjell i vekstrate mellom vekstforsøk 1 og 2 ($P<0,05$).

Stammen UIO038 skiller seg ut i vekstforsøk 2, da den har høyest vekstrate mellom dag 4-8, mens de andre stammene som ble målt har høyest vekstrate i starten av forsøkene (Tabell C4 i appendiks C).

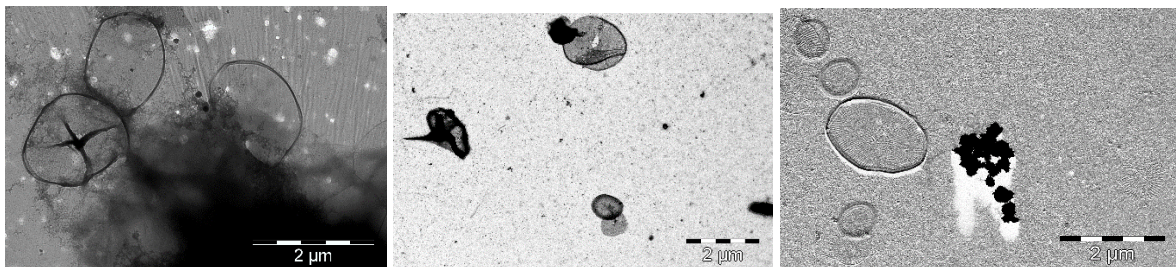
Anovatabeller finnes i appendiks C.

3.3 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)

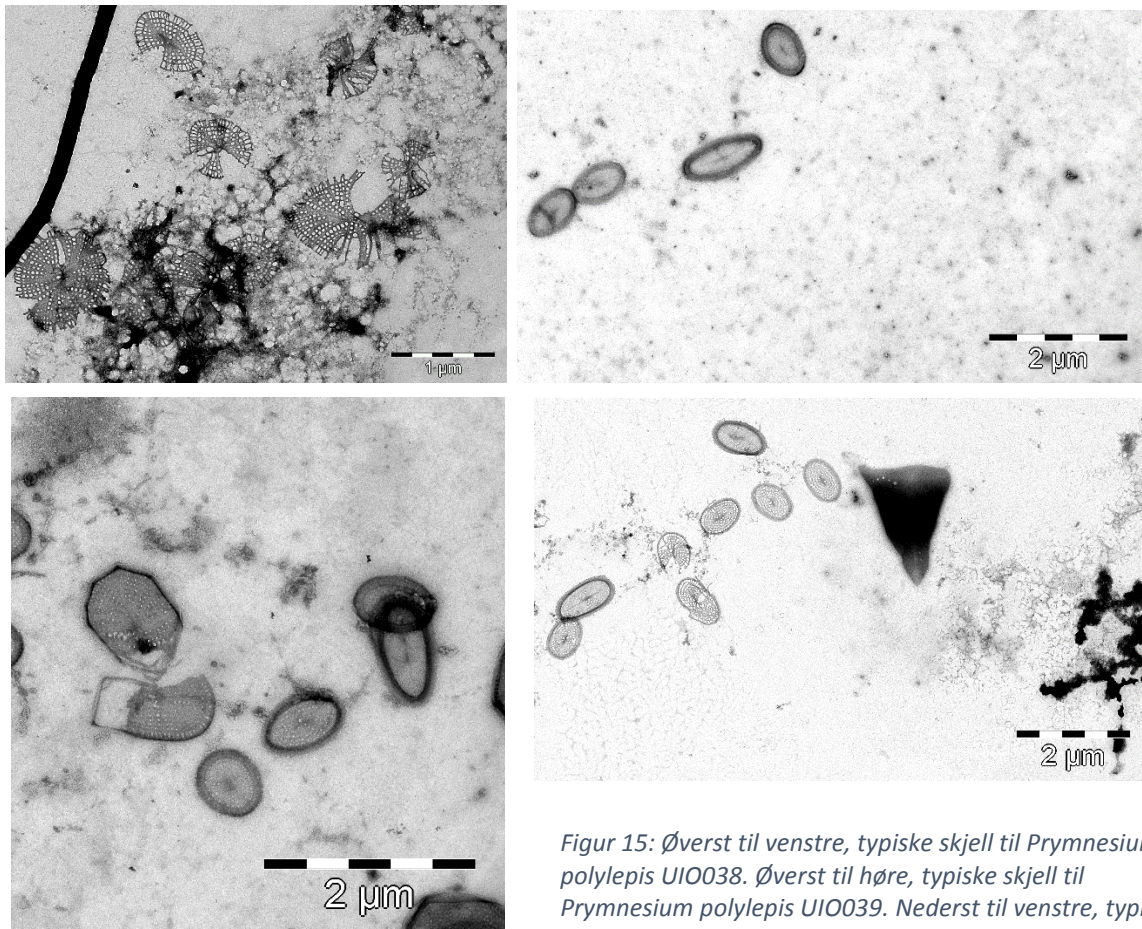
Gjentatte observasjoner av TEM-preparater viste at det er *Prymnesium polylepis* UIO037 som er av den avvikende celletypen (Fig. 14), i kontrast til tidligere hvor det har vært *P. polylepis* UIO036. De resterende stammene UIO036 og UIO038-UIO041 består av den typiske celletypen (Fig. 13 og Fig. 15). Blandingskulturene *P. polylepis* UIO036xUIO040 og UIO036xUIO041 er også av den typiske celletypen (Fig. 16). Det ble ikke observert noen avvikende skjell i blandingskulturene, slik som man kunne forvente ved å blande to kulturer (dog det var noen skjell som kunne være i tvil, men bilde var ikke mulig å oppnå pga. dårlig hinne på griden).



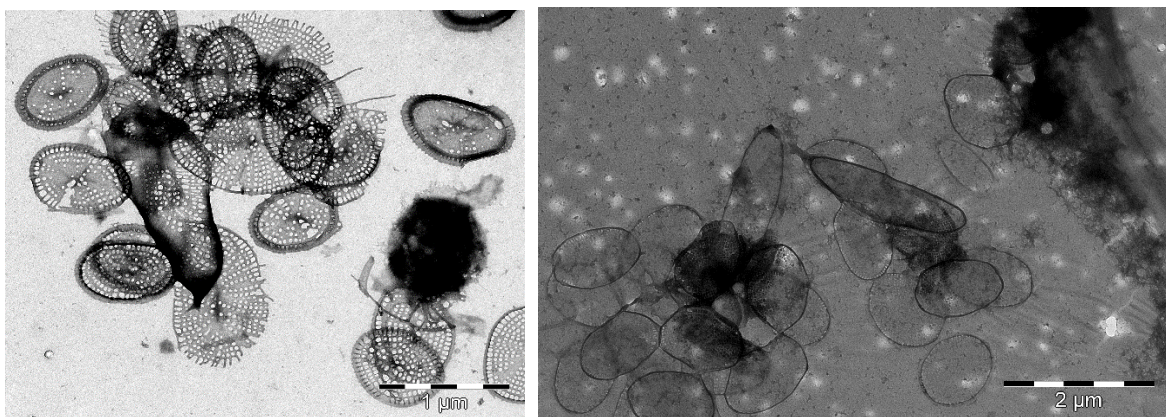
Figur 13: Typiske skjell til *Prymnesium polylepis* UIO036. Til venstre, et stort og et lite rundt skjell. I midten, et lite avlangt skjell og et lite rundt skjell. Nederst til venstre to store avlange skjell (snegleskjell) med kun en tagg. Bilde til venstre og i midten er fiksert med osmium 1% og skyggelagt med gull-paladium. Bilde til høyre fiksert med GLA 1% og farget med uranylacetat.



Figur 14: Avvikende skjell til *Prymnesium polylepis* UIO037. Til venstre og midten, to spisse skjell sett fra forskjellig vinkel. Til høyre, et stort og tre små skjell. Bilde til venstre og til høyre er fiksert med osmium 1% og skyggelagt med gull-paladium. Bilde i midten er fiksert med GLA 1% og farget med uranylacetat.



Figur 15: Øverst til venstre, typiske skjell til *Prymnesium polylepis* UIO038. Øverst til høye, typiske skjell til *Prymnesium polylepis* UIO039. Nederst til venstre, typiske skjell til *Prymnesium polylepis* UIO040. Nederst til høye, typiske skjell til *Prymnesium polylepis* UIO041). Fiksert med GLA 1% og farget med uranylacetat.



Figur 16: Til venstre, typiske skjell til blandingskultur *Prymnesium polylepis* UIO036xUIO040. Til høye, typiske skjell til blandingskultur *Prymnesium polylepis* UIO036xUIO041. Fiksert med GLA 1% og farget med uranylacetat.

De ulike skjelltypene ble målt (Tabell 5) og sammenlignet med tidligere målinger gjort av Paasche et al. (1990) i Tabell 1. Verdiene fra Tabell 1 avviker noe med mine funn. Av det store avlange typiske skjellet, snegleskjellet, så ble det funnet noen skjell med bare 1 tagg, mot 2 som er vanlig (Fig. 3 og Fig. 13). Snegleskjellet til *Prymnesium polylepis* blandingskultur UIO036xUIO040 virker også å være noe deformert (Fig. 16). Noen av mine skjellmålinger skilte seg klart ut, av det store typiske skjellet var det noen målinger som lå nede på $0,8 \times 0,84 \mu\text{m}$, og av det avvikende lille skjellet var det noen målinger som lå nede på $0,44 \times 0,55 \mu\text{m}$, se appendiks B for rådata over målinger.

Tabell 5: Gjennomsnittsmålinger av skjellstørrelse i de ulike *Prymnesium polylepis* stammene. Verdier er gitt i μm . Rådata finnes i appendiks B.

Stamme	Lite skjell	Stort skjell	Lite avlangt skjell	Stort avlangt skjell	Spisst skjell
P.pol UIO036	0,76 x 0,60	1,14 x 0,91	1,01 x 0,62	2,05 x 0,66	-
P.pol UIO037	0,71 x 0,61	1,92 x 1,30	-	-	1,73 x 1,53
P.pol UIO038	0,73 x 0,55	1,08 x 0,94	†	†	-
P.pol UIO039	0,78 x 0,49	1,17 x 0,40	1,09 x 0,53	†	-
P.pol UIO040	0,75 x 0,53	1,30 x 0,97	1,09 x 0,51	†	-
P.pol UIO041	0,75 x 0,54	†	1,05 x 0,54	†	-
P.pol UIO036x040	†	1,19 x 0,87	0,97 x 0,43	2,25 x 0,61	-
P.pol UIO036x041	0,78x0,53	1,32 x 0,9	1,01 x 0,46	1,64*	-

*Deformert skjell. Bare mulig å måle den lengste aksen. † Ingen celler av denne typen å måle ut ifra de bildene som ble tatt.

3.4 Virusforsøk

3.4.1 Virusforsøk 1: Eksperiment Raunefjordvirus

To uker etter at algekulturene ble tilsatt virus så var det kun blandingskulturene *Prymnesium polylepis* UIO036xUIO038 og UIO036x040 som fortsatt hadde god algevekst og ingen tegn til lysering. Hvis det har vært lysering i de andre kulturrørene så var det vanskelig å se pga. den runde bunnen på kulturrørene. Basert på dette grunnlag, ble det ikke gjort noe mer med dette forsøket.

3.4.2 Virusforsøk 2: Eksperiment med Oslofjordvirus

Virusforsøk 2.0: Tre dager etter at kulturene ble tilsatt virus, så var algene fortsatt i god vekst, og det var ingen tegn til lysering enda. Det var først ved dag 7 at det dukket opp tegn på lysering, med hvite/blanke prikker på bunnen av de fleste flaskene. Om det har skjedd lysering før dette, så har det ikke vært synlig. Elleve dager ut i forsøket så hadde alle flaskene i varierende grad fått et gulbrunt belegg i bunnen. Ved dag 11 så hadde også majoriteten av flaskene blitt kraftig lysert, med et karakteristikk blank/hvit prikkete lag på bunnen av flaskene.

Virusforsøk 2.1: *Prymnesium polylepis* stamme UIO038 og UIO041 var de eneste hvor kontrollene vokste i dette forsøket. I de andre kontrollene hos stamme UIO036, UIO037, UIO039 og UIO040 så dukket det opp store hvite partikler som var en del større enn *P. polylepis* celler og var klart synlig med det blotte øye. Disse partiklene dukket også opp i flaskene m/virus til sistnevnte stammer. Ettersom disse kulturene ikke vokste, ble disse stammene tatt ut av virusforsøk 2.1. Ved dag 3 så var det god algevekst i UIO038 og UIO041, men sistnevnte hadde fått et gulbrunt slimbelegg i bunnen av flaskene. Ved dag 7 kunne man skimte tegn til lysering hos UIO038 med karakteristiske hvit/blank prikkete lag på bunnen av flaskene. Hos UIO041 så var det fortsatt god algevekst med en ekstrem mørk farge på kulturen, så det var ikke mulig å se etter tegn på lysering her. Ved dag 11 så var det lett å se tegn på lysering hos UIO038, men hos UIO041 var det fortsatt god algevekst og

meget mørk farge på mediumet. Ved dag 14 så var fargen derimot lysere, men det var fortsatt ikke mulig å skimte noen tegn på lysering hos UIO041. Det skal dog ikke utelukkes at det har skjedd lyseringer her likevel. Grafisk fremstilling av alger og virus kan sees i Fig. 20.

3.4.3 Algetelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1

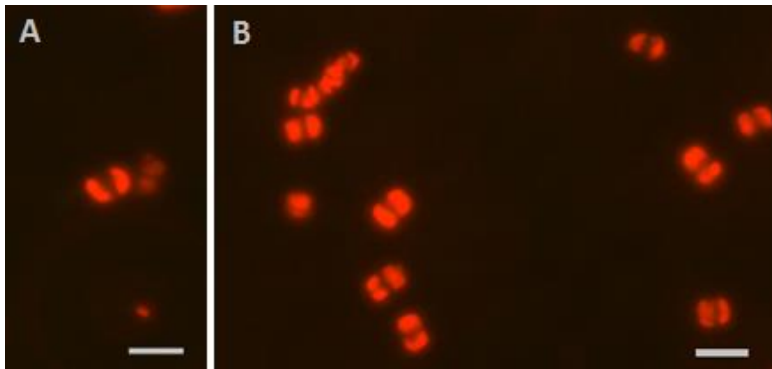
Estimering av celleantall og ploidivå i flow cytometer som opprinnelig var planlagt var ikke mulig, se diskusjon for mulige årsaker. Estimering av celleantall fra virusforsøkene 2.0 og 2.1 ble derfor basert på tellinger av kloroplastpar (hver *Prymnesium polylepis* celle inneholder 2 kloroplaster) under fluorescens mikroskop. Prøvene ble filtrert gjennom 1µm svart polykarbonat filter (poretics corporation, CA, USA).

Figur 17 viser normale kloroplastpar til *Prymnesium polylepis*. Alle algetellinger er basert på kloroplastpar av denne typen. Til høyre i Fig. 17 er et kloroplastpar tilhørende *P. polylepis* UIO038, og til venstre *P. polylepis* UIO041. Sistnevnte har noe mindre kloroplastpar, målt til å være 6,11 µm (n=6) mens førstnevnte ble målt til å ha et kloroplaster på 7,77µm (n=1). Kloroplastpar til resterende stammer (UIO036, UIO037, UIO039 og UIO040) hadde kloroplastpar på størrelse med UIO038 (Bilde ikke vist). Målinger ble gjort tvers over begge kloroplastene.

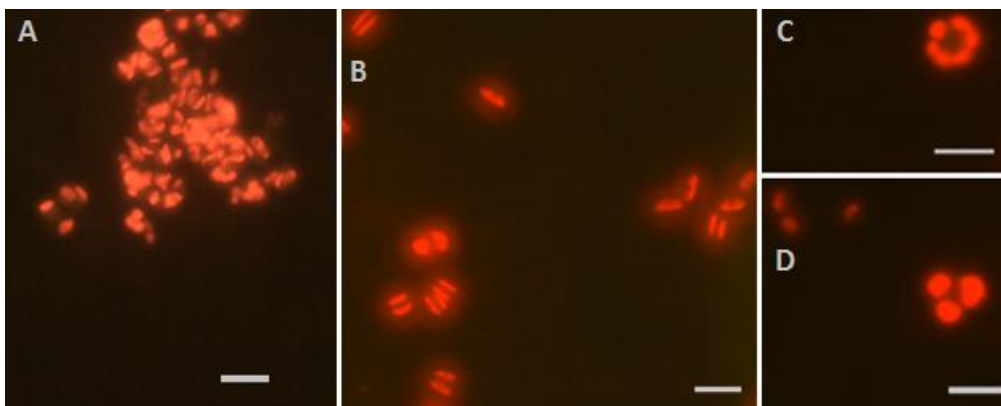
Underveis i forsøket ble det observert andre typer kloroplaster (Fig. 18). Det ble oppdaget at viruskonsentratet fra Ytre Oslofjord var kontaminert med andre protister (både autotrofe og heterotrofe) og bakterier, og på enkelte filtre fant jeg kloroplaster fra andre alger enn *P. polylepis*, som f.eks. pedinellide alger (*dictyochophyceae*) (Fig. 18C) og pennate diatomeer (Bilde ikke vist). Spesielt på dag 11 i forsøket ble det oppdaget i alle stammene, unntatt *P. polylepis* UIO037, kloroplaster som var misdannede og samlet seg i typiske klumper, og det var ikke mulig å skille dem fra hverandre ei heller telle dem separat (Fig. 18A). Enslige kloroplaster (øverst i Fig. 18D) var også vanlig å se i prøvene ved dag 7,11 og 14/15. Alle *P. polylepis* stammene sank i cellekonsentrasjon fra dag 11 til dag 14/15, unntatt UIO037 som fortsetter å vokse etter dag 11 (Fig. 20). I virusforsøk 2.1 ble det ikke funnet små

kloroplastpar (Fig. 18B) i kultur UIO041, men kun ordinære *P. polylepis* kloroplastpar (Fig. 17B) sammen med noen få enslige kloroplaster. Derimot så ble det funnet små kloroplastpar i UIO038 i virusforsøk 2.1.

