

ACTA PROTOZOO- LOGICA

REDACTORUM CONSILIUM

E. M. CHEISSIN (LENINGRAD), S. DRYL (WARSZAWA),

O. JÍROVEC (PRAHA), B. PÁRDU CZ (BUDAPEST),

G. I. POLJANSKY (LENINGRAD), Z. RAABE (WARSZAWA)

VOLUMEN II

Fasciculi: 10 — 18

W A R S Z A W A 1 9 6 4

INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ IM. M. NENCKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ACTA PROTOZOLOGICA

Redaktor Naczelny:
ZDZISŁAW RAABE

Sekretarz Redakcji:
ANDRZEJ GRĘBECKI

NOTICE TO AUTHORS

Acta Protozoologica is intended as a journal serving for the publication of original papers embodying the results of experimental or theoretical research in all fields of protozoology with the exception of purely clinical reports. The papers must be concise and will not be accepted if they have been previously published elsewhere. After acceptance by the Editors papers will be printed in the order as they have been received, in the possibly shortest time.

Papers are accepted in English, French, German and Russian. Every paper should begin with the name and postal address of the laboratory, name and the surname of the author, title in the language of the text and translation of the title into the author's own language. The paper should be accompanied by a summary in the language of the text, not exceeding 100 words, also with the translation into the author's own language. The authors speaking English, French, German, or Russian should translate the title and the summary into another one of the 4 languages accepted in the Journal. In the Russian texts also the name and the postal address of the laboratory, legends of tables, plates and text-illustrations must be translated, the translation of the summary may be somewhat more extensive, and the name of the author should be given additionally also in the Latin characters.

Manuscript should be a doublespaced typescript (30 lines on one side of a sheet) with a normal margin. No elements of the text should be fully typed in capitals nor in spaced set (only underlining with pencil is admissible). In decimal fractions points (not commas) should be used. The generally accepted abbreviations and symbols are recommended. Nomenclature must agree with the International Code of Zoological Nomenclature, London 1961. The original and one carbon copy of the whole text material should be supplied.

References must be cited in the text indicating only the author and year, thus: „Kinosita 1954 found that, etc.". Only all references cited in the text should be listed. The list must be arranged as follows:

Ehret C. F. and Powers E. L. 1959: The cell surface of Paramecium. Internatl. Rev. Cytol. 8, 97—133.

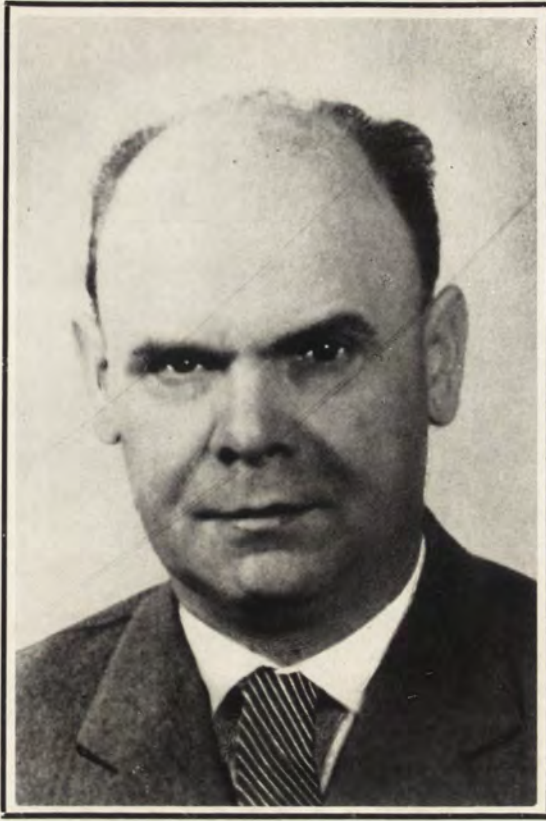
Gelei J. von 1939: Das äussere Stützgerüstsystem des Parameciumkörpers. Arch. Protistenk. 92, 245—272.

Titles of references are given in their original language (not translated). In papers written in English, French or German, the Cyrillic type of the Russian references is transliterated according to the international system (ISO Recommendation R 9 September 1954). This regulation is not applied to names if there exists their traditional spelling. Also the author may freely choose the transliteration of his own name. In Russian papers, the Russian references are cited in Cyrillic, the others in the Latin characters, but they must be listed all together in the Latin alphabetical order.

The following material should be supplied on separate sheets: 1. the running title for the page headlines, 2. tables, 3. legends for text-figures, 4. legends for plates. Line-drawings will be published in the text, photographs and raster-figures on separate plates. No coloured photographs can be published presently. Lettering on photographs and drawings should be marked in pencil. With no regard to the language of the text, only the Latin lettering, arabic numerals or generally accepted symbols are admissible for marking on illustrations. Numbering of text-figures, plates and tables must also be marked in pencil, as well in the legends as in the text. Tables are denoted in English and in French — Table, in German — Tabelle, in Russian — Таблица. In the Russian papers text-figures should be determined — Рис. and in all the others — Fig. Plates are denoted in English and French — Pl., in German — Taf., in Russian — Табл.

Galley proofs are sent to the authors. Authors receive 100 reprints without covers, free of charge.

Manuscripts may be submitted to each member of the Editorial Board or directly to the Office: Acta Protozoologica, Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa 22, ul. Pasteura 3, Poland.



BÉLA PÁRDUCZ (1911—1964)

On the 19th February, 1964, Dr. Béla Párducz, the prominent Hungarian protozoologist, member of Editorial Board of *Acta Protozoologica* passed away. This unexpected and sudden death carried off a Master in descriptive and experimental protozoology.

Béla Párducz was born on 3rd April, 1911, in Fehértemplom. He studied biology and geography at the Szeged University. After completing his studies in 1932 he entered the Zoological Institute of the same University headed by J. v. Gelei. His Ph. D. thesis on the morphology of *Uronema* was soon followed by an impressive series of papers on the fine structure and silver line system of hymenostomes and other ciliates. He discussed further the origin of sessilism in protozoa. These achievements gave him the grade of Privatdozent in protozoology in 1944. During the war he spent some years at the Kolozsvár University, again in Gelei's department.

After the war he joined the Hungarian Natural History Museum, where he participated in the organization of the biological laboratory. His ideas and his work continued to ripen and expand in this laboratory. Using an ingenious new method for rapid fixation and staining the ciliates which gives a true functional picture of the ciliature, he demonstrated the mode of movement of individual cilia and elucidated many problems of ciliary coordination during normal locomotion and different responses to stimuli. His results in this field represent the most important contribution not only to protozoology but to cell physiology and general biology as well. His much awaited syntheses remain unwritten. That is an irreparable loss.

Kristinebergs Zoologiska Station, Fiskebäckskil, Sweden

Tom FENCHEL¹

On the morphology, morphogenesis and systematics
of *Thigmophrya* Ch. Lw. (*Ciliata*, *Thigmotrichida*) with
a description of *T. saxicavae* sp. n.

Thigmophrya Ch. Lw. (*Ciliata*, *Thigmotrichida*), dens morfologi,
morfogenese og systematiske stilling, med en beskrivelse af *T. saxicavae*
sp. n.

The genus *Thigmophrya*, a group of ciliates inhabiting the mantle cavity of marine bivalves, was described by Chatton et Lwoff 1923. In this and subsequent papers (1926, 1949) these authors classified *Thigmophrya* as a thigmotrich ciliate because of the posteriorly situated mouth and the resemblance to the species of *Conchophthiridae*. They believed *Thigmophrya* to be a primitive genus from which other thigmotrich ciliates had evolved since *Thigmophrya* possesses a dense ciliation and reduction of the somatic ciliation is a general trend within some thigmotrich families (*Hemispeiridae*, *Ancistrocomidae*). Raabe 1936, to whom we owe the best description of the genus, studied *T. macomae* Ch. Lw. from the Baltic Sea. He too considered *Thigmophrya* as a thigmotrich genus and placed the genera *Myxophyllum* Raabe and *Conchophyllum* Raabe in the family *Thigmophryidae* Ch. Lw.

Neither Chatton et Lwoff nor Raabe could demonstrate the presence of adoral rows (i.e. an undulating membrane and an adoral zone of membranelles) in *Thigmophrya*. These rows are characteristic as well of all other thigmotrichs possessing a mouth as of their ancestors: the hymenostome ciliates, and their descendants: the spirotrich and the peritrich ciliates (Fauré-Fremiet 1950, Corliss 1956). It was therefore found desirable to restudy the morphology and morphogenesis of *Thigmophrya* in order to clarify the systematic position held by this genus.

Since it is now generally agreed that the thigmotrich ciliates are descendants of the hymenostome ciliates and that the mouth parts of the two groups are homologous (Fauré-Fremiet 1950, Corliss 1956, Raabe 1963), it is found desirable to describe the mouth of thigmotrichs in terms indicating the corresponding organelles in hymenostome ciliates. Therefore the right adoral row, which is called "row number 1" and "la cinétie stomatogène" by Chatton et Lwoff 1936, 1949, and Raabe 1959, 1963, will be called the undulating membrane (UM). The left adoral row, called "la cinétie A + B" by these authors, will be called the adoral zone of membranelles (AZM). In the following "row number 1" means the first somatic row to the right of the UM.

¹ Present address: Marinbiologisk Laboratorium, Grønnehave, Helsingør Denmark.

Materials and methods

The study was carried out at the Zoological Station of Kristineberg situated on the Gullmarfjord at the west coast of Sweden. The lamellibranch *Saxicava arctica* (L.) was found to harbour a hitherto undescribed *Thigmophrya* sp. The ciliates were studied both living and after fixation and staining. The nuclei were studied after fixation in Carnoy's fluid and staining in pyronin-methylgreen. The infraciliature was studied by the silver method of Chatton and Lwoff (Corliss 1953) and by a modification of this method described by Chatton 1940.

Thigmophrya saxicavae sp. n.

The species resembles, like other *Thigmophrya* species, *Paramecium caudatum* in the form of the body, the greatest width being in the posterior third of the body. The length was found to be 142μ (126 — 160μ) and the width 37μ (28 — 47μ). There are 50—60 somatic kineties arranged in a left and a right system. On the ventral side the two systems meet near the anterior end and behind the mouth. They form an anterior and a posterior suture of kineties. The anterior suture continues along the anterior rim to the dorsal side. The anterior part of the kineties of the left system is developed as a thigmotactic field; in accordance with this the anterior left side is slightly concave. The somatic rows are nearly parallel to the body axis, in contrast to *T. macomae*, where there is some torsion of the rows.

The mouth (Fig. 1 C) is situated on the ventral side about $\frac{1}{4}$ of the body length from the posterior end. As characteristic for *Thigmophrya*, it is situated in a vestibulum. It opens to the outside in a slit which is directed obliquely to the right. The vestibulum consists of a triangular pocket. The last kineties of the left system, about 7, go into the vestibulum, the walls of which they cover. The two first rows of the right system curve a little into the vestibulum. The pores of the contractile vacuole, usually 2—5, appear in the vestibulum between rows number 1 and 2.

In the vestibulum there is a triangular naked area between the rows number 1 and *n*. This area is situated on the right wall of the vestibulum. On silver impregnated specimens, lying on their right side, two rows of disorderly arranged kinetosomes are seen in the naked area. The rows run parallel to row number 1. Due to their position in a naked peristomal field between the right and the left systems of kineties and due to their behaviour during fission (see below), they are believed to be homologous with the adoral rows of other thigmotrich ciliates.

There is one ovoid macronucleus and one spheric micronucleus. Raabe 1939, mentions the occurrence of "Chromatinkörnchen" which are spheric bodies found in the macronucleus. Staining with pyronin-methylgreen shows that these spheres are big RNA-containing nucleoli imbedded in a matrix of much smaller DNA-containing granules (Fig. 1 B).

Conjugating pairs were found not infrequently. The conjugating individuals were attached to each other as shown on Fig. 1 D.

Thigmophrya saxicavae was found to infect nearly all big specimens of *Saxicava arctica* from dense populations in the Gullmarfjord.

Diagnosis of *Thigmophrya saxicavae* sp. n.

Length $142\ \mu$ ($126\text{--}160\ \mu$) and width $37\ \mu$ ($28\text{--}47\ \mu$). 50–60 somatic kineties running parallel to the body axis. About 7 somatic kineties go into the vestibulum, the opening of which is obliquely oriented. Living in the mantle cavity of *Saxicava arctica* (L.) in the Gullmarfjord (west coast of Sweden). Type slides are deposited in the International Collection of Ciliate Types, University of Illinois, Urbana, Illinois, U.S.A.

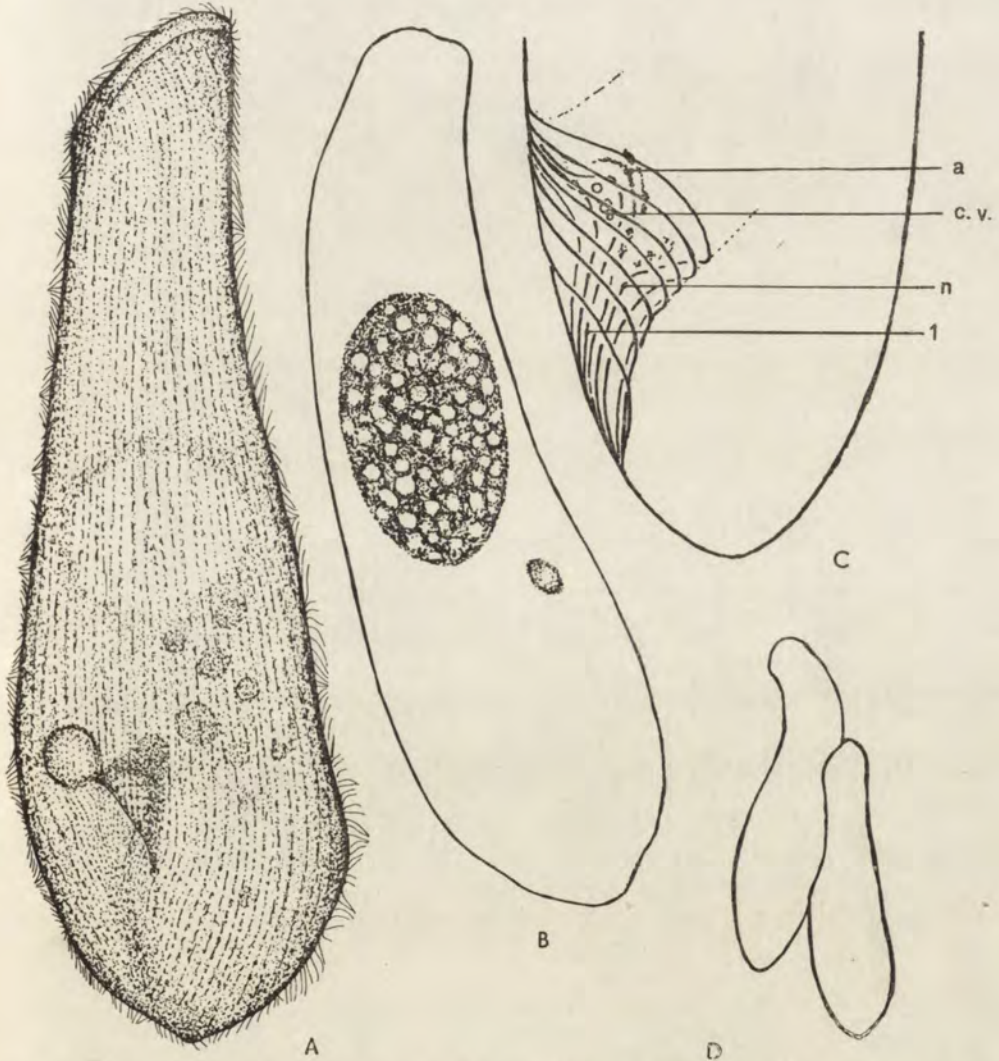


Fig. 1. *Thigmophrya saxicavae* sp. n. A. The living animal seen from the ventral side. B. Individual stained with pyronin-methylgreen. C. The mouth; schematic drawing after silver impregnated specimen seen from the left side. D. Outline of a conjugating pair; a — the adoral rows, c. v. — contractile vacuole pores, 1 and n — extreme somatic rows

The morphogenesis during division

The morphogenesis, especially the stomatogenesis, of thigmotrich ciliates has been studied in detail in two cases. Chatton et Lwoff 1936, studied

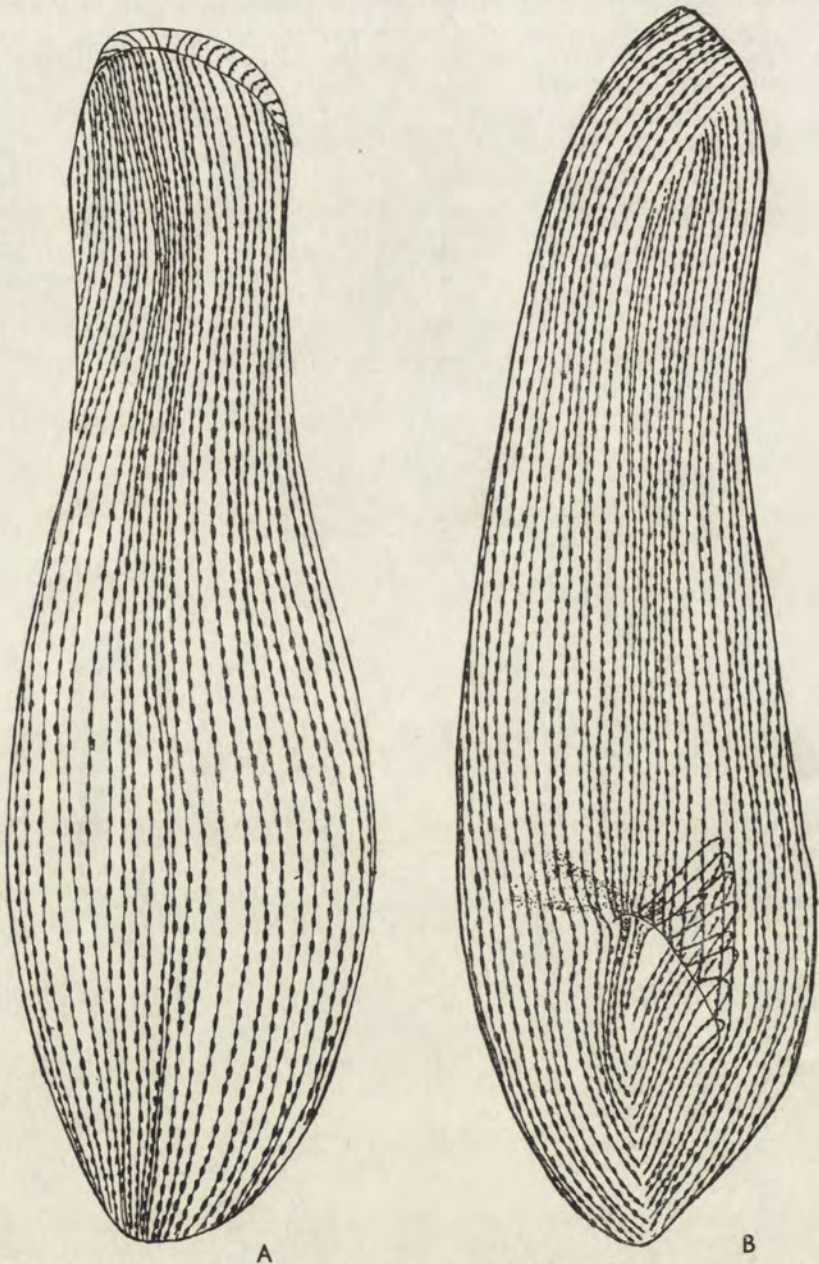


Fig. 2. *T. saxicavae* sp. n.; silver impregnated individuals seen from the dorsal left and the ventral side

the stomatogenesis of *Proboveria* Ch. Lw. and Raabe 1963, studied the stomatogenesis of *Conchophthirus* St. The findings of Chatton et Lwoff are in short the following. During division the UM is divided in two parts, one to the proter and one to the opisthe. The level of cleavage goes through the UM. AZM goes unchanged to the proter. To the left of the UM a number of membranelles appear in both the proter and in the opisthe. In the proter they disappear again and the old AZM is retained. In the opisthe three of the new membranelles form the new AZM of the opisthe while the rest disappears.

The fundamental findings of Raabe agree essentially with those of Chatton et Lwoff. In *Conchophthirus*, however, he found that the level of cleavage is behind the mouth. In both cases a pattern of membranelles resembling the tetrahymenal type are formed and some of the membranelles disappear again in a later phase of fission.

During the study of *T. saxicavae*, a great number of dividing individuals were found. However, some phases of division, especially the earliest, are lacking in the material. A possible explanation may be that some of these phases are of very short duration (c.f. Raabe 1963).

The first sign of division in *Thigmophrya* is the disappearance of the contractile vacuole pores and the straightening of the vestibulum and its somatic kineties.

In the earliest phases of division, which were studied, two mouth anlagen were already seen situated near each other behind the middle of the animal (Fig. 3 A). In the anlage of the proter the kinetosomes are more or less arranged in two rows, while the anlage of the opisthe only consists of one row of scattered kinetosomes. Between the rows number 1 and n the two anlagen are connected by a band of scattered kinetosomes. The somatic rows curve around the two anlagen. It is believed that the level of cleavage is established through or behind the old mouth since in the earliest phases of division, the opisthe is always smaller than the proter. The new contractile vacuole pores, which are formed during an early phase of the fission, appear between the rows 1 and 2 at the level of the mouth anlage. The number of kinetosomes in the mouth anlage increases. In the proter the right row becomes very distinct, and the left part becomes a dense cluster of kinetosomes (Fig. 3—4). It was difficult to observe the right row in the opisthe. Also here a dense cluster of kinetosomes appears.

Thereafter the formation of the vestibulum begins, first in the opisthe, later in the proter. The sinking starts at the mouth anlage and proceeds towards the left until about seven somatic rows are drawn into the vestibulum (Fig. 4). The stomatogenesis is completed by the disappearance of kinetosomes in the anlagen, especially in the left part, until only the two insignificant adoral rows visible in the vegetative individuals are left.

If in *Thigmophrya* the right adoral row is considered identical with the UM and the left one is considered identical with the AZM, the stomatogenesis of this genus resembles the stomatogenesis described previously for other thigmotrich genera. The main difference is that in *Thigmophrya* the AZM is not seen to be split into several membranelles in any phase of division.

The stomatogenesis of the previously studied genera as well as that of *Thigmophrya* are autonomous, i.e. the new mouth parts are formed by the old mouth. In all cases the old UM seems to be retained in both the proter

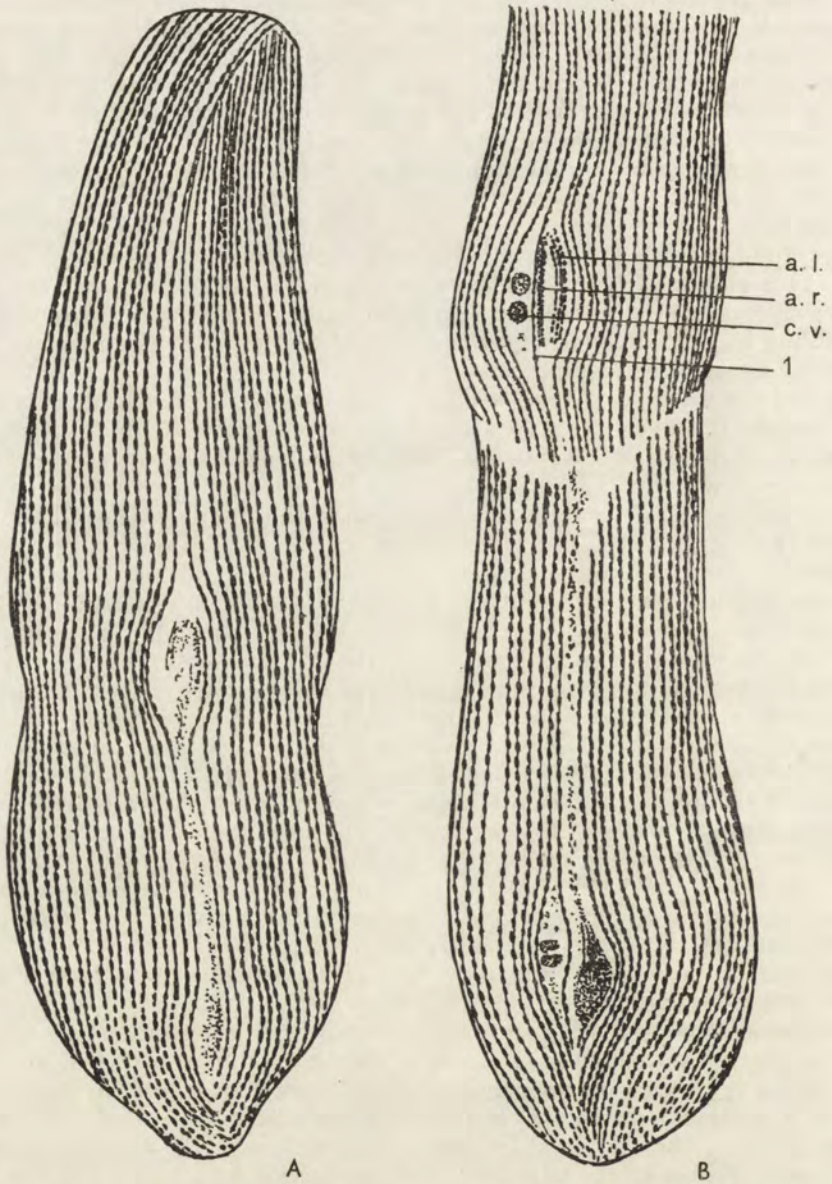


Fig. 3. *T. saxicavae* sp. n.; the first phases of division; a. l. — anlagen of the AZM, a. r. — anlagen of the UM, c. v. — contractile vacuole pores
1 — the first somatic row

and the opisthe, and the old AZM seems to be retained in the proter. Common to all three genera is also the increasing of the number of the kinetosomes of the AZM during division and the subsequent disappearance of some of the kinetosomes.

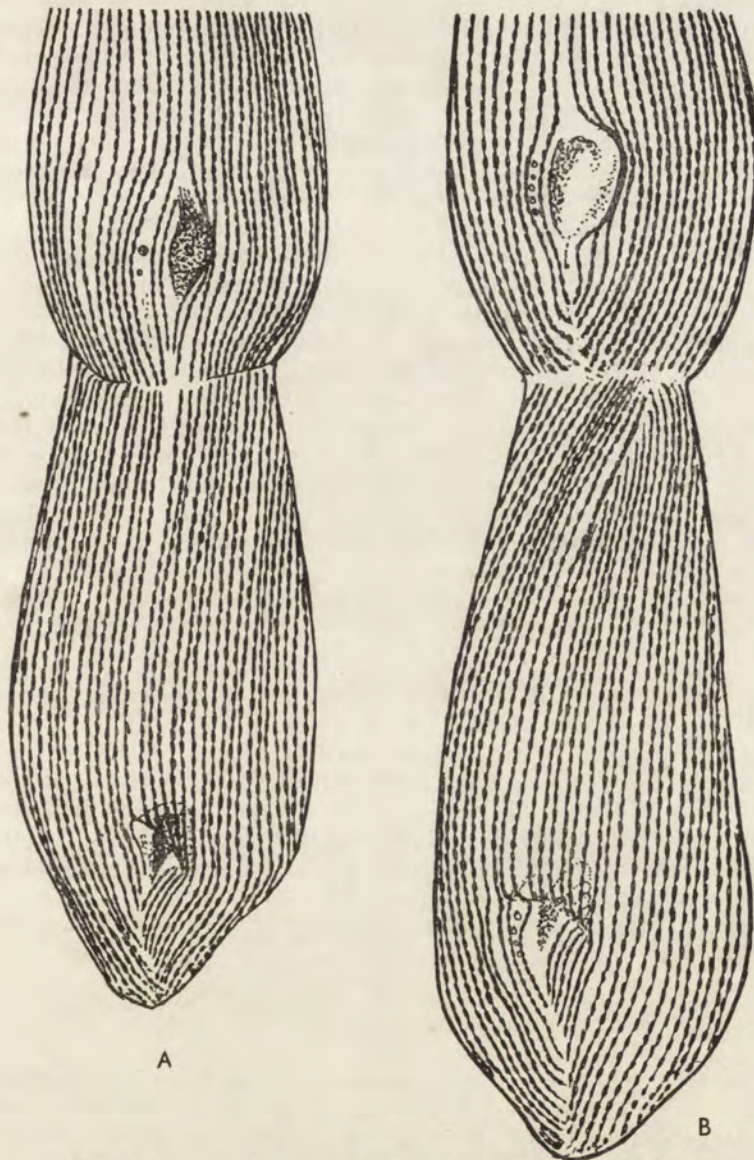


Fig. 4. *T. saxicavae* sp. n.; the later phases of division

The systematic position of *Thigmophrya*

On the basis of the morphological features of *Thigmophrya* previously described (Chatton et Lwoff 1923, Raabe 1936) combined with the present finding of adoral rows and the mode of fission, *Thigmophrya* must be classified as a thigmotrich ciliate. Together with *Myxophyllum* and *Conchophyllum* it forms a family, *Thigmophryidae*, within the order *Thigmotri-*

chida. It is found very unprobable that the *Thigmophryidae* is a primitive family, since the reduced adoral rows and the vestibulum are specialized characters, and the family could not possibly be ancestor of *Hemispeiridae* the members of which have well developed undulating membranes and adoral membranelles.

Looking for the ancestors of *Thigmophryidae* among other thigmatrich groups, the *Conchophthiridae* is found to be the most likely. This group contains, like *Thigmophryidae*, densely ciliated ciliates with reduced adoral rows and a tendency to form a vestibulum. The vestibulum of the genus *Conchophthirus*, however, differs from that of *Thigmophrya*. In the former genus the kineties of the right system go into the vestibulum, in *Thigmophrya* the kineties from the left system do.

Thigmophryidae and *Conchophthiridae* form a group of thigmatrich ciliates, creeping around on the epithelia of their hosts, feeding on particles from the substratum. They are thus flexible forms covered with a dense ciliation and with reduced oral ciliature. Another type of adaptation is seen in *Hemispeiridae*. These ciliates tend to be sessile filter feeders feeding on suspended material. They have strongly developed thigmatrich ciliature and adoral rows, especially an UM, while the somatic ciliature tends to be reduced. These two types are in two fundamentally different ways equally well specialized to the commensalic life in molluscs.

Summary

This paper is concerned with the systematics of the genus *Thigmophrya* Ch. Lw. A new species *T. saxicavae* sp. n. living in the mantle cavity of *Saxicava arctica* (L.) is described. The presence of adoral rows (UM and AZM) in the vestibulum of *Thigmophrya* is demonstrated. The morphogenesis during fission has been studied; it has many points of resemblance with that of *Conchophthirus* St. (Raabe 1963) and that of *Proboveria* Ch. Lw. (Chatton et Lwoff 1936), but the AZM was in no case seen to be split into separate membranelles at any phase of fission. The systematics of *Thigmophryidae* is discussed, it is found to be a specialized family probably closely related to *Conchophthiridae*.

RESUME

Dette arbejde drejer sig om den systematiske stilling slægten *Thigmophrya* Ch. Lw. En ny art *T. saxicavae*, som lever i gællehulen af *Saxicava arctica* (L.), bliver beskrevet. Tilstedeværelsen af adoral rækker (en undulerende membran og en adoral membranelzone) påvises i vestibulum. Morfogenesen under delingen er undersøgt: den har mange lighedspunkter med morfogenesen, som den er blevet beskrevet hos *Conchophthirus* St. (Raabe 1963) og hos *Proboveria* Ch. Lw. (Chatton og Lwoff 1936), men den adoral membranelzone bliver ikke delt op i flere membraneler på noget delingsstadium. *Thigmophryidae*'s systematiske stilling diskuteres, formodentlig er den en specialiseret familie, nært beslægtet med *Conchophthiridae*.

REFERENCES

- Chatton É. 1940: Sur une méthode rapide d'imprégnation à l'argent réduit par hydroquinone. C. R. Soc. Biol. 134, 229—232.
- Chatton É. et Lwoff A. 1923: Sur l'évolution des Infusoires des Lamellibranches. Les formes primitives du Phylum des Thigmotriches. Le genre *Thigmophrya*. C. R. Acad. Sci. 177, 81—84.
- Chatton É. et Lwoff A. 1926: Diagnoses des ciliés thigmotriches nouveaux. Bull. Soc. Zool. France, 51, 345—352.
- Chatton É. et Lwoff A. 1936: Les remaniements et la continuité du cinétome au cours de la scission chez les thigmotriches ancistruromés. Arch. Zool. exp. gén. 78, 84—91.
- Chatton É. et Lwoff A. 1949: Recherches sur les ciliés thigmotriches. I. Arch. Zool. exp. gén. 86, 169—253.
- Corliss J. O. 1953: Silver impregnation of ciliated protozoa by the Chatton—Lwoff technic. Stain Technol. 28, 97—100.
- Corliss J. O. 1956: On the evolution and systematics of ciliated protozoa. Syst. Zool. 5, 68—91, 121—140.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Morphologie comparée et systématique des ciliés. Bull. Soc. Zool. France, 75, 109—122.
- Raabe Z. 1936: Weitere Untersuchungen an parasitischen Ciliaten aus dem polnischen Teil der Ostsee. I. *Ciliata Thigmotricha* aus den Familien: *Thigmophryidae*, *Conchophthiridae* und *Ancistruromidae*. Ann. Mus. Zool. Pol. 11, 419—424.
- Raabe Z. 1959: Recherches sur les ciliés thigmotriches (*Thigmotricha* Ch. Lw.). VI. Sur les genres „*Ancistruroma*”, „*Ancistrina*” et les genres voisins. Acta Parasitol. Pol. 7, 215—247.
- Raabe Z. 1963: La stomatogenèse chez *Conchophthirus* (*Ciliata*, *Thigmotricha*). Acta Protozool. 1, 139—146.