På hvert filter ble det telt minimum 10 tilfeldige synsfelt telt, og opptil minimum 200 kloroplastpar. Spesielt på de siste dagene i virusforsøkene, var ikke dette mulig pga. lite alger (og dermed få kloroplaster) i prøven, da ble omtrent hele filteret telt. Se appendiks D for rådata over algetellinger.



Figur 17: Bilde av et normalt *Prymnesium polylepis* kloroplastpar. A) Et kloroplastpar til *Prymnesium polylepis* UIO038. B) Til høyre sees et kloroplastpar til *Prymnesium polylepis* UIO041. *Prymnesium polylepis* UIO041 ble observert under begge virusforsøkene (2.0 og 2.1) til å ha mindre kloroplastpar enn de andre *Prymnesium polylepis* stammene. (Skala=10 μ m). Algefiltrene er observert i epifluorescensmikroskop med blått eksitasjonslys med 63x objektiv. Bilder er tatt med et Leica MC 170 HD kamera (Leica Microsystems, GmbH, Tyskland).

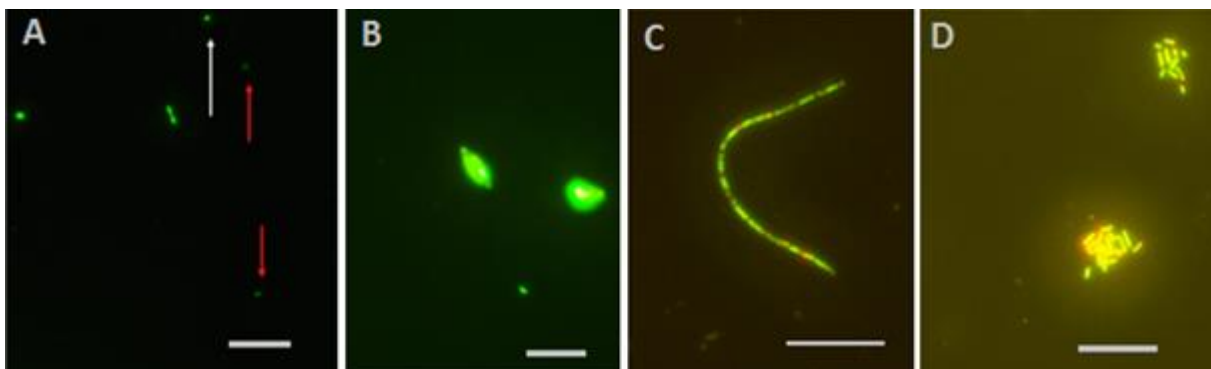


Figur 18: A) Kloroplastre i typiske uregelmessige klumper, fra *Prymnesium polylepis* UIO041 ved dag 7. B) I midten sees et normal *Prymnesium polylepis* kloroplastpar, og noen kloroplastpar av mindre type. Målte (n=5) 3,75 μ m tvers over begge kloroplastene. C) Pedinellid alge som typisk har 6 ringformede kloroplaster. D) Uidentifisert alge (skala=10 μ m).

3.4.4 Virustelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1

Viruskonsentratet fra OF2 inneholdt flere ulike typer virus. Algevirus, spesielt *phycodnaviridae*, bruker å være større enn bakterievirus, derfor fokuserte jeg kun på å telle de aller største virusene i prøven, som jeg har kalt for medium og store virus (Fig 19A). I prøvene var det også virus av mindre størrelse. Disse dekket hele filteret, men de var så vidt synlig på 100x forstørrelse og ble heller ikke fanget opp på bilder. Ettersom dette var umulig å telle og mest sannsynlig var bakterievirus, ble det ikke lagt noe mer vekt på dette. Begrenset tilgang på filtre gjorde det kun mulig å telle virus for dag 0 og dag 14/15.

Viruskonsentrasjonene for de to dagene, rundet opp til nærmeste hundretusen, er oppgitt i Tabell 6. Grafisk fremstilling for alger og virus kan sees i Fig. 20 og i Fig. 21. I virusforsøk 2.0 er det virus av mediumstørrelse som dominerer i prøvene hos alle algestammene, men det er variabelt hvor stor økningen er fra dag 0 til dag 14/15. I virusforsøk 2.1 er det de største virusene som dominerer (Tabell 7). Det ble også observert andre organismer på virusfiltrene. Mest sannsynlig en pennat kiselalge (Fig. 19B) og ulike typer bakterier (Fig. 19C og 19D). Bakteriene opptrådte oftest i lange entrådete kolonier og i klumper, og hadde synlige rød-orange områder, som kan tyde på at de har fotosyntetiserende pigmenter, og er da trolig cyanobakterier.



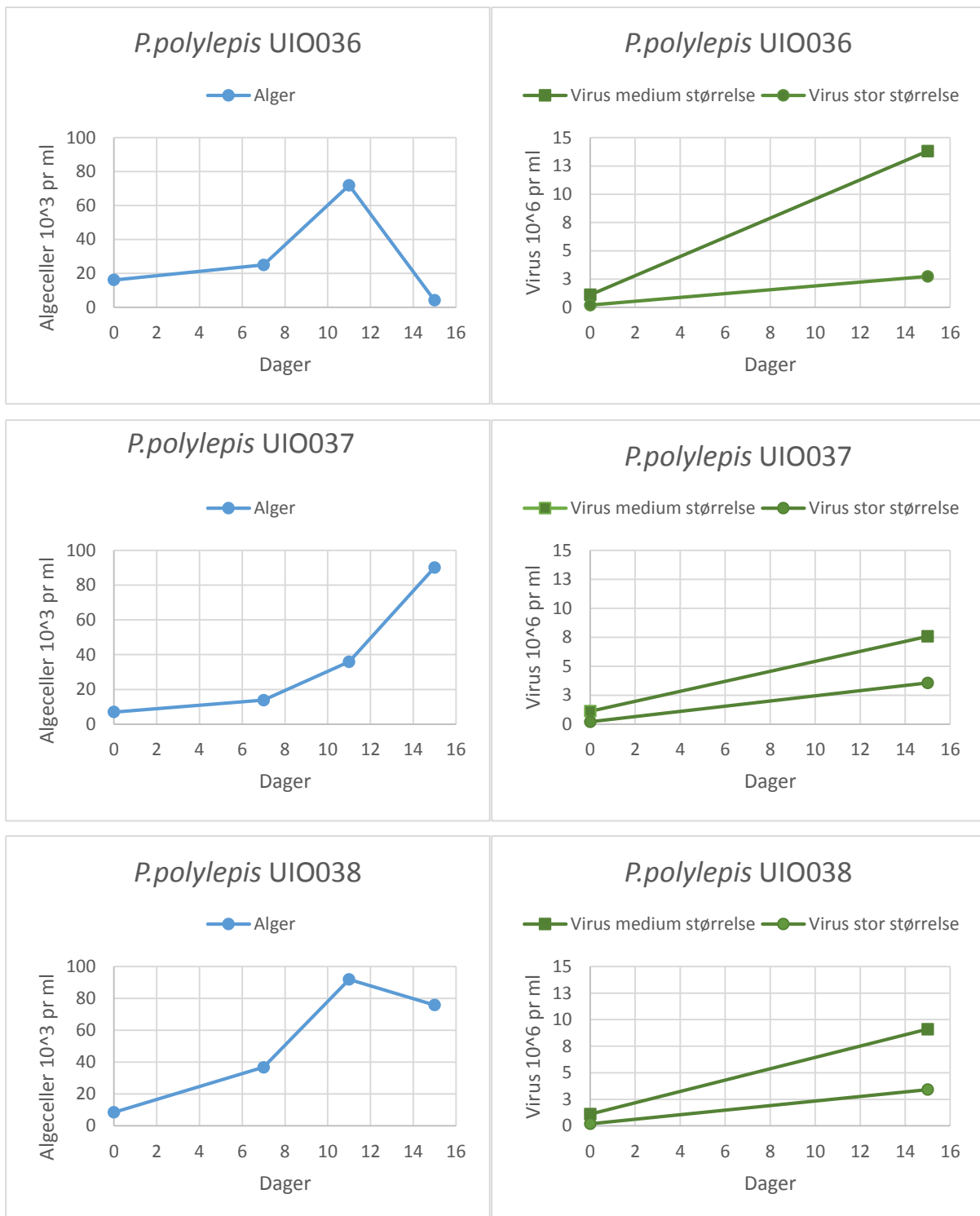
Figur 19: A) Rød piler viser medium virus, og hvit pil viser store virus. Prøvene viste seg også å inneholde enda mindre virus, som muligens kan være bakterievirus, men de ble ikke synlige på bilder. B) Viser to protister, den til venstre mest sannsynlig en pennat kiselalge. C og D) Bakterier i prøven, mest sannsynlig kolonidannende cyanobakterier. (Skala=10 μ m). Virusfiltre er observert i epifluorescensmikroskop med blått eksitasjonslys på 100x objektiv. Bilder er tatt med et Nikon D5000 kamera.

Tabell 6: Oversikt over virus pr ml for dag 0 og dag 14/15 og økningen i virusforsøk 2.0 og 2.1. Tallverdier for dag 0 og dag 14/15 er gitt i millioner (10^6) pr ml. (M= medium virusstørrelse. L= stor virusstørrelse).

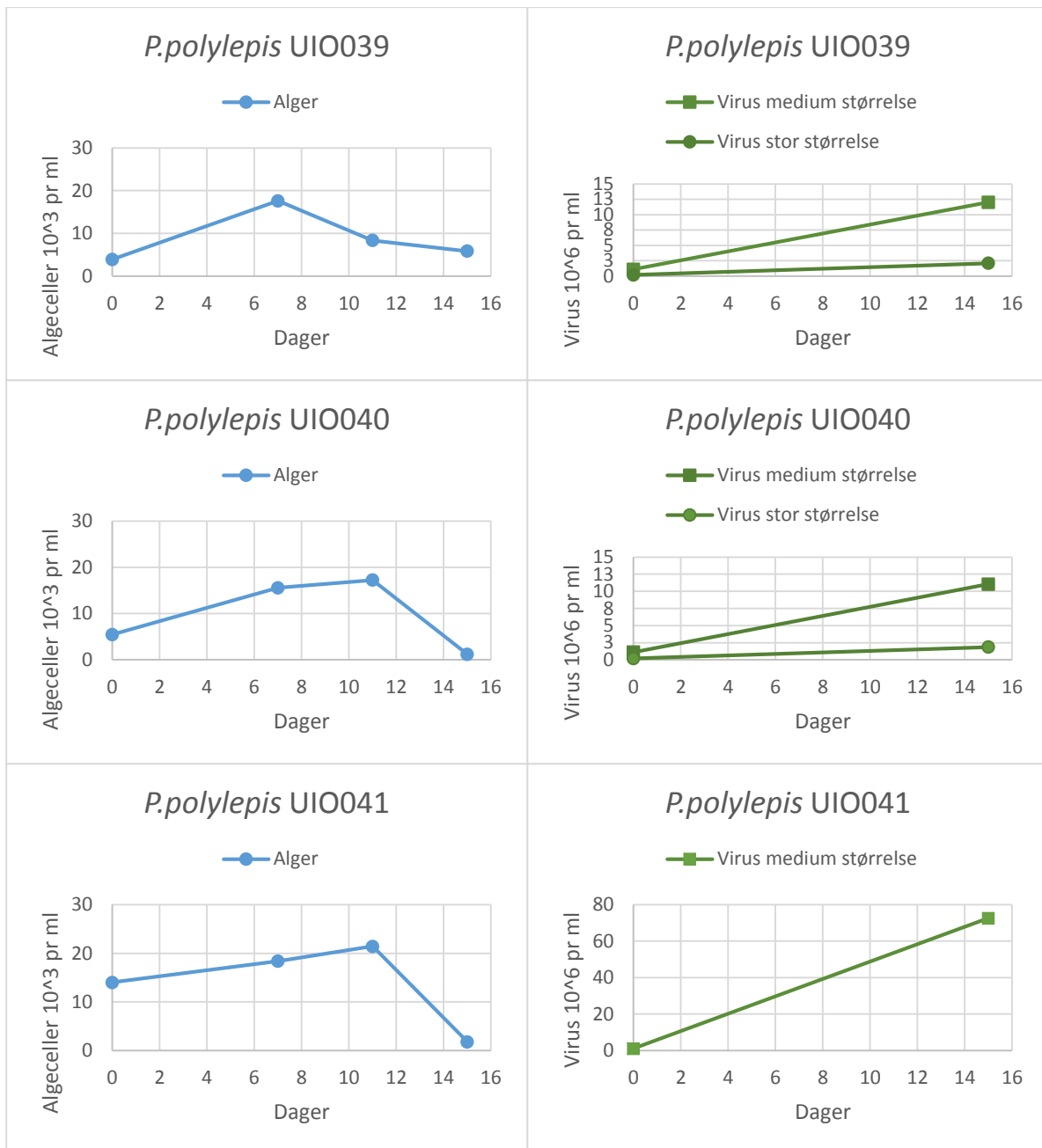
Virusforsøk 2.0												
Algestamme	036	037	038	039	040	041	036	037	038	039	040	041
Virusstørrelse	M	M	M	M	M	M	L	L	L	L	L	L
Dag 0	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	1,11	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Dag 15	13,8	7,58	9,10	12,02	11,04	72,67	2,72	3,56	3,41	2,09	1,85	0,97
Økningsfaktor	12,43	6,82	8,20	10,82	9,95	65,47	14,32	18,74	17,95	11	9,74	5,11

Virusforsøk 2.1				
Stamme	038	041	038	041
Virusstørrelse	M	M	L	L
Dag 0	0,043	0,0037	0,029	0,023
Dag 14	0,081	1,72	0,88	4,38
Økningsfaktor	1,88	464,86	30,34	190,43

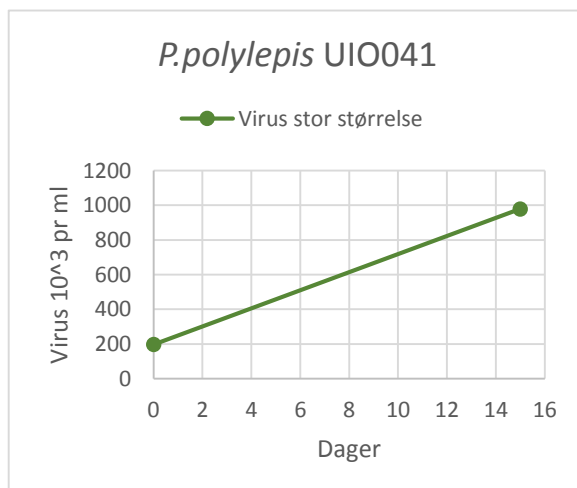
Virusforsøk 2.0



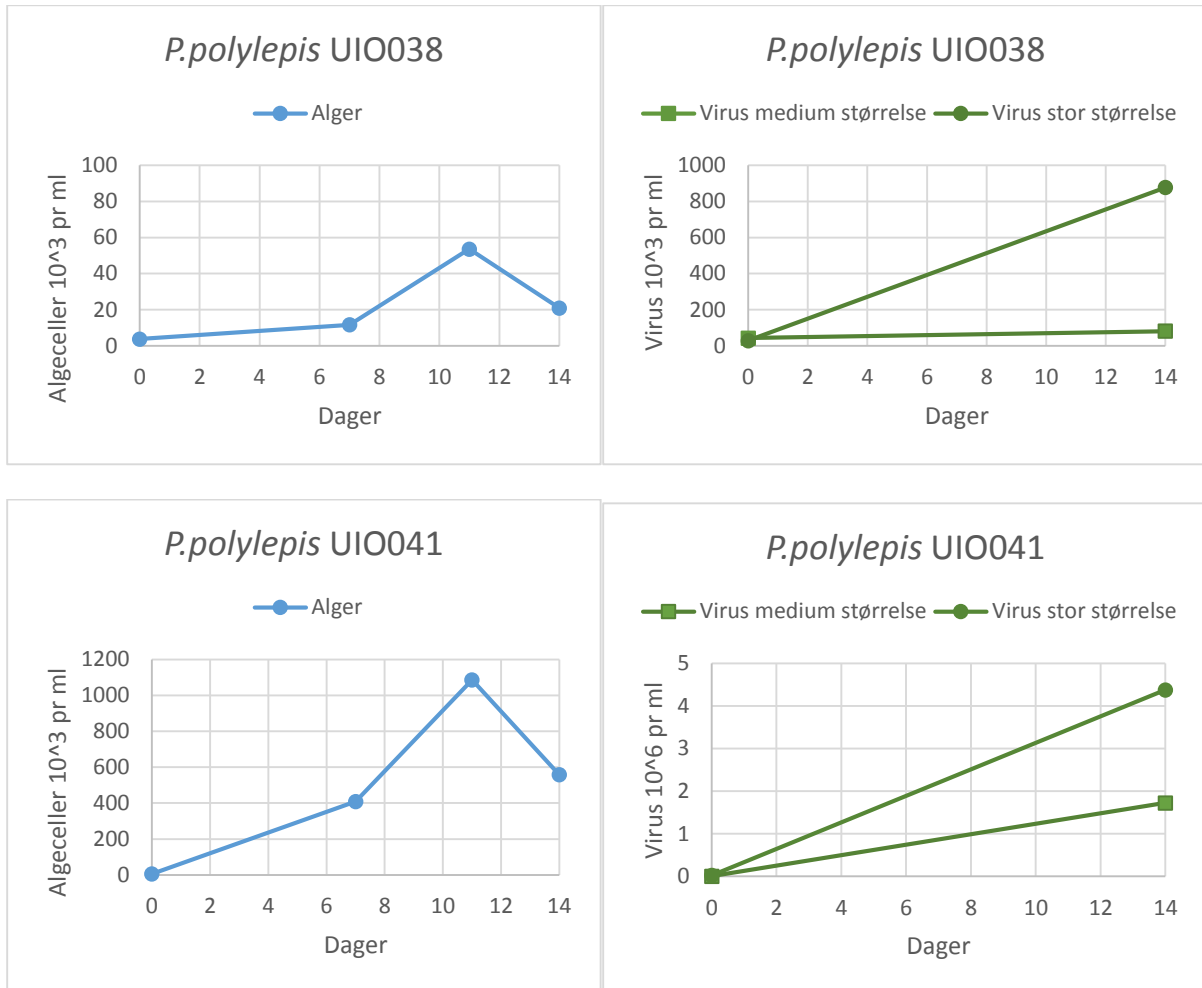
Figur 20: Seks ulike *Prymnesium polylepis* stammer ble tilsatt viruskonsentrat fra Ytre Oslofjord. På 4 ulike dager i forsøket ble celleantall pr ml estimert ved å telle kloroplastpar under fluoriserende lys. Fra samme algestamme ble det også telt virus i to ulike størrelseskategorier, medium og store. Virus ble kun telt ved dag 0 og 15. Medium virus ble klassifisert som å fylle en halv delstrek på måleokkulet på 100x, mens store virus ble klassifisert som å fylle over en delstrek på 100x.



Figur 20 fortsettelse: Seks ulike *Prymnesium polylepis* stammer ble tilsatt viruskonsentrat fra Ytre Oslofjord. På 4 ulike dager i forsøket ble celleantall pr ml estimert ved å telle kloroplaster under fluorerende lys. Fra samme algestamme ble det også telt virus i to ulike størrelseskategorier, medium og store. Virus ble kun telt ved dag 0 og dag 15. Medium virus ble klassifisert som å fylle en halv delstrek på måleokkulet på 100x, mens store virus ble klassifisert som å fylle over en delstrek på 100x.



Virusforsøk 2.1

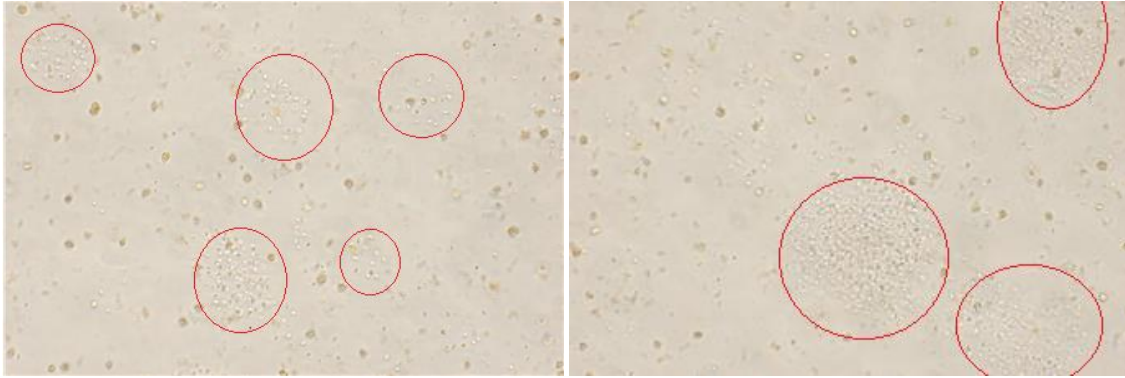


Figur 21: I virusforsøk 2.1 ble kun *Prymnesium polylepis* UIO038 og UIO041 brukt. På 4 ulike dager i forsøket ble celleantall pr ml estimert ved å telle kloroplaster under fluoriserende lys. Fra samme algestamme ble det også telt virus i to ulike størrelseskategorier, medium og store. Virus ble kun telt ved dag 0 og dag 14. Medium virus ble klassifisert som å fylle en halv delstrek på måleokkularret 100x, mens store virus ble klassifisert som å fylle over en delstrek på 100x.

3.4.5 Virusforsøk 3: Isolering av virus i fortyningsserier

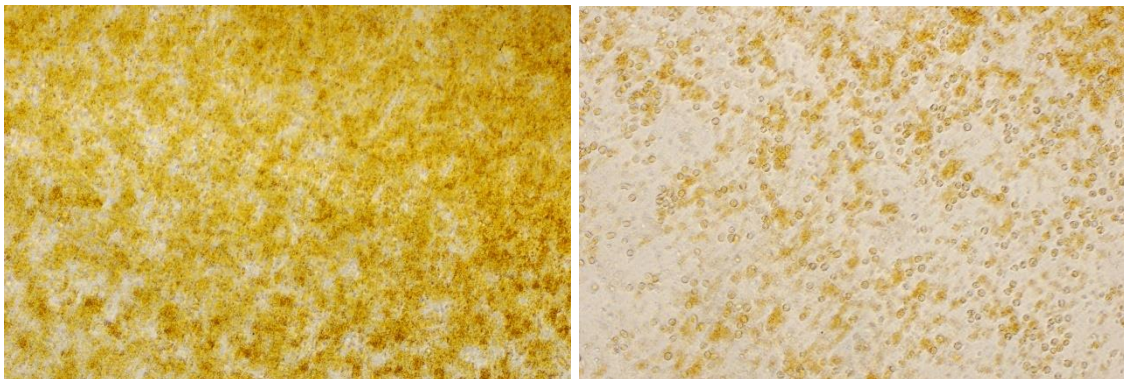
Én dag etter blanding av virus og alger så ble det oppdaget celler som lå sammen i klumper på ca. 8-15 stykk i multibrønnplate 1- 2 (50% alger og viruskonsentrat). Celleklumpene virket å ligge inne i noe slim som holdt cellene sammen (Fig. 22). I multibrønnplate 3-4 var det mer livløse *Prymnesium polylepis* celler på bunnen i brønnene med høyere viruskonsentrasjon. I tillegg så virket det som algene var mer livløse i brønnene med virussupernatant, enn i brønnene med viruskonsentrat. Ved dag 2 så ble det sett i alle multibrønnplatene at det var flere levende *P. polylepis* celler i brønnene med lavere viruskonsentrasjoner, og i tillegg så ser det ut som kontrollene har mere levende *P. polylepis* celler. Først ved dag 4 så ble det oppdaget tydelige tegn på kontaminering i multibrønnplate 1-2. Det ble funnet andre typer alger, mest trolig en pennat kiselalge og en heterotrof liten flagellat, mulig en *Bodo* sp. I tillegg til andre uidentifiserbare protister og bakterier.

Det ble ikke funnet tegn på kontaminering i multibrønnplatene med virussupernatant eller i kontrollene. Ved dag 4 ble det oppdaget tegn på lysering i multibrønnplatene 1-2, 3-4 og 7-8, og da spesielt i de brønner med høyest viruskonsentrasjon. På bunnen av brønnene var det blanke/hvitprykkete områder som kunne være lyserte algeceller. Det var vanskelig å si om det var slike tegn på lysering i multibrønnplate 5-6 på samme tidspunkt, da disse multibrønnplatene hadde fått et brunt belegg i varierende grad (Fig. 23). Det var også en tendens til flere celleklumper i brønnene med høyere viruskonsentrasjoner. Det ble prøvd å kapillærisolere disse celleklumpene for å så overføre dem til nytt friskt medium. Det visste seg at celleklumpene ble holdt sammen i en slags slimpose/sekk som var festet til bunnen med en relativt tykk stilk og det var derfor ikke mulig å få løsnet på celleklumpene.



Figur 22. Venstre) Bilde av celler (ukjent opphav) liggende i klumper på 8-15 celler, markert med rød ring. Fra multibrønnplate 1 ved dag 2. Høyre) Større klumper av celler, markert med rød ring. Fra multibrønnplate 1 ved dag 7. Brønner ble observert på 40x forstørrelse i et omvendt Nikon eclipse Te300 kamera og bilder er tatt med et Nikon D50 kamera. (Måleskala ikke satt inn).

I multibrønnplatene 1-2 og spesielt i multibrønnplate 5-6 (med viruskonsentrat) ble det også funnet brunt belegg av organisk materiale i varierende grad på bunnen av noen av brønnene. Noen av de heterotrofe protistene som fulgte med viruskonsentratet/kontamineringen så ut til å fortære det brune materialet.



Figur 23: Fra multibrønnplate 5 (viruskonsentrat og 25%alger) ved dag 7 i forsøket. Bilde tatt fra to ulike brønner. Brønnene er dekket av gulbrunt materiale av ukjent opphav. Brønner ble observert på 40x forstørrelse i et omvendt Nikon eclipse Te300 kamera og bilder er tatt med et Nikon D50 kamera. (Måleskala ikke satt inn).

3.4.6 Virusforsøk 4: Dyrkning av virus og alger i agaroseskåler

Én dag etter blanding av alger og virus i agaroseskåler så var det ikke noe tegn på levende celler i agaroseskålene. Først ved dag 4 ble det oppdaget flere levende celler i agarosekål nr 5 med viruskonsentrat fra OF2. Selv med en agaroseprosent på 0,15% som er forholdsvis tykt, så klarte *Prymnesium polylepis* å svømme fint i agarosen.

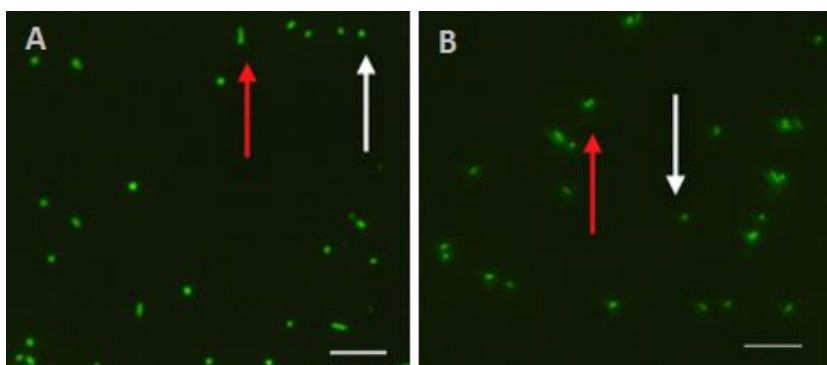
I kontrollene og resterende agaroseskåler ble ikke det funnet nevneverdig mange levende celler, kun 1-3 stykker pr agarosekål. Det kan ha vært flere algeceller som ikke har blitt registrert, da det kan være vanskelig å fokusere med mikroskopet gjennom den tykke agarosegeléen. Ved dag 11 så ble det funnet ca. 8-15 celler liggende sammen i klumper i agaroseskålene nr 1-3 med virussupernatant og i agarosekål nr 1-4 med viruskonsentrat. Celleklumpene kunne minne om klumpene i fortynningsrekkene (se 3.4.5), men det var vanskelig å avgjøre. Cellene i klumpen/kolonien var litt mindre enn *P. polylepis* celler, og mere firkantede i fasing og hadde ingen synlige flageller. Det var kun i agaroseplate nr 5 med viruskonsentrat at *P. polylepis* klarte å vokse fint i de 14 dagene forsøket varte.

3.4.7 Påvisning av stamkulturvirus til *Prymnesium polylepis*

Stamkultur *Prymnesium polylepis* UIO036 og UIO037 viste seg å inneholde både virus og bakterier. Ettersom de ble farget med SYBR green 1 så har de dobbeltrådet DNA (dsDNA). Stamkultur *P. polylepis* UIO037 viste seg å ha noe mindre virus ml⁻¹ (Tabell 7), men ettersom det kun er telt to filtre og 5 synsfelt på hver, så kan dette være tilfeldigheter pga. lite utvalg. Figur 24 illustrerer viruspartiklene i *P. polylepis* stammene, som runde små partikler, mens bakteriecellene er litt større og mere avlang i fasongen. Rådata over virustellingene finnes i appendiks E.

Tabell 7: Tabell over antall bakterier og virus i stamkulturene *Prymnesium polylepis* UIO036 og UIO037, i 2 ulike fortynninger 1:10 og 1:100 til totalt 5ml. Resultatene er basert på tellinger i 5 ulike synsfelt på 100x forstørrelse. Verdier er gitt i millioner pr ml.

<i>Prymnesium polylepis</i> UIO036	Bakterier	Virus	<i>Prymnesium polylepis</i> UIO037	Bakterier	Virus
1:10	0,1072	0,2288	1:10	0,0960	0,1168
1:100	0,2400	0,6480	1:100	0,1600	0,3360

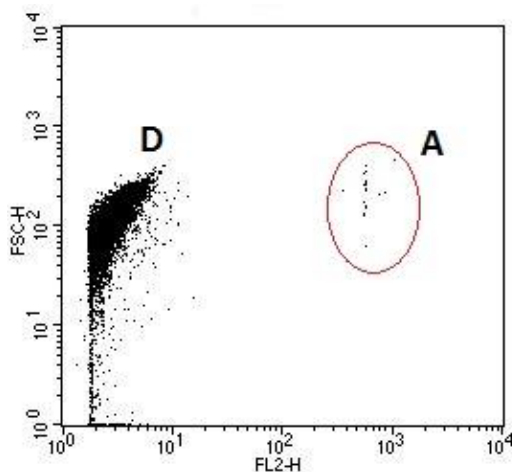


Figur 24: A) Virus fra stamkultur *Prymnesium polylepis* UIO036. B) Virus fra stamkultur *Prymnesium polylepis* UIO037. Rød pil indikerer bakterie. Hvit pil indikerer virus. (Skala=10 μ m). Virusfiltre er observert i epifluorescensmikroskop med blått eksitasjonslys på 100x objektiv. Bilder er tatt med et Nikon D5000 kamera.

3.5 Flow cytometri (FCM)

3.5.1 Isolering av cellekjerner

Før prøvene fra virusforsøk 2.0 og 2.1 skulle analyseres i flow cytometer for estimering av ploidinivå og celleantall, ble metoden og protokollen fra Marie et al. (2000) først testet ut på stamkulturer (Fig. 25). Kun et fåtall cellekjerner ble registrert hos *Prymnesium polylepis* UIO036 (Fig. 25), men det ble derimot registrert rikelige mengder debris (D). Tilsvarende resultat som i Fig. 25 var å finne hos resterende kulturer som ble testet (resultat ikke vist).



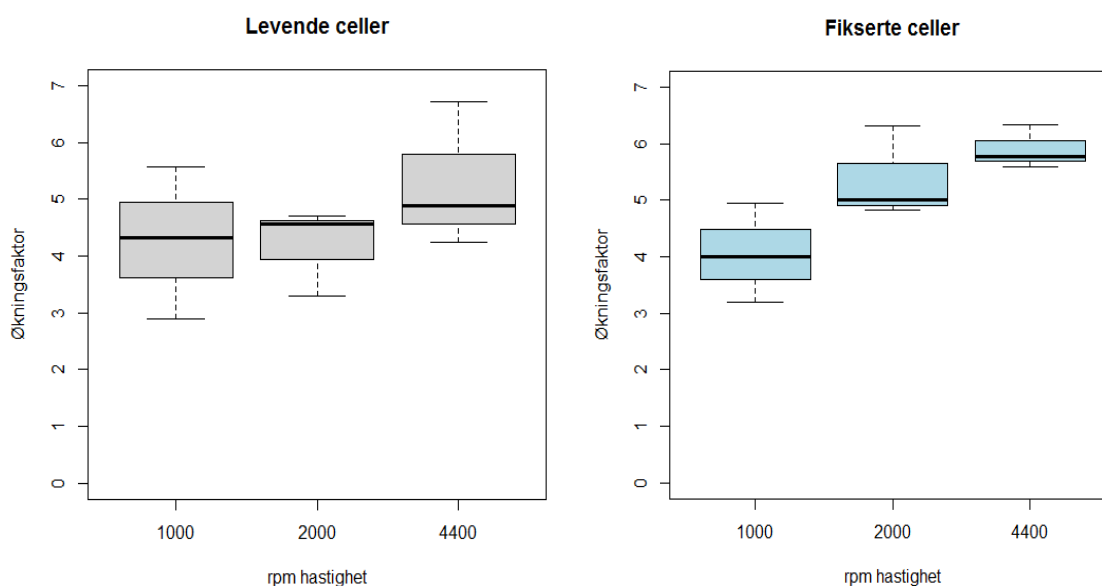
Figur 25: Flow cytometri måling av *Prymnesium polylepis* UIO036. Kulturen var i utgangspunktet tett nok, likevel ble det bare registrert et fåtall cellekjerner(A), men derimot rikelig mengder debris/rusk (D). Fluorescens (FL2-H) mot forward scatter (FSC-H) på log skala.

Basert på de dårlige resultatene var derfor ønskelig å forbedre protokollen og metoden. Det jeg ønsket å teste var om man kan oppkonsentrere celler (og cellekjerner) fra en prøve ved å sentrifugere på ulike hastigheter, og slik få registrert flere kjerner i flow cytometeret (se 3.5.2). Bruk av mindre mengder NIB buffer ble også testet ut for å se om dette kunne optimalisere utbyttet av cellekjerner (se 3.5.3).