Department of General Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology,
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Maria JERKA-DZIADOSZ

Urostyla cristata sp. n. (*Urostylidae*, *Hypotrichida*);
the morphology and morphogenesis

Urostyla cristata sp. n. (*Urostylidae*, *Hypotrichida*); morfologia
i morfogeneza

The ciliate described below had been found by Dr. M. Doroszewski in a small pool near Królikarnia country house, in the southern suburb of Warszawa. It was found again in a pond of Sadyba (Warszawa). Its third site is the river Jeziorka at the locality Jeziorna near Warszawa.

The culture was developed from a single individual. The Pringsheim's fluid was used as medium; dried and minced hen yolk was added to the medium as food.

For determination of the ciliate, fixed preparations demonstrating the nuclear apparatus were made, stained with Feulgen's fuchsin or Ehrlich's acid haematoxylin. For revealing the ciliary apparatus a rapid fixation with OsO_4 + sublimate and staining with iron haematoxylin was applied (after P á r d u c z 1952).

Besides, observations under the light- and phase-contrasting optics were carried out on living specimens.

Morphology

The length of the ciliate amounts $300\ \mu$ — $450\ \mu$, its width: $120\ \mu$ — $180\ \mu$. The peristome extends as far as $\frac{1}{4}$ of the body length. In the antero-sinistral part of the body, in front of the peristomal groove two rows of frontal cirri begin, crossing as an oblique crest the peristomal area and running further backwards along the middle line of the body. They terminate in front of the cross-running cirri which lie (8—12) in an oblique row not reaching beyond the body margin. The movements of frontal cirri are synchronized so that in observation of the living ciliate both rows produce an impression of a single one. On both sides of those cirri 7 rows of ventral cirri are present (Fig. 1).

A single contractile vacuole lies on the right body side at the level of the peristome and communicates with the anterior and posterior feeding canals.

The protrichocysts not disposed in rows and not numerous. Cell content is opaque and very elastic.

The nuclear apparatus of *Urostyla cristata* sp. n. is dispersed consisting of about 50 Ma and 6—8 Mi (Fig. 1).

The structure of *U. cristata* sp. n. is the nearest that of *U. grandis* Ehrbg., 1838 and *U. caudata* Stokes, 1886. The characters of those 3 species are compared in the Table 1.

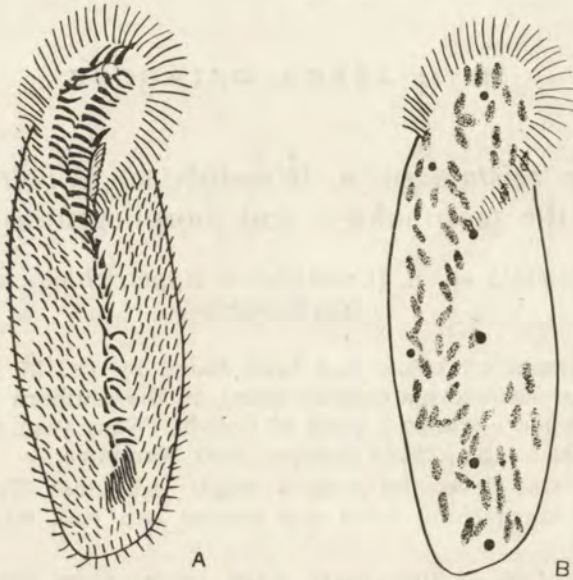


Fig. 1. *Urostyla cristata* sp. n. A. Diagram of the arrangement of the cirri upon the ventral surface of the ciliate. B. Diagram of the nuclear apparatus

Morphogenesis

Three organization areas participate in formation of the new body ciliature in the course of division. The FT (fronto-transversal) complex arises in the central part of the body, the ventral cirri of the right and left body sides appear as separate structures on the lateral body flanks of the ciliate.

The first morphologically perceptible phase of division is the formation of the AZM primordium of the future opisthe. This primordium appears approximately in the centre of the body, somewhat at the right from the peristomal groove, as a long stripe of tiny dense cilia disposed irregularly. Organization of the irregularly dispersed cilia into membranelles, packed closely one to another, proceeds from the anterior backwards.

Leftwards from the AZM being organized, an area arises with tiny cilia, initially irregularly dispersed, from which subsequently the frontal and transversal cirri develop; also the UM develops from some part of this area adjacent to AZM (Pl. I 3).

The frontal and transversal cirri and also the UM of the proter arise on the left side of the primary AZM being yet in reorganization.

The ventral cirri of the proter and opisthe right side arise in the organization areas situated at the right from the adoral zones. From the initially irregular compact area of cilia 7 rows of cirri emerge which stretch forwards and backwards and diverge laterally supplanting the former ciliature.

Table 1

Comparison of structural characters of *Urostyla grandis*, *Urostyla caudata* and *Urostyla cristata*

<i>Urostyla grandis</i>	<i>Urostyla caudata</i>	<i>Urostyla cristata</i>
Body length: 300—400 μ	Body length: 600 μ	Body length: 300—450 μ
Frontal cirri disposed in several rows in the frontal area	Frontal cirri in two oblique rows in the peristomal area	Frontal cirri in two oblique rows running backwards along the middle body line up to the transversal cirri
Transversal cirri 12—16, not extending beyond the body margin	Transversal cirri 8—10 in the form of two flags protruding over the body margin	Transversal cirri 8—12 not protruding over the body margin
Ventral cirri in 13 rows: 6 on the right, 7 on the left peristome side	Ventral cirri in 11 rows	Ventral cirri in 14 rows, 7 rows on each side of AZM
Protrichocysts in rows on the ventral side resemble the pattern of cirri	No protrichocysts	Few protrichocysts not disposed in rows
Nuclear apparatus dispersed. Number of Ma: over 100, of Mi: up to several tenth	Nuclear apparatus dispersed	Nuclear apparatus dispersed. Ma: about 50, Mi: 6—8
Single contractile vacuole, with 2 canals, located at the right from the peristome	Several contractile vacuoles, in row at the right side from the peristome	Single contractile vacuole with 2 canals at the right from the peristome
In division, new cirri arise in single organization area	No data on morphogenesis	In division new cirri arise in three organization areas

In a similar way, on the left body side arise the ventral cirri. The organization area of those cirri lies on the left body margin, externally from the left primary rows of cirri. At this place, 7 rows of small cirri arise from the initially uniform complex of cilia. Those cirri extend, as the division progresses, and occupy their proper position. The atrophy of the primary cilia-ture occurs between the V and VI stage of division (Fig. 2).

Division lasts about 200 min. beginning with the moment of emerging of the AZM primordium of the opisthe. The Fig. 2 shows the course of division and the time of duration of its stages.

The behaviour of the nuclear apparatus of *U. cristata* sp. n. in division is similar to that of *U. grandis* as described by H. Raabe 1946 and 1947 (Pl. II).

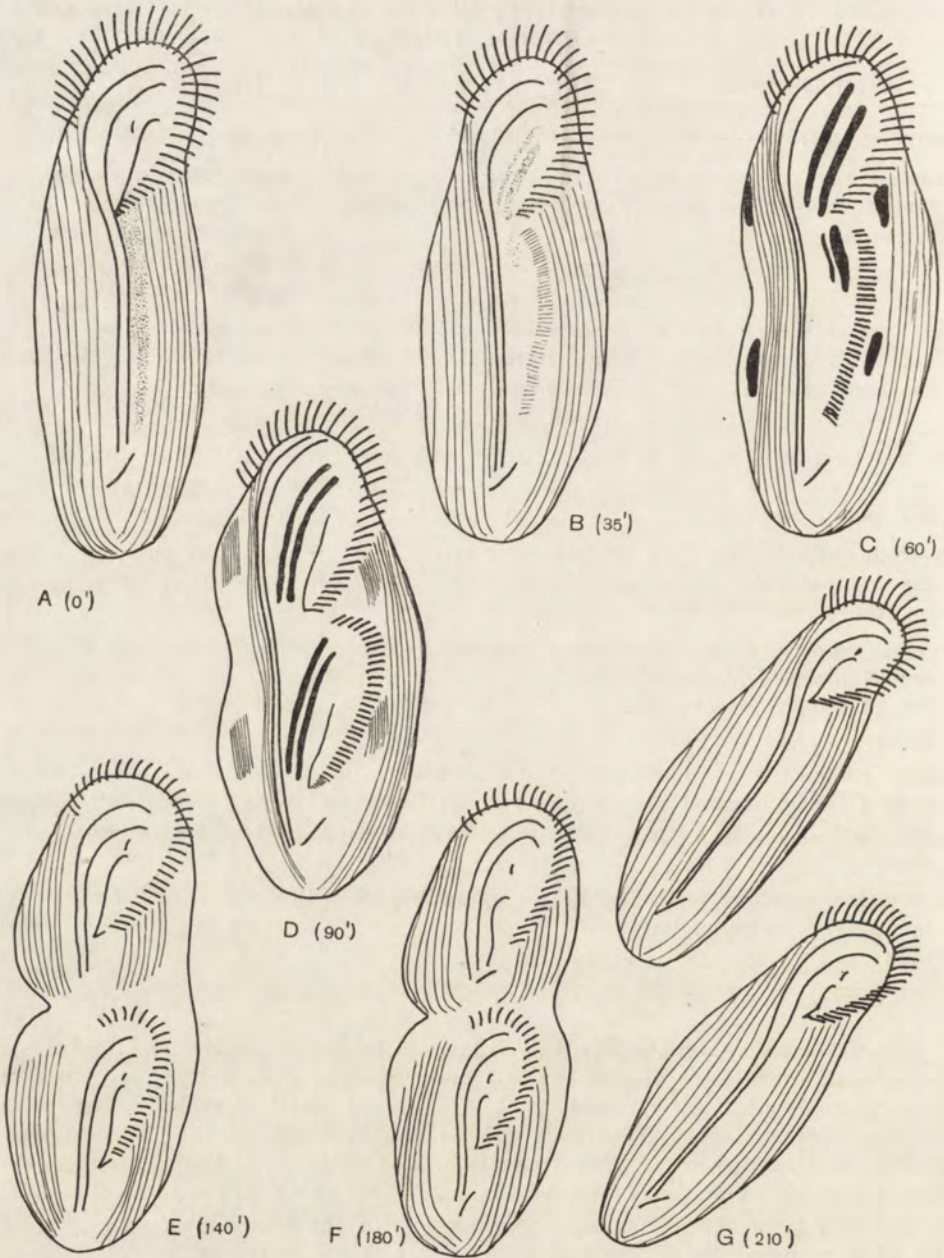


Fig. 2. Diagram of the division course. Numbers in parantheses indicate the time duration of the stages. Explanations in the text

Discussion

The species name "*crystata*" was chosen because of the characteristic comb-shaped disposition of the fronto-transversal cirri.

Urostyla cristata sp. n. belongs to the family *Urostylidae* Calkins, suborder *Stichotrichina*, order *Hypotrichida*, according to the system accepted by Fauré-Fremiet 1961.

The morphological characters of the ciliate as its dimensions, ciliature and structure of the nuclear apparatus remind in their general outline two species: *Urostyla caudata* Stokes, 1886 and *Urostyla grandis* Ehrbg., 1838. *U. cristata* sp. n. is differing from *U. caudata* in the pattern of its transversal cirri and in the presence of a single contractile vacuole, and from *U. grandis* in lower number of nuclei and in different disposition of protrichocysts and cirri. *U. cristata* sp. n. mostly resembles „*Urostyla* clone A" described by Pigoń 1956 and differs from it only in some morphological details, rather escaping the observation of the living ciliate. The possibility exists that Pigoń was studying just the same species.

The process of formation of new cirri in the course of division is in full harmony with the characteristic scheme of morphogenesis in *Hypotrichida*. The two organization areas as well of the opisthe as of proter, participate in the division of the ciliate which is accompanied by the fission of the nuclear and cytoplasmatic material.

The division of *U. cristata* sp. n. reminds in general the division of *U. grandis* described by Jerka-Dziadosz 1963. However, some essential differences are manifested. In *U. grandis* all the cirri arise in the single organization area and their groups differ only in the sequence of their formation and in position they are to occupy in the adult individual. In *U. cristata* sp. n. the primordia of cirri of different type arise separately and the sequence of their formation is strictly determined¹.

The pattern of morphogenesis typical for *U. cristata* sp. n. is found also in the representatives of more specialized families of *Hypotrichida*. The share of 3 organization areas in formation of the ventral ciliature was described by Wallengren 1902 in a representative of the suborder *Stichotrichina*: *Keronopsis (Holosticha) rubra*, as well as in the suborder *Sporadotrichina*: *Stylonychia mytilus*.

It follows from the above description that *Urostyla cristata* sp. n. resembles to the more primitive representatives of the family *Urostylidae* (as *U. grandis* is) in the structure of its ciliary system and of its nuclear apparatus, whereas the course of its morphogenetic processes reminds those phenomena in the more specialized families of *Hypotrichida*.

Summary

The new species of the genus *Urostyla*: *Urostyla cristata* sp. n. is described with the special reference to its morphogenesis. In division cirri arise in three organization areas: 1. the fronto-transversal cirri beside AZM, 2. the left ventral cirri externally from the old ventral cirri on the left body margin, 3. the right ventral cirri — at the right from AZM.

¹ The mutual relations of those areas and their sequence are the subject of author's further study.

STRESZCZENIE

Przedstawiono opis nowego gatunku z rodzaju *Urostyla*, a mianowicie *Urostyla cristata* sp. n., a przede wszystkim rozpatrzono jego morfogenezę. W czasie podziału cirri powstają w trzech polach twórczych: cirri frontarno-transwersalne przy AZM-ie, cirri brzuszne lewej strony za rzędami starych cirri brzusznych na brzegu ciała wymocзка po lewej stronie, a cirri brzuszne prawej strony ciała powstają po prawej stronie AZM-u.

REFERENCES

- Fauré-Fremiet E. 1961: Remarques sur la morphologie comparée et la systématique des *Ciliata-Hypotrichida*. C. R. Acad. Sci. 252, 3515—3519.
- Jerka-Dziadosz M. 1963: Morphogenesis in division and regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. Acta Protozool. 1, 43—54.
- Párducz B. 1952: Eine neue Schnellfixierungsmethode in Dienste der Protistenforschung und des unterrichtes. Ann. Muz. Nat. Hung. 2, 5—12.
- Pigoń A. 1956: Wielocukrowce w organizmie *Urostyla* w czasie życia aktywnego i encystacji. Acta Biochim. Pol. 3, 613—625.
- Raabe H. 1946: L'appareil nucléaire d' *Urostyla grandis* Ehrbg. I. Appareil micronucléaire. Ann. Univ. Curie-Skłodowska, S. C 1, 1—34.
- Raabe H. 1947: L'appareil nucléaire d' *Urostyla grandis* Ehrbg. II. Appareil macronucléaire. Ann. Univ. Curie-Skłodowska, S. C 1, 133—170.
- Stokes A. C. 1888: A preliminary contribution towards a history of the fresh-water *Infusoria* of the United States. J. Trenton Nat. Hist. Soc., 3, 71—319.
- Wallengren H. 1902: Zur Kenntnis der Neubildungs- und Resorptionsprozesse bei den hypotrichen Infusorien. Zool. Jahrb. Abt. Anat. Thiere 15, 1—58.

EXPLANATION OF PLATES I—II

Formation of new cirri in division

- 1: Ciliary system of *Urostyla cristata* sp. n. (10×15).
- 2: Primordium of AZM of the opisthe (10×25).
- 3: Organization area of fronto-transversal and ventral cirri of the right body side (10×25).
- 4: Organization area of the ventral cirri of the left body side (10×25).
- 5: Proter before separation (10×25).

[Párducz's haematoxylin staining]

Behaviour of the nuclear apparatus in division

- 6: Nuclear apparatus of an interdivision individual.
- 7: Compact macronucleus, micronuclei in division.
- 8—10: Division of Ma and Mi.
- 11: The nuclear apparatus of prother and opisthe before separation.

[Feulgen stain: 10×25]



3



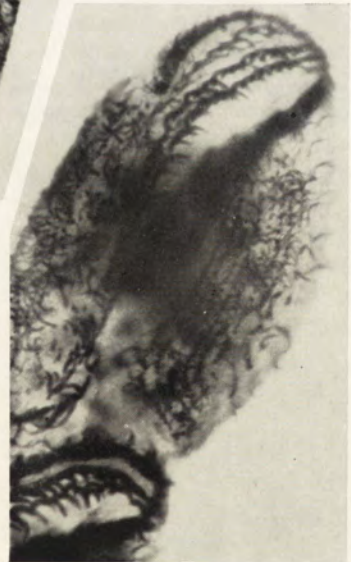
4



1



2



5

M. Jerka-Dziadosz

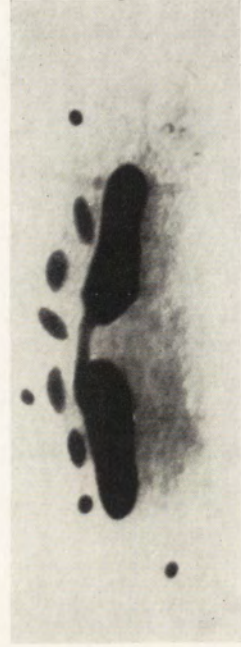
auctor phot.



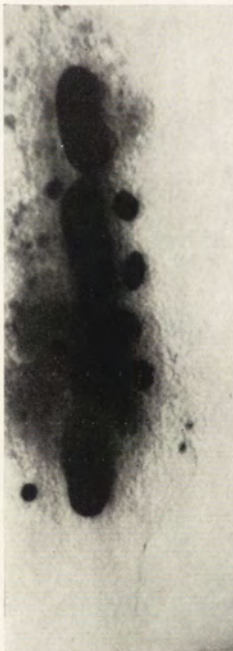
6



7



8



9



10



11

M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.

Department of General Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology,
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Maria JERKA-DZIADOSZ

Localization of the organization area in course of regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg.

Lokalizacja pola twórczego u *Urostyla grandis* Ehrbg. w przebiegu regeneracji

As stated in the preceding paper (Jerka-Dziadosz 1963) the normal formation site of the organization area in *Urostyla grandis* is strictly determined.

In division and in the physiological regeneration of this ciliate, the organization area arises in the centre of the body backwards from the peristomal depression between the rows of ventral cirri. In regeneration of fragments resulting after cross sections, the area appears in the middle of fragments between the rows of ventral cirri.

Determination of the formation site of oral structures has been ascertained in many *Protozoa*. Frankel 1960 a and b found that the formation site of oral structures is limited to one kinety in *Glaucoma chattoni*. In division, this place is also limited in longitude to the central body region, whereas in regeneration evoked by lesion after ultraviolet irradiation it has a certain possibility of shifting along the stomatogenic kinety.

In *Blepharisma* or in *Spirostomum* the formation region of primordia is not so strictly determined (Eberhardt 1962) since it embraces presumably several kineties. It shifts therefore not along a single line (kinety) but along a broader strand (several kineties).

The relatively least determined place is that of the oral primordium of *Stentor* (Tartar 1960) since it is not connected with any defined region of the pellicle but with the differentiation of pigment streaks wherever this differentiation occurs as result of operation.

In the present study the behaviour of fragments deprived of the middle body meridian — i. e. this part of the cell in which the organization area arises — was followed during division and physiological regeneration in *Urostyla grandis*.

I express my hearty thanks to Dr. M. Doroszewski for his guidance and protection of my work. I also thank Prof. Dr. Z. Raabe for reading the manuscript and also for his valuable suggestions.

Material and methods

Like in my former paper, as material *Urostyla grandis* was used cultivated in the Pringsheim's fluid, fed with *Tetrahymena pyriformis* cultivated on desiccated hen yolk.

All experiments were carried out on adult individuals of *U. grandis* 7—10 hrs after division. As shown in the studies of H. Raabe 1946, 1947 in the inter-division individuals of *U. grandis* the nuclear apparatus is dispersed all over the cell. In all the operations care was taken to dissect the

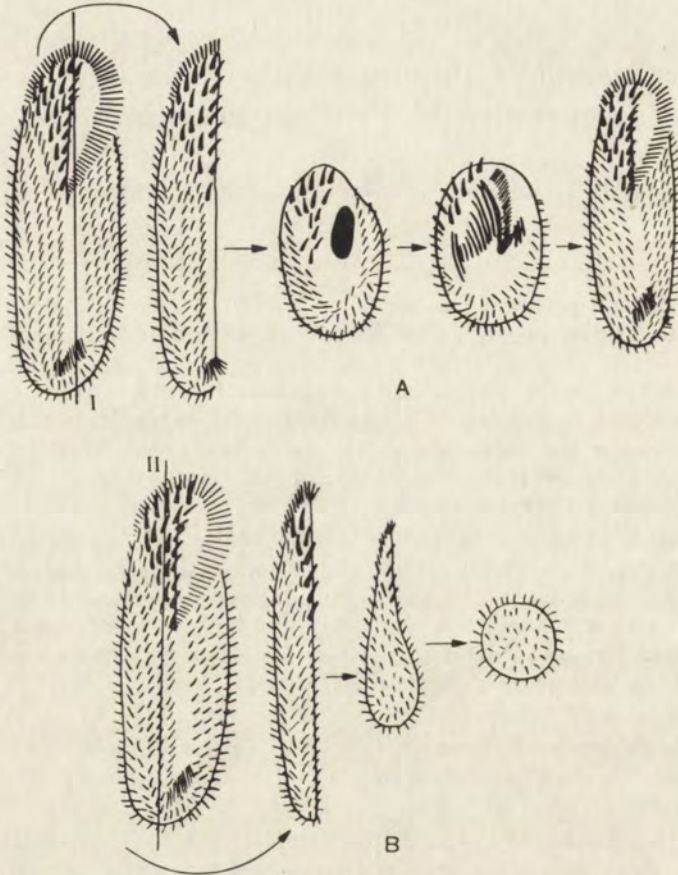


Fig. 1. Regeneration in *U. grandis*. A. The regeneration of lateral fragment. The longitudinal transection is executed near the main axis of the body. B. The behavior of the most lateral fragment (without the middle part of the body). Explanations in the text

ciliate so that each fragment contained as well the macro- as the micronucleus. The presence of the nuclear apparatus in different types of fragments was revealed by the Feulgen's method. All the fragments contained macro- and micronucleus.

Operations were executed with a properly sharpened dentistic needle or with a razor blade. The observed fragments originated from different individuals. Every type of operation was repeated over ten times.

Observations were carried out on living animals under the light microscope using also the phase contrasting optics. For demonstration of the ciliary apparatus material was rapidly fixed with osmium tetroxide + mercuric chloride mixture and stained with iron haematoxylin following Párducz 1952.

Results

In variants of operation section was done along 13 lines, in all cases perpendicularly to the ventral surface of the ciliate. Diagrams of the operations are shown in Figs. 2 and 3. Dashed parts represent the fragments under study.

Longitudinal sections

The first section line (I on the Fig. 1 A) runs along the plane which on the ventral side of the ciliate extends from forward along the undulating membrane (UM), across the peristomal groove, then through the centre of the band between the lateral rows of the ventral cirri. The ciliate was cut into halves. After operations both fragments moved with the characteristic rotation round the section line as the rotation axis. Both fragments — the left and the right — regenerate in a similar manner. The surface of the lesion shrinks.

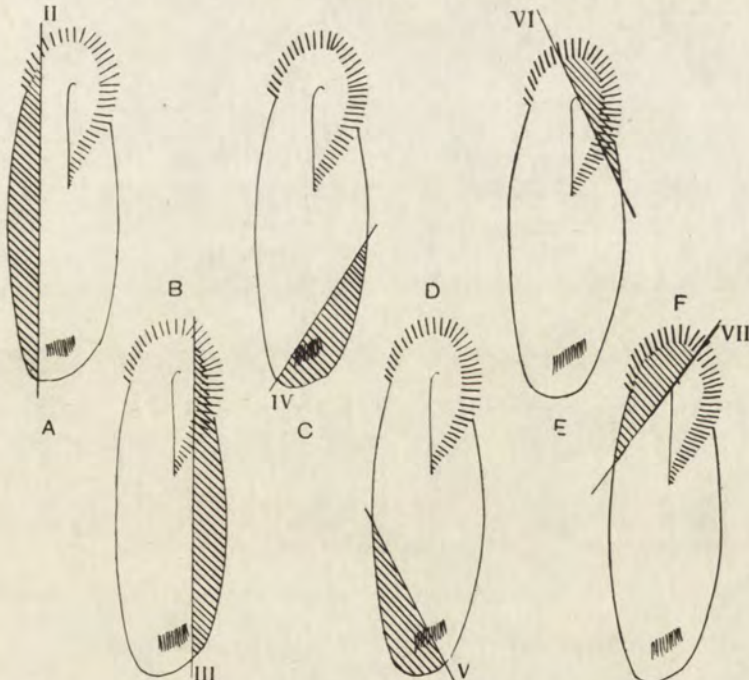


Fig. 2. Types of operations: the oblique and longitudinal transsections. The investigated fragments are dashed. Explanations in the text

The ventral cirri surround the fragments which become spherical. In the centre of those fragments — in the same place which after shrinkage embraced the territory adjacent to the wound after section — the organization area arises, giving origin to the new cirri system and to the oral ciliature (Fig. 1 A).

The second and third sections (along the line II and III — Fig. 2 A and B) separated the fragments comprising the right and left lateral margins of the ciliate. Both fragments contain a part of AZM and several extreme rows of the ventral cirri. The behaviour of fragments is represented diagrammatically in Fig. 1 B. After operation all the fragments behave in a similar manner. They move with a rotary motion round the section line which is the axis of rotation; after 20 min the fragments become spherical and desintegrate 10–20 hrs later. All fragments contained as well the macro- as micronucleus.

Oblique sections

The posterior oblique sections obtained after the operation along the IV and V line (Fig. 2 C and D) contained a part of lateral and a part of transversal cirri. The anterior oblique fragments resulting after section along the line VI (Fig. 2 E) comprised a part of the adoral zone, a part of the right lateral cirri and a piece of the lateral area with 3–5 frontal cirri; those fragments failed to contain UM. The oblique anterior fragments resulting after the section along the line VII (Fig. 2 F), contain the external part of AZM, a part of the frontal area as well as a part of the ventral cirri of the left body side. All above types of the oblique fragments fail to regenerate although they contain the macro- and micronuclei.

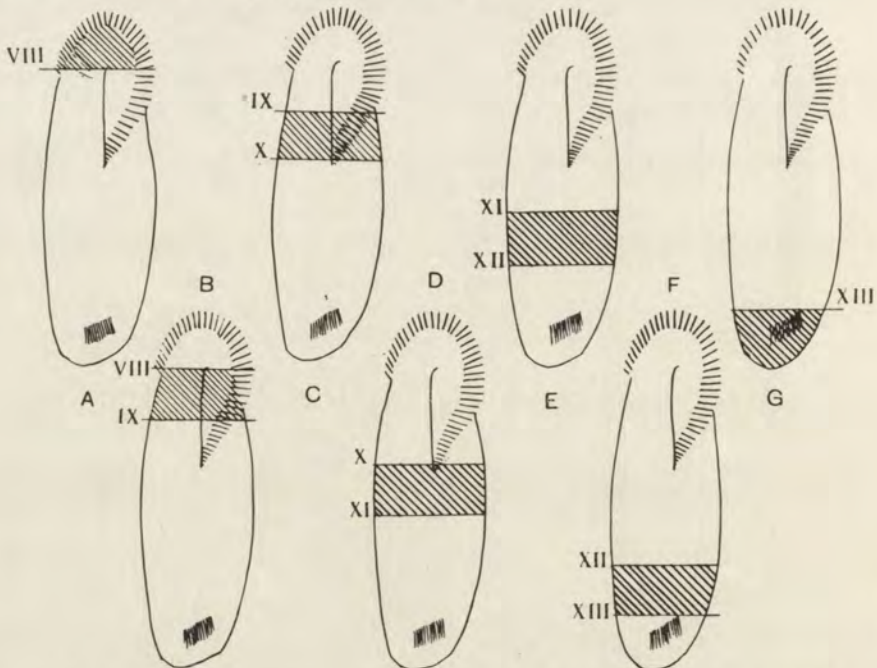


Fig. 3. Types of operations: the transversal bisections. The investigated fragments are dashed. Explanations in the text

Transverse sections

The fragments obtained after the section along the line VIII (Fig. 3 A) comprise the anterior part of AZM and the anterior part of the frontal area with the frontal cirri. Fragments arising after the section along the line VIII and IX, i. e. comprised between them (Fig. 3 B) contain the central part of AZM, UM, the inferior part of the frontal area and a few ventral cirri. Both groups of fragments — although containing the nuclear apparatus — fail to regenerate, they become spherical and die after 10—20 hrs.

Fragments comprised between the section line IX and X (Fig. 3 C) embrace the internal part of AZM, the cytostome and a part of the ventral cirri of the right and left body sides. They regenerate soon after cicatrization of the wounds. The organization area arises in the centre of the fragment between the rows of ventral cirri in the direct connection with the remnants of the primary cytostome.

Fragments arising after the section along the lines X and XI (Fig. 3 D) contain a part of the ventral ciliature exclusively. Regeneration begins after cicatrization of wounds. The organization area arises between the left and right rows of ventral cirri, nearer the anterior wound. A similar behaviour was observed in fragments resulting after the sections along the lines XI—XII and also in fragments comprised between the sections XII—XIII (Fig. 3 E and F). All fragments contained the nuclear apparatus. In all those fragments, the organization area arises in the anterior part of the fragment nearer the anterior wound.

The posterior fragment resulting after the section along the line XIII (Fig. 3 G) contains the transversal cirri. After the operation the fragment becomes spherical and dies although the control staining revealed the presence of the nuclear apparatus.

Discussion

The aim of the above presented experiments was to ascertain whether the occurrence of regeneration in *Urostyla grandis* Ehrbg. is associated with the capability of formation the ciliature primordia by some distinct body region.

Some authors stated that in a number of ciliates, the primordia of the new ciliature — either oral or somatic — arise in a strictly defined spot, sometimes connected with the stomatogenic kinety or with the division area. It is not elucidated whether the absence of the area involves the complete impossibility to reconstruct the ciliary structures in another place of the cell.

Unfortunately the degree of shifting of the formation place of the oral primordia was studied only in *Stentor coeruleus* (Tartar 1960 and 1962) and in *Paramecium aurelia* (Hanson 1962). In *Glaucoma chattoni* investigated by Frankel 1960 a, and b, as well as in *Spirostomum* and *Blepharisma* studied by Eberhardt 1962, nothing is known about the transverse shifting after longitudinal sections.

Tartar 1960 showed the possibility of the almost completely facultative shifting of the formation site of the primordium in *Stentor*, although Weisz 1951 suggested before the presence of a stomatogenic kinety in this ciliate.

As it was stated by Hanson 1962 the decisive role in the regeneration of the gullet is played by the posterior edge of the buccal opening together with ventral suture line. In *Urostyla grandis* the situation is more complex because the new oral structures — in contrast to *Stentor* and to *Paramecium* — arise during division in a direct connection with the parabasal oral apparatus.

After the transverse section behind the mouth, the organization area arises in *Urostyla grandis* at a shortest distance from the margin of the wound. It is worth being mentioned that in division of *Glaucoma*, the new mouth arises in a place equatorially defined as the middle segment of the kinety, but after desintegration of the primary oral apparatus, the new one arises behind it, at a spot possibly nearest the destroyed mouth. Golińska and Doroszewski 1964 stated in the case of *Dileptus* that in the fragments deprived of proboscis and cytostome, the primordia of the new cytopharyngeal complex and of the new ciliature of proboscis arise in the same body meridian in which they arose in division, however in the anterior cell moiety and not in the middle as it occurs in division.

It may be generally stated that in regeneration of all those ciliates a possibility of shifting the organization area along the meridian on which it was formed in division seems to exist. However, after destruction or amputation of this cell region on which the primordia arise in division — the regenerating organization area appears at a spot nearest its normal place.

In the former study (Jerka-Dziadosz 1963), it was stated in *Urostyla grandis*, that the organization area of the somatic and oral ciliature arises during division in the middle of the ventral body aspect, backwards from the peristomal groove, between the rows of ventral cirri. At the same place arises the organization area of the anterior fragment after a transverse section in the middle of the body as well as in individuals in course of physiological regeneration. In the posterior fragment, the organization area arises between the rows of ventral cirri, nearer the anterior body margin.

It was stated in the present study, that fragments arising as result of longitudinal section through the middle of the body (i. e. comprising a part of the median stripe of the ventral pellicle) regenerate normally (Fig. 1 A). After operation, the fragment is regulating its external form in this way that the the wound zone is found in the middle of the ventral body aspect, enclosed between the ventral cirri. In this place the organization area arises. Each of the fragments formed by the medial section, and comprising a part of the surface on which the organization area arises during division, begins to regenerate soon after the wound has shrunk and the fragment became spherical. The course of this process shows no difference from the regeneration of fragments arisen in effect of cross section in the middle of the ciliate body.

It follows from the subsequent experiments that the lateral fragments, deprived of the median body region (Fig. 1 B), fail to regenerate. All the fragments behave like the enucleated fragments of *Stylonychia mytilus* as described by Dembowska 1925. They regulate their external shape gaining a spherical form, more or less ciliated. Those fragments die in course of time. It was stated that all the lateral fragments of *Urostyla grandis* contained as well the macro- as the micronucleus. Consequently the incapability to regenerate lies not in the lack of nuclear apparatus. It is neither the matter of keeping the lateral fragments alive since in most cases they survive up to over 20 hrs. after operation. Presumably the lateral fragments as well as the

extreme anterior and posterior ones die of hunger having no possibility to reconstruct their oral apparatus.

The observation of fragments arising after cross sections (Fig. 3) indicates that the anterior and posterior sectors fail to regenerate, whereas the median fragments, containing this region of the body which lies between the peristomal groove and the transversal cirri, regenerate in all cases (Fig. 4). This median body part seems to be morphogenetically most active and may be determined as the presumptive organization area. Consequently, the presumptive organization area is this field in the ciliate body which is able to form the primordia during division and regeneration.

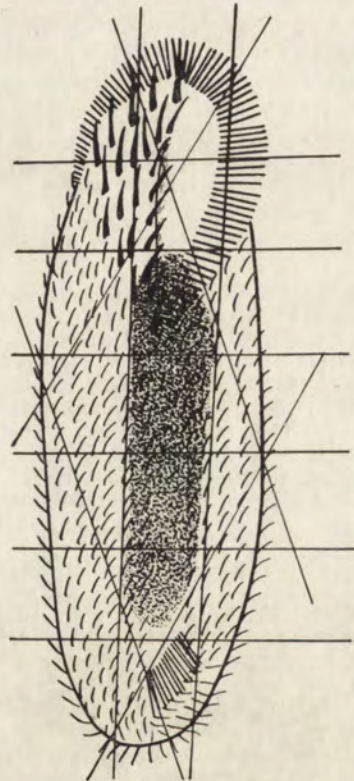


Fig. 4. The location of the presumptive organization area in the various fragments

The presumptive area in *Urostyla grandis* Ehrbg. is the cell territory between the rows of ventral cirri reaching anteriorly as far as the peristomal groove, and posteriorly — to the transversal cirri (Fig. 4). The fragments deprived of the presumptive organization area fail to regenerate their lost structures.

Summary

The capability of regeneration after different kinds of operations was studied in *Urostyla grandis*. It was proved that the condition of regeneration of a fragment is the presence of at least a part of this zone of the ciliate body

which is comprised between the ventral cirri, and is limited anteriorly by the peristomal groove, and reaches posteriorly as far as the transverse cirri. This part of the ciliate body surface has been called the presumptive organization area. This surface is able to develop the primordia of ciliature in division and regeneration. The fragments deprived of the presumptive organization area fail to regenerate their lost structures.

STRESZCZENIE

Zbadano zdolności do regeneracji fragmentów *Urostyla grandis*, przy różnych rodzajach operacji. Stwierdzono, że do regeneracji konieczna jest obecność we fragmencie przynajmniej część tej strefy ciała wymoczka, która znajduje się pomiędzy rzędami brzusznych cirri i jest ograniczona od przodu zagłębieniem peristomalnym, a z tyłu dochodzi do cirri transversalnych. Tę część powierzchni ciała wymoczka nazwano presumptywnym polem twórczym. Jest to powierzchnia zdolna do wytworzenia zawiązków urzęsienia w czasie podziału lub regeneracji. Fragmenty pozbawione presumptywnego pola twórczego nie regenerują utraconych struktur.

REFERENCES

- Dembowska W. S. 1925: Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*. Arch. Mikr. Anat. 104, 185—209.
- Eberhardt R. 1962: Untersuchungen zur Morphogenese von *Blepharisma* und *Spirostomum*. Arch. Protistenk. 106, 241—341.
- Frankel J. 1960a: Effects of localized damage on morphogenesis and cell division in a ciliate, *Glaucoma chattoni*. J. Exp. Zool. 143, 175—191.
- Frankel J. 1960b: Morphogenesis in *Glaucoma chattoni*. J. Protozool. 7, 362—376.
- Golińska K. and Doroszewski M. 1964: The cell shape of *Dileptus* in the course of division and regeneration. Acta Protozool. 2, 59—67.
- Hanson E. D. 1962: Morphogenesis and regeneration of oral structures in *Paramecium aurelia*; An analysis of infracellular development. J. Exp. Zool. 150, 45—65.
- Jerka-Dziadosz M. 1963: Morphogenesis in division and regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. Acta Protozool. 1, 43—54.
- Párducz B. 1952: Eine neue Schnellfixierungsmethode in Dienste der Protistenforschung und des Unterrichtes. Ann. Muz. Nat. Hung. 2, 5—12.
- Raabe H. 1946: L'appareil nucléaire d'*Urostyla grandis* Ehrbg. I. Appareil micronucléaire. Ann. Univ. Curie-Skłodowska, S. C 1, 1—34.
- Raabe H. 1947: L'appareil nucléaire d'*Urostyla grandis* Ehrbg. II. Appareil macronucléaire. Ann. Univ. Curie-Skłodowska, S. C 1, 133—170.
- Tartar V. 1961: The biology of *Stentor*. Pergamon Press.
- Tartar V. 1962: Morphogenesis in *Stentor*. In: Advances in Morphogenesis. Vol. 2. Academic Press, New York and London.
- Weisz P. 1951: An experimental analysis of morphogenesis in *Stentor coeruleus*. J. Exp. Zool. 116, 231—257.

EXPLANATION OF THE PLATE I

- 1: Nuclear apparatus of *Urostyla grandis*. Feulgen method.
- 2: Pattern of protrichocysts on the ventral aspect of the fragment (half of the ciliate body cut longitudinally) in course of rounding out. Párducz's haematoxylin technique.
- 3: Regenerating lateral fragment (half of the ciliate body cut longitudinally). Párducz's haematoxylin technique.
- 4: Nuclear apparatus of the lateral non-regenerating fragment.

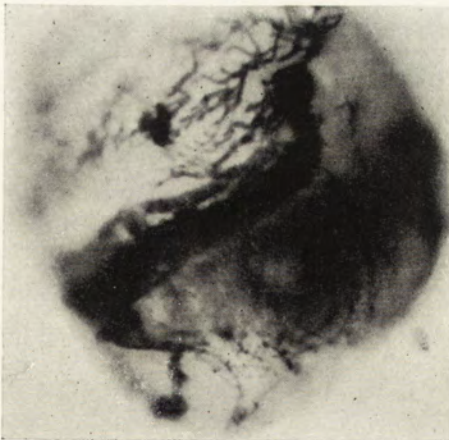
[Magnification of 1—4: 10×25]



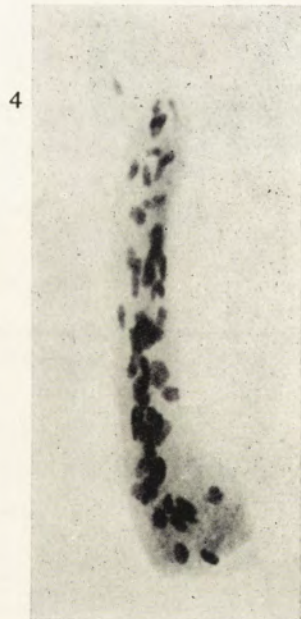
1



2



3



4

M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.

Department of General Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology,
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Irena TOTWEN-NOWAKOWSKA

Doublets in a clone of *Stylonychia mytilus* (O.F.M.)

Duplety w hodowli *Stylonychia mytilus* (O.F.M.)

Developmental anomalies involving formation of multiple forms, i.e. composed of two or more individuals, occur in ciliates rather frequently. They may be divided into the group of heteropolar monsters and of homopolar doublets (Fauré-Fremiet 1948 a and b) according to the structural symmetry of those forms. Doublets or monsters may arise either as spontaneous or as experimentally induced forms. In course of experiments, different physical agents (as different types of radiation, changes of temperature and osmotic pressure) or chemical factors (change of pH, formalin, alcohols, cyanides etc.) were applied as well as different types of microdissection. Since the phenomenon of formation multiple forms is ascribed to disturbances in course of division and conjugation, the factors applied would presumably involve disturbances in the normal development of morphogenetic processes.

Heteropolar monsters of *Paramecium caudatum* were reported by Balbiani 1891, Calkins 1911, Chen 1940, Fauré-Fremiet 1945 and 1948, Lloyd 1948 and 1949, Wichterman 1951 a and b, in *Colpidium* by Sonneborn 1932, in *Enchelys* and *Didinium* by Fauré-Fremiet 1948a. Homopolar doublets had been described by: Dawson 1920 in *Oxytricha*, Calkins 1925 in *Uroleptus*, Hanson 1962 and Sonneborn 1963 in *Paramecium*, Kimball 1941 and Katashima 1953 in *Euplotes*.

In the present study doublets of *Stylonychia mytilus* (as yet not described), their formation and course of regulation processes are investigated.

I wish to express my hearty thanks to Dr. M. Doroszewski for his valuable remarks and for patronage of this research. My thanks are also due to Miss K. Golińska M. Sc. for her help in my work.

Material and methods

In December 1962, in one of clones of *Stylonychia mytilus*, homopolar doublets appeared after a previous spontaneous mass conjugation of individuals. The factor evoking this phenomenon is as yet unknown. Initially the doublets made up about 80% of total number of individuals of the culture. Next days, the quantitative ratio of single individuals and doublets shifted in favour of single forms. Approximately 4 months later, a mass conjugation occurred, again followed by formation of doublets, but in a much lower number than in December 1962 (about 20% of the total number of individuals). Till June

1963 a gradual fall of doublets number occurred, down to a complete extinction of the phenomenon in June. In subsequent months, mass conjugation occurred twice but doublets failed to appear any more. A part of doublets isolated from the culture as well as mating pairs were placed separately in watch glasses. As food *Tetrahymena pyriformis* grown on Pringsheim's medium with yolk suspension was applied.

For observation the binocular microscope, the dark field and phase contrasting optics were used.

The photomicrographic documentation concerns as well the living material as that fixed with osmium tetroxide. For staining, iron haematoxylin after P á r d u c z 1952 and the Feulgen's procedure were applied.

Results

Reorganization of ex-conjugants

Reorganization of the cirri system after conjugation

The conjugation of *Stylonychia mytilus* (described, among others, by Grell 1951 and Lichtenberg 1955) lasts about 24 hrs., thereafter the separation of ex-conjugants follows. In the cases observed in the present study, soon after disjoining of the pair each of the ex-conjugants is reorganized. This reorganization resembles, as to the changes in the cirri system and in the nuclear apparatus, to the Ma reorganization after traumatization or starvation (D e m b o w s k a 1925 and 1938) and is followed by a distinct reduction of dimensions in both individuals (Fig. 1 A—D).

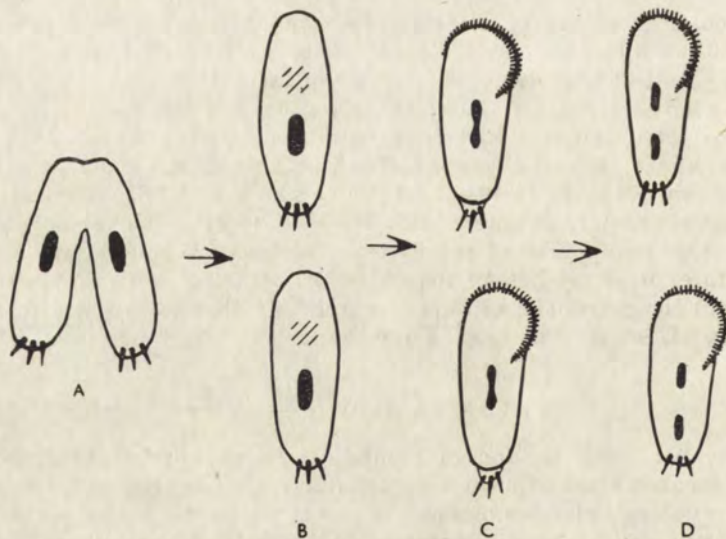


Fig. 1. Post-conjugation reorganization. A. Conjugating pair. B. Beginning of reorganization; formation of reorganization area (striped) in each ex-conjugant. C. Conclusive phase of reorganization; detachment and resorption of the caudal cirri. D. Individuals after reorganization

Despite the accomplished reorganization, the majority of ex-conjugants died, and only a negligible number of them survived remaining able to division.

Reorganization prior to separation of ex-conjugants

A certain number of pairs failed to separate 24 hrs. after conjugation. In those cases reorganization might also take place. The organization areas arised in each individual separately and the process developed synchronously in each ex-conjugant. After completion of reorganization, ex-conjugants separated from one another (Fig. 2 A—D).

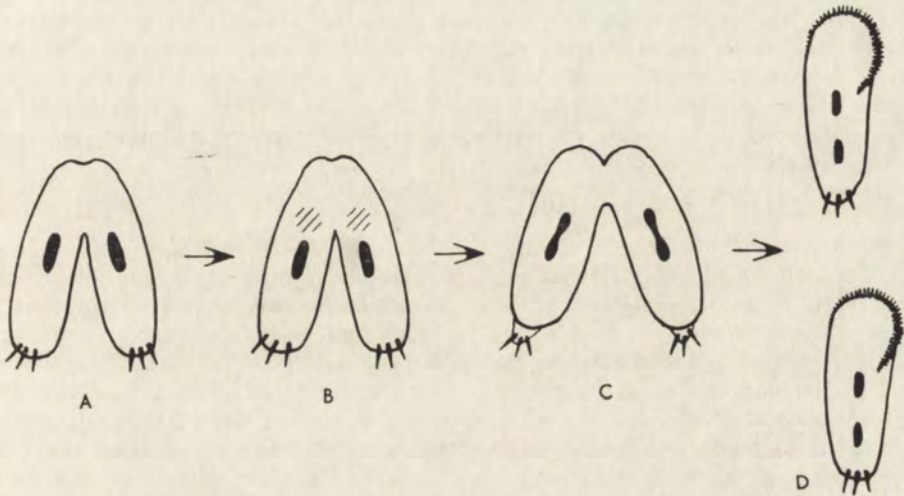


Fig. 2. Reorganization preceding the separation of ex-conjugants. A. Conjugating pair. B. Formation of organization areas (striped). C. Conclusive phase of reorganization (resorption of the caudal cirri). D. Individuals after separation of pairs

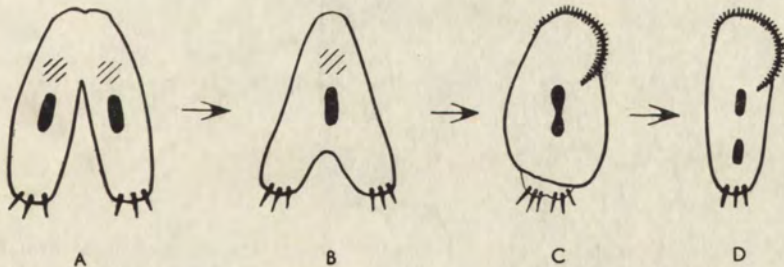


Fig. 3. Incomplete (defective) reorganization. A. Formation of organization areas in conjugating pairs (striped). B. Fusion of ex-conjugants and formation of incomplete doublet: beginning of the second reorganization and formation of a single organization area (striped). C. Conclusive phase of reorganization; detachment and resorption of the double set of caudal cirri. D. Individual after conclusion of reorganization

Incomplete reorganization

In some cases the reorganization is limited to the reconstruction of the cirri system without formation of new peristomes. Then fusion of both ex-conjugants occurred resulting in formation of a doublet: individual with a double cirri apparatus and two peristomes fused together. 2—3 hrs. later a new reorganization begun and formation of one organization area occurred. The double cirri system was resorbed and — in result — one normal individual was formed (Fig. 3 A-D).

Defective division and morphogenesis of doublets

During the prolonged union of ex-conjugants, a defective division might occur. In this process the organization areas of proter and of opisthe are formed probably one alongside of the other (the early stages of the areas formation were not observed). During the migration of cirri the body shape of the ciliate changes, forming a doublet composed of two cells with a structure and with proportions of normal individuals grown together by their dorsal surface.

Formation of homopolar doublets

Simultaneously with the change of the body shape and of the number of cirri, in each conjugating individual a pair of peristomes appeared, both at the same level, symmetrical to the longitudinal body axis. After completion of division processes, two double individuals detached from each other and begun their independent existence (Fig. 4 A—C and Pl. I 1—2). Those doublets showed the homopolar pattern and both component individuals had the proportions and the cirri system of a normal individual. Soon after the double individual had become independent, both peristomes ingested food and produced food vacuoles. The Ma apparatus, was, as a rule, double (4) but cases of slight deviations from the norm occurred also, as well towards the increase as towards diminishment of the nuclei number (3—5).

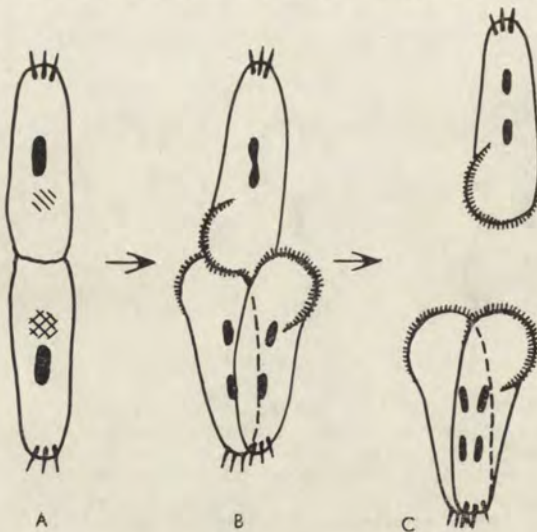


Fig. 4. Defective division and formation of homopolar doublets. A. Formation of double division areas (checked). B. Differentiation of new double peristomes. C. Homopolar doublets after separation of ex-conjugants

The course of the division process was not always synchronous in both conjugants. In some cases when in one partner the defective division occurred — in the other the post-conjugation reorganization took place. As result of both processes, one doublet and a single individual was formed (Fig. 5 A—C).

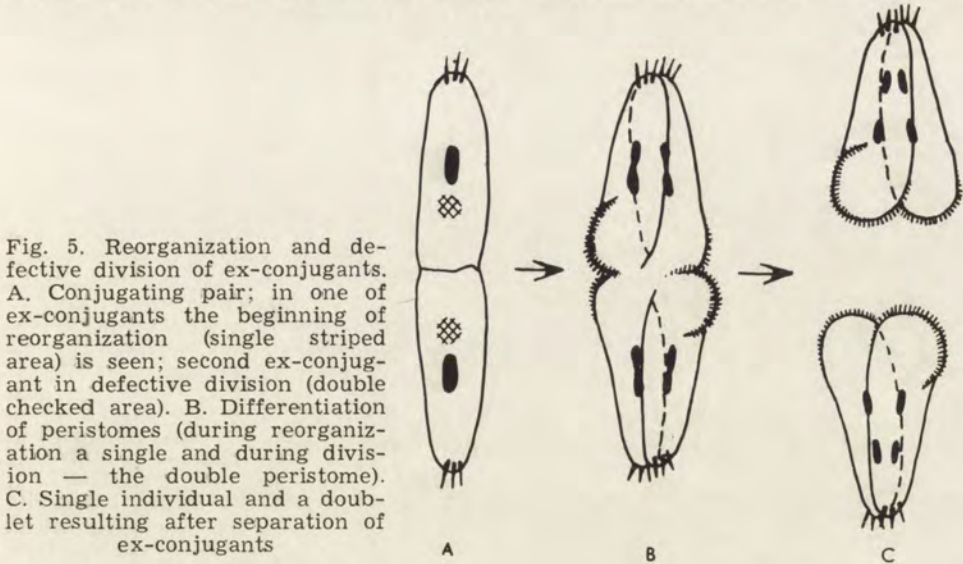


Fig. 5. Reorganization and defective division of ex-conjugants. A. Conjugating pair; in one of ex-conjugants the beginning of reorganization (single striped area) is seen; second ex-conjugant in defective division (double checked area). B. Differentiation of peristomes (during reorganization a single and during division — the double peristome). C. Single individual and a doublet resulting after separation of ex-conjugants

Formation of incomplete doublets

In those cases when the duplication of cirri systems failed to occur together with the duplication of the peristomes — incomplete doublets were formed with a quadruple cirri system and with two peristomes fused together. Like in the case of incomplete reorganisation this form was not durable. After approximately 2—3 hrs., a single organization area arose, followed by reorganization in which old cirri were resorbed. In consequence, a single individual was formed (Fig. 6 A—D).

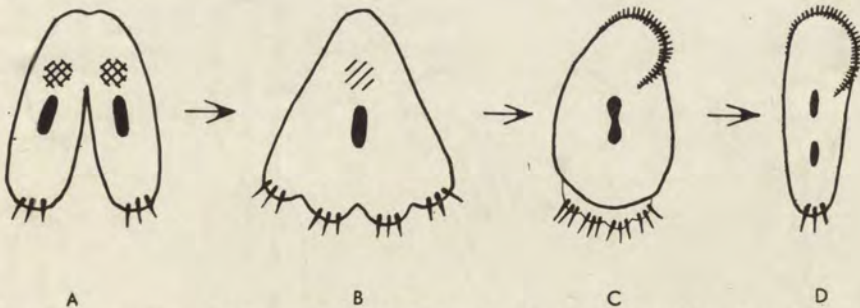


Fig. 6. Formation of incomplete doublets. A. Conjugating pair; formation of division areas (checked). B. Fusion of ex-conjugants and formation of incomplete doublets with quadruple system of cirri and a double peristome (formed from two peristomes grown together during conjugation); beginning of reorganization and formation of the single organization area (striped). C. Conclusive phase of reorganization; detachment and resorption of the quadruple set of caudal cirri. D. Single individual after reorganization

Division of doublets

Approx. 24 hrs. after formation, the doublets divided transversally. In the case of a spontaneous formation of doublets division might occur sooner, already after 16–18 hrs. Division of Ma developed in both individuals synchronously. In effect a second generation of doublets was formed (Fig. 7A–C and Pl. I 3).

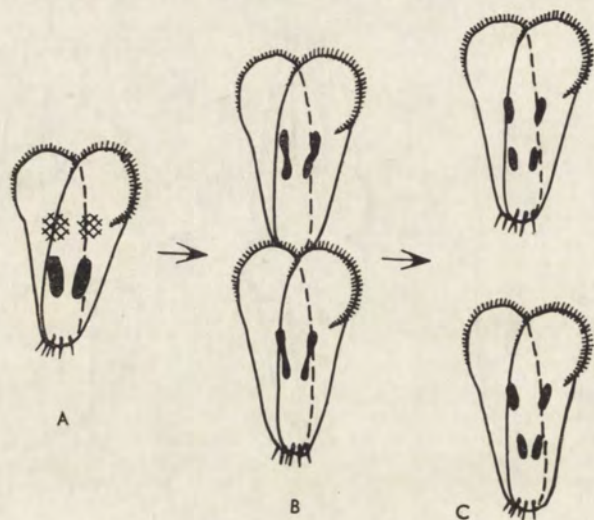


Fig. 7. Transverse division of homopolar doublets. A. Homopolar doublet. B. Doublet in transverse division. C. Doublets arising after transverse division

Return of doublets to the single form

Despite its relative stability, the double system showed a tendency of returning to the single form. In *Stylonychia* it was manifested by the gradual detaching of the double individuals along the main body axis from forward backwards. Reorganization of a regenerative type occurred soon after the final separation of two individuals (Fig. 8 A–D and Pl. I 4–6).

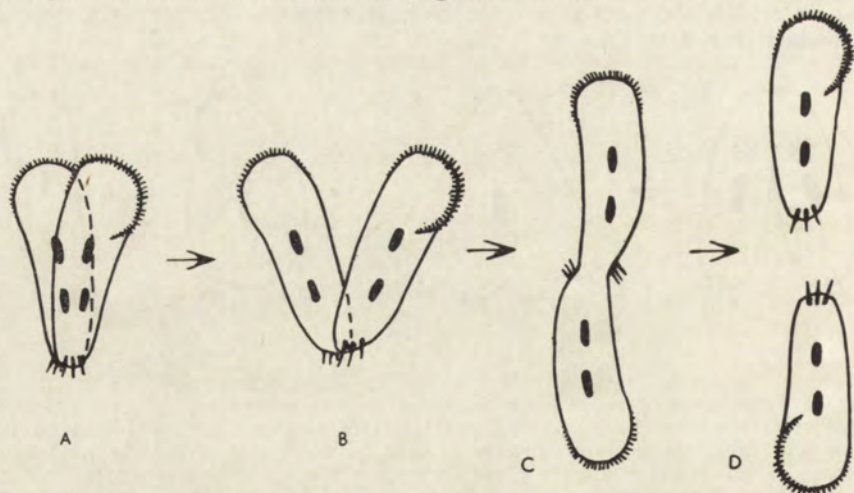


Fig. 8. Return of the doublet to the single form. A–D. Successive phases of fission of doublet along the body axis, from forward backwards

Multiplication of doublets

Division may occur at various stages of the doublet formation. If it appeared at the final stage of doublet fission, a group of 4 individuals was produced, in linear arrangement of pairs oriented in two opposite directions (Fig. 9 A—D and Pl. I 7).

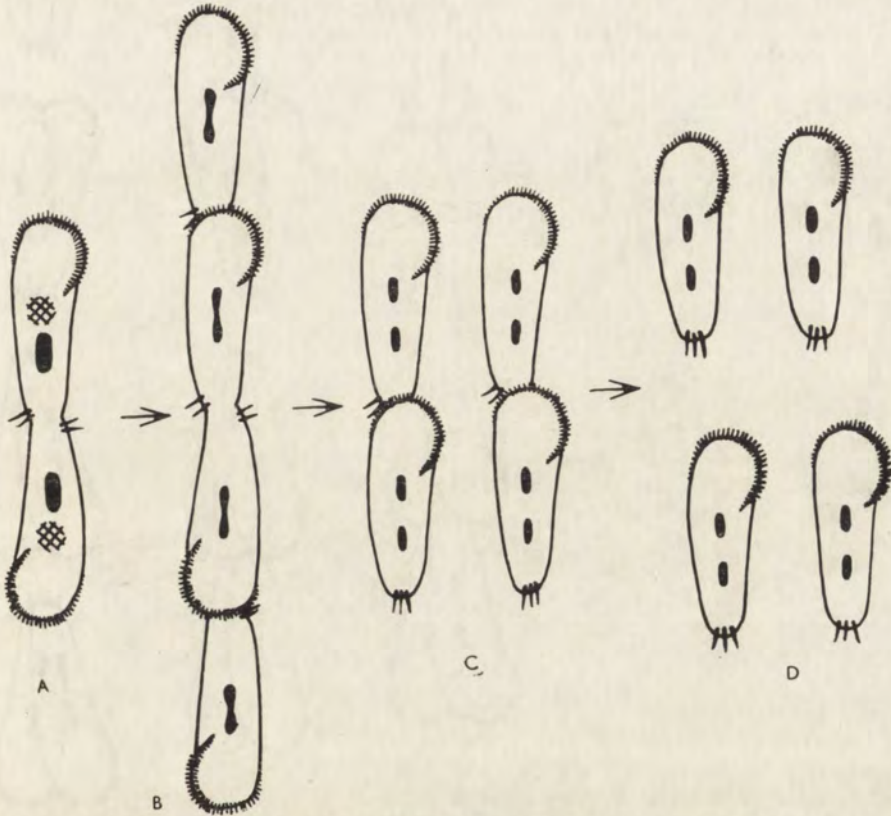


Fig. 9. Transverse division during the fission of the doublet along the body axis. A. Doublet in the conclusive phase of fission along the axis B. Transverse division C—D. Successive phases of detachment of single individuals

In this phase defective divisions could also occur, producing in effect two secondary doublets, joined together with their posterior poles. Those doublets in turn, might divide transversally producing a transitory system of 4 doublets oriented in pairs (4 individuals) in two opposite directions.

Doublets became detached, initially in junctions of the individuals of the primary doublet, producing 2 pairs of doublets. Subsequently the division of the secondary doublet was completed (Fig. 10 A—E).

Discussion

The doublets of *Stylonychia mytilus* investigated in the present study appeared spontaneously. However the factor evoking this phenomenon has

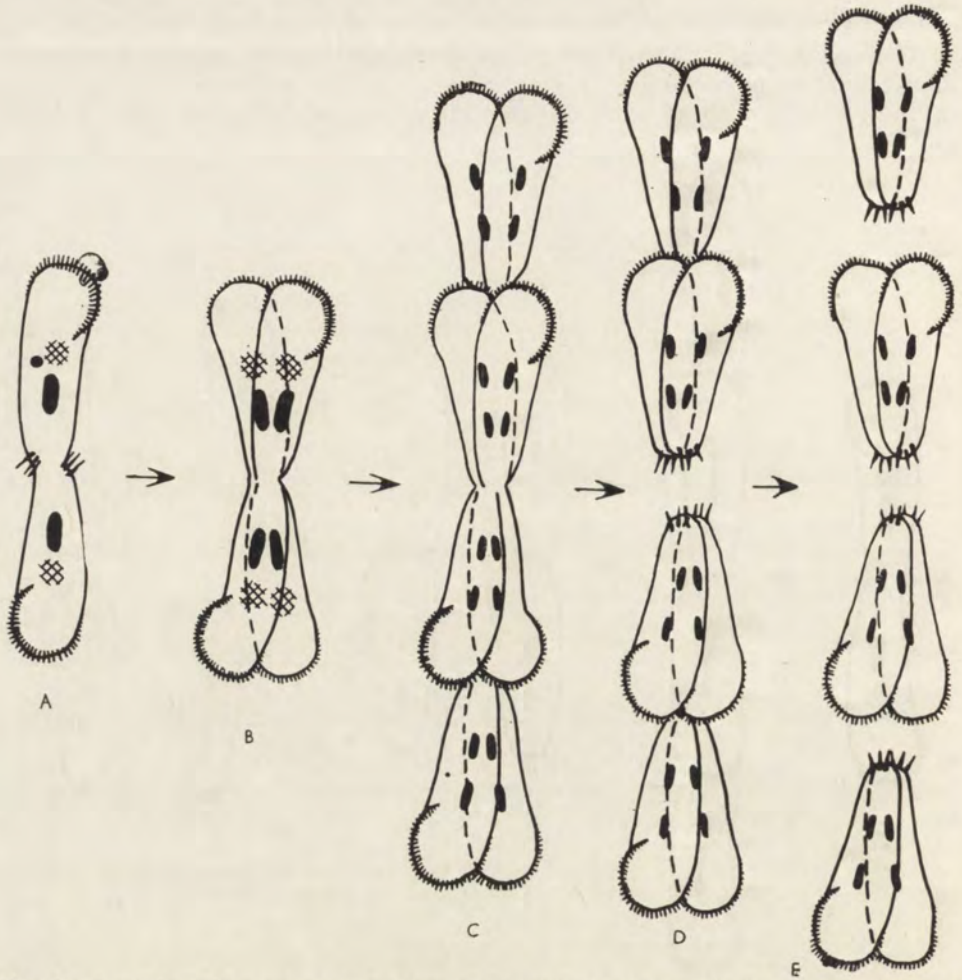


Fig. 10. Secondary formation of doublets. A. Doublet in the conclusive phase of fission along the axis. B. Defective division of two individuals of the primary doublet and formation of the secondary doublet. C. Transverse division of the secondary doublets. D—E. Detachment of doublets after the transverse division

not been as yet detected, it could be stated that the doublets arose as effect of some disturbances in the conjugation and division processes.

The mechanism of doublet formation consists according to Fauré-Fremiet 1948 in inhibition of division at a moment when the network of kineties had already been formed. In this case the division furrow fails to appear, and the proter and opisthe being just formed, shift from their mutual positions along the body axis producing in effect a doublet. Kimball 1941 presents a presumable course of this process in *Euplotes* in which the distinctly differentiated daughter individuals shift with respect to one another. In *Stylylonychia* the formation of doublets (similarly like division and regeneration) develop simultaneously with a fundamental reconstruction of the whole cell. The changes in the nuclear apparatus are accompanied by reorganization of

the cirri system: the old set had been resorbed and replaced by another newly-formed. Differentiation of the new peristomes occurred simultaneously in both daughter-individuals, even at the same level. After reorganization of the nuclear apparatus two pairs of Ma appeared, disposed at the same transverse plane in both individuals.

The doublet system, despite its rather long-lasting stability, shows a tendency of returning to the single form. Regulation may occur either by resorption of the double systems (as e.g. in *Leucophrys* — Fauré-Fremiet 1948 b) or by separation of the single individuals (as in *Euplotes* — Kimball 1941). In *Stylonychia* both paths of return to the single form are observed. Resorption of the double system and fusion of both cells occurred in the incomplete doublets with the double cirri system and no duplication of the single form by means of separation of its individuals along the longitudinal body axis, from the anterior pole backwards. In *Stylonychia*, the separation of doublets occurred independently from the transverse divisions.

In *Stylonychia* the regulation and division processes are similar in their general outline to the regeneration and post-starvation reorganizing processes described by Dembowska 1925 and 1938, and also to the changes occurring in division process of *Stylonychia* (Wallengren 1901).

In all those cases, one or two organization areas arise depending on the nature of the process. The whole cirri system is reconstructed and arises anew.

The present article is an introduction to further study in doublets which present a favorable material for the analysis of division and regeneration processes in ciliates.