3.5.2 Metodeutvikling sentrifugering – oppkonsentrering av celler

Det var ikke en signifikant forskjell i økningsfaktoren på ulike sentrifugeringshastigheter ved levende celler, dvs. utbyttet av celler ble ikke signifikant større ved å sentrifugere på en høyere hastighet ($P=0,24$). Det var derimot en signifikant forskjell i økningsfaktoren ved fikserte celler på ulike sentrifugeringshastigheter ($P<0,05$).

Uansett så kan det virke som sentrifugering er en god måte å oppkonsentrere celler på hvis prøven(e) ikke er så tett for å oppnå best mulig resultat fra flow cytometri målinger. Figur 26 viser økningsfaktoren for de ulike sentrifugeringshastighetene for levende og fikserte celler.

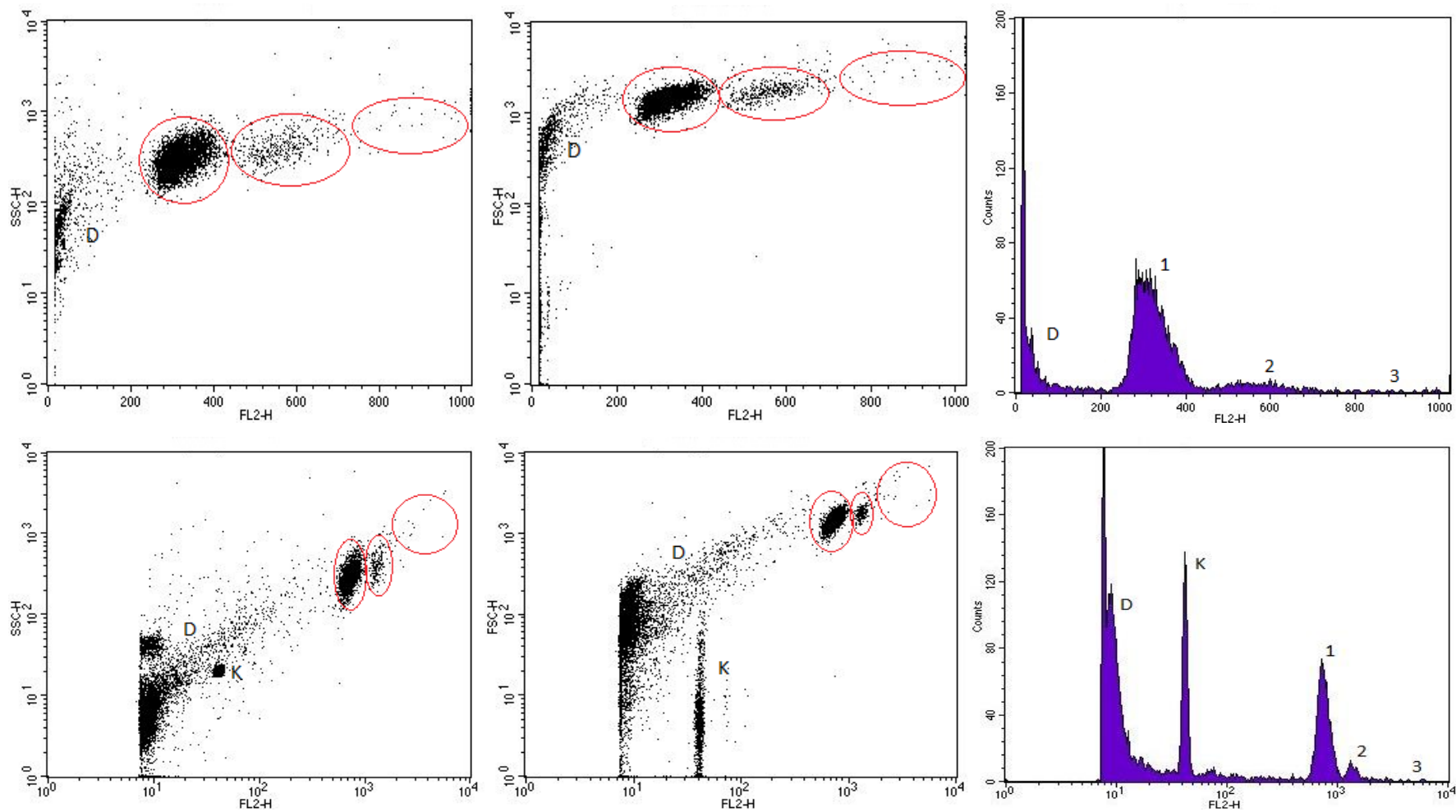


Figur 26: Bokplott over økningsfaktoren i antall celler (sluttkonsentrasjon/startkonsentrasjon) på ulike sentrifugeringshastigheter etter 15min, og mot levende og fikserte celler.

3.5.3 Metodeutvikling – lavere NIB konsentrasjon

Ved å senke NIB konsentrasjonen (3 deler prøve til 1 del NIB) så ble det oppnådd en bra flow cytometri analyse hos *Prymnesium polylepis* UIO037 (Fig. 27). Tilsvarende metode gav ikke samme resultat hos de resterende stammene som ble testet (resultat ikke vist), tendensen her var tilsvarende som i Fig. 25, med så å si ingen celler som ble detektert.

Det ble utført to målinger av *P. polylepis*; en på log skala og en på linær skala (Fig. 27). Lineær skala brukes for å se bedre sammenhengen mellom ulike ploidinivå, noe som ikke kan leses av like lett på log skala. Ettersom jeg kun fikk oppnådd analyse fra en av stammene, kan jeg ikke sammenligne ploidinivå med de andre stammene av *P. polylepis*. Det er derfor ikke mulig å si hvilket ploidinivå toppene i Fig. 27 har. Målingene/toppene som skiller seg ut er markert i Fig. 27 med røde ringer, og kalt for gate 1, 2, og 3. Medianverdiene for fluorescens og forward scatter for gate 1, 2 og 3 er gitt i Tabell F4 i appendiks F. Det kan virke som fluorescensen i gate 2 er ca. dobbelt så stor fluorescensen i gate 1.



Figur 27: Flow cytometri måling over *Prymnesium polylepis* UIO037. Øverste rad viser fluorescensmålinger på lineær skala. Nederste rad viser fluorescensmålinger på log skala. Til venstre er fluorescens plottet mot side scatter (SSC-H), i midten er fluorescens plottet mot forward scatter (FSC-H). Til høyre ser vi fordelingen av fluorescensmålinger. Gate 1, 2 og 3 markert med røde ringe. Disse gatene markerer 3 områder som skiller seg ut. På nederste rad er målingen kjørt med autofluorescerende kuler, som er markert med K. Nederst til venstre på hvert plott er det store mengder debris (D)

4. Diskusjon

4.1 Blandingsforsøk

Observasjoner rett etter blanding av *Prymnesium polylepis* kulturer gav ikke noe tegn på syngami. Hvis dette skulle vært synlig under mikroskopet, så måtte syngami ha skjedd hos et flertall av cellene. Da man kun ser på en brøkdel av cellene i prøven på et objektglass skal det gjøres litt til å observere syngami. I blandingskultur *P. polylepis* UIO036xUIO037 fant jeg etter ca. 10.min etter blanding, to celler som var koblet/festet til hverandre med en relativ tykk stilk (Fig. 10B og 10C). Om dette var noe koblingsorgan mellom to celler, eller rett og slett noe rusk i vannet som begge cellene ble festet til kan ikke vites. Ved å fokusere inn og ut på stilken, kan det ha virket som det lyste opp i midten av stilken. I motsetning til flageller og haptonema som bare er mørke når man fokuserer inn og ut. Blanding av kulturer på et senere tidspunkt gav ikke samme resultat.

En interessant observasjon av blandingskulturene var derimot at de klarte seg mye lengre i kultur før de falt sammen, i motsetning til de vanlige stamkulturene av *P. polylepis* (UIO036-UIO041) som pleier å bryte ned etter ca.10-14 dager. Noen av blandingskulturene hadde klart seg i samme rør i opptil 3mnd på 13°C klimarom uten å falle ned. Årsaken til dette kan ha vært at det har skjedd en genetisk utveksling mellom stammene som gjør dem bedre rustet. En annen mulig forklaring kan være at syngami har forekommet og gitt oppgav til diploide celler som har andre egenskaper enn de haploide cellene.

I blandingskulturene som hadde klart seg i månedsvis var det også en merkbar bakterievekst, men dette så ikke ut til å påvirke algene i stor grad. I et forsøk av Nygaard og Tobiesen (1993) ble det oppdaget at *P. polylepis* kan fortære bakterier, og at opptak av bakterier også økte under fosfor-mangel. Dette kan også muligens forklare hvorfor blandingskulturene holdt seg i live så lenge. Det kan ha oppstått næringsmangel i mediet etter en viss tid, og dermed har algene nyttiggjort seg av bakteriene som en alternativ fosforkilde.

En annen forklaring kan være at to ulike stammer klarer seg bedre sammen i kultur, ved at de ikke påvirker hverandre like mye. Ved et tilfelle ble også blandingskultur UIO036xUIO040 og UIO036xUIO041 målt ved CASY. Cellediameteren hos UIO036xUIO040 var høyere ($>11\mu\text{m}$) enn det jeg tidligere har observert når jeg har analysert *P. polylepis* i CASY ($7-10\mu\text{m}$). Dette var ca. 3 mnd etter at kulturene ble blandet. Den større cellediameteren kan tyde på at cellene er større, og derfor muligens diploide. Hvis de er diploide så har det skjedd en syngami i kulturene. Men dette burde bekreftes nærmere med analyser i flow cytometer.

4.2 Vekstforsøk

Jeg ønsket å teste om det var noen forskjell i vekstrate mellom de ulike stammene. Det var en signifikant forskjell i vekstrate mellom de ulike stammene i hvert forsøk. Dette kan bero på at enkelte av kulturene falt ned før forsøket var over, og dermed aldri fikk en eksponentiell vekst, slik at man kunne sammenligne en realistisk vekstrate.

Enkelte av kulturene vokste derimot ikke i det hele tatt gjennom forsøket/forsøkene, så dette kan mulig skyldes egenskaper til den enkelte stammen eller andre ytre faktorer (medie, lys, temperatur etc.) som har spilt inn. Det skal nevnes at inokulumet til vekstforsøk 1 ble startet med relativt gamle kulturer (ca. 2,5 uke gamle kulturer), så dette kan ha hatt en effekt på veksten til algene når de har blitt overført til nytt medium. I det første vekstforsøket ble det også brukt borosilikatglass med skrulokk, som kan ha vært skrudd litt for tett, slik at det ble dårlig gassutveksling i kulturene. I det andre vekstforsøket ble det brukt celledyrkningsflasker med ventilkork som skal ta hensyn til gassutveksling, og det er tydelig at noen av kulturene vokste bedre her. Inokulumet til vekstforsøk 2 ble startet med ca. 1,5 uke gamle kulturer, men likevel så falt enkelte av kulturene ned underveis i forsøket.

Det mest optimale hadde vært å kjøre vekstforsøk med flere ulike temperaturer og ulike lysforhold for å så sammenligne vekstraten til kulturene. Det eneste man kan si ved å kjøre vekstforsøk med kun en forklaringsvariabel (temperatur på 19°C og lysforhold på ca. $95\mu\text{mol fotoner m}^{-2}\text{s}^{-1}$) er at man kun ser hvilken/hvilke stammer som vokser best under disse forholdene. Det kan være at ved andre temperaturer eller andre lysforhold at andre

stammer igjen vokser bedre. Edvardsen (1992) gjennomførte også et vekstforsøk på *P. polylepis* og fant da vekstrater på oppmot 1,3 (k). I studien til Edvardsen (1992) vokste også typiske kulturer bedre ved >20°C i motsetning til avvikende kulturer, som kan forklare hvorfor inokulumet til *P. polylepis* UIO037 (som er den avvikende typen) ikke klarte å vokse opp i forkant på 19°C klimarommet.

4.3 Transmisjonselektronmikroskopi (TEM)

Observasjoner av de organiske skjellene til *Prymnesium polylepis* avdekket at det var UIO037 som består av den avvikende celletypen, og de resterende stammene er av den typiske celletypen. Dette står i stor kontrast til tidligere studier av Edvardsen og medarbeidere (Edvardsen & Medlin 1998; i Edvardsen et al. 2011) som har beskrevet UIO036-stammen som den avvikende celletypen og de andre stammene som typiske celletyper. Det har vært vist tidligere at en *P. polylepis* kultur kan endre celletype begge veier (Edvardsen & Paasche 1992), så om dette er forklaringen kan ikke vites 100%. En annen sannsynlig forklaring er at kulturene har blitt byttet om, ettersom flere analyser i elektronmikroskop alltid har gitt samme resultat, at UIO036 har kun hatt typiske skjell og UIO037 har kun hatt avvikende skjell. Stammen UIO037 (=B1511) er en klonkultur oppdrevet fra stammen B15 som i undersøkelsen til Edvardsen og Paasche (1992) bestod av både avvikende og typiske celler.

Hvis det skulle ha skjedd en endring i kulturene så skulle det kanskje ha vært mulig å finne begge skjelltyper i prøvene, slik som det ble funnet før det ble opprettet klonkulturer av *P. polylepis* (Edvardsen & Paasche 1992, Edvardsen & Vaultot 1996). Men igjen så har jeg kun undersøkt 8µl av en kultur (av totalt ca. 16ml), så det skal heller ikke utelukkes at prøvene kan inneholde andre typer skjell som ikke ble oppdaget.

4.4 Virusforsøk

I en studie av Brussaard et al. (1999) ble det oppdaget at rett før lysis av virusinfiserte *Phaeocystis pouchetii* celler sank den røde klorofyll autofluorescensen. Det samme gjaldt ikke for *Micromonas pusilla* celler, der sank den røde autofluorescensen først brått på slutten av forsøket. Noe som kunne antyde at fotosyntesen fortsatt var aktiv hos virusinfiserte *M. pusilla* celler. I en studie av Bratbak et al. (1998a) ble burst size for infiserte *P. pouchetii* celler lavere når algene ble dyrket i mørke sammenlignet med alger dyrket i lys. At virus fortsatt ble replikert inni verten under mørke forklarer de med at viruset ikke er så avhengig av vertens fotosyntese. Men her ser vi også at når algene ikke har det optimalt så går det også ut over burst sizen til virusene. Om de kloroplastparene jeg fant i mitt forsøk (Fig. 18B) som var mindre og dermed har mindre rød autofluorescens er *P. polylepis* celler, kan det tenkes at viruset/virusene som infiserer *P. polylepis* ikke er så avhengig av vertens fotosyntese.

Brussaard et al. (1999) målte rød autofluorescens til *P. pouchetii* og *M. pusilla* i flow cytometer, så om dette kan forklare mine funn i fluorescensmikroskopet kan ikke vites helt sikkert. Brussaard et al. (1999) mente også at økningen av celler i løpet av forsøket som hadde redusert fluorescens, skyldes lyserte algeceller.

Dette kan støtte mine funn da jeg ikke fant unormale/mindre kloroplastpar ved dag 0, og at de mindre kloroplastparene og de enslige kloroplastene som økte i antall underveis i forsøket var *P. polylepis* som har blitt lysert. Dette kan være en mulig forklaring da det var de mindre kloroplastparene og enslige kloroplastene (Fig. 18B nederst og Fig. 18D øverst) som dominerte og økte i prøvene ved dag 11 og 14/15 (bortsett fra *P. polylepis* UIO037 i virusforsøk 2.0 og UIO041 i virusforsøk 2.1).

Kontamineringen av andre typer alger med andre type kloroplaster (Fig. 16C og mulig Fig. 16D) var ikke dominerende i prøvene. Hvis de dukket opp på filteret så var det kun 1-2 av disse kloroplastene tilstede. Det skal dog ikke utelukkes at antallet av andre typer alger/kloroplaster kan ha vært høyere, men at jeg ikke har klart å skille dem fra *P. polylepis*.

Hvis de små kloroplastparene ikke tilhørte *P. polylepis*, men en annen alge, så har frekvensen av disse kloroplastene økt underveis i forsøket. Dette kan virke noe usannsynlig da prøvene er tilsatt viruskonsentrat fra havet, som skal inneholde mange ulike typer virus, og man ville derfor forvente at andre alger tilstede i prøven også skulle bli lysert.

Hvis det skulle tenke seg at de mindre kloroplastparene ikke tilhørte *P. polylepis*, så ville det i teorien ikke vært små kloroplastpar tilstede i virusforsøk 2.1. Virussupernatanten som ble tilført algekulturene i virusforsøk 2.1, er blitt sentrifugert ned for å bli kvitt alger og større partikler, slik at kun virusene ligger igjen på toppen av supernatanten. Da er det å forvente at virussupernatanten skal kun inneholde virus. Derimot så ble det oppdaget i kultur UIO038 i virusforsøk 2.1 små kloroplastpar, da er det rimelig å tro at disse småkloroplastparene faktisk tilhører *P. polylepis*. I kultur *P. polylepis* UIO041 i virusforsøk 2.1 ble det ikke funnet små kloroplastpar, men dog noen enslige kloroplastre. Denne stammen økte i løpet av forsøket til en cellekonsentrasjon på <1million, så i dette tilfellet er det rimelig å tro at algecellene har utviklet en resistens, og at man derfor ikke fant små kloroplastpar/lyserte celler her. Det ble heller ikke oppdaget tegn til kontaminering av andre typer kloroplaster (Fig. 18 C og 18D) i virusforsøk 2.1.