Summary

A spontaneous occurrence of homopolar post-conjugation doublets in *Stylonychia mytilus* was observed. The doublets consisted of two cells grown together by their dorsal surfaces. The shape, proportions and cirri system of those doublets were corresponding to those characters in the normal individuals. The doublets divided transversally producing a generation of new doublets. Multiple doublets could also occur. The return of doublets to the single form occurred by means of their separation along the body axis.

STRESZCZENIE

Stwierdzono w hodowli *Stylonychia mytilus* spontaniczne pojawienie się dubletów homopolarnych po koniugacji. Dublety zbudowane były z dwóch komórek zrosniętych ze sobą stroną dorsalną, mających kształt, proporcje i układ cirri odpowiadające osobnikom normalnym. Dublety dzieliły się poprzecznie, dając pokolenie dalszych dubletów; mogły też powstawać dublety zwielokrotnione. Powrót dubletu do postaci pojedynczej następował w drodze rozdzielania się dubletu wzdłuż osi ciała.

REFERENCES

- Balbiani E. G. 1891: Sur la formation des monstres doubles chez les infusoires. J. Anat. Physiol. 27, 169—196.
Calkins G. N. 1911: Effects produced by cutting *Paramecium* cells. Biol. Bull. 21, 36—72.
Calkins G. N. 1925: *Uroleptus mobilis*. V. The history of double organism. J. Exp. Zool. 41, 191—213.

- Chen T. T. 1940: Polyploidy and its origin in *Paramecium*. J. Hered. 31, 175—184.
- Dawson J. A. 1920: An experimental study of an amiconucleate *Oxytricha*. II. The formation of double animals or "twins". J. Exp. Zool. 30, 129—157.
- Dembowska W. S. 1925: Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*. Arch. Micr. Anat. 104, 185—209.
- Dembowska W. S. 1938: Körperreorganisation von *Stylonychia mytilus* beim Hungern. Arch. Protistenk. 91, 89—105.
- Fauré-Fremiet E. 1945: Duplicité homopolaire et symétrie chez les *Urostyla*. C. R. Soc. Biol. 139, 637.
- Fauré-Fremiet E. 1948a: Les mécanismes de la morphogénèse chez les Ciliés. Folia Biotheoretica 3, 25—58.
- Fauré-Fremiet E. 1948b: Doublets homopolaires et regulation morphogénétique chez le Cilié *Leucophrys patula*. Arch. Anat. Micr. Morph. Exp. 37, 183—203.
- Grell K. G. 1951: Die Paarungsreaktion von *Stylonychia mytilus* Müller. Z. Naturf., 6b, 45—47.
- Hanson E. D. 1962: Morphogenesis and regeneration of oral structures in *Paramecium aurelia*: An analysis of infracellular development. J. Exp. Zool. 150, 45—65.
- Katashima R. 1953: Studies on *Euplotes*. II. Macronuclear reorganization process, double and giant animals resulted from two-united exconjugants. J. Sci. Hiroshima Univ. 14, 57—66.
- Kimball R. F. 1941: Double animals and amiconucleate animals in *Euplotes patella* with particular reference to their conjugation. J. Exp. Zool. 86, 1—32.
- Lichtenberg E. 1955: Untersuchungen über die Auslösung der Koniugation und das Überleben der Exkoniuganten bei *Stylonychia mytilus*. Arch. Protistenk. 100, 378—394.
- Lloyd L. 1948: Induced and spontaneous abnormality in Ciliates. Nature 162, 188.
- Lloyd L. 1949: Induced and spontaneous abnormalities in *Paramecium*. Proc. Leeds Phil. Lit. Soc. Sci. Sect. 5, 140—154.
- Párducz B. 1952: Uj györgritő eljárás a volykutatás ésaktátos szalgásatában. Ann. Muz. Nat. Hung. 2, 5—12.
- Sonneborn T. M. 1932: Experimental production of chains and its genetic consequences in the ciliate protozoan, *Colpidium campylum* (Stokes). Biol. Bull. 63, 187—211.
- Sonneborn T. M. 1963: Does preformed cell structure play an essential role in cell heredity? In: The nature of biological diversity (ed. J. M. Allen). McGraw-Hill Publ. 165—221.
- Wallengren H. F. S. 1901: Zur Kenntnis des Neubildungs und Resorptionsprozesse bei der Teilung der Hypotrichen Infusorien. Zool. Jahrb. Abt. Anat. 15, 1—58.
- Wichterman R. 1951a: The effects of X-rays upon dividing and non-dividing cells of *Paramecium caudatum*. Biol. Bull. 101, 232.
- Wichterman R. 1951b: The effects of X-rays upon conjugant and vegetative stages of *Paramecium calkinsi*. Biol. Bull. 101, 232—233.

EXPLANATION OF THE PLATE I

- 1: Formation of doublets. Two newly formed peristomes are seen. (Párducz's haematoxylin stain)
- 2: Homopolar doublet of *Stylonychia mytilus*. (From living material, phase contrasting optics)
- 3: Cross section of the doublet. (Living material, phase contrast)
- 4—6: Doublet return to the single form. Successive phases of fission of the doublet along the body axis. (4 and 5 after Párducz's haematoxylin staining; 6 from living material, phase contrast)
- 7: Transverse division of the doublet in the conclusive phase of fission along the body axis. (Living material, phase contrast)



1



4



2



5



3



6



7

I. Totwen-Nowakowska

auctor phot.

Centre de Biologie cellulaire, Clermont-Ferrand, 1 Av. Vercingétorix

Pierre de PUYTORAC

Quelques aspects de l'ultrastructure du Cilié: *Prorodon viridis* Ehrbg. Kahl

Some aspects of the fine structure of the Ciliate:
Prorodon viridis Ehrbg. Kahl

En dehors des travaux de Rouiller, Fauré-Fremiet et Gauchery 1956, de Fauré-Fremiet 1962 et de Kaneda 1962, aucune étude au microscope électronique n'a été signalée sur l'ultrastructure des Ciliés Gymnostomes. Cependant, comme le souligne Pitelka 1963, il est particulièrement intéressant, pour des comparaisons, d'avoir des données précises sur l'ultrastructure de ces Infusoires que l'on tient généralement pour la souche ancestrale des autres Ordres. Parmi les Gymnostomes, les *Prorodon*, de forme ovoïde, à symétrie axiale, bouche apicale apparemment simple, ciliature uniforme, cinéties méridiennes bipolaires régulièrement espacées, qui étaient considérés comme le type même de Cilié primitif, ont pourtant été sortis du groupe des *Rhabdophorina* et classés par Fauré-Fremiet 1961, dans les *Cyrtophorina*, d'après leur armature pharyngienne relativement complexe. Nous avons donc poursuivi au microscope électronique des recherches sur ce genre, par l'examen d'une espèce à chlorelles symbiotiques: *Prorodon viridis* Ehrbg. Kahl, 1927, de morphologie générale caractéristique du genre et de 140—160 μ de longueur sur 70—50 μ de largeur.

Techniques

Les Ciliés provenant d'une riche culture, fixés pendant 30 minutes dans le tetroxyde d'osmium à 2%, incorporés à la gélose, ont été déshydratés puis inclus avec l'Epon 812. Les coupes, colorées à l'acétate de plomb ou à l'acétate d'uranyle ont été examinées au microscope RCA EMU 3D¹ et Siemens Elmiskop I.

Observations

Cytoplasme

L'enveloppe de revêtement de la cellule est constituée par la double membrane pelliculaire qui se poursuit le long des cils et qui est doublée, à une

¹ Nous adressons nos remerciements à Mr. le Professeur P. P. Grassé pour son aimable accueil au Laboratoire de Microscope Electronique du C. N. R. S.

distance de l'ordre de 120—150 Å, par la membrane plasmique (Pl. I 1). Celle-ci forme une structure annulaire autour de l'extrémité distale des cinéto-somes, puis elle se replie le long des crêtes de l'ectoplasme. Dans l'espace ainsi circonscrit par la membrane plasmique, se dépose une substance granulo-filamenteuse dense, contrastée, dont la partie profonde contient des granules irréguliers, sombres, ayant jusqu'à 50 μ de diamètre. Ce dépôt, dont l'épaisseur peut atteindre 550 μ donne au cortex un aspect caractéristique (Pl. I 1, 2). Les cils, de 340—360 μ de diamètre, sont implantés dans des sillons limités par de fortes crêtes ectoplasmiques, longitudinales, réunies par des anastomoses transversales qui compartimentent chaque cil ou des groupes de 2 cils seulement (Pl. III 4).

Les fibres centrales du cil se fixent sur un axosome lenticulaire de 76 μ de diamètre environ, inclus dans la concavité d'un septum. A 58—60 μ de distance de ce dernier, le cinétosome, de 590—600 μ de hauteur, porte un double diaphragme annulaire, formé de 2 éléments distincts, différents, espacés de 20 μ (Pl. I 1).

De la base des cinéto-somes et à leur gauche, part un rideau de 13 à 15 fibres tubulaires, de 140 Å de diamètre, obliquement dirigées vers la surface.

À la droite des cinéto-somes, longeant les fibres cinéto-somales, sont alignées, parallèlement aux cinéties, des canalicules de 990 à 1500 μ de diamètre (Pl. I 2 et II 3). Ils sont pourvus d'une membrane limitante interne, doublée, sur une partie seulement de sa surface, par une enveloppe de 20 à 45 fibrilles longitudinales (Pl. I 2), de 120—140 Å de diamètre, régulièrement juxtaposées, et semblant réunies les unes aux autres par un tractus osmiophile. Autour de ces canaux superficiels, sont des petits tubules anastomosés, à paroi contrastée et qui passent au reticulum endoplasmique (Pl. II 3).

À la base des crêtes ectoplasmiques est étalée une strate de microfibrilles, épaisse de 80 μ environ (Pl. II 3). Au pourtour de la bouche, les côtes sont plus hautes, plus étroites, et les images de trichocystes toxiques sont assez fréquentes. Ces derniers, en forme de bâtonnets de 4 μ de long sur 210 μ environ de large, sont inclus dans une vacuole à membrane limitante interne (Pl. I 2). Ils sont constitués d'une capsule externe épaisse, enfermant un tube longitudinal qui contient lui-même un organite axial (Pl. III 4). La paroi capsulaire granulo-filamenteuse devient plus transparente aux électrons dans la partie antérieure du trichocyste, tandis qu'au contraire, s'épaissit la paroi du tube interne, avant qu'elle se soude à l'enveloppe. La paroi du tube interne est complexe et formée, au moins, de 3 couches superposées différentes. Quant à l'organite axial, il paraît également hétérogène. La pointe des toxicystes affleure sous l'enveloppe de revêtement de la cellule, au niveau des crêtes intercalées entre les rangées ciliaires (Pl. I 2).

Armature pharyngienne

Elle est constituée par 25 couples de némadesmes (Pl. IV 5 et V 6). Chaque couple est lui-même formé par l'association de 2 éléments juxtaposés. Chacun de ces éléments, de section transversale pentagonale, résulte de l'organisation en une structure quasi-cristalline de 15 à 22 plans longitudinaux de 3 à 28 fibres tubulaires, longitudinales, de 120—125 Å de diamètre. Les fibres ont une structure périodique qui pourrait résulter de la spiralisation de fibrilles constitutives (Pl. VI 8).

Les 2 trichites associés en un couple sont reliés entre eux dans leur portion apicale par un tractus épais de structure différente de celle des némadesmes (Pl. III 4 et VII 10). Ils sont coiffés en outre par des pièces antérieures où aboutissent des fibres puissantes en relation avec les cinétosomes (Pl. VIII 11).

Le cytotome est limité par l'enveloppe de revêtement de la cellule, très plissée, les rideaux de fibres longitudinales précédemment signalées, persistant toujours à ce niveau. En profondeur, le dépôt de substance dense corticale disparaît et le cytotome n'est plus circonscrit que par une membrane doublée de quelques fibrilles tubulaires.

En s'enfonçant dans le cytoplasme, la nasse délimite un canal pharyngien rempli de ce cytoplasme alvéolaire particulier auquel Fauré-Frémiet a donné le nom de phagoplasme (Pl. IV 5 et V 6), et qui contient des vésicules ou des tubules à double paroi, et renfermant fréquemment des inclusions.

Discussion

En dépit d'une immédiate apparence, l'enveloppe de revêtement de la cellule est du type habituel chez les Hyménostomes en particulier, et chez beaucoup de Ciliés Holotriches. Le dépôt de la substance corticale contrastée se fait, en effet, sur l'emplacement de la couche dite alvéolaire (Pitelka 1963) présente chez ces Infusoires (*Paramecium*: Sedar and Porter 1955, Ehret and Powers 1959, Cheissin 1963; *Tetrahymena* et *Colpidium*: Pitelka 1961, Cheissin and Mossevitich 1962; *Paranassula*: Fauré-Frémiet 1962; *Anoplophrya*: de Puytorac 1961; *Ophryoglena*: Roque, de Puytorac et Savoie 1964). La présence de fibres tubulaires, régulièrement juxtaposées, contigues à la base des cinétosomes et remontant obliquement vers l'enveloppe de revêtement de la cellule, se retrouve chez *Prorodon* comme chez *Colpidium* (fibres postciliaires de Pitelka 1961), comme chez *Didinium* (de Puytorac, inédit) où elles sont encore plus importantes. Mises en évidence chez divers Ciliés astomes (de Puytorac 1959—63), elles sont également très développées chez les Ophryoglènes (Roque, de Puytorac et Savoie 1964).

Par contre, l'existence des canaux longeant régulièrement les cinéties et entourés de canalicules évoquant le „spongiome” des vacuoles contractiles, est une particularité de *Prorodon* à retenir, aucune disposition semblable n'ayant été décrité chez des Ciliés.

Il est à remarquer qu'à la base des cinétosomes, n'existent pas des couches fibrillaires comme chez les Ciliés astomes (de Puytorac 1959—63) ou chez divers Ciliés parasites. Il n'y a donc pas à ce niveau une limite nette entre l'ectoplasme et l'endoplasme. C'est ce qui est également réalisé chez les *Colpidium* et les *Ophryoglena* (Roque, de Puytorac et Savoie 1964).

L'observation de photographies électroniques permet d'affirmer que des trichocystes toxiques sont présents autour de la région antérieure, chez *Prorodon viridis*. Ils ont la même structure générale que les longs toxicystes du rostre des *Didinium* (Pl. V 7). Elle correspond dans l'ensemble, mais en plus complexe, au schéma qu'a signalé Fauré-Frémiet 1959, chez divers *Rhabdophorina*.

Il y a une enveloppe capsulaire, contenant un tube invaginé, à paroi complexe, et renfermant lui-même un organite central structuré. Cette architecture générale rappelle celle des capsules polaires des Actinomyxidies (de

Puytorac 1963), où le filament tubulaire invaginé contient également une baguette axiale. Dans la lumière du filament polaire invaginé des spores de certaines Microsporidies (*Mrazekia* — de Puytorac 1962) se tient aussi une substance figurée. Le fonctionnement de ces trichocystes toxiques paraît donc bien du même type que la dévagination du filament des Sporidies ou des nématocystes de Coelentérés.

La structure bucco-pharyngienne, enfin, retient l'attention. Les némadesmes constituent un organe bien défini, d'architecture relativement complexe, notamment vers son extrémité antérieure, apicale. L'association des némadesmes par couples ne semble pas se retrouver chez les *Coleps* (Rouiller, Fauré-Frémiet et Gauchery 1956). Elle n'existe pas dans la nasse de *Chlamydodon pedarius* (Kameda 1962). Elle ne serait, par contre, pas impossible chez certaines *Nassula*.

Les organites de *Prorodon* coiffant les némadesmes qui les prolongent en profondeur, jouent peut-être un rôle analogue à celui des trichites triangulaires des *Chlamydodon*, connectés avec les trichites allongés. D'autre part, les tractus fibreux de *Prorodon* sont peut-être l'équivalent de l'anneau fibreux de *Paranassula*.

Enfin, sont à noter les relations très précises des fibres du sommet des némadesmes avec les cinétosomes. Ces fibres apparaissent comme des racines ciliaires d'un mode particulier.

Résumé

Les observations au microscope électronique de *Prorodon viridis* démontrent l'existence de canaux longeant régulièrement chaque cinétie et bordés sur une partie de leur surface par des fibres, la présence de toxicystes, la complexité de l'architecture des némadesmes dans la réalisation d'une nasse. Les trichocystes toxiques ont la même structure que ceux des *Didinium*, avec une capsule externe, un tube invaginé à paroi complexe, un organite axial dans la lumière du tube. Les némadesmes sont associés par couples, dont les 2 éléments constitutifs sont réunis à leur partie antérieure et coiffés par des pièces particulières où aboutissent des fibres en étroite relation avec les cinétosomes.

SUMMARY

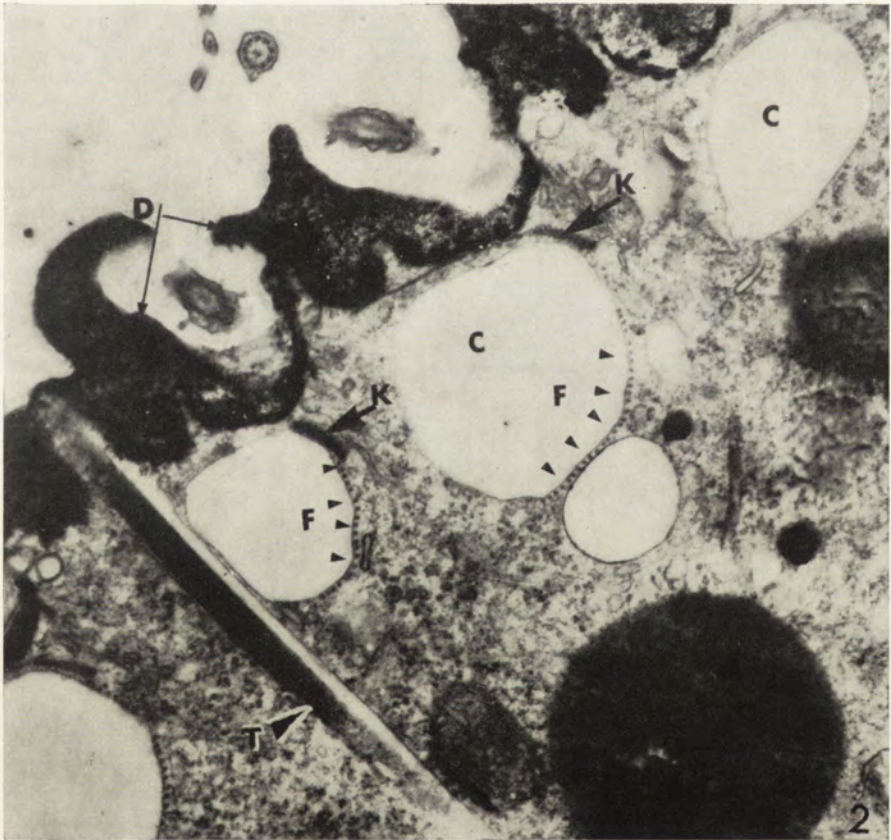
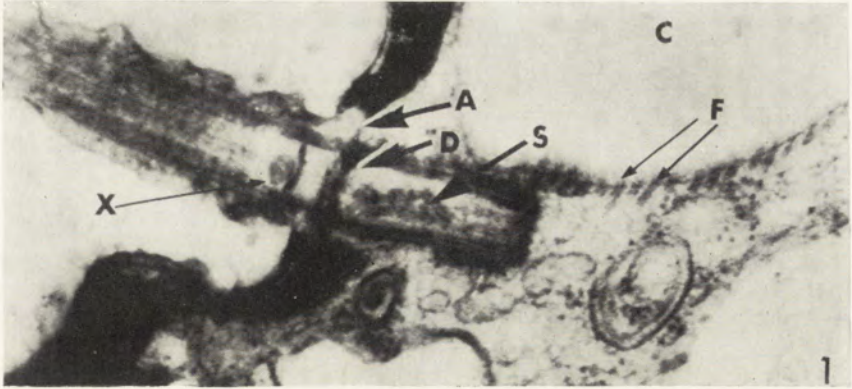
Observations of *Prorodon viridis* with electron microscope demonstrate existence of canals running, regularly along each kinety and bordered by fibrils on a part of their outside, presence of toxicysts, complexity of „nemadesmes” architecture in the building of „basket”. Toxicysts have the same structure as in *Didinium*, with outer capsule, intruded cylindrical tube, and central core in the tubular element. „Nemadesmes” are associated in pairs, elements of which are joined at their anterior part, and topped by particular pieces where are tending fibrils connected with kinetosomes.

BIBLIOGRAPHIE

- Cheissin E. and Mossevitch T. 1962: An electron microscope study of *Colpidium colpoda* (Ciliata, Holotricha). Arch. Protistenk. 106, 181—200.
- Ehret C. and Powers E. 1959: The cell surface of *Paramecium*. Int. Rev. Cytol. 8, 97—133.
- Fauré-Fremiet E. 1961: Les Ciliés *Cyrtophorina* et leur diversification morphologique. C. R. Acad. Sci. 252, 3912—3916.
- Fauré-Fremiet E. 1962: Le genre *Paranassula* Kahl (Ciliata, *Cyrtophorina*). Cahiers Biol. Mar. 3, 61—77.
- Kaneda M. 1962: Fine structure of the oral apparatus of the Gymnostome Ciliate *Chlamydodon pedarius*. J. Protozool. 9, 188—195.
- Pitelka D. 1961: Fine structure of the silverline and fibrillar systems of the Tetrahymenid ciliates. J. Protozool. 8, 75—89.
- Pitelka D. 1963: Electron microscopic structure of Protozoa. Pergamon Press.
- Puytorac P. de 1961 a: Complément à l'étude de l'ultrastructure des Ciliés du genre *Metaradiophrya* Heid 1935. Arch. Anat. Microsc. Morphol. exp. 50, 35—49.
- Puytorac P. de 1961 b: Observations sur l'ultrastructure d'*Anoplophrya commune* de Puyt., Cilié parasite du Ver *Eophila savigny* (G. et M.). C. R. Soc. Biol. 155, 783—785.
- Puytorac P. de 1962: Observations sur l'ultrastructure de la Microsporidie *Mrazekia lumbriculi* Jirovec. J. Microsc. 1, 39—46.
- Puytorac P. de 1963 a: Observations sur l'ultrastructure du Cilié astome *Mesnilella trispiculata* K. J. Microsc. 2, 189—196.
- Puytorac P. de 1963 b: Contribution à l'étude des Ciliés astomes: *Haptophryidae* Cépède 1963 (Cytologie, ultrastructure, taxonomie). Ann. Sci. Nat. Zool. 12 e S., 5, 12—14.
- Puytorac P. de 1963 c: L'ultrastructure des cnidocystes de l'Actinomyxidie *Sphaeractinomyxon amanieni* sp. nov. C. R. Acad. Sci. 256, 1594—1596.
- Roque M., Puytorac P. de et Savoie R. 1964: *Ophryoglena bacterocaryon* sp. n., Cilié Holotriche Peniculien. (Cytologie, ultrastructure, cycle). Arch. Zool. exp. gen. (sous presse).
- Rouiller C., Fauré-Fremiet E. and Gauchery M. 1956: The pharyngeal protein fibers of the ciliates. Proc. Stockholm Conf. Electron Microsc. 216—218.
- Sedar A. and Porter K. 1955: The fine structure of cortical components of *Paramecium multimicronucleatum*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 583—604.

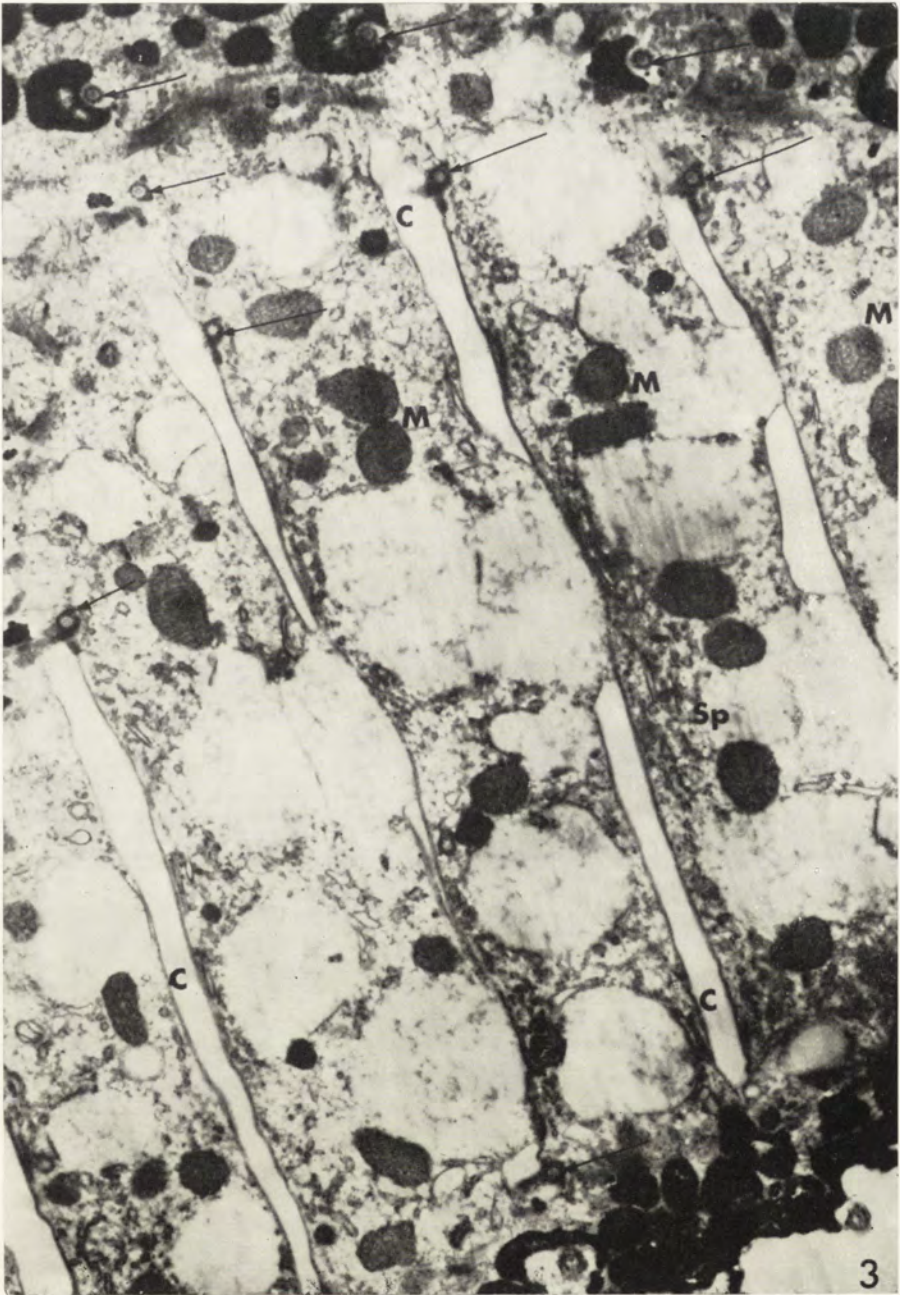
EXPLICATION DES PLANCHES I—VIII

- 1: Coupe longitudinale d'un cil et de son cinétosome, montrant les fibres centrales, l'axosome (X) sus-jacent à un septum concave, le double diaphragme (D) du cinétosome, l'anneau (A) formé par la membrane plasmique autour du cinétosome, la substance figurée (S) dans l'espace circonscrit par les fibrilles cinétosomiennes. Contre le cinétosome, vue d'une partie d'un canal (C) coupé transversalement et dont la paroi est doublée par des fibrilles (F) alignées ($\times 52\,900$).
- 2: Coupe transversale de *Prorodon* montrant la section longitudinale d'un toxicyste (T) et 4 canaux (C) longeant respectivement 4 cinéties dont on reconnaît les cinétodesmes (K). A remarquer que la membrane interne de chaque canal n'est doublée de fines fibrilles tubulaires (F) que sur une partie de son pourtour; D — dépôt cortical ($\times 23\,000$).
- 3: Coupe tangentielle à la surface de *Prorodon* montrant des sections longitudinales de 5 canaux (C) longeant les cinéties dont les cinétosomes sont indiqués par des flèches; S — strate fibrillaire située à la base des crêtes ectoplasmiques; SC — lacs de tubules autour des canaux; M — mitochondries ($\times 9\,700$).
- 4: Coupe tangentielle de la région apicale de *Prorodon*, montrant le système de crêtes ectoplasmiques compartimentant les cils, la présence de toxicystes (TY) dans l'aire buccale, les plissements du cortex autour du cytostome (B), quelques némademes (N), les pièces qui les surmontent (A) et les tractus fibrillaires (TF) qui y aboutissent ($\times 12\,600$).
- 5: Coupe oblique de la nasse, montrant la disposition concentrique des némademes (N), leur association par couple de 2, le cytoplasme limité par la nasse (phagoplasme) avec ses canalicules et vésicules (00) à inclusions ($\times 30\,000$).
- 6: Coupe longitudinale de la nasse, montrant les némademes plongeant dans le cytoplasme, associés par 2, leur réunion antérieure (T), les pièces qui les surmontent (A) le cytostome (B) ($\times 10\,000$).
- 7: Coupes transversales de toxicystes du rostre de *Didinium*. Chacun d'eux inclus dans une vacuole limitée par une membrane, est constitué d'une capsule externe (Cp), d'un tube invaginé (T) et d'un organite axial (CC) ($\times 27\,000$).
- 8: Coupe longitudinale de némademes montrant les fibres tubulaires constitutives ($\times 86\,400$).
- 9: Coupe transversale de némademes montrant la disposition des fibres tubulaires ($\times 86\,400$).
- 10: Coupe oblique du sommet d'un némademe (N) montrant une des 2 pièces sus-jacentes (A) et les tractus fibreux (TP) qui y aboutissent; B — cytostome ($\times 93\,600$).
- 11: Coupe oblique du sommet de la nasse montrant 2 pièces apicales (A), la connexion entre l'une d'elles et un cinétosome (C), les tractus fibreux (TB) ($\times 93\,600$).



P. de Puytorac

auctor phot.



P. de Puytorac

auctor phot.



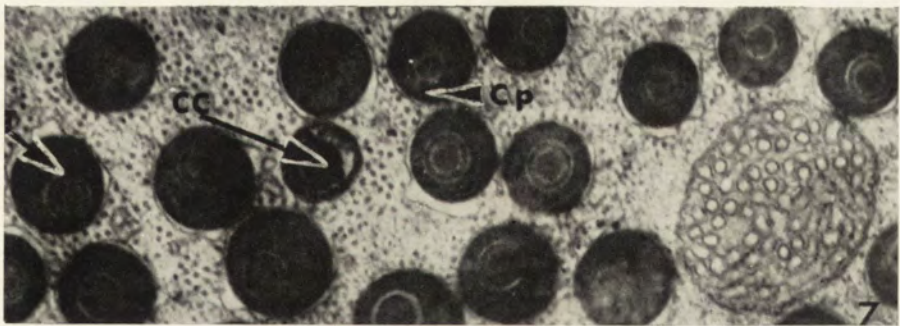
P. de Puytorac

auctor phot.



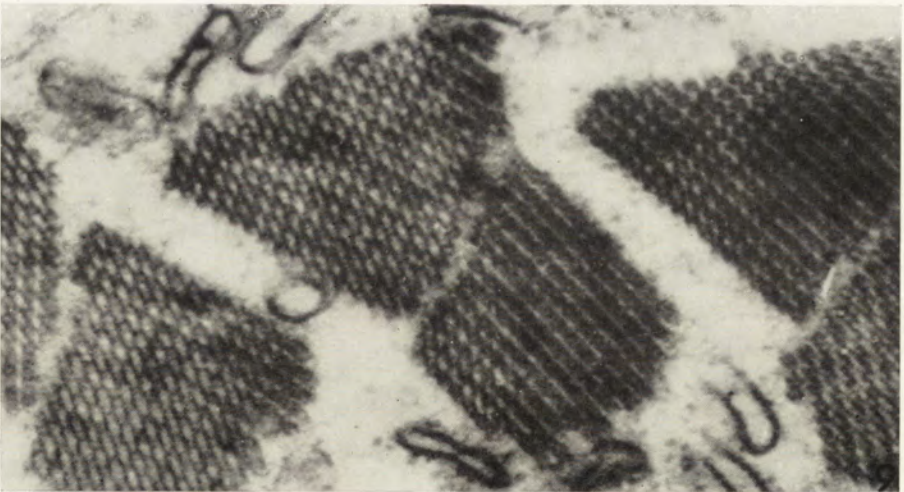
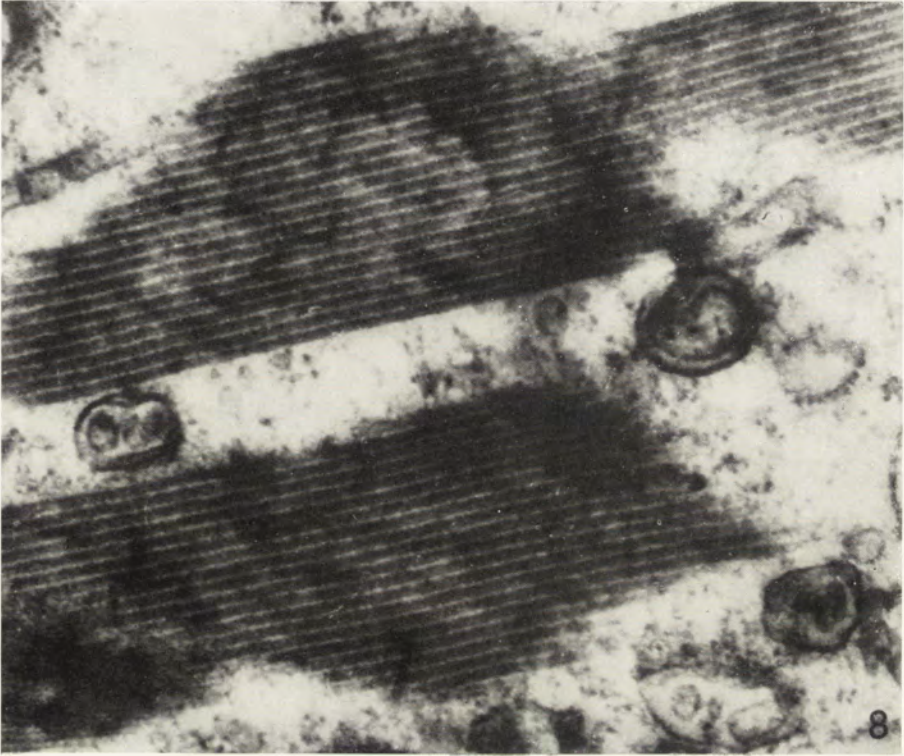
P. de Puytorac

auctor phot.