Det ble også funnet mengder av kloroplaster som var deformerte med utydelig form, og som samlet seg i store klumper (Fig. 18A). Dette kan være løse kloroplaster (eller kloroplaster fortsatt inne i celler) som har blitt lysert og senere har gått i oppløsning pga. den økte bakterieveksten. Jacobsen et al. (1996) så at bakterieveksten økte etter at *P. pouchetii* celler ble lysert, og bakteriene nyttiggjorde seg av det frigjorte organiske materialet. Jeg fant også store mengder bakterier på virusfilterene fra mitt forsøk. Disse ble derimot ikke telt, så ikke noe eksakt verdi kan oppgis. Det virket derimot som bakterieveksten var høyere ved dag 14/15 enn ved dag 0.

Bratbak et al. (1998b) fant også ut at næringsmangel, status på algecellene og lysmengde kan ha en effekt på «burst size», da virus er avhengig av vertens status og metabolisme for replikering. Lavere burst size var å finne hos kulturer i stasjonær fase (i.e. kulturer som ikke

vokser lengre), og i kulturer med næringsmangel (spesielt fosfor) og lysmangel sammenlignet med kulturer i eksponentiell fase, og kulturer som ble dyrket i næringsrikt medie og tilstrekkelig lys. Miljøfaktorer som lys, temperatur og næringsstoffer regulerer algevekst og dermed indirekte hvor godt og fort virus kan replikere seg i en vert. Da IMR ½ er et næringsrikt medium og *P. polylepis* ble dyrket samme lysforhold gjennom begge forsøkene er det ikke tenkelig at førstnevnte faktorer skulle ha noen effekt for mine virusforsøk.

Thyrhaug et al. (2003) gjorde virusforsøk på bl.a. *Emiliania huxleyi*, *Chrysochromulina ericina*, *Pyramimonas orientalis* og *Phaeocystis pouchetii*. De ble infisert med deres respektive virus (EhV-99B1, CeV-01B, PoV-01B og PpV-01) og alle kulturer ble lysert og nådde minimal algetetthet innen 1-2 uker. Sluttkonsentrasjonen av virus nådde 10^8 - 10^9 ml⁻¹. Etter denne perioden så var det i alle kulturer noen algeceller som ikke hadde blitt lysert og hadde klart seg, og som vokste eksponentielt før de nådde stasjonærfasen. Thyrhaug et al. (2003) tilsatte så virus fra de kulturene som hadde klart seg til nye friske algekulturer, og oppdaget at de nye algekulturene ble lysert innen 1 uke. Det interessante var derimot da de tilsatte nye virus til de algekulturene som hadde allerede klart seg gjennom en viruslysning, var at de kulturene ikke ble lysert. Virus konsentrasjonen økte relativt sakte i disse kulturene også. Thyrhaug et al. (2003) forklarte dette med at algecellene har en fenotypisk plastisitet og algecellene som hadde klart seg i første runde av viruslysning hadde utviklet en fenotypisk resistens til virusinfeksjon ettersom de ikke ble lysert i runde 2.

I mitt virusforsøk ble kun virus fra virusforsøk 2.0 tilsatt til virusforsøk 2.1 med nye friske algeceller. Jeg gjorde ikke noe eksperiment med eventuelle overlevende celler fra første virusforsøk og tilsatte virus på nytt til de overlevende cellene. Det jeg oppdaget i mitt forsøk var at virus av medium størrelse dominerte i virusforsøk 2.0, mens de var de store virusene som dominerte i antall i virusforsøk 2.1, dog i ulik grad mellom stammene. I virusforsøk 2.0 så var det en nedgang i cellekonsentrasjonen i alle stammene fra dag 11 til dag 15, unntatt UIO037 som er den avvikende cellypen. Likevel så kom ikke UIO037 stammen så høyt opp i celleantall, kun oppimot 90.000 celler ml⁻¹. Det som bruker å være vanlig for *P. polylepis* er å komme oppimot minimum 4-500.000 celler ml⁻¹ hvis de er i en god vekstperiode. I mine to

vekstforsøk (punkt 3.2) så hadde ikke UIO037 stammen så god vekstrate, så det kan tenkes at UIO037 hadde en relativ lav vekstrate i virusforsøkene uavhengig av viruspåvirkning. Sjøvann fra Solbergstrand kan ha en effekt på denne sensitive arten pga. slampartikler i vannet herfra, i forhold til sjøvann fra Drøbak (pers. med Sissel Brubak).

I lange perioder kan også alle *P. polylepis* stammene ha dårlig vekst, før de plutselig blomstrer opp og vokser fint ved hver overføring. Uavhengig av dette, så var *P. polylepis* UIO037 den eneste stammen som ikke sank i antall fra dag 11 til dag 15. Ser man også på virusøkningen, så var dette den stammen som hadde den laveste økningen i virus av mediumstørrelse (Tabell 6). Om UIO037 er fenotypisk annerledes (bortsett fra de organiske skjellene) som gjør at de blir mer resistent/mindre mottagelig for virus er ikke kjent. Andre alternativ kan være at de andre stammene vokste generelt dårlig uavhengig av viruspåvirkning, og dette gjenspeiler seg i resultatene (Fig. 20 og Fig. 21). Da de negative kontrollene uten virus vokste greit, så er derimot ikke dette en sannsynlig forklaring.

I virusforsøk 2.1 så var det de store virusene som dominerte, og her ser man at *P. polylepis* UIO041 kommer opp i celleantall på over 10^6 celler ml^{-1} ved dag 11, og likevel er det en økning i virus. En forklaring på dette kan være at de store virusene ikke er så lytiske og at algene frigjør virusene via «budding» og at algene sameksisterer bedre med denne type virus i motsetning til virus av medium størrelse.

En annen forklaring kan være at noen celler i UIO041- stammen utviklet underveis i forsøket en fenotypisk resistens som gjorde at cellene nådde en tetthet på over 1 million celler ml^{-1} samtidig som det var noen celler i denne kulturen som ikke hadde en slik fenotypisk resistens mot virus, og dermed ble lysert og replikerte virusene. Den andre stammen i virusforsøk 2.1, UIO038, har ca. samme vekstkurve som i virusforsøk 2.0. Virus økningen i UIO038 i virusforsøk 2.1 er mye mindre enn UIO041, men samtidig er algeveksten mye lavere i UIO038. Ser man derimot på antall store virus per celle på slutten av virusforsøk 2.1, så er det ca. 13 store virus pr levende algecelle i UIO038 kontra 4 virus per algecelle i UIO041.

En årsak som kan spille inn på virustellingen og dermed resultat var at det kunne komme utskilling av fargestoffer fra SYBR green som da bl.a. lyser opp filteret slik at det blir vanskeligere å se virusene, og disse utskillingene kan også dekke over virusene, slik at virusestimeringen blir feil. Dette kan dog reduseres ved å gå til et annet synsfelt og telle virus der. Brussard et al. (2007) nevner også at det ikke er antallet virus som har noe å si hvor vellykket algeceller blir lysert, men antallet infeksjøs virus.

Ser man på virusene som ble sett på i stamkulturene (punkt 3.4.7) så er dette også store virus. Ingen virus av mindre størrelse ble observert på filtrene fra kulturene som ble sett på. Da dette ble kun gjort som en kvalitativ og ikke en kvantitativ undersøkelse, skal det ikke utelukkes at det også kan finnes andre typer virus enn store i disse prøvene også, men at de ikke har blitt observert. Ettersom kun 5 synsfelt ble telt på hvert filter, så er det heller ingen sammenheng mellom 1:10 og 1:100 fortynningen, dette beror nok på telling av for lite utvalg.

Det ble kun sett på virus fra *P. polylepis* UIO036 og UIO037, da disse to stammene har vært de mest vanskelig å få god vekst på. Det skal ikke utelukkes at også de andre stammene har virus i stamkulturene, da også de kan ha dårlig vekst til tider. Det kan da virke som de store virusene sameksisterer med *P. polylepis*, og at den typiske vekstkurven til algene på 10-14 dager er et resultat av at cellene blir lysert og faller ned på dette tidspunkt. Og ikke pga. av næringsmangel som ikke er mulig å få på så kort tid, da IMR ½ er et næringsrikt algemedium. Andre svepeflagellater, f.eks. *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* og *Prymnesium parvum* derimot bruker å klare seg mye lengre enn 10-14 dager før de trenger ny overføring eller faller sammen (Observasjoner fra UIO algekultursamlingen).

Et resultat fra blandingsforsøket (punkt 3.1) var at blandingskulturene klarte seg mye lengre i kultur før de falt sammen, noen opptil flere måneder på 13°C rommet. Det kan være at i blandingskulturene så har det skjedd genetisk utveksling ved syngami slik at den genetiske variasjonen har blitt større, og at cellene er derfor bedre rustet mot bl.a. viruslysning. En annen forklaring, som nevnt tidligere, er at disse kulturene kan ha utviklet en fenotypisk resistens. Disse kulturene falt ned først etter mange måneder, og da var det også synlig

bakterievekst i mediet. Det kan være at det først oppstod næringsmangel på dette tidspunkt, og at eventuelle virus i mediet ikke hadde noe effekt på algemortalitet før den tid.

Sammenligner vi dette med virusforsøk 1 (punkt 3.4.1) så var det kun enkelte blandingskulturer som var i live etter 2 uker, resten av kulturene hadde ikke vokst opp i det hele tatt. Om det har skjedd lyseringer her, var ikke lett bedømme da det ble brukt kulturrør som er runde i bunnen. Dermed er det ikke like lett å «se» etter tegn på lysering her kontra flaskene i virusforsøk 2.0 og 2.1 som er flate i bunnen, hvor lyserte celler samler seg på bunnen som hvite/blanke prikker. I dette forsøket ble det ikke laget negative kontroller, så algemortaliteten kan også ha vært påvirket av andre ytre faktorer. At kun enkelte blandingskulturer var i live etter 2 uker med virus kan støtte opp hypotesen om at det kan ha skjedd genetisk utveksling som gjorde at disse cellene var bedre rustet mot bl.a. virusangrep.

Et annet eksempel på fenotypisk resistens finner vi også blant *Phaeocystis pouchetii* og *Phaeocystis globosa*. Denne arten har både encellede flagellater og kan danne kolonier (som ikke har flageller). Jacobsen et al. (1996) foreslo at slimlaget som omringer koloniene beskytter cellene i kolonien mot virusangrep. Det er ikke cellene i seg selv som er resistent, men slimlaget rundt kolonien som beskytter cellene fra virusangrep. Da celler som slippes ut fra kolonien kan bli infisert av virus. I et mesocosm eksperiment utført av Brussard et al. (2005) ble det konkludert med at kolonistadiet til *Phaeocystis globosa* faktisk er en mekanisme for å unnsnippe virus.

En ulempe med kolonistadiet kan være derimot at kolonier har lavere opptak av næringsstoffer og dermed muligens vil fortere oppleve næringsmangel enn enslige celler, som igjen kan påvirke veksten til kolonicellene (Ploug et al. 1999). Hamm et al. (1999) foreslår at den røffe hinnen rundt *Phaeocystis globosa* kolonier faktisk er en mekanisk beskyttelse mot bl.a. beiting, infeksjon av virus og andre patogener som gjør at cellene i kolonien ikke har så høy mortalitet og dermed er i stand til å danne masseoppblomstringer. Om celleklumpene jeg fant (punkt 3.4.5) faktisk er kolonier av *P. polylepis* er veldig usikkert da kapillærisolering av disse koloniene ikke var vellykket. Cellekoloniene var festet meget hardt til bunnen av brønnene med en relativt tykk stilk. Om kapillærisoleringen hadde vært

vellykket og det ble dannet nye *P. polylepis* celler av disse koloniene så hadde det vært mulig å si at også denne arten har et kolonistadie (muligens for å unnslippe virus). Det eneste man kan si sikkert er at cellene i kolonien ikke hadde (synlige) flageller noe som også for øvrig gjelder for kolonistadiet til *P. pouchetii*. Cellene beveget seg litt i kolonien, men ikke nevneverdig, de var også litt mindre i størrelse og litt mer firkantete i form enn ordinære *P. polylepis* celler. Om det ikke var *P. polylepis* som dannet disse koloniene, så kan det ha vært noen av algene fra kontamineringen. Uansett hvilken art som dannet koloniene, så må det ha vært en alge som mest sannsynlig lager disse koloniene for å unnslippe virus. Jo høyere viruskonsentrasjon i brønnene, jo mer kolonier var det i de respektive brønnene. Eneste måte å bekrefte dette på er å starte et nytt virusforsøk med *P. polylepis* og anskaffe et viruskonsentrat uten kontaminering, slik at man med 100% kan utelukke påvirkning av andre alger/protister.

Manton og Park (1962) fant ved et tilfelle et pseudofilament i en *Prymnesium polylepis* kultur, om dette kan være celleklumpene jeg fant i mine multibrønner kan jeg ikke si sikkert. Brussard et al. (2007) nevner også at noen virus kan være veldig stamme-spesifikk, slik at ikke alle virus vil lysere alle stammer innenfor en art, men bare noen. Det kan også være flere virus som lyserer samme stamme/art. Dette er også rimelig å anta for mine observasjoner, at *P. polylepis* har flere enn en type virus (jf. medium og store virus). Det er også mulig at *P. polylepis* UIO037 er mer resistent for de type virus som var i viruskonsentratet hentet fra Oslofjorden, men at denne stammen kan ha andre typer virus som ikke de andre stammene har, og som ikke var tilstede i viruskonsentratet.

Det er derfor vanskelig å si om *P. polylepis* UIO037 er mer eller mindre resistent. Det eneste man kan konkludere med at i dette forsøket så sank ikke cellekonsentrasjonen i UIO037, slik tendensen var hos de andre stammene. *Prymnesium polylepis* UIO041 vokste meget godt i virusforsøk 2.1., men nedgangen her ved dag 11 til dag 15 kan skyldes at kulturen var meget tett, og at tettheten og at selvskygging kan ha hatt en effekt på algemortaliteten i tillegg til viruspåvirkning).

I virusforsøket med agaroseskåler ble det bare funnet levende *P. polylepis* i en av de totalt 12 agaroseskålene. Kun i en av agaroseskålene vokste *P. polylepis* fint under hele forsøket. Algene i denne agaroseskålen klarte fint å svømme gjennom den relative tykke agarosegeléen. I de andre agaroseskålene ble det bare observert et fåtall algeceller. Det skal ikke utelukkes at det har vært celler som ikke har blitt observert, da det kan være vanskelig å fokusere med mikroskopet gjennom agarosen. Det ble også funnet noen celler liggende klumpvis, men jeg kunne ikke avgjøre om dette lignet på celleklumpene som ble observert i fortynningsforsøket.

En mulig årsak til at cellene ikke vokste i de andre agaroseskålene kan være at algecellene døde da de ble blandet med agarosen (1del agarose til 9 deler algekultur) som på det tidspunkt holdt en temperatur på ca. 50°C. Den varme temperaturen på agarosen kan ha hatt en effekt på de sensitive *P. polylepis* cellene. Det er dog vanskeligere å oppnå lavere temperatur på agarosen uten at den stivner før man har fått blandet det med algekulturen. Å dyrke *P. polylepis* med virus i agaroseskåler ser ikke ut til å være en effektiv metode. I så fall måtte man ha tatt i bruk en agarose med lavere «gelling point», som tillater en lavere temperatur på agarosen før den stivner.

4.5 Flow cytometri

Ettersom det kun var mulig å oppnå én flow cytometri måling av *P. polylepis* UIO037, er det ikke mulig å si med 100% sikkert hvilket ploidi-nivå gate 1,2 og 3 har i Fig.27. Dette var kun en test analyse, så det ble ikke brukt interne standarder, kun autofluoriserende kuler. Det er derimot to muligheter å tolke Fig. 27 på. Den ene muligheten er at alle celler har samme ploidinivå, enten haploid(n) eller diploid($2n$), og gate 1 viser celler i G1 fasen, gate 2 viser celler i G2 fasen og gate 3 er celler som har klumpet seg sammen, eller kommet samtidig gjennom væskestrømmen som belyses av laseren. Andre alternativ er at gate 1 er haploide (n) celler i G1 fasen, gate 2 er haploide(n) celler i G2 og diploide($2n$) celler i G1, gate 3 er diploide($2n$) celler i G2 fasen. Hvilke av disse tolkningene som er riktig er det ikke mulig å svare på når man ikke kan sammenligne med de andre *P. polylepis* stammene eller med en

intern standard slik at man får absolutte verdier og kan sammenligne med tidligere målinger av *P. polylepis* kjerner (Edwardsen & Vaultot 1996).

Noe av årsaken til at oppkonsentreringsfaktoren ved levende celler ikke er like høy som ved fikserte celler, kan være at mange av algecellene fortsatt var i live etter sentrifugering, og kunne dermed bevege seg i eppendorfrøret før man har fått tatt ut 90% av volumet, en annen årsak som også kan spille inn er at celler fiksert med glutaraldehyde veier mere, og dermed synker og blir spinnet ned lettere ved sentrifugering kontra levende celler. Det var derimot ikke en signifikant forskjell mellom økningsfaktoren på de ulike sentrifugeringshastighetene ved levende celler. Ved fikserte celler så ser vi at det var en signifikant forskjell i økningsfaktoren ved å sentrifugere på høyere hastighet. Det kan ha noe med at fikserte celler gjerne blir litt mer «sticky» pga den viskøse glutaraldehyden. Fikserte celler samlet seg gjerne langs kanten som en stripe i eppendorfrørene, og da hjelper det muligens å sentrifugere på høyere hastigheter for å få cellene ned i bunnen av eppendorfrøret.