P. de Puytorac

auctor phot.



P. de Puytorac

auctor phot.



P. de Puytorac

auctor phot.



P. de Puytorac

auctor phot.

Maria WOLSKA

Infraciliature of *Didesmis ovalis* Fior. and *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) — fam. *Buetschliidae* (*Ciliata*, *Rhabdophorina*)

Infraciliatura *Didesmis ovalis* Fior. i *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) — fam. *Buetschliidae* (*Ciliata*, *Rhabdophorina*)

Species belonging to the genera *Didesmis* Fiorentini and *Blepharozoum* Gassowsky are representatives of the symbiotic fauna of horse coecum.

In the material obtained from horses of the Łódź province, supplied by the slaughterhouse of Łódź, the species *Didesmis ovalis* Fior. prevailed in the genus *Didesmis*. Another species of this genus — *D. quadrata* Fior. was much more scarce. Out of the two species of the genus *Blepharozoum* Gassowsky, only the species *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) was found in the investigated material.

The best results of silver impregnation gave the combination of Fernandez-Galiano 1959 and Chatton et Lwoff 1936 methods applied in the preceding study (Wolska 1963).

Didesmis ovalis Fiorentini, 1890

Genus *Didesmis* and species *D. ovalis* had been described by Fiorentini 1890; another species of this genus — *D. quadrata* was described in the same publication. Hsiung 1929 reported the new species — *D. spiralis*, however, Strielkow 1939 identified this new species as a form of species *D. quadrata*.

Didesmis ovalis Fior. (Fig 1 A) has a shape of a flattened cylinder with a distinct incision below the anterior pole. The body is tapering gradually at the posterior pole. On the anterior of the body, around the mouth, a group of cilia occupy the narrowed body part. A similar group of cilia surrounds the cytophyge on the opposite pole. The elongated Ma lies approx. in the centre of the body. Its long axis is oriented in line with the long body axis of the ciliate. The small Mi. adheres to the median part of Ma. Below the anterior ciliary group and laterally when the flattened side of the ciliate is observed, lies the vacuole with concretions ("Konkrementenvakuole" described by Dogiel 1929, considered by him and others as the equilibrium organelle). It forms a distinct convexity. Near the posterior pole, on the same side as the „Konkrementenvakuole" lies the contractile vacuole.

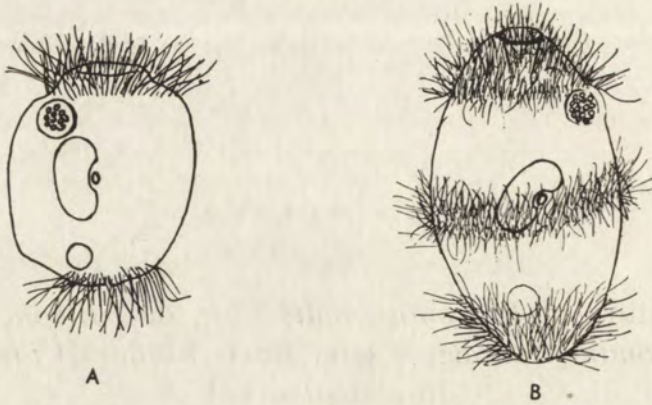


Fig. 1. General aspect of *Didesmis ovalis* (A) and *Blepharozoum trizonum* (B); magn. $\times 450$

Dimensions of the ciliate are: length 27μ — 63μ , width 19μ — 44μ . Measurements have been performed on the material fixed with formol, sampled from 3 horses.

After silver impregnation the infraciliature of *Didesmis ovalis* appears as it is represented in Fig. 2 A. The densely disposed, short, slightly spiralized kineties of the anterior body region converge on the edge of the oral opening, slightly bending inside on the broad margins. They correspond to the ciliated region. Around the very broad cytopyge converge also the short kineties, they fail however to produce a closed zone like in the case of the anterior kineties, but are split into two parts along the lines crossing the flat surfaces of the

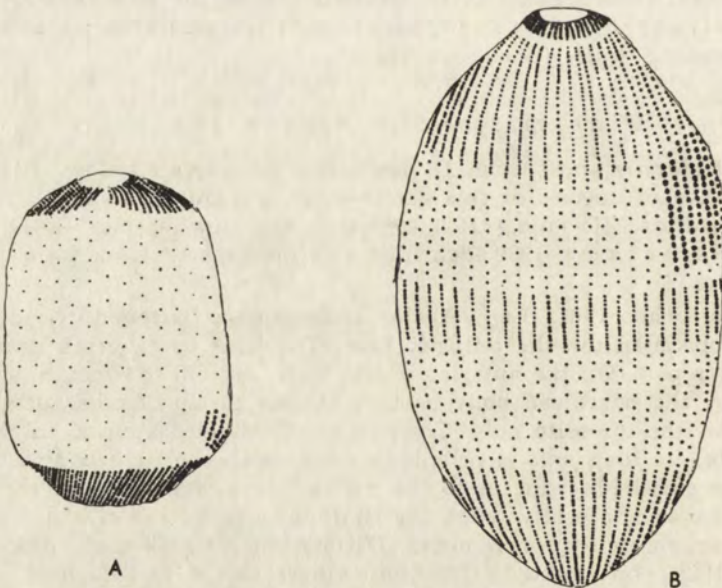


Fig. 2. Schematized system of kineties in *Didesmis ovalis* (A) and *Blepharozoum trizonum* (B)

ciliate (Pl. I 1). Those kineties correspond to the posterior ciliature. Faintly expressed kineties, without spiralization, less numerous than in the ciliated regions, and with largely spaced kinetosomes, run over the whole non-ciliated body region. On the convexity of the "Konkrementenvakuole", six strikingly distinct short kineties occur, each of them consisting of several very big, non-ciliated, kinetosomes (Pl. I 2). This group of kineties is fully isolated from the kineties of the anterior body part. It may be observed in the early division phases that those kineties are the prolongation of the anterior kineties of the opisthe.

Blepharozoum trizonum (Hsiung, 1930)

Gassowsky 1918 described the genus *Blepharozoum* with a single species *B. zonatum*, a parasite of the horse coecum. He reported that this protozoon is entirely ciliated, however during its motion the cilia adhere so strongly to the body surface in some spots (forming two rings) that the whole ciliature seems differentiated into 3 zones. The first ring seemingly deprived of cilia ("pervyj perehvat") arises approx. in the middle of the body; the second is dividing the posterior body part into two nearly equal moieties. Hsiung 1930 described the new genus *Alloiozoum* with the genus *A. trizona*. The ciliature of this protozoon consists of three zones separated from one another by two naked rings. Strielkow 1939 redescribed the genus *Blepharozoum* Gassowsky stating the existence of two non-ciliated zones seen on the cross section of the ciliate. For that reason he recognized the identity of the genus *Alloiozoum* Hsiung with the former genus *Blepharozoum* Gassowsky and, consequently, *Alloiozoum trizona* Hsiung was determined as *Blepharozoum trizonum* (Hsiung).

Blepharozoum trizonum (Hsiung) is an elongated ciliate tapering at both ends, circular in cross section (Fig. 1 B). Its length amounts 50—102 μ , the width 24—69 μ . The maximal width falls approx. on the middle of the body length. The oral opening lies terminally on the anterior pole; the cytopyge is also situated terminally, on the posterior body pole. Cilia cover the anterior and posterior region as well as a median not very broad girdle. Consequently, two naked rings exist: one in front of the median ciliated girdle, another behind it. The ovoid macronucleus has no fixed position, the micronucleus closely adheres to its median region. On the anterior body part protrudes the "Konkrementenvakuole" (Pl. II 1). One or two contractile vacuoles lie in the posterior body half. In the description of Strielkow 1939 some differentiation of the peristomal territory is mentioned. Strielkow writes that the very oral opening is surrounded by a differentiated ridge with short cilia ("... obosoblennym valikom s korotkimi resničkami"). In general, the ciliature is characterized by Strielkow as follows: only the anterior third part of the body is entirely covered by meridional ciliary rows, narrow ciliary zone surrounds the body somewhat lower than the middle of its length, the third tuft-like zone lies on the posterior body end.

The silver impregnation method reveals that all the kineties of the anterior part of the body continue their course across the whole body (Pl. I 3). The kinetosomes pattern in the parts corresponding to the non-ciliated rings is however much more loose than in the ciliated girdles. The anterior ciliated area is differentiated into two parallel zones separated from each other by a very narrow interstice which is reflected in the kineties pattern by the

space between the kinetosomes somewhat broader than usually. The anterior zone (the first one) forms a compact framework of the mouth (Fig. 2 B, Pl. I 4, II 8). The rows of the anterior ciliated kineties go posteriorly somewhat below the "Konkrementenvakuole" on both its sides (Pl. II 5). The ciliated anterior and posterior zones are very conspicuous owing to the dense location of kinetosomes (Pl. II 6).

On the protuberance of the "Konkrementenvakuole", on the level of the non-ciliated zone (like in *Didesmis ovalis*) several segments of kineties occur. They are distinguished by kinetosomes bigger than others lying on the same level (Pl. II 8).

Discussion

The ciliated rows of the anterior body part of *Didesmis ovalis* show spiralization. This phenomenon, rather frequent in parasites, is considered as an adaptation of the intestinal parasite to movement in the medium which offers a rather strong resistance (Raabe 1947).

In the anterior (ciliated) body part of *Blepharozoum trizonum*, the ciliature tends towards the reduction, for a narrow non-ciliated ring appears not far from the mouth. The gradual reduction of ciliature in the family *Buetschliidae* is indicated by Strelkow 1939 in a series of species, beginning with the fully ciliated *Holophryoides*, and concluding with *Buetschlia* in which the ciliature is reduced to a girdle around the buccal opening.

Both species described above keep some traces of the primary ciliature in the form of continuation of kineties on the non-ciliated body parts.¹ This agrees well with the rule of genetic continuity of kinetosomes (Chatton, Lwoff et Lwoff 1929), being however not a direct evidence of continuity. This problem is discussed by Grimstone 1961 and Raabe 1963.

As well in *Didesmis ovalis* as in *Blepharozoum trizonum* the characteristic group of kinetosomes on the surface of the „Konkrementenvakuole" is present. In *D. ovalis* those kinetosomes are entirely deprived of cilia and separated from the anterior ciliated zone. In *B. trizonum* their isolation from the anterior ciliated zone is not complete and a part of those kinetosomes seem to retain their cilia. According to Strelkow 1939 the "Konkrementenvakuole" is deprived of cilia. In some cases after silver impregnation, cilia are blackened as well. Then they are visible also on the "Konkrementenvakuole". Nevertheless it can be hardly decided whether all the cilia visualized on the level of the "Konkrementenvakuole" belong to the kinetosomes connected with this structure. Some of the cilia of the anterior zone might possibly adhere to the „Konkrementenvakuole". It may be postulated that the specialization of kinetosomes upon the "Konkrementenvakuole" and the loss of their primary function as basis of cilia, failed to proceed in *B. trizonum* as far as it occurred in *D. ovalis*. Neither has the reduction or the general ciliature reached such a high degree as in *D. ovalis*.

Formation of special kinetosomes spacially related with the "Konkrementenvakuole" suggests some functional connection between those structures. Pluripotence ascribed to kinetosomes (Weisz 1954) speaks in favour of this supposition.

¹ Probably Gassowsky 1918 observed the kinetosomes over the whole body of *B. trizonum* and concluded therefore that it is entirely covered with cilia.

Summary

The study of the infraciliature in two species from the family *Buetschliidae*: *Didesmis ovalis* Fiorentini and *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) — protozoa species, and Yugoslavia is the new, as yet not reported territory of their kinetosomes of the primary full ciliature, 2. existence of a group of isolated kinetosomes on the surface of the "Konkrementenvakuole". It seems probable that kinetosomes play some role in functioning of this organelle.

STRESZCZENIE

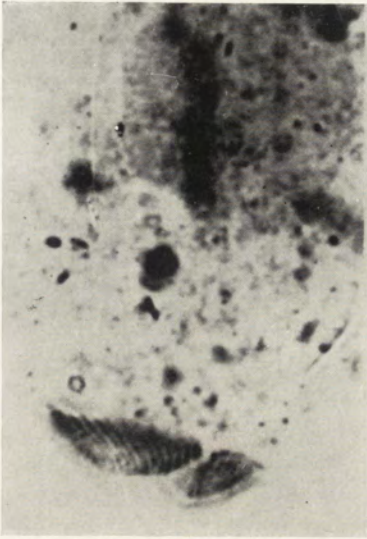
Zbadanie infracyliatury dwóch gatunków z rodziny *Buetschliidae*: *Didesmis ovalis* Fiorentini i *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) — pierwotniaków o orzęsieniu zredukowanym do paru stref — wykazało: 1. zachowanie się kinetosomów pierwotnego orzęsienia pełnego, 2. istnienie grupy wyodrębnionych kinetosomów na powierzchni „Konkrementenvakuole”. Wydaje się prawdopodobne, że kinetosomy odgrywają jakąś rolę w funkcjonowaniu tego organellum.

REFERENCES

- Chatton E., Lwoff A. et Lwoff M. 1929: Les infraciliatures et la continuité génétique des systèmes ciliaires récessifs. C. R. Acad. Sci. 188, 1190—1192.
- Chatton E. et Lwoff A. 1936: Techniques pour l'étude des protozoaires, spécialement de leurs structures superficielles (cinéto-me et argyrome). Bull. Soc. Franc. Micr. 5, 25—39.
- Dogiel V. A. 1929: Die sog. "Konkrementenvakuole" der Infusorien als eine Statocyste betrachtet. Arch. Protistenk. 68, 319—348.
- Fernandez-Galiano D. 1959: La infraciliación en *Cycloposthium edentatum* Strelkow. Boll. Real Soc. Espanola Hist. Nat. 57, 139—151.
- Florentini A. 1890: Intorno ai protisti dell'intestino degli equini. Boll. Sci. Pavia, 12, 51—60.
- Gassowsky G. 1918: On the microfauna of the intestine of the horse. Trudy Petrogr. Obšč. Estestwoisp. 49, 20—37.
- Grimstone A. V. 1961: Fine structure and morphogenesis in *Protozoa*. Biol. Rev. 36, 97—150.
- Hsiung T. S. 1929: On *Didesmis spiralis* sp. nov., a new Ciliate from the large intestine of the horse. J. Parasitol. 16, 99.
- Hsiung T. S. 1930: A monograph on the *Protozoa* of the large intestine of the horse. Iowa Sta. Coll. J. Sci. 4, 359—423.
- Raabe Z. 1947: Les voies des adaptations morphologiques à la vie parasitique chez les Ciliés. Ann. Univ. Curie-Sklod. C, 2, 299—411.
- Raabe Z. 1963: Kontynuacja a reorganizacja w procesach morfogenetycznych orzęsków (*Ciliata*). Kosmos A, 1, 13—24.
- Strelkow A. 1939: Paraziticheskiye infuzorii iz kishchnika neparnokopytnyh semjstwa *Equidae*. Parasitic Infusoria from the intestine of the *Ungulata* belonging to the family *Equidae*. Uč. Zapis. Leningr. Gos. Pedag. Inst. im. A. Hercena, 17, 1—262.
- Weisz P. B. 1954: Morphogenesis in *Protozoa*. Quart. Rev. Biol. 29, 207—229.
- Wolska M. 1963: Morphology of the buccal apparatus in *Balantidium coli* (Malmsten, 1857), Acta Protozool. 1, 147—153.

EXPLANATION OF PLATES I—II

- 1: *Didesmis ovalis*, posterior body part, viewed slightly from the side (×2110)
- 2: *Didesmis ovalis*, big kinetosomes on the „Konkrementenvakuole” (×2110)
- 3: *Blepharozoum trizonum*, general aspect (×1150)
- 4: *B. trizonum*, isolated zone of kineties around the buccal opening (×2110)
- 5: *B. trizonum*, the anterior ciliated body part and a fragment of the naked zone with kinetosomes (×2110)
- 6: *B. trizonum*, convexity of the „Konkrementenvakuole” (×1150)
- 7: *B. trizonum*, medium and posterior body parts (×2110)
- 8: *B. trizonum*, group of big kinetosomes on the „Konkrementenvakuole” (×2110)



1



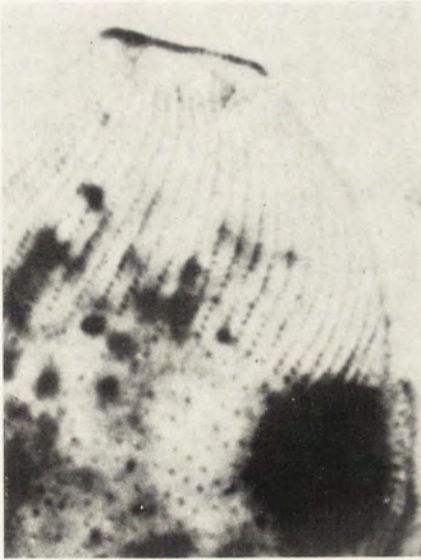
2



3



4



5



6



7



8

M. Wolska

auctor phot.

Laboratory of General Parasitology, Department of Parasitology,
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3

Stanisław L. KAZUBSKI

Contribution to the study of the fauna of parasitic ciliates in the land snail *Poiretia algira* (Brug.) from Yugoslavia

Przyczynek do poznania fauny orzęsków pasożytujących
u ślimaka lądowego *Poiretia algira* (Brug.) w Jugosławii

Occurrence of the parasitic ciliates in an individual of the land snail *Poiretia algira* (Brug.) was stated by Prof. Dr. Z. Raabe during his sejour in Yugoslavia. The silver impregnated material (after the B. Klein's method) collected by him was given to me for investigation. For that reason I wish to express my hearty thanks to Prof. Raabe.

The land snail *Poiretia algira* (Brug.) from the family *Oleacinidae* belongs to the common, widely spread species in the western part of the Balkan peninsula. It is a predator species, occurring on the surface of soil in humid shady places, in shallow crevices of rocks and also in caves. The specimen studied by Prof. Raabe was found the 6th of May 1960 in Split on the peninsula Marian near the Oceanographic Institute.

The examination of the collected material showed that the specimen of *Poiretia algira* was infected with two species of ciliates: *Tetrahymena rostrata* (Kahl, 1926) — *Hymenostomata*, and *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861) — *Thigmotricha*. Since the snail *Poiretia algira* is a new host for both ciliates species, and Yugoslavia is the new, as yet not reported territory of their occurrence, it seems appropriate to communicate the descriptions and the most important biometrical data of the detected population of parasites.

Tetrahymena rostrata (Kahl, 1926)

The trophic individuals measure 45—85 μ in length, the mean value (based on 141 measurements) being 64.0 μ . The biggest individual, in which the pre-division stomatogenesis was far advanced, was 90 μ long. The width of ciliates when measured in the broadest place, somewhat behind the middle of the body length, amounts 32—60 μ , the mean width being 44.9 μ .

The number of the meridional ciliary rows amounts most frequently 40—43, reaching however sometimes 45. Those rows are characterized by the displaced basal granules which is typical for *T. rostrata*.

The mouth, situated behind the anterior suture, measures 7—9 μ in length and has a complex of membranelles, typical for *Tetrahymena*. The number

of postoral rows beginning behind the mouth is usually two: the row "1", the stomatogenic one, and the row "n". However, sometimes the anterior segment of the penultimate row "n-1" is reduced, increasing the number of postoral rows up to three.

The excretory pores of the contractile vacuole being 2-5 (mostly 4) are situated near the posterior body end, always between the 6th and 14th, and most frequently between the 7th-8th and 12th meridional row.

In the population of *Tetrahymena rostrata* under study, disturbances in the course of the meridional rows were rather frequently observed. Most often those disturbances occurred in the "1" or "n" and the adjacent rows located on the ventral side.

Out of 161 ciliate individuals in which the stomatogenic row was visible, in 20 of them different steps of stomatogenesis were observed. Individuals with a distinct division furrow, nor the conjugating specimens were never noticed.

Myxophyllum steenstrupi (Stein 1861)

Ciliates with the oval body shape, the anterior part being broadly rounded. Dimensions: length 99-130 μ (mean 113.2 μ), width 70-92 μ (mean 79.1 μ). Macronuclei 7 in number are disposed in a pattern which is typical for this species. The ciliates were numerous.

*

Both the ciliate species described above are characterized by a high polyxenity. As follows from the data, even unpublished known to the author, for *Tetrahymena rostrata* 10 and for *Myxophyllum steenstrupi* over 35 species of land snails are known to be their hosts. This list is probably not full. The complete data concerning the morphological character of those parasites in all the hosts known, have neither been published as yet although the exact study of their variability range — evoked by their polyxenity and by the extensive distribution over the world presents an unusually interesting problem.

The morphological data of *Tetrahymena rostrata* have been reported only for the ciliate originating from *Deroceras reticulatum* (Müll.) from Oregon, USA (Kozloff 1957) and from *Zonitoides nitidus* (Müll.) from Poland (Kazubski 1958). Comparison of those data with informations concerning the parasite of *Poiretia algira* communicated in the present study (Table 1) indicates a rather insignificant variability in respect to the host difference and to the geographical site of origin of the material.

Descriptions and illustrations concerning *Myxophyllum steenstrupi* had been reported only by: Stein 1861 and Raabe 1934 for the specimens from *Succinea putris* (L.), Quennerstedt 1869 and Rossolimo und Jakimowitsch 1929 for the specimens from *Succinea pfeifferi* Rossm., from different places in Europe; Žďárská 1960 published a combined description of *M. steenstrupi* from *Succinea putris* (L.), *Laciniaria biplicata* (Mont.) and *Cepea vindobonensis* C. Pfr. from Czechoslovakia: Penn 1958

combined the description of specimens found in 3 snail land species from Iowa, USA. The individuals of *M. steenstrupi* found in *Poiretia algira* from Yugoslavia failed to differ essentially in shape and dimensions from individuals described by the above mentioned authors.

Table 1

Comparison of morphological data on *T. rostrata* in different hosts

Host	Body dimensions		Total number of rows	Number of post-oral rows	Number of excretory pores	Localization of the excretory pores; meridional rows:
	length μ	width μ				
<i>Deroceras reticulatum</i> (Oregon, USA)	56—88	23—31	41—58	1—3	3—6	8—14
<i>Zonitoides nitidus</i> * (Poland)	34—91	26—67	43—51	2—3	3—6	8—15
<i>Poiretia algira</i> (Yugoslavia)	45—85	32—60	40—45	2—3	2—5	6—14

* In the former article (Kazubski 1958), as result of an erroneous definition of the row „n”, the figures of successive meridional ciliary rows had been marked incorrectly. In the above table this error has been corrected.

Summary

Occurrence of two parasitic ciliate species: *Tetrahymena rostrata* (Kahl, 1926) — *Hymenostomata* and *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861) — *Thigmotricha* in *Poiretia algira* (Brug.) — *Oleacinidae* found in Yugoslavia is described.

STRESZCZENIE

Opisano występowanie u ślimaka lądowego *Poiretia algira* (Brug.) - *Oleacinidae* z Jugosławii, dwóch gatunków pasożytniczych orzęsków: *Tetrahymena rostrata* (Kahl, 1926) — *Hymenostomata* i *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861) — *Thigmotricha*.

REFERENCES

- Kazubski S. L. 1958: *Trichia lubomirskii* Ślós. (*Helicidae*), a new host of *Tetrahymena limacis* (Warren, 1932) Kozloff, 1946 (*Ciliata*) and *Zonitoides nitidus* Müll. (*Zonitidae*) a new host of *T. rostrata* (Kahl, 1926) Corliss, 1952 in Poland. Bull. Acad. pol. Sci., Cl. II. 6, 247—252.
- Kozloff E. N. 1957: A species of *Tetrahymena* parasitic in the renal organ of the slug *Deroceras reticulatum*. J. Protozool. 4, 75—79.
- Penn J. H. 1958: Studies on ciliates from mollusks of Iowa. Proc. Iowa Acad. Sci. 65, 517—534.

- Quennerstedt A. 1869: Bidrag til sveriges Infusorie-fauna III. Acta Univ. lund. 6, 1—35.
- Raabe Z. 1934: Weitere Untersuchungen an einigen Arten des Genus *Conchophthirus* Stein. Mem. Acad. pol. Sci. Lettr. Cracovie, B (II), 211—235.
- Rossolimo L. B. und Jakimowitsch K. 1929: Die Kernteilung bei *Conchophthirus steenstrupi* St. Zool. Anz., 84, 323—333.
- Stein F. 1861: Über ein neues parasitisches Infusionsthier aus dem Darmkanal von Paludinen und über die mit demselben zunächst verwandten Infusorienformen. S. B. böhm. Ges. Wiss. 85—90.
- Žďárská Z. 1960: Prvoci z našich suchozemských plžů. Vest. Československé Zool. Spol., 24, 54—64.

EXPLANATION OF THE PLATE I

Tetrahymena rostrata (Kahl, 1926)

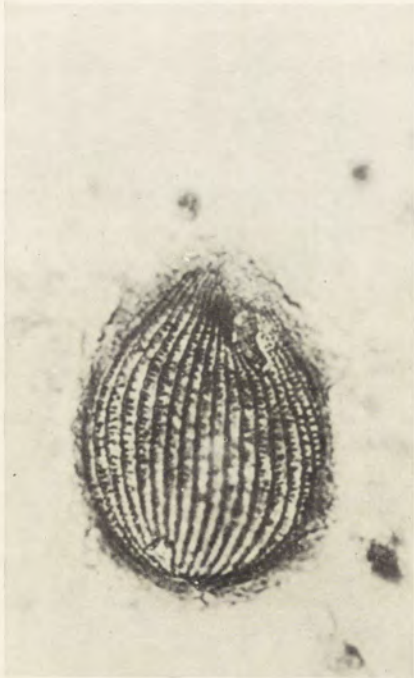
- 1: Ventral side; mouth and excretory pores are seen
- 2: Left side of the ciliate
- 3: Juvenile individual
- 4: Advanced stomatogenesis; disturbances in the row 1 are seen
[Magnification of the photomicrographs 1—3 is the same]



1



2



3



4

S. L. Kazubski

auctor phot.

Лаборатория цитологии одноклеточных организмов, Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград Ф-121, Проспект Маклина 32

Laboratory of Cytology of Unicellular Organisms, Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad F-121, Prospekt Maklina 32.

Г. И. СЕРГЕЕВА

G. I. SERGEJEVA

Активность кислой фосфатазы на разных стадиях жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis* (Ehrbg.) Stein (*Ciliata*)

Activity of acid phosphatase at different stages of the life cycle of *Nyctotherus cordiformis* (Ehrbg.) Stein (*Ciliata*)

В настоящее время как для *Metazoa* так и для *Protozoa* достаточно точно с помощью гистохимических методик установлено, что существует непосредственная связь между присутствием кислой фосфатазы в лизосомах и процессами фаго и пиноцитоза (Birns 1960, Seaman 1961, Nevikoff 1961, Хольтер 1962, де Дюв 1962, Müller and Törö 1962, Müller, Tóth and Törö 1962, Barka 1962, Daems 1962, Сергеева 1963).

Кроме того ряд авторов указывает на наличие этого фермента в некоторых структурах, вырабатывающих секрет (Fauré-Fremiet 1962), причем некоторые исследователи отмечают присутствие кислой фосфатазы в области аппарата Гольджи (El Mofty 1957). В последнее время появились электронно-микроскопические данные о том, что активность кислой фосфатазы четко выявляется во внутриклеточных структурах, подвергающихся дегенеративным изменениям, в частности, кислая фосфатаза обнаружена в дегенерирующих митохондриях (Novikoff and Essner 1962). Но, как указывают и сами авторы, было бы очень важно получить подтверждение их данных на других объектах.

Однако, если локализация кислой фосфатазы в определенных цитоплазматических структурах в настоящее время ни у кого не вызывает сомнений, то вопрос о наличии её в ядрах до сих пор остаётся не решенным окончательно. Здесь следует указать, что большинство работ по выявлению кислой фосфатазы выполнено либо на тканях многоклеточных, либо на вегетативных особях одноклеточных организмов. Поэтому представляет несомненный интерес изучение распределения этого фермента на разных стадиях жизненных циклов простейших, так как они являются одновременно и одной клеткой, и целым организмом. Из литературы нам известны лишь две работы, в которых авторы приводят подробные сведения по распределению кислой фосфатазы на разных стадиях жизненных циклов протистейших (Weisz 1949, Бейер 1960).

Объектом исследования была выбрана паразитическая инфузория *Nyctotherus cordiformis* (Ehrbg.) Stein, обитающая в толстой кишке некоторых видов амфибий. Морфология и жизненный цикл *N. cordiformis* хорошо изучены рядом авторов (Боева-Петрушевская 1933, Wichterman 1937, Лом 1955, Stahlmann 1962, Голикова 1963).

Материал и методика

Популяции *Nyctotherus cordiformis* извлекались из кишечника головостиков, сеголеток и половозрелых травяных лягушек (*Rana temporaria* L.), фиксировались в холодном кальций-формоле (Baker 1946) в течение четырех часов, промывались 16 часов в холодной дистиллированной воде и затем помещались в инкубационную среду Гомори pH 5.0—5.1 (Пирс 1962) на три часа. Далее следовала быстрая промывка в дистиллированной воде и проведение материала через 1.5% Na_2S ¹ (Преснов 1954). После пребывания в Na_2S материал тщательно отмывался в водопроводной воде и после проведения через спирты и ксилол либо заключался в бальзам, либо заливался в парафин. В качестве субстрата применялся α -глицерофосфат. Контролем служили два раствора: 1. инкубационная среда без глицерофосфата и 2. 0.25% раствор NaF (Bullivant 1961) в инкубационной среде.

Материал изучался на тотальных препаратах и на срезах толщиной 4 μ . Фотографирование препаратов осуществлялось с помощью микроскопа МБИ-66 при самом высоком положении конденсора.

Результаты исследований

Изучение распределения кислой фосфатазы в жизненном цикле *Nyctotherus cordiformis* показало, что на разных стадиях цикла локализация активности фермента различна. В течение круглого года в кишечнике травяной лягушки можно всегда найти вегетативных особей *N. cordiformis*, которые составляют основную массу каждой популяции. При исследовании распределения кислой фосфатазы у вегетативных особей выяснилось, что локализация активности этого фермента различна у них в осенне-зимний и летний периоды.

Для осенне-зимних особей характерна чрезвычайно интенсивная реакция цитоплазмы и отсутствие реакции в макро- (Ma) и микронуклеусе (Mi). Реакция цитоплазмы бывает настолько интенсивной, что рассмотреть какие-либо внутриклеточные структуры обычно можно только на срезах. Однако часто передний участок тела, находящийся над Ma, остаётся бесцветным (Табл. I 1) при этом размеры его варьируют у различных особей. Возможно, это связано с тем, что в этой части тела находятся наибольшие скопления зерен гликогена (Stahlmann 1962, Голикова 1963) и обычно отсутствуют пищеварительные вакуоли.

На срезах толщиной 4 μ (увел. 90 \times 10) отчетливо виден гранулярный характер реакции (Табл. I 2). Мелкие коричнево-черные гранулы, размеры которых колеблются в пределах 0.3—0.7 μ , располагаются вокруг пищеварительных вакуолей и эритроцитов лягушки, которые попадают в кишечник в момент вскрытия и в массе заглатываются инфузориями. Реакция самих эритроцитов, как правило, отрицательна; отсутствует реакция и внутри пищеварительных вакуолей.

¹ Подробное описание методики дано в другой статье (Сергеева 1963).

Кроме этого, постоянно окрашиваются в коричнево-черный цвет гранулы в области базальных зерен ресничек и иногда можно рассмотреть, что окраска их не гомогенна. Интенсивно окрашиваются и гранулы, лежащие в основании мембранелл ротовой полости,² окраска их, как правило, также не гомогенна: между темно-коричневыми зернами видны совершенно неокрашенные участки. Эти гранулы часто имеют продолговатую форму, длина их около 2 μ , ширина около 1 μ .

У летних вегетативных особей распределение кислой фосфатазы в цитоплазме в основном аналогично локализации этого фермента у осенне-зимних инфузорий. Однако реже встречаются инфузории с неокрашенными передними участками тела. В это время у них запасы гликогена очень незначительны (Г о л и к о в а 1963), и пищеварительные вакуоли более равномерно распределены по всему телу инфузории. В отличие от осенне-зимних вегетативных особей летние характеризуются интенсивной положительной реакцией Ма, причем кислая фосфатаза в них выявляется в виде очень мелких гранул, плотно упакованных внутри ядра. Ми, как и у осенне-зимних особей, отстаёт бесцветным.

Так как жизненный цикл *N. cordiformis* строго приурочен к биологии хозяина, весной, в период икрметания лягушек, в их кишечниках происходит преддистное деление и инцистирование инфузорий.

Цисты инфузорий отличаются от всех стадий цикла чрезвычайно слабой реакцией на кислую фосфатазу: чуть желтоватую окраску имеют Ма и оболочка цисты.

Распределение кислой фосфатазы у делящихся инфузорий (Табл. I 3) резко отлично от локализации этого фермента у вегетативных особей. Прежде всего исчезает интенсивная реакция цитоплазмы, последняя окрашивается в желтый цвет. Четкая положительная реакция у каждой дочерней особи обнаруживается в области образования нового ротового аппарата, нового цитопита и новых поверхностях (кортикальных) структур, возникающих вдоль границы деления. Ма дочерних особей окрашиваются в коричнево-черный цвет, при этом ясно видны отдельные мелкие округлые гранулы, тесно прилегающие друг к другу. Однако Ми, как и у вегетативных особей, остаются бесцветными.

Одновременно с вегетативными и делящимися инфузориями в кишечнике головастика, у которых уже произошла закладка второй пары ног, встречаются конъюганты *N. cordiformis*.

Характер распределения кислой фосфатазы у конъюгантов (Табл. II 4—6) еще более резко отличается от локализации этого фермента у вегетативных особей. Уже у большинства ранних конъюгантов цитоплазма становится почти бесцветной. Фермент выявляется только в Ма и в месте слияния конъюгантов, то есть в области ротового отверстия и переднего отдела ротовой полости обоих партнеров. В каждом Ма хорошо видны мелкие округлые гранулы темно-коричневого цвета, относительно плотно прилегающие друг к другу. Интенсивная реакция Ма сохраняется на протяжении всей конъюгации, то есть в еще не фрагментированном Ма (Табл. II 4) и на последующих этапах его фрагментации (Табл. II 5—6). Иногда в распадающемся Ма можно видеть цепочки из гранул, дающих интенсивную реакцию на кислую фосфатазу.

² Наименование частей ротового аппарата приводится согласно Корлиссу (Corliss 1961).

Цитоплазма остаётся бесцветной на протяжении всей конъюгации, а после расхождения конъюгантов у ранних эксконъюгантов исчезает совершенно реакция в области ротового отверстия и ротовой полости. Вообще весь ротовой аппарат и его структуры у ранних эксконъюгантов, как правило, бесцветны (Табл. II 7). Кроме того, если у конъюгантов положительную реакцию на кислую фосфатазу дают все или хотя бы часть гранул в основании ресничек тела, то у эксконъюгантов все поверхностные структуры обычно бесцветны. Таким образом, у эксконъюгантов интенсивную положительную реакцию на кислую фосфатазу, как правило, обнаруживают только фрагменты Ма: обычно они окрашены в коричнево-черный цвет. Однако на одном препарате можно встретить эксконъюгантов с различной по интенсивности окраской фрагментов: как правило, слабее реакция на кислую фосфатазу у особей с наиболее мелкими фрагментами. Интересно, что в отличие от пищеварительных вакуолей, где кислая фосфатаза выявляется по их краям, в фрагментах Ма (как это видно на срезах) активность фермента выявляется по всей их толщине.

Во время конъюгации и в эксконъюгационный период Ми каждого конъюганта испытывает сложные превращения, в результате которых образуются новый Ми и Ма. В то время как зачаток нового Ма находится в задней части тела, новый Ми занимает свое обычное место над ротовой полостью. У таких особей реакция Ми отрицательна. Так как в данном случае материал изучался только на тотальных препаратах, зачаток Ма не удалось обнаружить в связи с тем, что общая реакция цитоплазмы на кислую фосфатазу заднего отдела тела была чрезвычайно интенсивной. В период формирования нового Ма вновь появляется четкая реакция в основании мембранелл ротовой полости и в области базальных зерен ресничек, покрывающих тело.

У *N. cordiformis* помимо ядер испытывают полную или частичную реорганизацию и другие структуры тела (Wichterman 1937). Целиком перестраивается ротовой аппарат: старый исчезает, а позади него образуется новый. В районе образования нового ротового аппарата обнаруживается четкая, но не очень интенсивная реакция на кислую фосфатазу, при этом распределение сернистого свинца имеет гранулярный характер. Так, при увеличении 90×10 ясно видны гранулы, расположенные вдоль контуров вновь образующихся цирр. Старый же ротовой аппарат на всем протяжении, за исключением верхнего отдела ротовой полости, совершенно бесцветен. У особей с реорганизующимся ротовым аппаратом цитоплазма бесцветна, Ми также не даёт реакции на кислую фосфатазу; Ма окрашивается в коричневый цвет, при этом в нём отчетливо видны (при увел. 90×10) мелкие округлые гранулы, тесно примыкающие друг к другу. Реснички у реорганизующейся особи не имеют правильного расположения, а положительная реакция в области базальных зерен обнаруживается лишь на отдельных небольших участках тела. Такие участки Вайсц (Weisz 1949), изучавший распределение кислой фосфатазы у стентора, назвал „реорганизационными полями“.

Обсуждение

Использование усовершенствованного метода Гомори (Пирс 1962) показало, что активность кислой фосфатазы, катализирующей гидролиз фосфомоноэстера при pH 5.0—5.1, различна на разных стадиях жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis*.

Прежде всего четко видна разница в цитоплазматической активности этого фермента между различными стадиями цикла. Как указывалось в предыдущем разделе, для вегетативных особей характерна чрезвычайно интенсивная реакция цитоплазмы на кислую фосфатазу. Как известно, вегетативные особи активно питаются на протяжении круглого года, так как в задней кишке лягушек даже во время зимней спячки имеются пищевые остатки и большое количество бактерий.

В цистах, у делящихся, реорганизующихся и конъюгирующих особей кислая фосфатаза в цитоплазме, как правило, вообще не выявляется. Вихтерман, подробно изучавший морфологические изменения *N. cordiformis* на всех стадиях цикла, указывает, что делящиеся, реорганизующиеся и конъюгирующие инфузории не питаются, что отчетливо видно по исчезновению из цитоплазмы этих стадий пищеварительных вакуолей. Поэтому наличие кислой фосфатазы в цитоплазме вегетативных особей и отсутствие этого фермента в цитоплазме делящихся, реорганизующихся и конъюгирующих особей может служить доказательством участия его в процессах фагоцитоза. Отсутствие изучаемого фермента в цитоплазме цист также не противоречит этому утверждению, так как известно, что цисты являются не питающейся стадией.

Появление кислой фосфатазы в месте слияния конъюгантов несомненно служит подтверждением участия этого фермента в процессе секреции (Faugé-Fremiet 1961), так как известно (Wichterman 1937), что конъюганты выделяют слизистый секрет, благодаря которому они прочно слипаются друг с другом.

Более интересным, как нам кажется, является тот факт, что на протяжении жизненного цикла у инфузорий этого вида резко меняется реакция Ма. Как было показано выше и в предыдущем сообщении (Сергеева 1963), если у осенне-зимних вегетативных особей Ма не содержит кислой фосфатазы, то летом у делящихся инфузорий, у конъюгантов и эксконъюгантов и у летних вегетативных особей в Ма обнаруживается чрезвычайно интенсивная реакция на кислую фосфатазу.

Вопрос о ядерной локализации кислой фосфатазы в настоящее время является наиболее спорным. В ряде работ можно найти указания на наличие этого фермента в ядрах (Moog 1964, La Velle, Chan and La Velle 1954, Преснов 1954, Бейер 1960, Роскин и Теодореску 1963). Однако, если некоторые из авторов (La Velle, Chan and La Velle 1954) обнаруживают кислую фосфатазу на хроматиновых глыбках и вокруг ядрышек, то другие считают, что наиболее богаты кислой фосфатазой ядрышки (Бейер 1960, Роскин и Теодореску 1963). Функция ядерной кислой фосфатазы, как правило, связывалась с синтезом в ядре белка или рибонуклеиновой кислоты. Однако в последние годы, после открытия де Дювом с сотрудниками новых клеточных органоидов — лизосом и в связи с обнаружением в них набора кислых гидролитических ферментов большинство исследователей кислой фосфатазы занялось изучением этих клеточных структур. Постоянное присутствие кислой фосфатазы в лизосомах сделало этот фермент индикатором на присутствие лизосом в клетке. Далее была установлена непосредственная связь между лизосомами и процессами пино- и фагоцитоза (см. Novikoff 1961, Müller and Tögö 1962, Барка 1962, Хольтер 1962). Изучение этих процессов отодвинуло на второй план вопрос о ядерной локализации этого фермента. Кроме того, в некоторых работах (Danielli 1953, Burstone 1958, Пирс 1962) указыва-

лось, на то, что при выявлении локализации фосфатаз следует с большой осторожностью относиться не только к отрицательным результатам, но и к положительным, вследствие возможной диффузии фермента и промежуточных продуктов реакции. Это привело к тому, что все чаще ядерную локализацию фермента стали считать артефактом. Однако в одной из своих работ Эсснер и Новиков (Essner and Novikoff 1961) опубликовали электрограммы печени крысы, на которых четко видна реакция ядер на кислую фосфатазу. При этом авторы подчеркивают, что положительная реакция на кислую фосфатазу не является артефактом.

Постоянное присутствие кислой фосфатазы в *Ma N. cordiformis* всегда на одних и тех же стадиях цикла служит неоспоримым доказательством, как нам кажется, истинности ядерной локализации этого фермента. Отсутствие же кислой фосфатазы в *Ma* осенне-зимних вегетативных особей при чрезвычайно интенсивной реакции окружающей цитоплазмы подтверждает высказанное положение и свидетельствует в пользу того, что при использовании метода Гомори в описанной выше модификации диффузия фосфата свинца и диффузия фермента практически сведены к нулю. При этом следует учесть, что срок инкубации измерялся не минутами, а был равен 3 часам.

Однако полученные нами данные указывают на то, что локализация кислой фосфатазы в *Ma* может быть обусловлена различными причинами. Так, появление интенсивной реакции на кислую фосфатазу в *Ma* конъюгантов и постоянное присутствие фермента на всех этапах фрагментации его у конъюгантов и эксконъюгантов несомненно доказывает участие изучаемого фермента в процессах лизиса дегенерирующих структур клетки. В этом отношении следует упомянуть об электронномикроскопическом исследовании клеток печени крыс, проведенном Новиковым и Эсснером (Novikoff and Essner 1962), в котором они приводят данные о появлении кислой фосфатазы в дегенерирующих митохондриях. Интересно, что дегенерирующие митохондрии, в отличие от интактных, окружены мембраной. Однако кислая фосфатаза выявляется не в районе мембраны, как это наблюдается в обычных пищеварительных вакуолях, а по всей толщине окруженной мембраной митохондрии. Последнее целиком согласуется с нашими данными: на срезах через фрагменты *Ma* видно, что они целиком заполнены сернистым свинцом. Кроме того, при исследовании активности кислой фосфатазы у *N. cordiformis* попутно нами были обнаружены конъюганты и эксконъюганты инфузорий рода *Balantidium* с фрагментированным *Ma*. У них, также как и у *N. cordiformis*, на фоне светлой цитоплазмы четко выделялись коричнево-черные фрагменты *Ma*.

Значительно труднее объяснить появление кислой фосфатазы в *Ma* делящихся и реорганизующихся инфузорий и у летних вегетативных особей. Как известно, *Ma* многих инфузорий являются высокополиплоидными генетически активными ядрами (Fauré-Fremiet 1953, Полянский и Райков 1960). Методом автордиографии для некоторых видов инфузорий доказано, что деление *Ma* не является простым распределением ядерного материала между дочерними особями, так как при этом происходят сложные реорганизационные процессы, связанные с синтезом ДНК. Каким образом в этих процессах участвует кислая фосфатаза, пока неизвестно. Но сам факт наличия этого фермента у инфузорий во время деления и у летних вегетативных особей (когда происходит интенсивный рост инфузорий) нам кажется достаточно важным и должен несомненно повысить интерес к выяснению роли этого фермента в метаболических процессах, происходящих в ядре.

Следует указать, что резкое увеличение активности кислой фосфатазы было нами обнаружено также в делящихся ядрах *Opalina ranarum* и *Protoopalina intestinalis* — паразитических *Mastigophora*, также обитающих в толстой кишке некоторых видов амфибий (неопубликованные данные).

В некоторой связи с нашими данными можно рассматривать и наблюдения Бейер 1960, касающиеся распределения фосфомоноэстераз в жизненном цикле кокцидий *Eimeria magna* Peard, поражающих эпителий кишечника кролика. Бейер отмечает чрезвычайно сильную реакцию ядер на кислую фосфатазу на всех стадиях эндогенного цикла кокцидий, причем наиболее интенсивная реакция обнаружена автором в нуклеолах. Как известно, кокцидии характеризуются коротким эндогенным циклом, на протяжении которого почти непрерывно происходит множественное деление стадий развития паразита. Возможно, именно этой особенностью кокцидий объясняется постоянное присутствие кислой фосфатазы в ядрах. Что же касается связи кислой фосфатазы непосредственно с синтезом РНК и ДНК, имеющиеся в литературе данные о наличии подобной связи требуют дополнительного уточнения. Несмотря на то, что нам ни на одной стадии жизненного цикла не удалось обнаружить кислую фосфатазу в *M. cordiformis* и что *Mi* вегетативных особей содержит только хроматиновый материал (Stahlmann 1962), делать определенные выводы об отсутствии связи между активностью кислой фосфатазы и метаболизмом ДНК и, в частности, синтезом её, также преждевременно. Решение этого вопроса невозможно без использования методов биохимии и автордиографии.

Нерешенным остаётся также вопрос о роли кислой фосфатазы в процессе образования нового ротового аппарата у делящихся и реорганизующихся особей *N. cordiformis* и при формировании новых поверхностных структур у делящихся инфузорий. При дальнейшем исследовании этих процессов важно выяснить, участвует ли этот фермент непосредственно в процессах образования новых структур или он появляется там, где необходим лизис старых, чтобы на месте последних могло произойти формирование новых клеточных структур.

Резюме

Локализация активности кислой фосфатазы различна на разных стадиях жизненного цикла инфузории *Nyctotherus cordiformis* (паразита некоторых амфибий). Для вегетативных особей характерна чрезвычайно интенсивная реакция цитоплазмы, гранул в области базальных зерен ресничек тела и гранул в основании мембранелл ротовой полости. У осенне-зимних инфузорий часто отсутствует кислая фосфатаза в переднем отделе тела (видимо, здесь находятся большие запасы гликогена). Присутствие фермента в *Ma* совпадает с периодом наиболее активного роста инфузорий.

Цисты характеризуются чрезвычайно низкой активностью фосфатазы, выявляющейся только в *Ma* и в оболочке их. У делящихся инфузорий фермент выявляется в *Ma*, в области образования ротового аппарата и цитопига, и вдоль границы деления.

У конъюгантов фермент присутствует в области их слияния и в *Ma*. Реакция в основании ресничек тела слабее, чем у вегетативных особей. Интенсивная реакция сохраняется на всех этапах фрагментации *Ma*. У ранних эконъюгантов все остальные структуры обычно характеризуются отрицательной реакцией.

У реорганизующихся особей кислая фосфатаза выявляется в Ma, в области образования нового ротового аппарата и в верхнем отделе старой ротовой полости. В Mi кислая фосфатаза отсутствует на всех стадиях жизненного цикла.

Проведенное исследование подтвердило участие кислой фосфатазы в процессах пищеварения, лизиса внутриклеточных структур (в частности фрагментов Ma) и секреции, и показало, что она может присутствовать в ядре, однако только на определенных стадиях жизненного цикла *N. cordiformis*.

SUMMARY

By means of Gomori's method modified by the author, the localization of acid phosphatase catalyzing the hydrolysis of phosphomonoesterase at pH 0.5—5.1 was demonstrated to be different at different developmental stages of *Nyctotherus cordiformis*, a ciliate which is known to live in a large intestine of some amphibian species.

A very strong reaction of the cytoplasm and of the basal granules of the body cilia and of the buccal cavity membranelles is characteristic of the vegetative stages. In autumn-winter ciliates acid phosphatase was frequently found to be absent in the anterior body part, above the Ma. This fact might be explained by a great storage of glycogen accumulated by the animals at the season in question. Besides, the autumn-winter vegetative stages lack acid phosphatase in both Ma and Mi, while in the summer ones Ma is usually packed with rounded granules of PbS. The presence of acid phosphatase in Ma coincides with the most intensive growth period.

The cysts appeared to be very poor in acid phosphatase, the latter being revealed distinctly only in Ma and cyst membrane. A very low metabolic activity of the ciliate at a cyst-stage would account for a low content of the enzyme.

In the dividing ciliates acid phosphatase is present in Ma of daughter specimens, in the regions of the development of both buccal apparatus and cytophyge of either specimens and along the division line.

During the conjugation acid phosphatase was revealed in Ma of either conjugants as well as in the area of junction. The enzymatic reaction in the basal granules of the cilia is poorer than in those of the vegetative stages. The reaction remains to be strong at all the steps of Ma fragmentation, the fragments being always full of the granules of PbS.

In the early ex-conjugants, all the cellular structures, with exception of Ma-fragments, are usually characterized by a negative reaction as concerns acid phosphatase.

In the re-organizing specimens, acid phosphatase was revealed in Ma, in the area of development of the new buccal apparatus and in the upper part of the former buccal cavity.

In Mi acid phosphatase was failed to be found.

Thus, the present investigation allowed, firstly, to confirm the concept of the participation of acid phosphatase in the processes of both intracellular digestion and lysis of intracellular structures (Ma-fragments, for example), as well as in the process of secretion; secondly, it shows the possibility of nuclear localization of acid phosphatase at certain (but usually well defined) developmental stages of the studied unicellular organism.

ЛИТЕРАТУРА

- Baker J. 1946: The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. Micr. Soc.* 87, 441—470.
- Baraka T. 1962: Cellular localization of acid phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 231—232.
- Бейер Т. В. 1960: Цитологическое исследование различных стадий жизненного цикла кокцидий кролика. Фосфомоноэстеразы у *Eimeria magna* Perard, 1924. В сб.: Вопросы цитологии и протистологии, 277—284.
- Birns M. 1960: The localization of acid phosphatase activity in the ameba, *Chaos chaos*. *Exp. Cell. Res.* 20, 202—205.
- Боева-Петрушевская Т. П. 1933: Материалы к циклу развития *Nyctotherus cordiformis*. Тр. Петергофского биол. инст. 10, 342—344.
- Bullivant S. 1961: The staining of thin section of mouse pancreas prepared by the Fernandez-Moran Helium. II. Freeze-substitution method. *J. Biophys. Cytochem.* 6, 322—339.
- Corliss J. O. 1961: *The Ciliated Protozoa*. London—New York.
- Daems W. T. 1962: *Mouse liver lysosomes and storage*. Leiden.
- Догель В. А., Полянский Ю. И. и Хейсин Е. М. 1962: *Общая протозология*. Москва—Ленинград, 30—67.
- Дюв К. де 1962: Идентификация и характеристика особых цитоплазматических частиц печени крысы. Тр. Пятого Междунар. биохим. конгресса, Симпозиум 2, Москва, 171—177.
- Essner E. and Novikoff A. 1961: Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 773—784.
- El Mofty M. M. 1957: Cytochemical localization of acid phosphatase in *Trichonympha turkestanica* Berstein (*Trichonympha*, *Trichonymphidae*). *Nature* 180, 1367.
- Fauré-Fremiet E. 1953: L'hypothèse de la sénescence et les cycles de réorganisation nucléaire chez les Ciliés. *Rev. Suisse Zool.* 60, 426—438.
- Fauré-Fremiet E. 1962: Pouvoir lytique et phosphatase acide chez les Ciliés. *C. R. Acad. Sci.* 254, 2691—2693.
- Голикова М. Н. 1963: Морфологическое и цитохимическое исследование жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis* Stein. *Acta Protozool.* 1, 31—42.
- Хольтер Х. 1962: Пиноцитоз. Тр. Пятого Междунар. биохим. конгресса, Симпозиум 2, Москва, 263—270.
- La Velle O., Chan N. L. and La Velle F. W. 1954: Acid phosphatase activity as related to nucleic acid sites in the nerve cell. *Anat. Rec.* 119, 305—325.
- Lom J. 1955: Polysacharidové rezervy nálevniců rodu *Balantidium* a *Nyctotherus*. *Českoslov. Biol.* 4, 397—409.
- Moog F. 1946: The physiological significance of the phosphomonosterases. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 21, 41—59.
- Müller M. and Törö I. 1962: Studies on feeding and digestion in *Protozoa*. III. Acid phosphatase activity in food vacuoles of *Paramecium multimicronucleatum*. *J. Protozol.* 9, 98—102.
- Müller M., Tóth J. and Törö I. 1962: Studies on feeding and digestion in *Protozoa*. IV. Acid phosphatase and nonspecific esterase activity of food vacuoles in *Ameba proteus*. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 13, 105.

- Novikoff A. 1961: Lysosomes and related particles. In: The cell and their component parts, Vol. 2, New York—London.
- Novikoff A. B. and Essner E. 1962: Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J. Cell Biol.* 15, 140—145.
- Пирс Э. 1962: Гистохимия. Москва.
- Полянский Ю. И. и Райков И. Б.. 1960: Роль полиплоидии в эволюции простейших. *Цитология* 2, 509—518.
- Преснов М. А. 1954: Гистохимические исследования фосфата нормальных тканей. *Журн. общ. биол.* 15, 321—335.
- Роскин Г. И. и Теодореску М. Е. 1963: Витамин В₁ и активность фосфатаз в нервных клетках крысы. *Цитология* 5, 97—100.
- Seaman G. R. 1961: Acid phosphatase activity associated with phagotrophy in the ciliate, *Tetrahymena*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 243—244.
- Сергеева Г. И. 1963: Распределение кислой фосфатазы у паразитических простейших из амфибий. *Цитология* 5, 348—351.
- Stahlmann C. von 1962: Die „Kernaufhängung“ des Makro- und Mikronukleus bei *Nyctotherus*-Arten (*Spirotricha*, *Ciliata*) und die mit diesem Thema in Zusammenhang stehenden Feinstrukturen (Eine elektronenmikroskopische Untersuchung). *Zool. Beiträge* 7, 27—82.
- Weisz P. 1949: Phosphatase in normal and reorganizing *Stentor*. *Biol. Bull.* 97, 108—110.
- Wichterman R. 1937: Division and conjugation in *Nyctotherus cordiformis*, with special reference to the nuclear phenomena. *J. Morphol.* 60, 563—611.

ПОДПИСИ К ТАБЛИЦАМ I—II

Активность кислой фосфатазы у осенне-зимних вегетативных особей

Nyctotherus cordiformis

- 1: Общий вид реакции на тотальном препарате, $\times 300$
- 2: Продольный срез через инфузорию, $\times 670$ (по Сергеевой 1963); Ма — макронуклеус, В. С. — ротовая полость, PbS — гранулы сернистого свинца.

Активность кислой фосфатазы у делящейся инфузории

- 3: Тотальный препарат, $\times 450$; Ма — макронуклеус, В. С. А. — район образования нового ротового аппарата, Ср — место образования нового цитопига.

Активность кислой фосфатазы во время конъюгации
(тотальные препараты)

- 4: Конъюганты с нефрагментированным Ма, $\times 1000$
- 5: Конъюганты, у которых Ма мигрировали в заднюю часть тела и начинают испытывать фрагментацию, $\times 450$
- 6: Конъюганты с целиком фрагментированным Ма, $\times 300$; положительная реакция на кислую фосфатазу в области слияния конъюгантов и в фрагментах Ма (темные участки цитоплазмы в передней и задней частях тела не означают диффузного распределения фермента, а являются результатом того, что там лежат фрагменты Ма, находящиеся не в фокусе).

Активность кислой фосфатазы у ранних эконъюгантов

- 7: Тотальный препарат, $\times 450$; фермент присутствует только в фрагментах Ма

EXPLANATION OF PLATES I—II

Activity of the acid phosphatase in autumn-winter vegetative individuals
Nyctotherus cordiformis

- 1: General view of the reaction effect in total preparation, $\times 300$
- 2: Longitudinal section of the ciliate, $\times 670$ (after Sergejeva 1963); Ma — macronucleus, B. C. — oral cavity, PbS — granulation of lead sulfate.

Activity of acid phosphatase in dividing ciliate

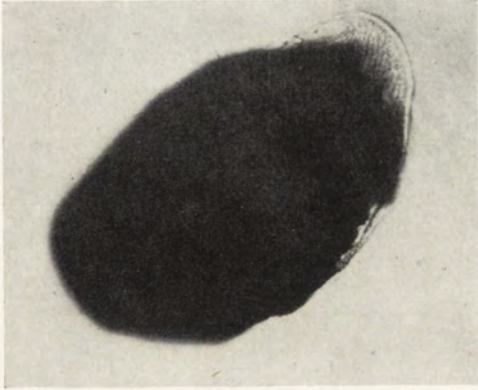
- 3: Total preparation, $\times 450$; Ma — macronucleus, B. C. A. — zone of formation of the new buccal apparatus, Cp — place of formation of the new cytopype.

Activity of acid phosphatase during conjugation (total preparations)

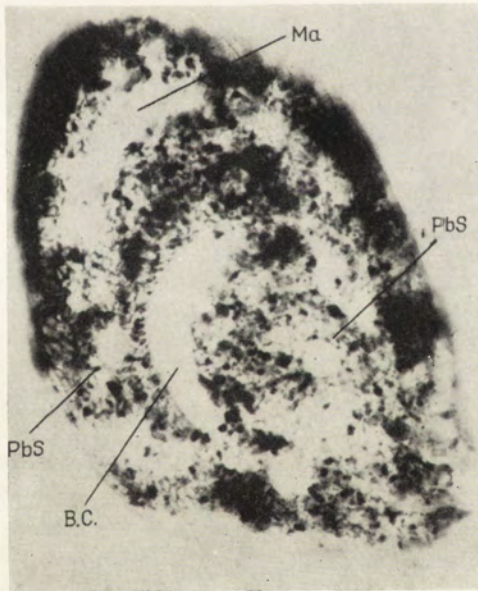
- 4: Conjugants with a non-fragmented Ma, $\times 1000$
- 5: Conjugants in which Ma migrated to the posterior body part and begins fragmentation, $\times 450$
- 6: Conjugants with completely fragmented Ma, $\times 300$; positive reaction of the acid phosphatase is in the zone of fusion of conjugants and in the fragments of Ma (the dark places of cytoplasm in the anterior and posterior body parts are not indicating a diffuse distribution of the enzyme but are caused by presence of Ma fragments being out of focus)

Activity of acid phosphatase in early exconjugants

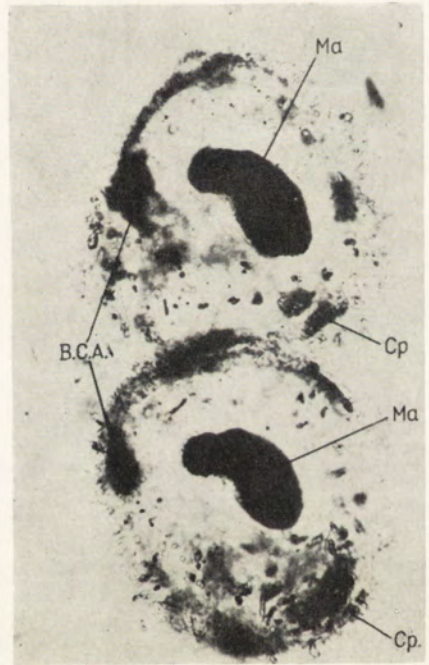
- 7: Total preparation, $\times 450$; enzyme is present only in fragments of Ma.



1



2



3

Г. И. Сергеева

auctor phot.



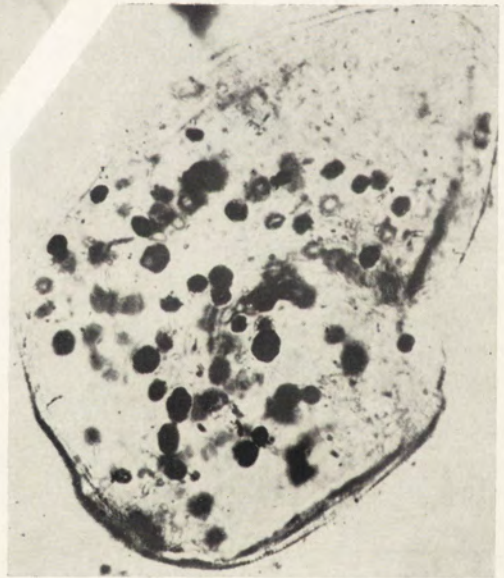
4



5



6



7

Г. И. Сергеева

auctor phot.

Лаборатория цитологии одноклеточных организмов, Институт цитологии Академии наук СССР, Ленинград Ф-121, Проспект Маклина 32

Laboratory of Cytology of Unicellular Organisms, Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad F-121, Prospekt Maklina 32

А. В. УСПЕНСКАЯ
A. V. USPENSKAJA

Запасные питательные вещества, РНК, ДНК, и дыхательные ферменты на разных стадиях жизненного цикла
Ichthyophthirius multifiliis

Reserve materials, RNA, DNA, and respiratory enzymes at different stages of the life cycle of *Ichthyophthirius multifiliis*

Жизненный цикл, морфология, экология и биология инфузории *Ichthyophthirius multifiliis*, паразитирующей в коже рыб, к настоящему времени хорошо изучены благодаря целому ряду исследований (Neresheimer 1908, Buschkiel 1910, Haas 1933, Breindl und Jirovec 1934, Mc Lennan 1935, 1936, 1937, 1942, и 1943, Mugard 1948, Байер 1955, Nie Da-shau и Lee Lean-siang 1960, Wagner 1960).

В связи с особенностями жизненного цикла ихтиофтириуса он представляет интересный объект для цитохимических исследований. На стадии трофонта, единственной паразитической стадии ихтиофтириуса, происходит активное питание и накопление веществ, являющихся источником энергии. На последующих же стадиях жизненного цикла, не связанных с хозяином, ихтиофтириус не питается (стадии палинтомического деления, инвазионная стадия бродяжки). Во время этих стадий организм получает энергию, благодаря утилизации ранее накопленных веществ.

В работах Мак Леннена (Mc Lennan 1936, 1943) много сделано в отношении цитохимического изучения жизненного цикла ихтиофтириуса, однако, приведенные этим автором данные еще недостаточно полны. Наиболее подробно Мак Леннен изучил стадию трофонта в процессе его роста и накопления в нем запасных питательных веществ. Из последовательных стадий палинтомического деления он касается только второго и третьего делений, а о бродяжках упоминает вскольз. Не изучены им нуклеиновые кислоты.

Целью нашего исследования было получить более полное представление о динамике нуклеиновых кислот, запасного жира, белков и гликогена на всех последовательных стадиях жизненного цикла ихтиофтириуса, а затем выяснить, как влияют на состав и содержание этих компонентов такие неблагоприятные условия, как дефицит кислорода, низкие рН и низкие температуры.

Материал и методика

Работа была начата в мае 1960 г. и закончена в 1962 г.

Ихтиофтириуса мы получали в рыбхозе „Ропша” с колюшек и карпов, а затем разводили их в лабораторных условиях, содержа зараженную рыбу в кристаллизаторах в отстоянной водопроводной воде при комнатной температуре 18—20°C. При цитохимических исследованиях мы использовали следующие методы:

1. Жировые включения изучались на тотальных препаратах фиксированных 4% нейтральным формалином и окрашенных насыщенным раствором судана III, а также на срезах после фиксации жидкостью Шампи и последующей обработкой раствором Na_2S в 70% спирте.

2. Распределение полисахаридов изучалось на тотальных препаратах, окрашенных раствором Люголя, и на срезах подвергнутых реакции PAS по Мак Манусу и Хочкиссу в модификации Лилли. Контрольные срезы обрабатывались слюной (1 час при 37°C), холодной и горячей водой.

3. Белки мы выявляли сулемовым раствором бромфенолового синего по Мезия, Бреверу и Алферту, а основные белки прочным зеленым при pH 8.2 по Алферту и Гешвинду (Пирс 1962).

4. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) определялась с помощью реакции Фельгена.

5. Для определения рибонуклеиновой кислоты (РНК) использовалась окраска метиловым зеленым-пиронином по Унна при pH 4.7, толлуидиновым синим по Браше (Пирс 1962) и галлоцианином. Контролем служили срезы, обработанные раствором кристаллической рибонуклеазы.

6. Митохондрии окрашивались кислым фуксином по Кулю, Альтману (Ромейс 1953) и выявлялись с помощью реакции на сукциндегидразу с применением Нитро-СТ по Нахласу в модификации Бейер 1962.

Цитохимическая методика использованная нами, в ряде случаев не совпала с таковой применявшейся Мак Ленненом, который для определения жиров кроме судана III употреблял судан IV и сульфат нильского голубого, по методике Лоран Смита; для выявления гликогена хлор-цинк-йод с серной кислотой; для выявления белков реакцию Миллона на тирозин, а также нингидрин, который Пирс считает неудовлетворительной методикой для определения SH-групп (Пирс 1962). Митохондрии Мак Ленен окрашивал прижизненно светлым зеленым и кислым фуксином Альтмана.