Bruk av mindre mengder NIB konsentrasjon ved isolasjon av cellekjerner kunne vise seg å ha en positiv effekt. Kun ved èt tilfelle ble det oppnådd en vellykket flow analyse, dette var med en *P. polylepis* UIO037 kultur. Samme metode (1 del NIB + 2 deler prøve) ble også prøvd på de andre stammene, men uten samme resultat. Det kan virke som debriset vi får (Fig. 25) er ødelagte cellekjerner/og celler. NIB bufferen har den egenskap at den fjerner lipidmembraner, men det kan tenkes at ved for høy NIB konsentrasjon så skader den også membranen(e) rundt cellekjernen (pers med. Per Johan Færøvig). Det kan også tenkes at protokollen fra Marie et al. (2000) fungerer utmerket på mange andre typer alger, men ikke for denne arten, og at det dermed behøves å utvikle en protokoll som er mer egnet for *P. polylepis*.

4.6 Konklusjon

Formålet med denne oppgaven var å finne ut om det var noen forskjell i virusresistens mellom de ulike morfotypene til *Prymnesium polylepis*, og om det var noen forskjell i virussresistens mellom de ulike stammene, og om det var noen forskjell i vekstrate mellom stammene. Innledningsvis formulerte jeg fire spørsmål for å belyse disse problemstillingene, og disse er nå besvart etter beste evne.

Observasjoner fra virusforsøk 2.0 kan tyde på at det er forskjell i virussresistens mellom de to ulike celletypene, da den avvikende kulturen UIO037 ikke sank i cellekonsentrasjon i løpet av forsøket, mens de andre typiske kulturene sank i cellekonsentrasjon på slutten av forsøket. Observasjoner fra virusforsøk 2.1 kan tyde på at det er en forskjell i resistens mellom de andre typiske stammene, og at kanskje stammene underveis utviklet en resistens mot virus. En annen forklaring kan være at en kultur består av to morfotyper/genotyper, hvor den ene er resistent, noe som kan forklare at UIO041 i virusforsøk 2.1 kom opp i cellekonsentrasjon på <1 millioner ml^{-1} , men likevel så var det en økning i viruskonsentrasjon. Dette kan forklares med at de mottagelige cellene i kulturen ble lysert og dermed replikerte virusene i prøven.

Det ble ikke observert syngami etter å ha blandet ulike *Prymnesium polylepis* kulturer, men blandingskulturene holdt seg bedre i kultur under samme vekstbetingelser i motsetning til stamkulturene. Noe som kan tyde på at det har skjedd en genetisk utveksling.

Det fjerde spørsmålet gikk ut på om det var noen forskjell i vekstrate mellom *Prymnesium polylepis* stammene. Vekstforsøkene viste at vekstraten varierte noe mellom stammene, men at andre ytre faktorer kan også ha påvirket vekstraten negativt.

Referanseliste

- Bopp, L., Kohfeld, K. E., Le Quere, C., & Aumont, O. (2003). Dust impact on marine biota and atmospheric CO₂ during glacial periods. *Paleoceanography*, 18(2). doi: 10.1029/2002pa000810
- Bratbak, G., Jacobsen, A., & Heldal, M. (1998a). Viral lysis of *Phaeocystis pouchetii* and bacterial secondary production. *Aquatic Microbial Ecology*, 16(1), 11-16. doi: 10.3354/ame016011
- Bratbak, G., Jacobsen, A., Heldal, M., Nagasaki, K., & Thingstad, F. (1998b). Virus production in *Phaeocystis pouchetii* and its relation to host cell growth and nutrition. *Aquatic Microbial Ecology*, 16(1), 1-9. doi: 10.3354/ame016001
- Brussaard, C. P. D., Bratbak, G., Baudoux, A. C., & Ruardij, P. (2007). *Phaeocystis* and its interaction with viruses. *Biogeochemistry*, 83(1-3), 201-215. doi: 10.1007/s10533-007-9096-0
- Brussaard, C. P. D., Kuipers, B., & Veldhuis, M. J. W. (2005). A mesocosm study of *Phaeocystis globosa* population dynamics - 1. Regulatory role of viruses in bloom. *Harmful Algae*, 4(5), 859-874. doi: 10.1016/j.hal.2004.12.015
- Brussaard, C. P. D., Thyraug, R., Marie, D., & Bratbak, G. (1999). Flow cytometric analyses of viral infection in two marine phytoplankton species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology*, 35(5), 941-948. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3550941.x
- Carlsson, P., Graneli, E., & Olsson, P. (1990). *GRAZER ELIMINATION THROUGH POISONING - ONE OF THE MECHANISMS BEHIND CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS BLOOMS*. New York: Elsevier.
- Dahl, E., Lindahl, O., Paasche, E., & Thronsen, J. (1989). The *Chrysochromulina Polylepis* Bloom in Scandinavian Waters During Spring 1988 *Novel Phytoplankton Blooms* (pp. 383-405): Springer-Verlag.
- Derelle, E., Ferraz, C., Escande, M. L., Eychenie, S., Cooke, R., Piganeau, G., Grimsley, N. (2008). Life-Cycle and Genome of OtV5, a Large DNA Virus of the Pelagic Marine Unicellular Green Alga *Ostreococcus tauri*. *Plos One*, 3(5), 13. doi: 10.1371/journal.pone.0002250
- Dunigan, D. D., Fitzgerald, L. A., & Van Etten, J. L. (2006). Phycodnaviruses: A peek at genetic diversity. *Virus Research*, 117(1), 119-132. doi: 10.1016/j.virusres.2006.01.024
- Edvardsen, B. (1993). *TOXICITY OF CHRYSOCHROMULINA SPECIES (PRYMNESIOPHYCEAE) TO THE BRINE SHRIMP, ARTEMIA-SALINA* (Vol. 3). Amsterdam: Elsevier Science Publ B V.
- Edvardsen, B., & Medlin, L. (1998). Genetic analyses of authentic and alternate forms of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta). *Phycologia*, 37(4), 275-283. doi: 10.2216/i0031-8884-37-4-275.1
- Edvardsen, B., Moy, F., & Paasche, E. (1990). *HEMOLYTIC-ACTIVITY IN EXTRACTS OF CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS GROWN AT DIFFERENT LEVELS OF SELENITE AND PHOSPHATE*. New York: Elsevier.

- Edvardsen, B., & Paasche, E. (1992). 2 MOTILE STAGES OF *CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS* (PRYMNESIOPHYCEAE) - MORPHOLOGY, GROWTH, AND TOXICITY. *Journal of Phycology*, 28(1), 104-114. doi: 10.1111/j.0022-3646.1992.00104.x
- Edvardsen, B., & Paasche, E. (1998). Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium and Chrysochromulina*. *NATO ASI Series Series G Ecological Sciences*, 41, 193-208.
- Edvardsen, B., Throndsen, J., Paasche, E. (200). "A compedium for the course Harmful Algae, BIO 4381, University of Oslo", p. 1-26.
- Edvardsen, B., & Vault, D. (1996). Ploidy analysis of the two motile forms of *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology*, 32(1), 94-102. doi: 10.1111/j.0022-3646.1996.00094.x
- Eppley, R. W., Holmes, R. W., & Strickland, J. D. H. (1968). Sinking rates of marine phytoplankton measured with a fluorometer. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1((2)), 191-208.
- Frada, M., Probert, I., Allen, M. J., Wilson, W. H., & de Vargas, C. (2008). The "Cheshire Cat" escape strategy of the coccolithophore *Emiliania huxleyi* in response to viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15944-15949. doi: 10.1073/pnas.0807707105
- Fuhrman, J. A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, 399(6736), 541-548. doi: 10.1038/21119
- Graneli, E., Paasche, E., & Maestrini, S. Y. (1993). 3 YEARS AFTER THE *CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS* BLOOM IN SCANDINAVIAN WATERS IN 1988 - SOME CONCLUSIONS OF RECENT RESEARCH AND MONITORING (Vol. 3). Amsterdam: Elsevier Science Publ B V.
- Green, J. C., Perch-Nielsen, K., & Westbroek, P. (1989). Phylum *Prymnesiophyta*. In: L. Margulis (Ed.), *Handbook of protocista* (pp. 293-317). Boston, MA: Jones and Bartlett
- Green, J. C., & Hori, T. (1990). THE ARCHITECTURE OF THE FLAGELLAR APPARATUS OF *PRYMNESIUM-PATELLIFERA* (PRYMNESIOPHYTA). *Botanical Magazine-Tokyo*, 103(1070), 191-207. doi: 10.1007/bf02489625
- Hamm, C. E., Simson, D. A., Merkel, R., & Smetacek, V. (1999). Colonies of *Phaeocystis globosa* are protected by a thin but tough skin. *Marine Ecology Progress Series*, 187, 101-111. doi: 10.3354/meps187101
- Hibberd, D. J. (1980). Prymnesiophytes (=Haptophytes). *Developments in Marine Biology*, 2, 273-317.
- Hori, T., & Green, J. C. (1991). THE ULTRASTRUCTURE OF THE FLAGELLAR ROOT-SYSTEM OF *ISOCHRYSIS-GALBANA* (PRYMNESIOPHYTA). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 71(1), 137-152.
- Jacobsen, A., Bratbak, G., & Heldal, M. (1996). Isolation and characterization of a virus infecting *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology*, 32(6), 923-927. doi: 10.1111/j.0022-3646.1996.00923.x

- Kawachi, M., Inouye, I., Maeda, O., & Chihara, M. (1991). THE HAPTONEMA AS A FOOD-CAPTURING DEVICE - OBSERVATIONS ON *CHRYSOCHROMULINA-HIRTA* (PRYMNESIOPHYCEAE). *Phycologia*, 30(6), 563-573. doi: 10.2216/i0031-8884-30-6-563.1
- Lackey, J. B. (1939). Notes on plankton flagellates from the Scioto River (with descriptions of new forms). *Lloydia Cincinnati*, 2, pp. 128-143.
- Leadbeat.Bs. (1971). OBSERVATIONS BY MEANS OF CINE PHOTOGRAPHY ON BEHAVIOUR OF HAPTONEMA IN PLANKTON FLAGELLATES OF CLASS HAPTOPHYCEAE. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 51(1), 207-&.
- Malin, G., Turner, S. M., Liss, P. S., & Aiken. (1992). SULFUR - THE PLANKTON CLIMATE CONNECTION. *Journal of Phycology*, 28(5), 590-597. doi: 10.1111/j.0022-3646.1992.00590.x
- Manton, I. (1967). FURTHER OBSERVATIONS ON FINE STRUCTURE OF *CHRYSOCHROMULINA CHITON* WITH SPECIAL REFERENCE TO HAPTONEMA PECULIAR GOLGI STRUCTURE AND SCALE PRODUCTION. *Journal of Cell Science*, 2(2), 265-&.
- Manton, I., & Leadbeater, B. S. C. (1974). FINE STRUCTURAL OBSERVATIONS ON 6 SPECIES OF *CHRYSOCHROMULINA* FROM WILD DANISH MARINE NANNO PLANKTON INCLUDING A DESCRIPTION OF *CHRYSOCHROMULINA-CAMPANULIFERA* NEW-SPECIES AND A PRELIMINARY SUMMARY OF THE NANNO PLANKTON AS A WHOLE. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter*, 20(5), 1-25.
- Manton, I., & Parke, M. (1962). PRELIMINARY OBSERVATIONS ON SCALES AND THEIR MODE OF ORIGIN IN *CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS* SP NOV. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 42(3), 565-&.
- Marie, D., Simon, N., Guillou, L., Partensky, F., & Vaultot, D. (2000). DNA/RNA Analysis of Phytoplankton by Flow Cytometry *Current Protocols in Cytometry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Noble, R. T., & Fuhrman, J. A. (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 14(2), 113-118. doi: 10.3354/ame014113
- Nygaard, K., & Tobiesen, A. (1993). BACTERIVORY IN ALGAE - A SURVIVAL STRATEGY DURING NUTRIENT LIMITATION. *Limnology and Oceanography*, 38(2), 273-279.
- Paasche, E., Edvardsen, B., & Eikrem, W. (1990). A POSSIBLE ALTERNATE STAGE IN THE LIFE CYCLE OF *CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS* MANTON ET PARKE PRYMNESIOPHYCEAE *Geissler, U., Et Al.* (pp. 91-100).
- Parke, M., Manton, I., & Clarke, B. (1955). STUDIES ON MARINE FLAGELLATES .2. 3 NEW SPECIES OF *CHRYSOCHROMULINA*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 34(3), 579-&.
- Parke, M., Manton, I., & Clarke, B. (1956). STUDIES ON MARINE FLAGELLATES .3. 3 FURTHER SPECIES OF *CHRYSOCHROMULINA*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 35(2), 387-&.

- Parke, M., Manton, I., & Clarke, B. (1958). STUDIES ON MARINE FLAGELLATES .4. MORPHOLOGY AND MICROANATOMY OF A NEW SPECIES OF *CHRYSOCHROMULINA*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37(1), 209-&.
- Ploug, H., Stolte, W., Epping, E. H. G., & Jorgensen, B. B. (1999). Diffusive boundary layers, photosynthesis, and respiration of the colony-forming plankton algae, *Phaeocystis* sp. *Limnology and Oceanography*, 44(8), 1949-1958.
- Rohwer, F., & Thurber, R. V. (2009). Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, 459(7244), 207-212. doi: 10.1038/nature08060
- Rowe, J. M., Fabre, M. F., Gobena, D., Wilson, W. H., & Wilhelm, S. W. (2011). Application of the major capsid protein as a marker of the phylogenetic diversity of *Emiliana huxleyi* viruses. *Fems Microbiology Ecology*, 76(2), 373-380. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01055.x
- Sandaa, R. A., Heldal, M., Castberg, T., Thyraug, R., & Bratbak, G. (2001). Isolation and characterization of two viruses with large genome size infecting *Chrysochromulina ericina* (Prymnesiophyceae) and *Pyramimonas orientalis* (Prasinophyceae). *Virology*, 290(2), 272-280. doi: 10.1006/viro.2001.1161
- Schroeder, D. C., Oke, J., Hall, M., Malin, G., & Wilson, W. H. (2003). Virus succession observed during an *Emiliana huxleyi* bloom. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2484-2490. doi: 10.1128/aem.69.5.2484-2490.2003
- Skjoldal, H. R., & Dundas, I. (1991). The *Chrysochromulina polylepis* bloom in the Skagerrak and the Kattegat in May-June 1988: environmental conditions, possible causes, and effects. Report of the ICES Workshop on the *Chrysochromulina polylepis* bloom in the Skagerrak and Kattegat in May-June 1988, Bergen, 28 February - 2 March 1989. *International Council for the Exploration of the Sea Cooperative Research Report*, ii-iv, 1-59.
- Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), 356-361. doi: 10.1038/nature04160
- Thyraug, R., Larsen, A., Thingstad, T. F., & Bratbak, G. (2003). Stable coexistence in marine algal host-virus systems. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 27-35. doi: 10.3354/meps254027
- Tobiesen, A. (1991). GROWTH-RATES OF HETEROPHYTES-MARINA (HELIOZOA) ON *CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS* (PRYMNESIOPHYCEAE). *Ophelia*, 33(3), 205-212.
- Underdal, B., Skulberg, O. M., Dahl, E., & Aune, T. (1989). DISASTROUS BLOOM OF *CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS* (PRYMNESIOPHYCEAE) IN NORWEGIAN COASTAL WATERS 1988 - MORTALITY IN MARINE BIOTA. *Ambio*, 18(5), 265-270.
- Van Etten, J. L. (2011). Another Really, Really Big Virus. *Viruses-Basel*, 3(1), 32-46. doi: 10.3390/v3010032
- Van Etten, J. L., Graves, M. V., Muller, D. G., Boland, W., & Delaroque, N. (2002). *Phycodnaviridae* - large DNA algal viruses. *Archives of Virology*, 147(8), 1479-1516. doi: 10.1007/s00705-002-0822-6
- Yasumoto, T., Underdal, B., Aune, T., Hormazabal, V., Skulberg, O. M., & Oshima, Y. (1990). *SCREENING FOR HEMOLYTIC AND ICHTHYOTOXIC COMPONENTS OF CHRYSOCHROMULINA-POLYLEPIS AND GYRODINIUM-AUREOLUM FROM NORWEGIAN COASTAL WATERS*. New York: Elsevier.

Appendiks A: IMR ½ og saltholdighet

Tabell A1: Oppskrift på algemediumet IMR ½.

Navn	Kjemikalie	Mengde per 1L
Sjøvann		X mL avhengig av ‰
MilliQ eller dH ₂ O		X mL (til 1L)
Nitrat stamløsning	KNO ₃	0,5 mL
Fosfat stamløsning	KH ₂ PO ₄	0,5 mL
Spormetallløsning	TM lsg pH 7,9	0,5 mL
Vitamin løsning		0,5 mL
Selenittløsning	lsg 10 ⁻⁵ M	1 mL

Tabell A2: Utregning over promille (PSU) i forhold til mengde sjøvann.

Promille	Prosent Sjøvann
~ 30 ‰	90 %
~ 25 ‰	75 %
~ 22 ‰	70 %
~ 10 ‰	25 %

Appendiks B: Skjellmålinger fra TEM-bilder

Tabell B1: Rådata over skjellmålinger basert på de TEM-bildene jeg tok. Antall målinger (=n) er oppgitt under hver kategori.