В опытах по влиянию неблагоприятных факторов среды на количество и локализацию изучаемых компонентов мы подвергали инфузорий воздействию каждого из этих факторов в отдельности, а затем фиксировали и обрабатывали материал указанными выше цитохимическими методами.

Для получения малых количеств кислорода в среде мы использовали либо длительное кипячение воды, с последующим охлаждением в герметически закупоренном аппарате Боброва, из которого затем, как из батометра, заполнялись кислородные склянки с подопытными инфузориями, либо пропуская через воду очищенный водород.

Определение содержания водорода в начале и в конце опыта производилось по способу Винклера. Применение первой из указанных методик позволило снизить количество кислорода до 0.8 мг/л; вторым методом можно было добиться 0.4 мг/л O_2 и даже нулевых значений кислорода.

Для снижения рН вода подкислялась соляной кислотой. Определение рН производилось потенциометром ЛП-58.

Для получения данных по влиянию низких температур на обмен у ихтиофтириуса мы помещали зараженных рыб в холодильник и выдерживали их там от трех дней до одного месяца при 4°C.

Вагнер (Wagner 1960), не касаясь цитохимии, изучал влияние на развитие ихтиофтириуса низких температур, количества кислорода в воде, содержания солей и рН среды. Методика его исследования совпадает с нашей. Кислород он удалял кипячением, а рН среды изменял, добавляя в воду HCl и NaOH. Однако Вагнер проводил опыты при 15°C, тогда как мы — при 20°C, с чем, видимо, связано некоторое расхождение результатов.

Динамика запасных питательных веществ и нуклеиновых кислот на разных стадиях жизненного цикла ихтиофтириуса

Запасной жир

Во время роста трофонта, с первых дней внедрения его в кожу рыбы, происходит постепенное накопление нейтрального жира и он расходуется на тех стадиях жизненного цикла, которые протекают вне хозяина. У зрелого трофонта в ярко-оранжевый цвет судан III окрашивает довольно крупные капли жира, образующие неравномерные скопления (Рис. 1 А). Сразу же после инцистирования ихтиофтириуса, при подготовке его к размножению, расположение жира несколько меняется: капли его делаются мельче и более равномерно рассеяны по всей цитоплазме (Рис. 1 В—Г). Во время деления происходит распределение жира между дочерними особями. В работе Мак Леннена (Mc Lennan 1943) указывается, что у трофонта процентное содержание жира равно 6 по отношению ко всему объему тела, а к моменту завершения третьего деления снижается до 4.16%. К концу деления, перед выходом бродяжки из цист, количество жира в каждой особи все еще довольно велико. В это время капли жира немногочисленны, но сравнительно крупные (Рис. 1 Н) у вышедших из цист бродяжек, на первые сутки их свободного плавания, жир опять располагается более диффузно и более мелкими каплями (Рис. 1 I). На вторые сутки его становится гораздо меньше и капли имеют слабозеленый цвет (Рис. 1 J), а перед гибелью бродяжек жир почти совсем исчезает (Рис. 1 K). После проникновения бродяжек в рыбу количество жира в молодом трофонте опять начинает увеличиваться (Рис. 1 L). Картина эта подтверждается и при применении метода фиксации жидкостью Шампи с последующей обработкой Na₂S.

Гликоген

Только что снятый с рыбы зрелый трофонт обладает огромными запасами гликогена. При окраске раствором Люголя он оказывается весь забит гликогеновыми гранулами, сливающимися в сплошную темнокоричневую массу (Рис. 2 А). Во время палинтомического деления количество его уменьшается и уже на стадии 8 томитов можно различить отдельные скопления гликогена (Рис. 2 D), а на стадии 16—32 томитов гликоген располагается в виде крупных коричневых глыбок на светло-желтом фоне (Рис. 2 E—F). Перед выходом бродяжек из цисты эти глыбки все еще крупные и темно-окрашенные, а на стадии бродяжек происходит полное расходование запасов гликогена. На первые сутки свободного плавания бродяжки, гранулы его становятся мельче, распределяются равно-

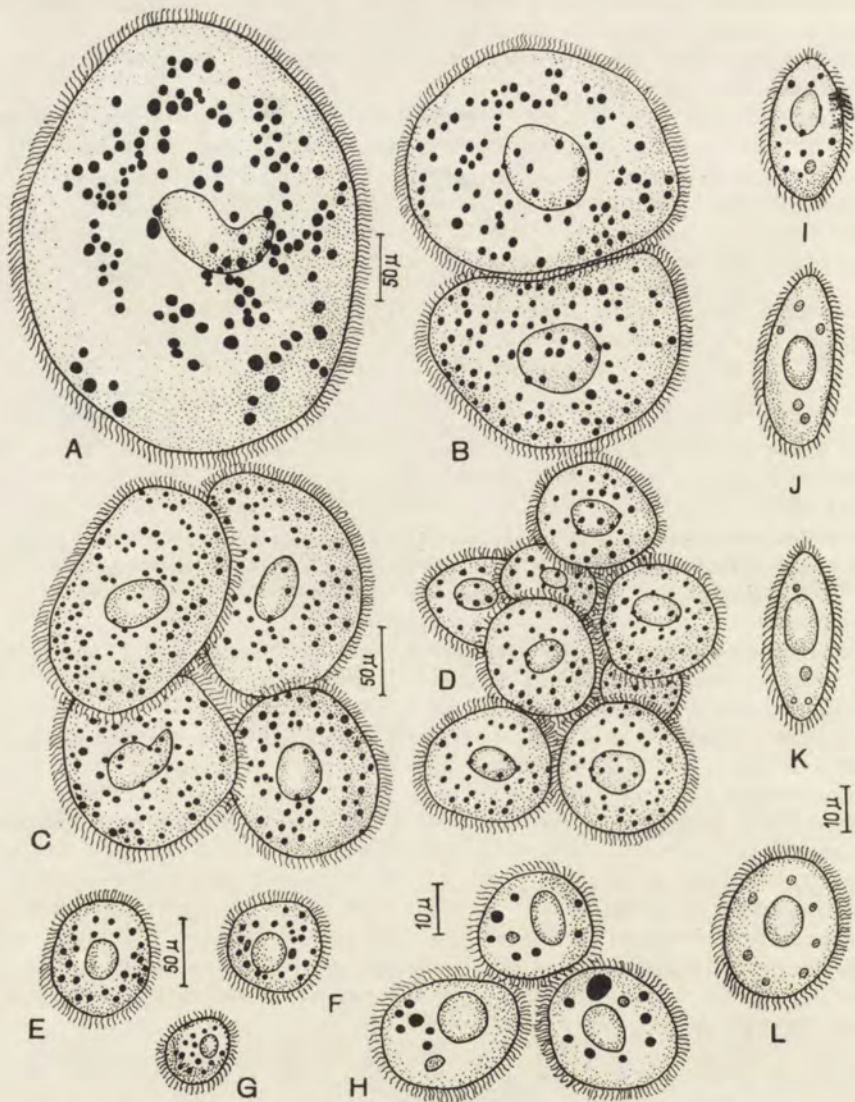


Рис. 1. Количество жира у разных стадий икhtiофтириуса (Судан III). А — трофонт, В — стадия двух томитов, С — четырех, D — восьми, E — 16, F — 32, G — 64, H — сформированная бродяжка перед выходом из цисты, I — только что вышедшая из цисты, J — через сутки, K — через двое суток после выхода из цисты, L — молодой трофонт на вторые сутки после внедрения в рыбу

Fig. 1. Quantity of fat in different stages (Sudan III). A — trophont, B — 2, C — 4, D — 8, E — 16, F — 32, G — 64 tomits stage, H — formed free-swimming individual before leaving the cyst, I — having just left the cyst, J — 24 hrs., K — 46 hrs. after leaving the cyst, L — young trophont the second day after penetrating into the fish

мернее и окрашиваются в более светлый коричневый цвет. На вторые сутки на лимонно-желтом фоне видны немногочисленные светло-коричневые пятнышки, а перед гибелью бродяжки они иногда и вовсе отсутствуют (Рис. 2 I). После внедрения бродяжки в рыбу, в первые сутки жизни паразитической стадии, вновь начинают появляться светло-коричневые глыбки гликогена (Рис. 2 J). Как отмечает Мак Леннен (Mc Lennan 1936) накопление его идет параллельно росту инфузорий. Этот же автор (Mc Lennan, 1943), центрифугируя

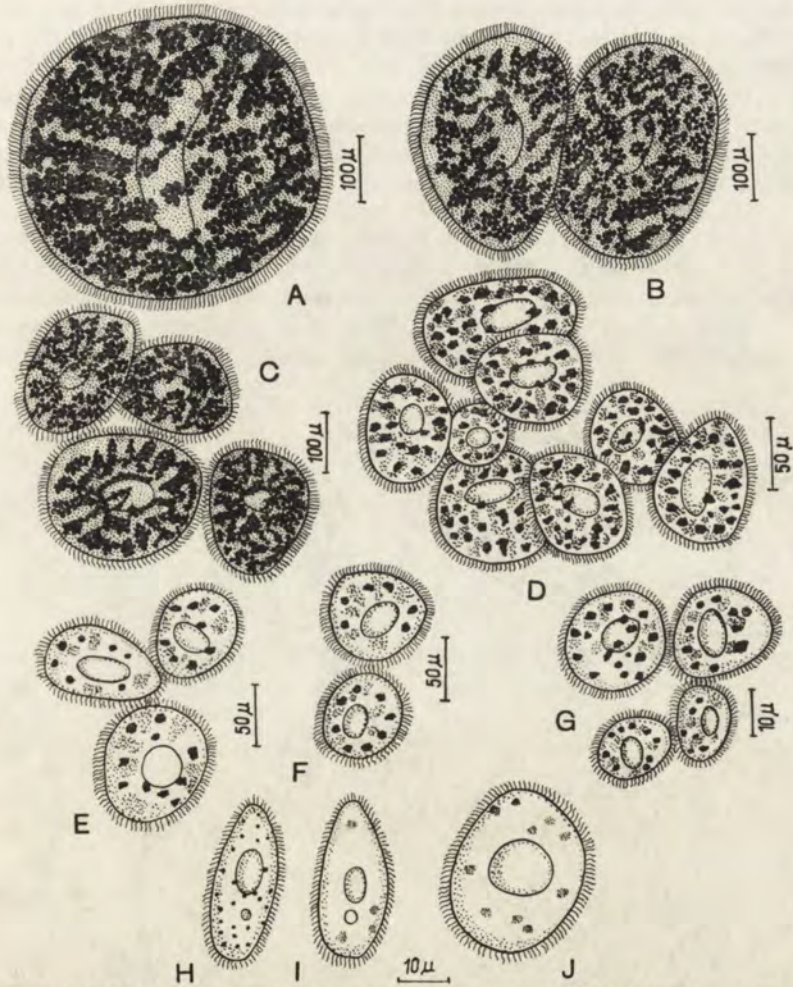


Рис. 2. Количество гликогена у разных стадий (Люголь). А — трофонт, Б — 2 томита, С — 4 томита, D — 8 томитов, Е — 16 томитов, F — 32 томита, G — бродяжка перед выходом из цисты, H — через сутки, I — через двое суток после выхода из цисты, J — молодой трофонт на вторые сутки после внедрения в рыбу

Fig. 2. Quantity of glycogen in different stages (Lugol). A — trophont, B — 2 tomits, C — 4 tomits, D — 8 tomits, E — 16 tomits, G — free-swimming individual before leaving the cyst, H — 24 hrs., I — 48 hrs. after leaving the cyst, J — young trophont the second day after penetration into the fish

ихтиофтириусов показал, что общее количество гранул гликогена и белка снижается к моменту завершения третьего деления с 30 до 28%. Расходование гликогена по мере деления и во время свободного плавания бродяжек мы обнаруживали также и с помощью методики PAS. Гликоген у ихтиофтириуса присутствует в одной из форм, которая нацело растворяется в слюне при 37°C и не растворяется в холодной и горячей воде — в форме парагликогена.

Белки

Запасной белок, окрашивающийся сулемовым раствором бромфенолового синего в темно-синий цвет, у трофонта представлен крупными гранулами, в большом количестве рассеянными во всей толще цитоплазмы (Рис. 3 А). Этим же методом в макронуклеусе выявляется мелкая синяя зернистость расположенная продольными рядами точно соответствующими расположению фельгенположительного материала. Эти же гранулы дают ярко-зеленое окрашивание прочным зеленым по методу Алферта и Гешвинда для выявления основных белков (Пирс 1962). Последний факт, так же, как и расположение гранул говорят о том, что гранулы эти представляют из себя гистоны связанные с ДНК (Браше 1960, Де Робертис, Новинский и Саэс 1962). Во время деления инфузории гранулы запасного белка в цитоплазме становятся мельче и распределяются более равномерно (Рис. 3 В—С). В макронуклеусе зерна гистона, во время деления, уже не образуют продольных рядов. Перед выходом бродяжек

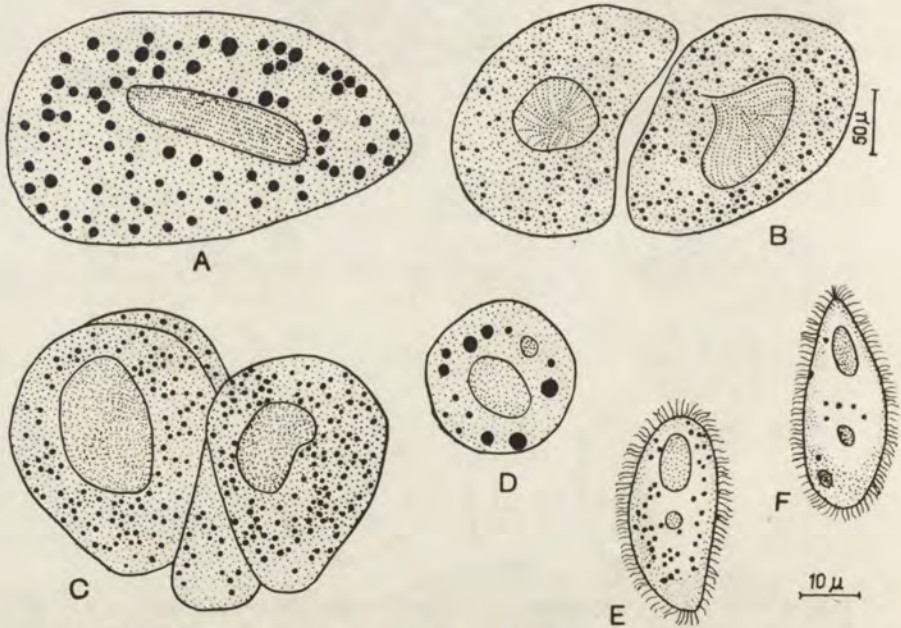


Рис. 3. Количество запасного белка у разных стадий (окраска бромфеноловым синим); срезы через: А — зрелого трофонта, В — стадию двух, С — 4-х томитов, D — бродяжек готовых к выходу из цисты, E — бродяжка через сутки, F — через двое суток после выхода из цисты

Fig. 3. Quantity of reserve protein in different stages (bromophenol-blue); sections of: A — an adult trophont, B — the stage of 2, C — the stage of 4 tomites, D — of free-swimming individuals ready for leaving the cyst, E — free-swimming individual 24 hrs., F — 48 hrs. after leaving the cyst

из цист в цитоплазме каждой дочерней особи остается небольшое количество крупных, по сравнению с объемом клетки, гранул запасного белка (Рис. 3 D). У бродяжек на первые сутки плавания гранулы запасного белка опять становятся мельче и рассеяны по всей цитоплазме, а на вторые сутки они совсем исчезают (Рис. 3 E—F).

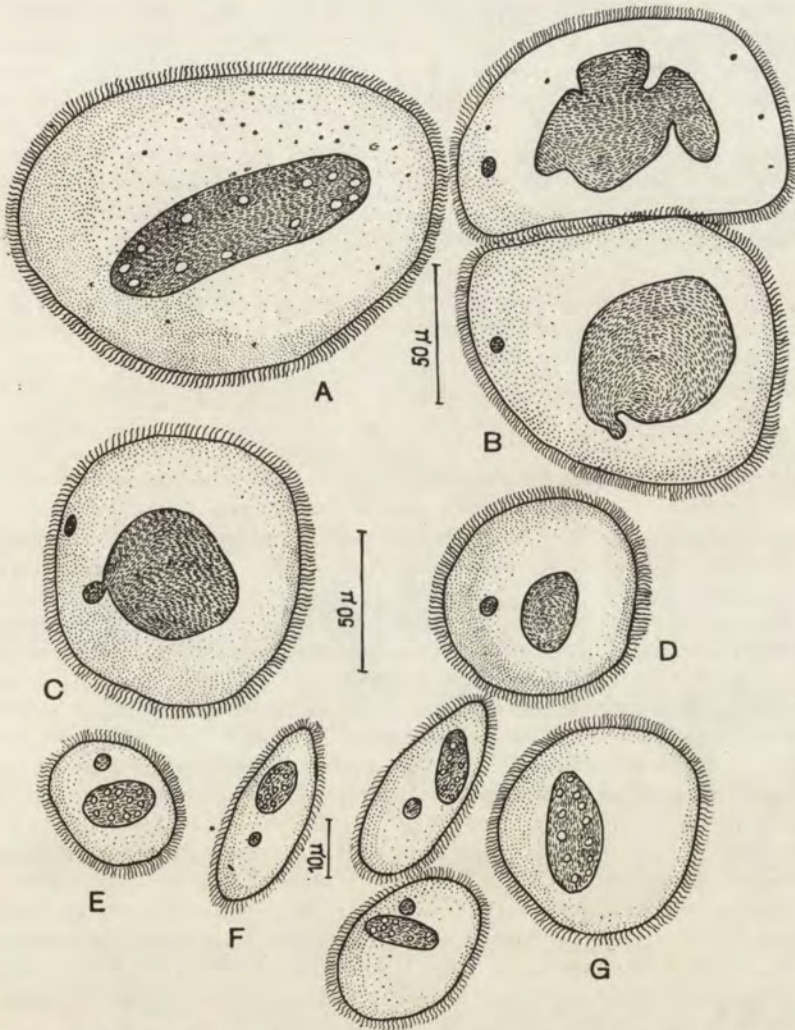


Рис. 4. ДНК на разных стадиях развития (реакция Фельгена, тотальные препараты). А — зрелый трофонт, В — 2 томита, С — 4 томита, D — 8 томитов, Е — бродяжка готовая к выходу из цисты, F — на вторые сутки после выхода из цисты, G — молодые трофонты, 2—6 дней после внедрения в рыбу

Fig. 4. DNA in different stages (Feulgen reaction, whole mounts). A — adult trophont, B — 2 tomits, C — 4 tomits, D — 8 tomits, E — free-swimming individual ready for leaving the cyst, F — second day after leaving the cyst, G — young trophonts 2—6 days after penetration into the fish

Нуклеиновые кислоты; ДНК

На всех стадиях жизненного цикла макронуклеус ихтиофтириуса дает интенсивную положительную реакцию Фельгена (Рис. 4 А—Г). В зависимости от момента деления макронуклеуса он то более, то менее компактен. На срезах через макронуклеус трофонта видны продольные ряды хроматиновых зерен. На стадиях палинтомического деления происходит элиминация части хроматина макронуклеуса и этот хроматин некоторое время присутствует в цитоплазме в виде фельгенположительных тельц. Микронуклеус у паразитической стадии находится в углублении макронуклеуса, а во время деления дает слабую положительную реакцию Фельгена. Поэтому на тотальных препаратах и даже на срезах через трофонт и томонт его трудно обнаружить. На стадиях 8—16 томитов он обычно хорошо виден. В промежутке между делениями он имеет вид округло-овального фельгенположительного тельца. После окончания палинтомии микронуклеус делается компактным, и у готовых к выходу из цисты и у свободноплавающих бродяжек по интенсивности окраски по Фельгену не уступает макронуклеусу. Другой фельгенположительный материал встречающийся в цитоплазме не что иное как ядра заглоченных ихтиофтириусом кровяных и эпителиальных клеток хозяина. Вскоре после прекращения питания они исчезают.

Нуклеиновые кислоты; РНК

Рибонуклеиновая кислота в большом количестве присутствует в цитоплазме, а также в довольно многочисленных нуклеолах в макронуклеусе трофонта. Это продемонстрировано на препаратах окрашенных галлоцианином, толлуидиновым синим и метиловым зеленым-пиронином. После обработки срезов рибонуклеазой цитоплазма не окрашивается указанными методами, а на месте нуклеол остаются пустоты (Рис. 5 А—В). Во время деления количество цитоплазменной РНК несколько снижается, судя по менее интенсивной окраске дочерних особей галлоцианином (Рис. 6). Что же касается нуклеол то они исчезают сразу же после инцистирования, при подготовке к первому делению (Рис. 5 С—F) и вновь появляются лишь после окончания деления перед выходом бродяжек из цисты (Рис. 5 G). У бродяжек нуклеол много и на вторые сутки их свободного плавания (Рис. 5 H). Увеличение количества нуклеол обычно связывают с усилением синтеза РНК и белка (Браше 1960). Таким образом можно думать, что во время деления синтез этих веществ в макронуклеусе приостанавливается, а затем опять усиливается. Известно, что во время митоза в интерфазном ядре клеток многоклеточных организмов нуклеолы исчезают к началу клеточного деления, одновременно с усилением способности хроматина к окрашиванию, а к концу деления нуклеолы возникают вновь. В этом отношении макронуклеус ихтиофтириуса обнаруживает сходство с ядрами клеток многоклеточных в период митоза.

Митохондрии

Сопоставление препаратов окрашенных кислым фуксином по Альтману и препаратов подвергнутых реакции на сукциндегидразу, показало что сукциндегидразной активностью обладают те самые гранулы, размером в среднем 0.5 μ , которые окрашиваются в темно-красный цвет кислым фуксином. Эти эндоплазматические тельца были обнаружены на всех стадиях жизненного цикла ихтиофтириуса (Рис. 7). Изучение под электронным микроскопом показало, что эти тельца обладают типичным для митохондрий строением. Количество их у тро-

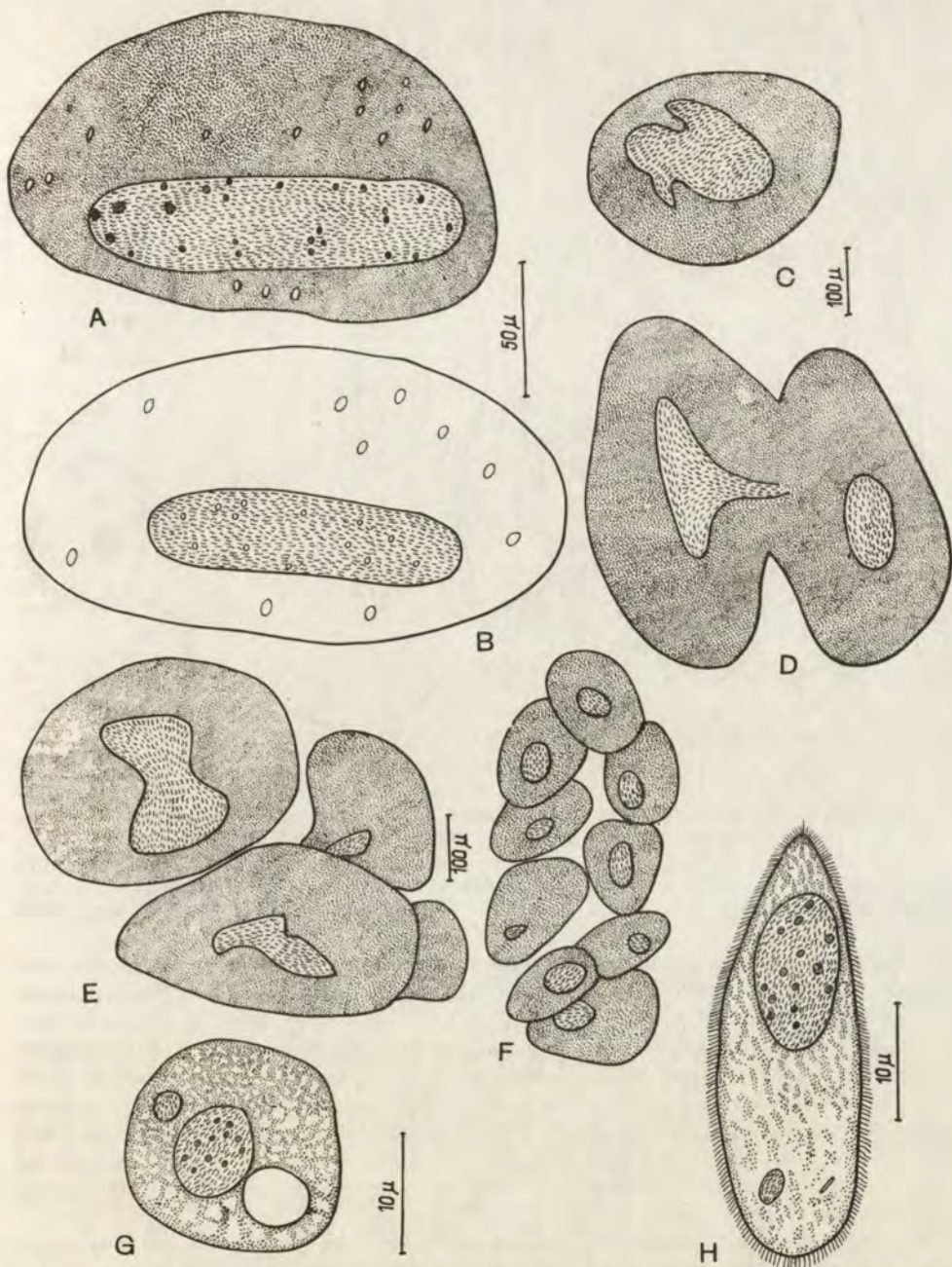


Рис. 5. РНК у разных стадий; срезы через: А — трофонта (окрашенный метиловым зеленым—пиронином), В — трофонта (окрашенный метиловым зеленым—пиронином, после обработки рибонуклеазой), С — только что инцистированного томонта, D — стадию двух, E — четырех, F — восьми томитов, G — бродяжек готовых к выходу из цисты, H — бродяжка на вторые сутки после выхода из цисты.

Fig. 5. RNA in different stages; sections of: A — trophont after methyl green-pyronine staining, B — a trophont stained with methyl green-pyronine after treatment with ribonuclease, C — a just incysted tomont, D — 2, E — 4, F — 8 tomits stage, G — free-swimming individuals ready for leaving the cyst, H — the second day after leaving the cyst

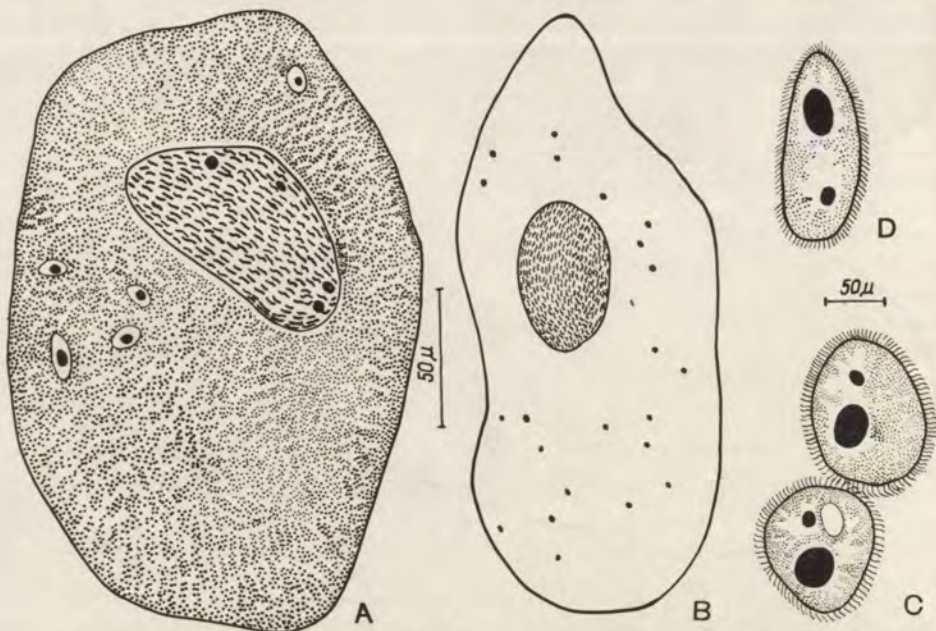


Рис. 6. РНК на разных стадиях (галлоцианин). А — срез через зрелого трофонта, В — срез через трофонта, окрашенный галлоцианином, после обработки рибонуклеазой, С — сформированные бродяжки, готовы к выходу из цисты, D — бродяжки через двое суток после выхода из цисты

Fig. 6. RNA in different stages (Gallocytanin). A — section of a mature trophont, B — of a trophont stained with gallocytanin after ribonuclease treatment, C — formed free-swimming individuals ready for leaving the cyst, D — two days after leaving the cyst

фонта очень велико. Во время деления митохондрии распределяются более или менее равномерно между дочерними особями. На последней стадии деления количество их колеблется в пределах от 60 до 200 в зависимости от размеров особей. У бродяжек митохондрии равномерно рассеяны в цитоплазме. Перед гибелью бродяжек их скопления обнаруживаются, обычно, вокруг макронуклеуса. Считается, что такая картина (Рис 7 G) чаще наблюдается в патологических случаях (Де Робертис, Новинский и Саэс 1962). Нужно отметить, что Mc Lennan 1936 указывает, что ему не удалось обнаружить хондриозом ни на стадиях деления, ни у бродяжек, и ошибочно приходит к выводу, что они на этих стадиях отсутствуют.

При выявлении сукциндегидразной активности на различных стадиях жизненного цикла ихтиофтириусов, мы, согласно методике, разбивали подопытных инфузорий, находящихся на одной из интересующих нас стадий, на 4 группы и каждая группа обрабатывалась особым образом. Первая группа подвергнута замораживанию на сухом льду, а затем, после оттаивания, инкубированная при 20°C в субстрате Нахласа без янтарнокислого натрия, не давала реакции на сукциндегидразу. Вторая группа, замороженная и инкубированная в субстрате Нахласа с янтарнокислым натрием, дала четкую специфическую реакцию на сукциндегидразу. На бледносиреневом или чуть розоватом фоне выступали темные сине-фиолетовые гранулы диформаза. Третья группа, не замороженная и инкубированная в субстрате Нахласа без янтарнокислого натрия, давала поло-

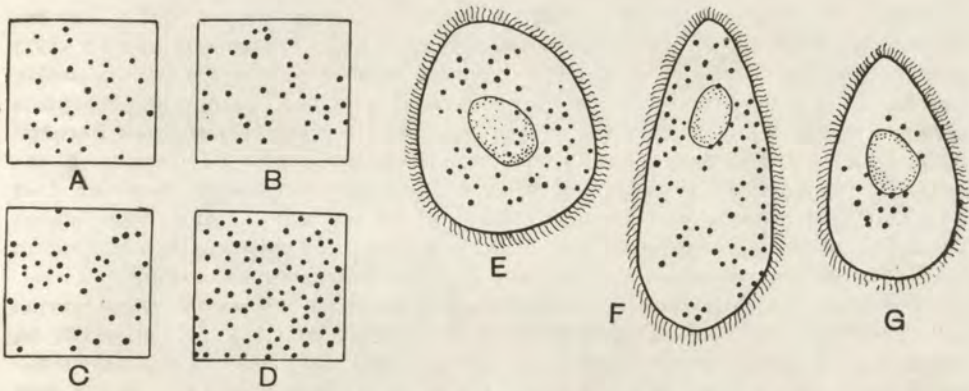


Рис. 7. Сукциндегидразная активность на разных стадиях. А — зрелый трофонт, В — только что инцистированный томонт, С — стадия двух томитов, D — трофонт два часа находившийся в условиях дефицита кислорода (0.7 мг/л), Е — бродяжки готовые к выходу из цисты, F — бродяжки через сутки после выхода из цисты, G — бродяжка перед гибелью.

Fig. 7. Activity of succindehydrogenase in different stages. А — adult trophont, В — just incysted tomont, С — 2 tomits stage, D — trophont kept for 2 hrs. in oxygen deficiency conditions (0.7 mg/l), Е — free-swimming individuals ready for leaving the cyst, F — first day after leaving the cyst, G — before death

жительную реакцию, по силе равную таковой в препаратах второй группы. В этом случае выявлялась эндогенная активность дегидраз. Четвертая группа, по которой выявлялась общая активность дегидраз и которая не замораживалась, а инкубировалась в субстрате Нахласа с янтарнокислым натрием, дала более сильную чем во второй группе положительную реакцию, с более сильной окраской фона. Локализация гранул формазана совпала с таковой во второй и третьей группе.

Экспериментально было выяснено, что лучшее время замораживания, для ликвидации эндогенной активности других дегидраз, для трофонта — 30 минут, а для бродяжек 10—12 минут. При инкубации трофонтов, после замораживания, которое приводит к нарушению пелликулы, положительную реакцию можно получить уже через 2—3 часа. Такой же срок достаточен и в том случае, если сделать в пелликуле проколы. Трофонт же с ненарушенной пелликулой должен инкубироваться не менее 12 часов. Что касается бродяжек, то для них достаточно и часовая инкубация.

Влияние различных неблагоприятных условий на запасы жира, гликогена, белка и на количество РНК

Низкие значения рН, дефицит кислорода и низкие температуры задерживают инцистирование и размножение ихтиофтириуса. Поэтому влияние перечисленных факторов изучалось только на трофонте.