Prymnesium polylepis UIO036

lite	lite forts.	stort	avlangt	snegle
0,85x0,66	0,77x0,62	1,29x0,96	1,03x0,62	2,22x0,62
0,75x0,6	0,64x0,55	1,24x0,8	1,16x0,58	1,71x0,64
0,80x0,58	0,79x0,94	0,93x0,93	1,12x0,45	2,13x0,68
0,77x0,64	0,76x0,56	1x1,08	1,11x0,45	2,13x0,68
0,75x0,55	0,68x0,72	1,2x1,04	1,06x0,59	n=4
0,72x0,59	0,64x0,56	1,12x0,88	1,12x0,48	
0,75x0,59	0,76x0,52	0,8x0,88	1,02x0,61	
0,75x0,55	0,64x0,58	0,8x0,84	n=7	
0,53x0,73	0,85x0,61	1,27x0,89		
n=18		1,10x0,96		
		1,17x0,89		
		1,31x0,89		
		1,31x0,89		
		1,23x0,94		
		n=14		

Prymnesium Polylepis UIO037

lite	lite forts.	stort	stort forts.	spisst
0,78x0,78	0,59x0,71	1,91x1,21	1,90x1,30	1,75x1,5
0,78x0,69	0,77x0,59	2x1,47	1,90x1,30	*1,70x1,55
0,69x0,69	0,71x0,59	2x1,3	1,7x1,22	n=2
0,78x0,69	0,77x0,59	2x1,39	1,74x1,38	
0,74x0,61	0,47x0,47	2,20x1,28	2,09x1,45	
0,82x0,61	0,59x0,71	1,08x1,76	1,45x1,7	
0,74x0,66	0,59x0,71	1,78x1,3	2,03*1,31	
0,72x0,58	0,47x0,59	1,9x1,3	1,86*1,24	
0,71x0,71	0,83x0,59	1,78x1,3	1,96x1,44	
0,71x0,71	0,74x0,64	2,02x1,30	2x1,37	
0,59x0,71	0,55x0,77	2,02x1,19	1,96x1,30	
0,77x0,71	0,80x0,65	1,9x1,3	2,14x1,25	
0,77x0,71	0,72x0,81	2,02x1,30	1,90x1,30	
0,47x0,53	0,5x0,42	1,78x1,19		
0,59x0,71	0,52x0,44	n= 27		
0,59x0,71	0,82x0,68			
0,59x0,71	0,75x0,75			
0,55x0,44	0,79x0,68			
n=37	0,75x0,68			

Tabell B1 fortsettelse: Rådata over skjellmålinger basert på de TEM-bildene jeg tok. Antall målinger (=n) er oppgitt under hver kategori.

Prymnesium polylepis UIO038

lite	stort				lite	stort	avlangt
0,73x0,55	1,08x0,94				0,82x0,48	1,17x0,88	1,17x0,48
n=1	n=1				0,79x0,48	n=1	1x0,58
					0,79x0,48		n=2
					0,5x0,73		
					0,79x0,52		
					n=5		

Prymnesium polylepis UIO039

Prymnesium polylepis UIO040

lite	stort	avlangt		lite	avlangt
0,8x0,56	1,24x0,96	1,12x0,6		0,72x0,54	1,09x0,54
0,75x0,51	1,28x0,96	0,48x1,03		0,72x0,54	1x0,54
0,68x0,55	1,3x1,03	0,48x1,10		0,81x0,54	n=2
0,75x0,48	1,37x0,96	0,48x1,10		n=3	
0,75x0,55	1,3x0,96	n=4			
n=5	n=5				

Prymnesium polylepis UIO041

Prymnesium polylepis UIO036xUIO040

stort	avlangt	snegle	lite		stort	avlangt	snegle
1,02x0,92	0,97x0,43	2,25x0,61	0,77x0,54		1,36x0,90	1,04x0,45	1,64*
1,18x0,92	n=1	2,3x0,61	0,81x0,54		1,45x0,90	0,97x0,46	n=1
1,2x0,77		n=2	0,81x0,54		1,17x0,92	n=2	
1,23x0,92			0,72x0,5		0,88x1,28		
1,28x0,87			0,81x0,59		n=4		
1,17x0,82			0,81x0,54				
1,17x0,84			0,81x0,45				
1,17x0,92			0,76x0,51				
1,17x0,87			0,87x0,51				
1,33x0,87			0,84x0,58				
n=10			0,76x0,52				
			0,69x0,52				
			0,73x0,61				
			0,76x0,52				
			n=14				

Prymnesium polylepis UIO036xUIO041

Appendiks C: Vekstforsøksdata

Tabell C1: Rådata av casymålinger fra vekstforsøk 1. Tall omgjort til celler pr ml. Ved dag 0 ble alle stammer startet med et inokulum på ~2000 celler pr ml.

Vekstforsøk 1

Dag	36-1	36-2	36-3	37-1	37-2	37-3	38-1	38-2	
1	4154	5034	4760	3958	4828	2690	5394	6270	
2	4042	5226	5546	1522	3602	3296	3780	5168	
3	3578	7682	7225	2428	3442	3666	3046	4144	
4	3976	10698	11282	1904	2666	3126	5865	11590	
5	5195	14285	13363	2080	1980	3306	6620	12055	
6	3690	7555	7870	2028	1948	3314	7770	13420	
7	4175	13205	12775	3550	2920	3745	13560	21280	
8	NA	NA	NA	1675	1590	1705	7900	15580	
9	NA	NA	NA	1605	960	1910	5580	12000	
Vekstforsøk 1 forts.									
Dag	39-1	39-2	39-3	40-1	40-2	40-3	41-1	41-2	41-3
1	4134	3458	3492	3796	3864	3774	4006	3942	3534
2	4274	4542	3656	9165	8500	3614	3354	4466	2694
3	5568	5150	5972	11230	8330	10460	4912	5068	4368
4	5610	5546	5802	10930	10630	17420	5618	5126	4730
5	6325	6385	6095	13840	18220	21940	6275	5755	5430
6	6285	5650	5535	28480	20400	44940	4195	6180	4910
7	4710	4855	10550	11620	15320	67900	5320	4330	3530
8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Tabell C2: Rådata av casymålinger fra vekstforsøk 2. Tall omgjort til celler pr ml. Ved dag 0 ble alle stammer startet med et inokulum på ~2000 celler pr ml.

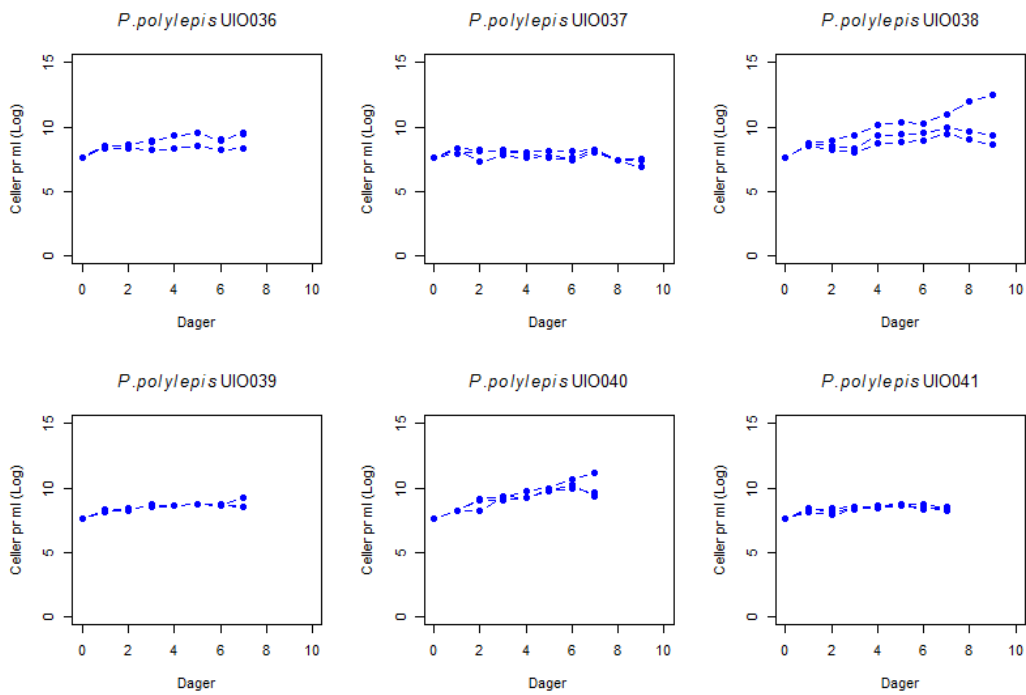
Vekstforsøk 2

Dag	36-1	36-2	36-3	38-1	38-2	38-3
1	5742	5262	9566	11890	5164	4688
2	10170	7594	7624	21468	14326	12246
3	17530	12308	15286	30064	27228	21588
4	10404	15252	18824	35024	37844	29980
5	NA	NA	NA	66670	64010	69520
6	116550	68140	71520	124390	152510	137010
7	NA	188971	182034	317244	364538	318655
8	697700	628100	650400	946400	1027200	1001100
9	1100500	787600	828600	1285800	1455200	1274400
10	1190600	821800	784800	1466000	1510000	1326000

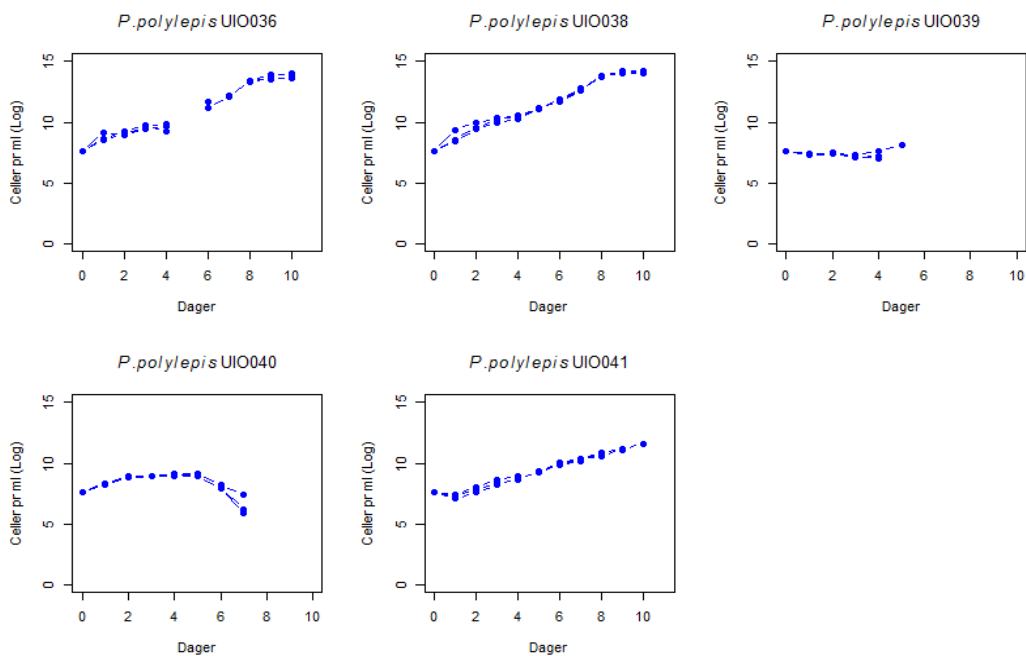
Vekstforsøk 2 forts.

Vekstforsøk 2									
Dag	39-1	39-2	39-3	40-1	40-2	40-3	41-1	41-2	41-3
1	1502	1642	1432	4222	3890	4030	1662	1144	1526
2	1790	1610	1570	6804	7876	6620	3190	1922	2484
3	1448	1334	1240	7684	7806	7596	5758	3650	4202
4	1940	1116	778	8336	9054	7392	7348	5922	5908
5	2872	NA	NA	9416	7722	7812	NA	10594	10812
6	NA	NA	NA	3748	2804	2776	20668	19284	23028
7	NA	NA	NA	1634	512	354	30408	30612	32500
8	NA	NA	NA	NA	Na	Na	40844	51004	48988
9	NA	NA	NA	NA	Na	Na	70220	74480	65240
10	NA	NA	NA	NA	Na	Na	112540	104840	113080

Log grafer over vekstforsøk 1 og 2. (naturlige logaritmen)



Figur C1: Log grafer over *P. polylepis* stammene i vekstforsøk 1. Celler pr ml.3 replikater per stamme.



Figur C2: Log grafer over *P. polylepis* stammene i vekstforsøk 2. Celler pr ml.3 replikater per stamme

Tabell C3: Anovatabell for vekstforsøk 1. K (vekstraten) ~ stamme

```
> summary(m1)

Call:
lm(formula = k ~ stamme, data = subset(test, forsøk == "1"))

Residuals:
    1          2          3          4 
-6.535e-17  6.535e-17  6.163e-33  1.541e-32

Coefficients:
            Estimate Std. Error  t value Pr(>|t|)
(Intercept)  5.600e-01  6.535e-17  8.570e+15 < 2e-16 ***
stammeUIO038  2.700e-01  1.132e-16  2.385e+15  2.67e-16 ***
stammeUIO040  2.600e-01  1.132e-16  2.297e+15  2.77e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 9.241e-17 on 1 degrees of freedom
Multiple R-squared:  1, Adjusted R-squared:  1
F-statistic: 4.114e+30 on 2 and 1 DF, p-value: 3.486e-16

> anova(m1)
Analysis of Variance Table

Response: k
      Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
stamme  2 0.070275 0.035137 4.1142e+30 3.486e-16 ***
Residuals 1 0.000000 0.000000
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
..
```

Tabell C4: Rådata av k – vekstraten for de stammene/replikatene som ble målt i vekstforsøk 1 og 2.

stamme	replikat	forsøk	k	Ved dag
UIO036	2	1	0,56	0 -4
UIO036	3	1	0,56	0 -4
UIO038	3	1	0,83	0 -4
UIO040	3	1	0,82	2 -6
UIO036	1	2	1,22	0 -3
UIO036	2	2	0,84	0 -3
UIO036	3	2	0,85	0 -3
UIO038	1	2	1,17	4 -8
UIO038	2	2	1,18	4 -8
UIO038	3	2	1,23	4 -8
UIO040	2	2	0,99	0 -2
UIO040	3	2	0,86	0 -2
UIO041	1	2	0,75	1 -4
UIO041	2	2	0,8	1 -6
UIO041	3	2	0,76	1 -6

Tabell C5: Anovatabell for vekstforsøk 2. K (vekstraten) ~ stamme

```

> m2<-lm(k~stamme, data=subset(test,forsøk == "2"))
> summary(m2)

Call:
lm(formula = k ~ stamme, data = subset(test, forsøk == "2"))

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.13000 -0.04417 -0.01333  0.03333  0.25000

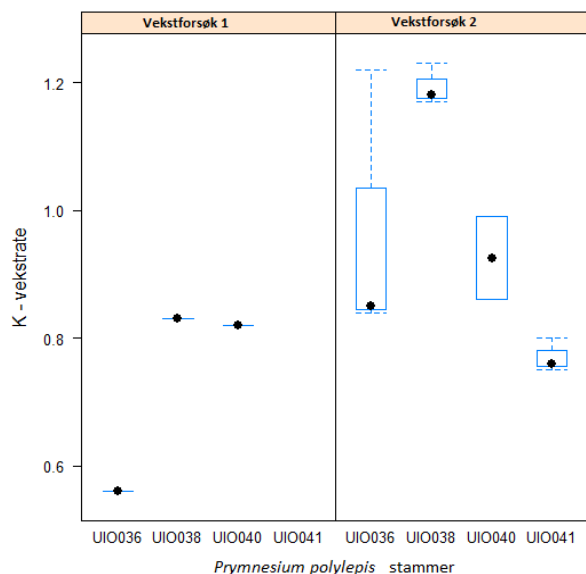
Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  0.97000    0.07095  13.671 2.64e-06 ***
stammeUIO038  0.22333    0.10034   2.226  0.0614 .
stammeUIO040 -0.04500    0.11218  -0.401  0.7003
stammeUIO041 -0.20000    0.10034  -1.993  0.0865 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1229 on 7 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.7213,    Adjusted R-squared:  0.6019
F-statistic:  6.04 on 3 and 7 DF,  p-value: 0.02353

> anova(m2)
Analysis of Variance Table

Response: k
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
stamme  3  0.27365  0.091216   6.0398 0.02353 *
Residuals 7  0.10572  0.015102
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```



Figur C3: Bokspolott over vekstraten K for henholdsvis vekstforsøk 1 og 2 for de enkelte stammene som ble målt (se tabell C4).

Anovatabell for vekstraten k for begge vekstforsøkene samlet (k~stamme*forsøk)

```
Call:
lm(formula = k ~ stamme * forsøk, data = test)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-0.13000 -0.02167  0.00000  0.01500  0.25000

Coefficients: (1 not defined because of singularities)
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.15000    0.17560    0.854  0.4178
stammeUIO038    0.31667    0.29681    1.067  0.3172
stammeUIO040    0.56500    0.30050    1.880  0.0969 .
stammeUIO041   -0.20000    0.09386   -2.131  0.0657 .
forsøk          0.41000    0.10494    3.907  0.0045 **
stammeUIO038:forsøk -0.04667    0.16921   -0.276  0.7897
stammeUIO040:forsøk -0.30500    0.17560   -1.737  0.1206
stammeUIO041:forsøk      NA          NA      NA      NA
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.115 on 8 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8428,    Adjusted R-squared:  0.7249
F-statistic: 7.149 on 6 and 8 DF,  p-value: 0.007004
```

```
> anova(m3)
```

Analysis of Variance Table

Response: k

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
stamme	3	0.258778	0.086259	6.5276	0.015254 *
forsøk	1	0.266136	0.266136	20.1396	0.002035 **
stamme:forsøk	2	0.041942	0.020971	1.5870	0.262748
Residuals	8	0.105717	0.013215		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anovatabell for vekstraten til UIO036 i begge forsøkene (k~forsøk, data=UIO036)

```
Call:
lm(formula = k ~ as.factor(forsøk), data = c)

Residuals:
    1      2      5      6      7 
1.905e-17 -8.940e-18  2.500e-01 -1.300e-01 -1.200e-01

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.5600     0.1250   4.479  0.0208 *
as.factor(forsøk)2  0.4100     0.1614   2.540  0.0847 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.1768 on 3 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.6826,    Adjusted R-squared:  0.5768 
F-statistic: 6.452 on 1 and 3 DF,  p-value: 0.08468

> anova(mc)
Analysis of Variance Table

Response: k
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
as.factor(forsøk) 1 0.20172 0.201720  6.4516 0.08468 .
Residuals        3 0.09380 0.031267
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Anovatabell for vekstraten til UIO038 i begge forsøkene (k~forsøk, data=UIO038)

```

Call:
lm(formula = k ~ as.factor(forsøk), data = d)

Residuals:
      3      8      9     10
-1.735e-18 -2.333e-02 -1.333e-02  3.667e-02

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.83000    0.03215   25.820  0.0015 **
as.factor(forsøk)2  0.36333    0.03712    9.788  0.0103 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.03215 on 2 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9796,    Adjusted R-squared:  0.9693
F-statistic: 95.81 on 1 and 2 DF,  p-value: 0.01028

```

```

> anova(md)
Analysis of Variance Table

Response: k
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
as.factor(forsøk) 1 0.099008 0.099008  95.814 0.01028 *
Residuals        2 0.002067 0.001033
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Anovatabell for vekstraten til UIO040 i begge forsøkene (k~forsøk, data=UIO040)

```

Call:
lm(formula = k ~ as.factor(forsøk), data = e)

Residuals:
      4     11     12
 0.000  0.065 -0.065

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    0.82000    0.09192    8.920  0.0711 .
as.factor(forsøk)2  0.10500    0.11258    0.933  0.5222
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.09192 on 1 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.4652,    Adjusted R-squared:  -0.06962
F-statistic: 0.8698 on 1 and 1 DF,  p-value: 0.5222

```

```

> anova(me)
Analysis of Variance Table

Response: k
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
as.factor(forsøk) 1 0.00735 0.00735  0.8698 0.5222
Residuals        1 0.00845 0.00845

```

Appendiks D: Algetelling

Algetelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1. Hel= Hele kloroplastpar til *Prymnesium polylepis*. Halv= enslige kloroplastre. Lite par= Små kloroplastpar. FOV= antall synsfelt telt. Omgjort til celler/kloroplastpar pr ml ved formelen: (antall partikler telt/antall synsfelt/ volum prøve) * (antall synsfelt på x forstørrelse)

Virusforsøk 2.0	Stamme	UIO036				Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Omgjort til pr ml		
			Hel	Halv	Lite par				Hel	Halv	Lite par
	Dag	0	207	-	-	-	0,5ml	45	16137		
		7	242	379	-	-	0,5ml	34	24969	39104	
		11	205	259	72	-	0,25ml	20	71914	90857	25258
		14	94	334		107	1ml	40	4122	14646	
									Omgjort til pr ml		
	Stamme	UIO037	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv	Lite par
	Dag	0	365	-	-	-	1ml	92	6959		
		7	221	219	28	-	0,5ml	56	13844	13719	1754
	Måling 1	11	48	205	101	-	0,25ml	31	10863	35918	22859
	Måling 2	11	365	-	-	-	0,25ml	42	60972		
		14	617	-	-	-	0,5ml	24	90185		
									Omgjort til pr ml		
	Stamme	UIO038	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv	Lite par
	Dag	0	335	-	-	-	1ml	69	8516		
		7	262	131	13	-	0,5ml	25	36764	18382	1824
		11	275	244	24	-	0,25ml	21	91876	81519	8018
		14	454	*	*	*	0,5ml	25	75840		

Virusforsøk 2.0 forts.	Stamme	Omgjort til pr ml								
		UO039	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv
Dag	0	242	-	-	-	1ml	109	3894		
	7	203	66			0,25ml	81	17583	5717	
1måling	11	22	316	66		0,1ml	33	11693	167959	35080
2måling	11	161	*	*		0,5ml	113	4998		
	14	203	169	67	12	1ml	61	5837	4859	1927
								Omgjort til pr ml		
Stamme	UO040	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv	Lite par
Dag	0	336	-	-	-	1ml	108	5457		
	7	293	*	*	-	1ml	33	15573		
	11	27	209	74		0,25ml	11	17221	133304	47199
	14	13	*	*			32	1187		
								Omgjort til pr ml		
Stamme	UO041	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv	Lite par
Dag	0	392	-	-	-	1ml	49	14032		
1måling	7	285	75	10	-	0,5ml	73	13696	3604	481
2måling	7	303	116	27	-	1ml	23	23107	8846	2059
1måling	11	117	247	91	-	0,7ml	12	24430	51576	19002
2måling	11	212	306	232	-	1ml	17	21873	31572	23937
3måling	11	174	263	121	-	0,5ml	31	19690	29761	13693
	14	26	*	*	*	0,6ml	42	1809	*	*

Virusforsøk 2.1	Omgjort til pr ml										
	Stamme	UIO038	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv	Lite par
Dag	0	361	-	-	-	-	1ml	169	3747		
2måling	7	91	349	36	-	-	0,5ml	23	13879	53230	5491
1måling	7	343	*	*	*	*	1ml	63	9550	*	*
	11	220	*	*	*	*	0,1ml	72	53594	*	*
	15	110	217	202	16	16	0,4ml	23	20971	38512	3050
									Omgjort til pr ml		
Stamme	UIO041	Hel	Halv	Lite par	Klumper/misdanna	Prøve telt	FOV	Hel	Halv	Lite par	
Dag	0	520	11	-	-	1ml	162	5630	119		
	7	989		-	1	0,25ml	17	408166			
	11	232	36	-	4	0,025	15	1085141	168384		
	15	350	105	-	17	0,1ml	11	558090	167427		

Utregning over hvor mange synsfelt en spesifikk forstørrelse har. Sylinderen som prøven har blitt filtrert gjennom er målt til å være 8mm i radius (dette blir da også radiusen på filteret, som har et areal på 201.061.929 μm^2). Deretter har hvert synsfelt blitt målt med et objektivmikrometer, for å måle radiusen hvert synsfelt. Deretter regnet jeg ut hvor stor prosent et synsfelt utgjorde av hele filteret, for å finne ut hvor mange synsfelt et filter «rommer». Dette tallet har igjen blitt brukt til å regne ut alger og virus pr ml.

Antall FOV for et filter	Forstørrelse	Areal μm for et FOV	Radius μm for et FOV	% av total filter for hver FOV	Radiusen til forstørrelsen
5000	100x	41547	115	0,02%	0,115mm
1754	63x	115410	192	0,057%	0,1917mm
773	40x	259672	288	0,129%	0,2875mm
193	20x	1038689	575	0,5166%	0,575mm
48	10x	4154756	1150	2,0664%	1,15mm

Appendiks E: Virustelling fra virusforsøk 2.0 og 2.1

Virusforsøk 2.0						Pr ml	
Stamme	UIO036	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	411	73	50µl	37	1110811	197297
	14	663	131	10µl	24	13812500	2729167
						Pr ml	
Stamme	UIO037	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	411	73	50µl	37	1110811	197297,3
	14	379	178	10µl	25	7580000	3560000
						Pr ml	
Stamme	UIO038	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	411	73	50µl	37	1110811	197297,3
	14	437	164	10µl	24	9104167	3416667
						Pr ml	
Stamme	UIO039	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	411	73	50µl	37	1110811	197297,3
	14	553	96	10µl	23	12021739	2086957

Virusforsøk 2.0 fort.						Pr ml	
Stamme	UIO040	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	411	73	50µl	37	1110811	197297
	14	530	89	10µl	24	11041667	1854167
Stamme	UIO041	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	411	73	50µl	37	1110811	197297
	14	3488	47	10µl	24	72666667	979167
Virusforsøk 2.1						Prml	
Stamme	UIO038	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	103	70	0,5ml	24	42917	29167
	14	39	421	0,1ml	24	81250	877083
						Pr ml	
Stamme	UIO041	Medium	Store	Telt	FOV	Medium	Store
Dag	0	18	115	0,5ml	49	3673	23469
	14	100	254	0,01ml	29	1724138	4379310

Tabell over tellingene for virus i stamkulturer. Antall sysnfelt telt n=5.

500ml		50μ	
1:10 fortykning 036		1:100 fortykning 036	
Bakterier	virus	Bakterier	virus
88	120	12	28
48	124	12	32
56	116	8	32
52	108	12	42
24	104	16	28
53,6	114,4	12	32,4
Pr ml			
107200	228800	240000	648000

500ml		50μl	
1:10 fortykning 037		1:100 fortykning 037	
Bakterier	virus	Bakterier	virus
92	48	4	8
40	76	8	20
32	48	8	20
36	60	8	16
40	60	12	20
48	58,4	8	16,8
Pr ml			
96000	116800	160000	336000

Appendiks F: FCM og metode utvikling sentrifugering – Oppkonsentrering av celler

Tabell D1: Rådata over målinger av levende celler, målt før og etter sentrifugering. 3 målinger av hver replikat (A-C). Oppgitt er også median og gjennomsnittsmålinger for de 3 replikatene. Økningsfaktoren er også oppgitt (sluttkonsentrasjon/startkonsentrasjon).

Levende celler	Før	Etter					Økning gj.snitt	Økning median	Stamme					
		1	2	3	Gj.snitt	Median								
1000rpm														
Replikat	A	298000	294800	280400	291067	294800	1643000	1699200	1642600	1661600	1643000	5,70865781	5,573270014	41
	B	297800	294800	304400	299000	297800	1290200	1301600	1273400	1288400	1290200	4,3090301	4,332437878	
	C	360800	369400	343200	357800	360800	1049800	1074400	998000	1040733	1049800	2,908701323	2,909645233	
Levende celler	Før	Etter												
2000rpm														
Replikat	A	321800	294800	280400	299000	294800	1150400	976400	833000	986600	976400	3,299665552	3,312075984	41
	B	297800	294800	304400	299000	297800	1400400	1409800	1011800	1274000	1400400	4,260869565	4,702484889	
	C	360800	369400	343200	357800	360800	1690200	1652400	1381600	1574733	1652400	4,401155208	4,579822616	
Levende celler	Før	Etter												
4400rpm														
Replikat	A	319000	307400	301400	309266,7	307400	1305400	1393000	1283600	1327333	1305400	4,291873249	4,246584255	41
	B	335800	297600	286400	306600	297600	1454600	1448000	1480600	1461067	1454600	4,765383779	4,887768817	
	C	399200	382200	378800	386733,3	382200	2577800	2570400	2545600	2564600	2570400	6,631442855	6,725274725	

Tabell D2: Rådata over målinger av fikserte celler, målt før og etter sentrifugering. 3 målinger av hver replikat (A-C). Oppgitt er også median og gjennomsnittsmålinger for de 3 replikatene. Cellene er fiksert med GLA 25% til en endelig konsentrasjon på 1%.

Fiksert		Før					Etter							
1000rpm	Replikant	1	2	3	Gj.snitt	Median	1	2	3	Gj.snitt	Median	Økning gj.snitt	Økning median	Stamme
	A	249800	173600	167200	196866,7	173600	884600	845200	860800	863533,3	860800	4,386386725	4,958525346	41
	B	182000	211200	240200	211133,3	211200	848800	849200	666400	788133,3	848800	3,732870224	4,018939394	
	C	256600	264400	207800	242933,3	256600	849000	822800	818600	830133,3	822800	3,41712404	3,206547155	
Fiksert		Før					Etter							
2000rpm	Replikant	1	2	3	Gj.snitt	Median	1	2	3	Gj.snitt	Median	Økning gj.snitt	Økning median	Stamme
	A	216200	219800	191800	209266,7	216200	1178800	1082800	811000	1024200	1082800	4,894233832	5,008325624	41
	B	245400	165000	177400	195933,3	177400	1122400	1145400	653800	973866,7	1122400	4,970398095	6,326944758	
	C	214200	215600	215000	214933,3	215000	1072000	1039600	1036000	1049200	1039600	4,881513648	4,835348837	41
Fiksert		Før					Etter							
4400rpm	Replikant	1	2	3	Gj.snitt	Median	1	2	3	Gj.snitt	Median	Økning gj.snitt	Økning median	Stamme
	A	254800	253600	222400	243600	253600	1467400	1450800	1485600	1467933	1467400	6,025998905	5,786277603	41
	B	236000	235000	240000	237000	236000	1320000	1340200	708000	1122733	1320000	4,737271449	5,593220339	
	C	253200	245800	148800	215933,3	245800	1604000	1556200	1087200	1415800	1556200	6,556653288	6,331163548	

Tabell D3: Tabell over oppkonsentreringsfaktoren for levende og fikserte celler, etter de har blitt sentrifuger på gitte hastigheter for de 3 replikatene (basert på medianverdier fra tabell D1 og D2).

Rpm hastighet	Levende celler-oppkonsentrering			Fikserte celler-oppkonsentrering			Median (levende vs. fiksert)
	A	B	C	A	B	C	
1000 rpm	5,57	4,33	2,9	4,95	4,01	3,2	4,33 / 4,01
2000 rpm	3,3	4,7	4,57	5,00	6,32	4,83	4,57 / 5,00
4400 rpm	4,24	4,88	6,72	5,78	5,59	6,33	4,88 / 5,78

Tabell D4: Histogram statistikk over de to flow cytometrimålingene (log og lineær) hos *Prymnesium Polylepis* UIO037 basert på to parameter, fluorescens (FL2-H) og forward scatter (FSC-H).

File name	Aquisition date	Gate	Gated events	Total events	X parameter	Mean	CV	Median	Peak channel
P.pol.lin.RB.008	25.02.14	G1	4770	10000	FSC-H (Log)	1401,53	18,93	1420,18	1472
P.pol.lin.RB.008	25.02.14	G2	396	10000	FSC-H (Log)	1811,18	25,12	1746,58	1596
P.pol.lin.RB.008	25.02.14	G3	32	10000	FSC-H (Log)	3376,01	36,90	3219,68	3398
P.pol.lin.RB.008	25.02.14	G1	4770	10000	FL2-H (Linear)	319,16	11,15	317,00	283
P.pol.lin.RB.008	25.02.14	G2	396	10000	FL2-H (Linear)	561,60	10,27	558,00	597
P.pol.lin.RB.008	25.02.14	G3	32	10000	FL2-H (Linear)	862,35	9,33	846,00	752
P.pol.hoy.thres.RB.004	25.02.14	G1	2030	10000	FSC-H (Log)	1452,25	19,92	1472,21	1512
P.pol.hoy.thres.RB.004	25.02.14	G2	203	10000	FSC-H (Log)	1836,82	28,11	1794,35	1639
P.pol.hoy.thres.RB.004	25.02.14	G3	17	10000	FSC-H (Log)	3286,80	46,76	2864,38	2665
P.pol.hoy.thres.RB.004	25.02.14	G1	2030	10000	FL2-H (Log)	724,86	12,21	716,92	691
P.pol.hoy.thres.RB.004	25.02.14	G2	203	10000	FL2-H (Log)	1316,55	10,50	1298,02	1274
P.pol.hoy.thres.RB.004	25.02.14	G3	17	10000	FL2-H (Log)	2988,23	40,80	2689,60	2641

Flow centrifuge

Levende celler

Anova tabell for økningsfaktor~rpm

```
> summary(mc2)
```

```
Call:
```

```
lm(formula = økning ~ rpm, data = a)
```

```
Residuals:
```

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.1998 -0.9705  0.1436  0.2736  1.5095
```

```
Coefficients:
```

```
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  3.7730932   0.7270410     5.19  0.00127 **
rpm          0.0003267   0.0002551     1.28  0.24121
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 1.092 on 7 degrees of freedom
```

```
Multiple R-squared:  0.1898,    Adjusted R-squared:  0.074
```

```
F-statistic: 1.639 on 1 and 7 DF,  p-value: 0.2412
```

```
> anova(mc2)
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: økning
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
rpm     1  1.9550   1.9550   1.6393 0.2412
Residuals 7  8.3481   1.1926
```

```
> |
```

Flow centrifuge

Fikserte celler

Anova tabell for økningsfaktor~rpm

```
> summary(mc3)
```

```
Call:
```

```
lm(formula = økning ~ rpm, data = b)
```

```
Residuals:
```

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-1.20381 -0.39381 -0.05682  0.28397  1.43318
```

```
Coefficients:
```

```
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  3.9208079   0.5237335   7.486 0.000139 ***
rpm          0.0004830   0.0001838   2.628 0.034013 *
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
Residual standard error: 0.7867 on 7 degrees of freedom
```

```
Multiple R-squared:  0.4966,    Adjusted R-squared:  0.4247
```

```
F-statistic: 6.906 on 1 and 7 DF,  p-value: 0.03401
```

```
> anova(mc3)
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: økning
```

```
      Df Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
rpm     1  4.274   4.2740   6.9062 0.03401 *
Residuals 7  4.332   0.6189
```

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```