Влияние низких температур

Известно, что ихтиофтириус не образует цист покоя и перезимовывает, видимо, на рыбах (Бауэр 1959). Как показали Бауэр 1955, 1959 и Вагнер (Wagner 1960) при температуре 2—3°C не происходит инцистирования и не образуется бродяжек. При 3—4°C инцистирование у покинувшего рыбу ихтиофт-

ириуса, может произойти так же как и выход бродяжек, но их образуется относительно немного: 50—100 в цисте, и они крупные. Согласно Бауеру 1959 температура оказывает очень большое влияние на рост паразита в тканях рыбы. При 28—30°C иктиофтириус достигает зрелости и покидает хозяина на четвертые сутки, а при 8—9°C на тридцать пять — сороковые сутки. По данным Вагнера (Wagner 1960) при 2—5°C весь цикл иктиофтириуса длится 2—4 месяца. В зимовалах температура, в зависимости от водоснабжения может быть от 1—2 до 7°C. Следовательно созревание иктиофтириуса на рыбе зимой очень задерживается. В связи с этим интересно было выяснить, что происходит в это время с запасными питательными веществами и с нуклеиновыми кислотами.

После переноса трофонтов, находящихся в рыбе из комнатной температуры в температуру 4°C уже на третьи сутки происходит сильное их ожирение, по сравнению с трофонтами содержащимися при 20°C. Крупные капли нейтрального жира, окрашивающиеся суданом III в оранжевый цвет, заполняют всю инфузорию (Рис. 8 В). Увеличивается также и количество гликогена (Рис. 8 А).

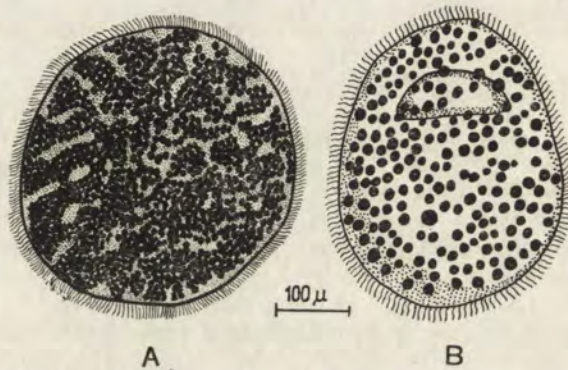


Рис. 8. Трофонт после месячного пребывания в температуре 4°C. А — гликоген выявленный люголем, В — жир выявленный суданом III.
Fig. 8. Trophont after one month long sejour in temp. 4°C. А — glycogen revealed with lugol, В — fat revealed with sudan III

Люголь дает почти черное окрашивание. Гликоген в этих условиях существует, видимо, в иной форме, чем при оптимальных температурных условиях, т. к. он легко растворяется не только слюной, но и холодной водой. После месячного пребывания трофонтов на рыбе в холодильнике при 4°C количество жира и гликогена очень велико, белковые гранулы также в большем количестве, чем при оптимальных температурах, заполняют цитоплазму (Рис. 9 А). Интересно, что за это время сильно возрастает количество РНК. В макронуклеусе появляется очень много нуклеол (Рис. 10) и хроматин по Унна дает не голубовато-зеленоватую окраску, как это наблюдается при выращивании иктиофтириуса при 20°C, а фиолетовую, что говорит об увеличении количества РНК не только в нуклеолах, но и РНК непосредственно связанной с хроматином (Браше 1960). Макронуклеус в это время интенсивно фельгенположителен, хроматиновые зерна расположены тесными продольными рядами, нуклеолы по методу Фельгена не красятся и образуют большое количество пустот по периферии ядра. Таким образом при низких температурах происходит значительное увеличение количества РНК и белка, накопление жира и гликогена, что должно быть

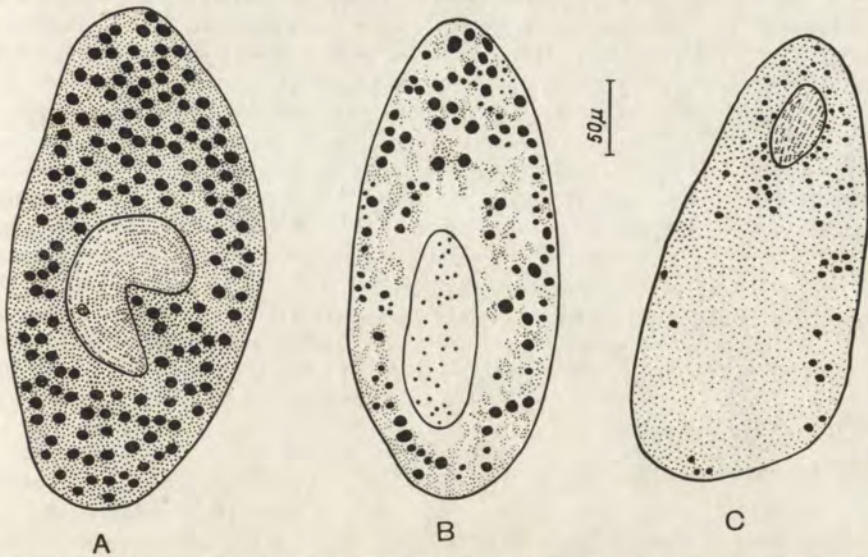


Рис. 9. Количество белка в зависимости от условий существования (окраска бромфеноловым синим); срезы через: А — трофонта ихтиофтириуса, прожившего месяц при 4°C, В — трофонта после часового его пребывания в воде с рН равным 4.7, С — трофонта ихтиофтириуса прожившего 2 часа в условиях дефицита O₂ (0.7 мг/л)

Fig. 9. Quantity of protein as depending on life conditions (bromophenol-blue stain); sections of: А — a trophont kept for 1 month in 4°C, В — a trophont kept in water with pH=4.7, С — a trophont kept for 2 hrs. in conditions of O₂ deficiency (0.7 mg/l).

Рис. 10. Нуклеолы в макронклеусе трофонта содержавшегося в течение месяца при температуре 4°C.
Fig. 10. Nucleoli in the macronucleus of a trophont kept for 1 month in the temp. 4°C



связано с замедлением созревания ихтиофтириуса, с удлинением паразитической стадии, на которой осуществляется питание, с замедлением скорости расходования запасных веществ, по сравнению с расходованием их во время нормального течения цикла в оптимальных условиях. Ихтиофтириус в это время растет, успевая достичь очень крупных размеров. При вскрытии рыб из зимовалов найденные на них ихтиофтириусы всегда очень крупны (до 1 мм), а в проходящем свете цитоплазма их кажется темной, т. к. заполнена запасными веществами. Если перенести таких ихтиофтириусов в температуру 15—20°C, то они сразу же оседают и начинают необыкновенно быстро делиться, давая при этом большое количество бродяжек. Такая задержка в созревании ихтиофти-

риуса, и увеличение размеров и количества запасных питательных веществ так же, как и РНК в зимний период, может иметь значение для поддержания численности вида. За зиму ихтиофтириусов на рыбах остается немного. В случае гибели рыбы и попадании ихтиофтириусов в воду они либо совсем не дают бродяжек, либо дают их слишком мало. Весной же с повышением температуры те инфузории, которым удалось сохраниться, обладая значительными размерами, большими запасами питательных веществ, сразу производят большое количество жизнеспособных бродяжек, которые, имея больше запасов, могут дольше плавать и заражать, поэтому, большее число рыб. Увеличение количества запасных питательных веществ и количества нуклеиновых кислот при низких температурах отмечено и у свободноживущих простейших (Ковалева 1962 и 1963, Ковалева и Селиванова 1963, Полянский 1963). Давно известным фактом является также увеличение размеров свободноживущих инфузорий, выращиваемых при низких температурах (Hertwig 1903, Полянский 1957, Александров 1962). Оба эти явления связывают с замедлением темпов деления и обмена.

Влияние низких рН среды

По данным Вагнера (Wagner 1960) рН, при которых ихтиофтириус может существовать и размножаться, при температуре 15°C колеблется от 6 до 10. По нашим данным, полученным при температуре 20°C, ихтиофтириусы еще давали инвазионных бродяжек, при рН равных 5. При более низких значениях рН инцистирования и размножения не происходит. При очень низких рН равных 3.4—4.0 прекращалось движение и через 5 минут наступала гибель, при рН 4.15 инфузории погибали за 20 минут, при рН 4.9 они жили в течение двух часов.

Если рН было не слишком низким и смерть наступала не очень быстро, то прижизненно можно было наблюдать происходящие в теле паразита изменения: инфузории вытягиваются по продольной оси и начинают быстро плавать производя при этом вращательные движения вокруг длинной оси. Цитоплазма светлеет. Благодаря изменению состояния коллоидов цитоплазмы происходит отщипывание капель жира, которые сливаются и образуют наблюдаемое *in vivo* большое черное пятно на заднем конце инфузории. Это же пятно красится суданом III и чернится при применении жидкости Шампи с последующей обработкой Na_2S (Рис. 11). После оседания ихтиофтириуса на дно, начинают проявляться клеточные структуры, хорошо становится виден макронуклеус, а затем прекращается биение ресничек и инфузория погибает.

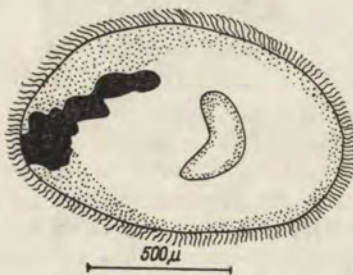


Рис. 11. Отщипывание капель жира под влиянием низкого рН.
Fig. 11. Aggregation of fat globules as effect of a low pH

Ни при окраске раствором Люголя, ни при применении методики PAS не удается подметить изменений количества гликогена, количество гранул запасного белка остается тем же. Реакции на ДНК и РНК не дают заметных отличий

от контроля. Однако, при всех методах окраски цитоплазма кажется как бы створоженной или хлопьевидной в связи с изменением состояния коллоидов под влиянием низких рН. Гистоны в макронуклеусе, имеющие обычно вид продольных рядов мелких гранул, после пребывания ихтиофтириуса в течение часа в среде с рН 4.7 собираются в более крупные глыбки (Рис. 9 В).

Подобные изменения состояния коллоидов под влиянием слабых кислот и щелочей у простейших описывались и раньше (Johnson 1924, Hopkins 1926) и вполне совпадают с комплексом изменений, характерных для паранекроза (Насонов и Александров 1940, Насонов 1962).

При действии на ихтиофтириуса концентрации водородных ионов равной 4.7 в течение часа эти явления еще обратимы. При более длительных воздействиях таких рН, или при воздействии более высоких концентраций водородных ионов (рН 3.5—4.15) паранекротические изменения переходят в необратимую коагуляцию коллоидов, приводящую к смерти.

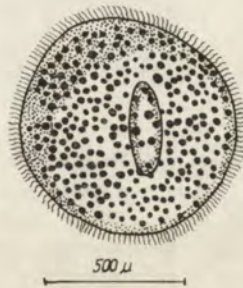
Влияние дефицита кислорода в воде

В опытах Вагнера, начиная с 0.6—0.8 мг O₂ на 1 л. воды при 15°C, а в наших опытах начиная с 0.8 мг/л при 20°C, ихтиофтириусы уже не могут нормально жить и размножаться и через некоторое время погибают. При наблюдении *in vivo*, неспособные к делению при дефиците кислорода, ихтиофтириусы некоторое время плавают, затем сильно раздуваются и оседают на дно. Такие картины можно было наблюдать при концентрации O₂ равной 0.6 мг/л — через 3 часа, при более низких концентрациях O₂ равных 0.3—0.15 — через 1—1.5 часа.

У подопытных ихтиофтириусов происходит заметное ожирение, вся плазма забита крупными каплями жира (Рис. 12). Ожирение при удушьи — явление

Рис. 12. Ожирение в условиях дефицита кислорода

Fig. 12. Fat deposition in conditions of oxygen deficiency



давно установленное для простейших. Еще Жинкин 1929 и затем Барбарин 1938 отмечали его у *Stentor* и *Paramecium*. Указанные авторы высказывают мнение, что образование жира во время удушья — это „следствие расщепления запасов гликогена и распада протоплазматических белков”. Барбарин отмечает, что у *Paramecium caudatum* параллельно ожирению идет уменьшение запасов гликогена, гликоген в этом случае является основным энергетическим источником, а жир при этом не вовлекается в процессы обмена, а откладывается в клетке.

У ихтиофтириуса такой связи между гликогеном и жиром не наблюдается. В последних сроках удушья гликогена у него остается так же много, как и в контроле. (Препараты обрабатывались раствором Люголя и по методике PAS). При дефиците кислорода у ихтиофтириуса происходит усиленное расходование белковых запасов. На препаратах, окрашенных бромфеноловым синим, в контроле крупные белковые гранулы равномерно распределены по всему полю среза,

у подопытных животных их остается очень мало и большая часть цитоплазмы имеет серо-голубой цвет без синих гранул (Рис. 9 А). Таким образом, при дефиците кислорода у ихтиофтириуса наблюдается ожирение, количество гликогена остается приблизительно на том же уровне, количество же белка резко уменьшается. Случаи использования простейшими белкового субстрата во время аэробного дыхания уже отмечались в литературе (работа Boell and Woodruff 1941 с *Paramecium calkinsi*, Humphrey and Humphrey 1948 с *Paramecium caudatum*).

В условиях дефицита кислорода количество нуклеол в макронуклеусе ихтиофтириуса уменьшается, и если удастся продержать инфузорий в склянке с низким содержанием кислорода в воде (0.9—1.0 мг/л в начале опыта; 0.8—0.7 в конце) сутки, то нуклеолы не видны совсем. Изменений в интенсивности окраски цитоплазменной РНК за этот срок обнаружить не удалось. Как показали опыты, ихтиофтириус является аэробом. По данным Вагнера (Wagner 1960) в среднем, во время палинтомического деления, каждая делящаяся особь потребляет 0.001 мг O_2 за 24 часа при температуре 15°C. Недостаток кислорода в воде приводит к серьезному нарушению в обмене и к гибели организма.

Применение метода с нитро-СТ по Нахласу в модификации Бейер показало, что существенную роль в дыхании ихтиофтириуса играет сукциндегидраза. При попытке выяснить сукциндегидразную активность у ихтиофтириуса находящегося в условиях пониженного содержания кислорода в воде (0.7 мг/л в течение двух часов и в течение 20 часов при колебании O_2 от 0.9 до 3.0 мг/л), была получена положительная реакция. Казалось, что митохондрии у подопытных ихтиофтириусов расположены гуще и окрашены ярче, чем в контроле (препараты замороженные и инкубированные в субстрате Нахласа с янтарно-кислым натрием; Рис. 7 С). Должно быть затруднения в дыхании вызывают вначале усиление ферментативной активности. Насколько изменяется в это время интенсивность дыхания нам не известно, т.к. мы не измеряли скорость потребления O_2 .

Для того чтобы понять механизм дыхания ихтиофтириуса мы провели опыты с ингибиторами дыхания. В качестве ингибитора сукциндегидразной активности мы использовали малонат. Т.к. малонат является ингибитором конкурентного типа, то для контроля использовалась смесь сукцината с малонатом, раствор сукцината и вода. Для выявления наличия системы цитохромов мы использовали в качестве ингибитора KCN, а затем испытывали действие KCN с малонатом. Ввиду того, что ихтиофтириус плохо переносит такие стандартные среды, как среда Лозина-Лозинского и буферные растворы, мы проводили эти опыты используя в качестве среды некую водопроводную воду, отстоянную в течение трех суток, т.е. ту воду, которую мы употребляли и при разведении ихтиофтириуса. Опыты наши длились не более 5 часов. За это время вряд ли могли произойти существенные сдвиги в составе этой нестандартной среды. В предварительных опытах мы испробовали разные рН для ингибиторов и выяснилось, что при рН 5.0—5.4, как малонат, так и KCN действуют на ихтиофтириуса быстрее, чем при более высоких рН. По литературным данным (Диксон и Уэбб 1961, Михлин 1960) в этих пределах рН и малонат, и цианиды должны проявлять себя как ингибиторы, а для ихтиофтириуса эти концентрации водородных ионов тоже еще благоприятны. Поэтому те серии опытов, результаты которых мы используем для выводов, проводились именно при этих значениях рН. Предварительные опыты позволили выяснить, что при указанных рН малонат действует на тропонта в концентрации N/500, тогда как KCN не ниже

Таблица 1

Действие ингибиторов на трофонта при pH 5 (среднее из 2-х серий опытов)*

Время в мин.	Малонат N/500	Малонат + сукцинат N/500	Сукцинат N/500	KCN		KCN N/200 + малонат N/500	Вода
				N/100	N/200		
0	—	—	—	—	—	—	—
3	(—)	—	—	—	—	—	—
10	(±)	—	—	(—)	—	—	—
13	+	—	—	(±)	—	—	—
15		(—)	—	+	—	(—)	—
20		(—)	—		(—)	(—)	—
23		(—)	—		(—)	(±)	—
28		(±)	—		(—)	(±)	—
30		(±)	—		(±)	(±)	—
35		(±)	—		(±)	+	—
38		+	—		(±)		—
46			—		+		—
60			инцисти- ровались				инцисти- ровались

* Во всех таблицах: — нормальное состояние инфузории, (—) — угнетенное состояние, (±) — частичная гибель, + — стопроцентная гибель. Количество трофонтов в каждом опыте было не менее 20, бродяжек не менее сотни.

Таблица 2

Действие ингибиторов на трофонта при pH 5.4

Время в мин.	Малонат N/500	Малонат + сукцинат N/500	Сукцинат N/500	KCN N/200	KCN N/200 + малонат N/500	Вода
0	—	—	—	—	—	—
5	(±)	—	—	—	—	—
10	(±)	—	—	—	—	—
11	+	(—)	—	—	—	—
60		(±)	—	—	(—)	—
85		+	—	—	(±)	—
175			—	—	+	—
238			—	(—)		—
255			—	(±)		—
300			инцисти- ровались	+		инцисти- ровались

Таблица 3

Действие ингибиторов на бродажек при pH 5 (средние из 2-х серий опытов)

Время в мин.	Малонат		Малонат + сукцинат		Сукцинат		KCN N/200	KCN N/200 + малонат N/500	Вода
	N/500	N/1000	N/500	N/1000	N/500	N/1000			
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	+	+	(—)	—	—	—	—	—	—
5			(—)	(±)	—	—	—	—	—
10			(±)	(±)	—	—	—	—	—
11			+	(±)	—	—	(—)	—	—
12				+	—	—	(—)	—	—
15					—	—	(±)	(—)	—
25					—	—	+	(±)	—
36					—	—		+	—

Таблица 4

Действие ингибиторов на бродажек при pH 5.4

Время в мин.	Малонат N/500	Малонат + сукцинат N/500	KCN N/500	KCN + малонат N/500	Сукцинат N/500	Вода
0	—	—	—	—	—	—
5	+	(—)	(—)	(—)	—	—
25		+	(—)	+	—	—
30			+		—	—

Таблица 5

Влияние ингибиторов на трюфонта при pH 5.4 (среднее из 3-х серий опытов)

Время в мин.	Малонат N/500	KCN N/300 + малонат N/500	KCN N/300 + малонат N/500 + монооксиацетат N/3000	Вода
6	—	—	—	—
5	(—)	—	(±)	—
8	(±)	—	+	—
13	+	(—)		—
30		(±)		—
40		(±)		—
65		+		—

чем в концентрации N/200, на бродяжек же в концентрации N/500 KCN и N/1000 малоната.

Из приведенных рядом таблиц (Таблицы 1—4) видно, что малонат убивает инфузорий быстро, при помещении же их в смесь малоната с сукцинатом, являющихся конкурентами, срок жизни трофонты, так же как и бродяжек удлиняется. В растворе сукцината N/500 ихтиофтириусы способны инцистироваться и начать деление, что говорит об отсутствии токсического действия данных концентраций этого вещества. Исходя из этих данных можно утверждать, что важную роль в дыхании ихтиофтириуса играет сукциндегидраза. То, что KCN, в низких концентрациях (N/200, N/500), оказывает летальное действие на трофонты и бродяжек указывает на наличие системы цитохромов у ихтиофтириуса. Осталось непонятным почему смесь малоната с KCN неизменно действует медленнее, чем один малонат. Для выяснения причин этого явления были поставлены дополнительные опыты с испытанием воздействия на ихтиофтириуса смеси малоната, KCN и моноодацетата. В Таблице 5 приведены усредненные данные, полученные на основании трех опытов. Из таблицы видно, что в смеси всех трех ингибиторов ихтиофтириус погибает быстрее всего, в смеси же малоната и KCN медленнее всего. Полученные результаты наводят на мысль, что при резком подавлении аэробной части дыхания, с одновременным воздействием на сукциндегидразу и систему цитохромов, вступает в действие гликолитический механизм, который, однако, не может обеспечить длительного существования и ненадолго продлевает жизнь ихтиофтириуса.

Резюме

В ходе жизненного цикла ихтиофтириуса запасной жир, гликоген и белок накапливаются по мере роста паразитической стадии и расходуются во время палинтомического деления и, главным образом, во время свободного плавания бродяжек. Синтез РНК в Ма наблюдается у трофонты, прекращается во время деления и возобновляется после окончания деления продолжаясь и у бродяжек. Митохондрии выявляются на всех стадиях жизненного цикла. Все стадии обнаруживают значительную сукциндегидразную активность, связанную с митохондриями.

Пребывание ихтиофтириуса в условиях низких положительных температур (+4°C) приводит к задержке его созревания и удлинению сроков паразитирования. За месяц, проведенный в этих условиях на рыбе, трофонт успевает достичь крупных размеров, в нем происходит накопление всех запасных питательных веществ (жир, гликоген, белок) и увеличение количества РНК в ядре и цитоплазме.

Высокая концентрация водородных ионов в воде (рН ниже 5 при 20°C) вызывает изменение состояния клеточных коллоидов по типу паранекроза и в конечном итоге приводит к гибели ихтиофтириуса. Дефицит кислорода в воде приводит к ожирению и чрезмерному расходованию белков. Концентрация кислорода ниже 0.8 мг/л при 20°C оказывается летальной в связи с нарушением обмена.

Сукциндегидраза играет существенную роль в дыхании ихтиофтириуса. Ихтиофтириус обладает системой цитохромов. Возможно наличие гликолитического механизма, который, однако, не может обеспечить существования в условиях дефицита кислорода. Все это говорит о том, что ихтиофтириус облигатный аэроб.

SUMMARY

The investigation of reserve materials, RNA, DNA, and respiratory enzymes at different stages of the life cycle of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet was carried out under the optimum and unfavourable conditions. It was found that the reserve materials (i. e. glycogen, fats and proteins) were accumulated at the parasitic stages, and were utilized both, at stages of palintomic division and of free-swimming. During the palintomic division RNA of nucleoli in the macronucleus was found to disappear and reappear only after the division being completed. All the stages show positive succinic dehydrogenase activity connected with mitochondria. It was established that low temperatures retarded the development of *Ichthyophthirius* prolonging its parasitic stage and lead into the accumulation of all investigated materials and of RNA. The deficiency of oxygen (lower than 8 mg/l at 20°C) leads to the overfattening, to the enormous decrease of proteins and, as a result, to the death of *Ichthyophthirius*. The high hydrogen-ion concentration (i. e. pH lower than 5, at 20°C) leads to the paranecrosis and also to the death. It is stated that the great part in the respiration of *Ichthyophthirius* is played by succinic dehydrogenase. The system of cytochrome enzymes is present. The glycolysis does not play any particular part in maintaining the existence of *Ichthyophthirius* which is the obligate aerobic organism.

ЛИТЕРАТУРА

- Александров В. Я. 1962: Экспериментальный анализ понятия чувствительность. Изв. АН СССР сер. биол. 4, 83—117.
- Барбарин В. В. 1938: Факторы определяющие баланс жира и гликогена у *Paramecium caudatum*. Сообщение 3. Влияние удушья на накопление жира. Биол. журн. 7, 391—398.
- Бауер О. Н. 1955: Ихтиофтириус в прудовых хозяйствах и меры борьбы с ним. Изв. ВНИОРХ 36, 1—206.
- Бауер О. Н. 1959: Экология паразитов пресноводных рыб. Изв. Гос. НИОРХ 49, 1—206.
- Бейер Т. В. 1962: О распределении сукциндегидразы в жизненном цикле *Eimeria intestinalis*. Цитология 4, 232—237.
- Boell E. and Woodruff L. 1941: Respiratory metabolism of mating types in *Paramecium calkinsi*. J. Exp. Zool. 87, 385—402.
- (Brachet J.) Браше Ж. 1960: Биохимическая цитология. Москва.
- Buschkiel A. L. 1910: Beiträge zur Kenntnis des *Ichthyophthirius multifiliis*. Arch. Protistenk. 21, 1—102.
- Buschkiel A. L. 1936: Neue Beiträge zur Kenntnis des *Ichthyophthirius multifiliis*. Arch. Neerland. Zool. 2, 176.
- Breindl V. und Jirovec O. 1934: Cytologie und Entwicklung von *Ichthyophthirius multifiliis*. Vestnik Kral. Čes. Spol. Nauk. 2, 1—7.
- (De Robertis E., Novinski W. and Saez F.) Де Робертис Э., Новинский В. и Сазс Ф. 1962: Общая цитология. Москва.
- (Dickson M. and Webb E.) Диксон М. и Уэбб Э. 1961: Ферменты. Москва.
- Haas G. 1933: Beiträge zur Kenntnis der Cytologie von *Ichthyophthirius multifiliis*. Arch. Protistenk. 81, 88—137.
- Hertwig R. 1903: Über Korrelation von Zell und Kerngrösse. Biol. Zbl. 23, 49—62, 108—119.
- Hopkins D. L. 1926: The effect of hydrogen-ion concentration on locomotion and other life processes in *Amoeba proteus*. Proc. N-Y. Acad. Sci. 7, 311—315.
- Humphrey B. A. and Humphrey G. E. 1948: Studies in the respiration of *Paramecium caudatum*. J. Exp. Biol. 25, 123.
- Johnson W. N. 1924: The reactions of *Paramecium* to solution of known hydrogen-ion concentration. Biol. Bull. 37, 119.

- Ковалева Н. Е. 1952: Влияние температуры культивирования на чувствительность инфузорий к повреждающему воздействию рентгеновских лучей. Цитология 4, 306—317.
- Ковалева Н. Е. 1963: Влияние температурного фактора на содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в макронуклеусе *Paramecium caudatum*, облученных рентгеновскими лучами. Сб.: Вопр. морф. и физиол. простейших, 123—130.
- Ковалева Н. Е. и Селиванова Г. В. 1963: Влияние температурного фактора на содержание ДНК и РНК в макронуклеусе *Paramecium caudatum*. Цитология 5, 273—279.
- McLennan R. F. 1935: Observation on the life cycle of *Ichthyophthirius* a ciliate parasitic on fish. North West Scient. 9, 12—14.
- McLennan R. F. 1936: Dedifferentiation and redifferentiation in *Ichthyophthirius*. II. The origin and function of cytoplasmic granules. Arch. Protistenk. 86, 404—426.
- McLennan R. F. 1937: Growth in the ciliate *Ichthyophthirius*. I. Maturity and encystment. J. Exp. Zool. 76, 423—441.
- McLennan R. F. 1942: Growth in *Ichthyophthirius*. J. Exp. Zool. 91, 1—15.
- McLennan R. F. 1943: Centrifugal stratification of grannules in the ciliate *Ichthyophthirius*. J. Morphol. 72, 1—25.
- Михлин Д. М. 1960: Биохимия клеточного дыхания. Изд. АН СССР.
- Mugard H. 1948: Regulation du nombre des cinéties au cours du cycle d'un cilié *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. Arch. Anat. Micr. Morph. Exp 37, 204—213.
- Насонов Д. Н. 1962: Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. Изд. АН СССР.
- Насонов Д. Н. и Александров В. Я. 1934: К вопросу об изменениях живого вещества при обратном переходе его в мертвое состояние. Арх. биол. наук. 36, 1—96.
- Насонов Д. Н. и Александров В. Я. 1940: Реакция живого вещества на внешнее воздействие. Москва—Ленинград.
- Neresheimer E. 1908: Der Zeugenskreis des *Ichthyophthirius*. Ber. Biol. Versuchsstation München. 1, 165—184.
- Nie Da-shau и Lee Lean-siang 1960: Изучение морфологии и жизненного цикла ихтиофтириуса и лечение от него с описанием нового вида (китайский). Тр. Инст. гидробиол. АН, 10 марта.
- (Pears E.) Пирс Э. 1962: Гистохимия теоретическая и прикладная. Москва.
- Полянский Ю. И. 1957: Температурная адаптация у инфузорий. I. Зависимость теплоустойчивости *Paramecium caudatum* от температурных условий существования. Зоол. журн. 36, 1630—1664.
- Полянский Ю. И. 1963: Зависимость содержания гликогена и жира в цитоплазме *Paramecium caudatum* от температуры. Сб.: Вопр. морфол. и физиол. простейших. 103—110
- (Romeis V.) Ромейс В. 1953: Микроскопическая техника. Москва.
- Wagner G. 1960: Entwicklungszyklus von *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet und der Einfluss physikalischer und chemischer Aussenfaktoren. Z. Fischerei 9, 425—442.
- Жинкин Л. Н. 1929: Жир и причины его образования у инфузории *Stentor polymorphus*. Тр. Петергофск. естеств. научн. инст. 6, 199—215.

Fasciculi praeparati:

M. V. Krylov: On the validity of the genus *Smithia* França [К вопросу о самостоятельности рода *Smithia* França] — A. Czapik: La stomatogenèse du Cilié *Uronema marinum* Dujardin (*Hymenostomatida*, *Tetrahymenina*) [Stomatogeneza orzęska *Uronema marinum* Dujardin (*Hymenostomatida*, *Tetrahymenina*)] — M. Wolska: Study on the representatives of the family *Paraisotrichidae* Da Cunha (*Ciliata* — *Trichostomata*) [Badania nad przedstawicielami rodziny *Paraisotrichidae* Da Cunha (*Ciliata* — *Trichostomatida*)] — E. M. Cheissin and L. P. Ovchinnikova: A photometric study of DNA content in macronuclei and micronuclei of different species of *Paramecium* [Фотометрическое изучение содержания ДНК в макронуклеусах и микронуклеусах разных видов *Paramecium*] — E. M. Cheissin, L. P. Ovchinnikova and B. N. Kudriavtsev: A photometric study of DNA content in macronuclei and micronuclei of different strains of *Paramecium caudatum* [Фотометрическое изучение содержания ДНК в макронуклеусах и микронуклеусах различных линий *Paramecium caudatum*] — B. R. Seshachar and R. Vimala Devi: Cytology of *Frontonia elliptica* (Beardsley) [Cytologie der *Frontonia elliptica* (Beardsley)] — B. R. Seshachar and R. Vimala Devi: Observations on *Spirostomum teres* Clap. [Beobachtungen über *Spirostomum teres* Clap.] — Ю. И. Полянский и Т. М. Познанская: Длительные культивирование *Paramecium caudatum* при 0° [A long-lasting culture of *Paramecium caudatum* at 0°] — Г. В. Касинова: Влияние различных условий культивирования зеленых и бесцветных клеток *Euglena gracilis* на их выживаемость после рентгеновского облучения [Influence of different culture conditions of green and noncoloured cells of *Euglena gracilis* on their survival after X-ray irradiation] — L. Czarska: Role of the K⁺ and Ca²⁺ ions in the excitability of protozoan cell. Chemical and electric stimulation of contractile vacuoles [Znaczenie jonów K⁺ i Ca²⁺ w pobudliwości komórki pierwotniaczej. Drażnienie chemiczne i elektryczne wodniczek kurczliwych] — V. Golemansky: Thécamoebiens nouveaux et peu connus [Нови и малко познати тестадеи] — М. В. Крылов: О развитии некоторых пироплазмид в организме позвоночных хозяев [On the development of some piroplasmidians in the vertebrate hosts].

SUBSCRIPTION

price is \$ 7.50 for one volume consisting of four parts appearing quarterly

Place your order with your bookseller or directly with:

RUCH

Warszawa, Wilcza 46, Poland

Payment should be remitted to the local bank for transfer to Account No. 1534-6-71 at Narodowy Bank Polski, Warszawa, Poland.

In the East-European countries the subscription orders are to be placed with the local agencies for press distribution.

Fasciculi:

10. T. Fenchel: On the morphology, morphogenesis and systematics of *Thigmophrya* Ch. Lw. (*Ciliata*, *Thigmotrichida*) with a description of *T. saxicavae* sp. n. [*Thigmophrya* Ch. Lw. (*Ciliata*, *Thigmotrichida*), dens morfologi, morfogeneze og systematiske stilling, med en beskrivelse of *T. saxicavae* sp. n.] 113
11. M. Jerka-Dziadosz: *Urostyla cristata* sp. n. (*Urostylidae*, *Hypotrichida*); the morphology and morphogenesis [*Urostyla cristata* sp. n. (*Urostylidae*, *Hypotrichida*); morfologia i morfogeneza] 123
12. M. Jerka-Dziadosz: Localization of the organization area in course of regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. [Lokalizacja pola twórczego u *Urostyla grandis* Ehrbg. w przebiegu regeneracji] 129
13. I. Totwen-Nowakowska: Doublets in a clone of *Stylonychia mytilus* (O. F. M.) [Dublety w hodowli *Stylonychia mytilus* (O. F. M.)] 137
14. P. de Puytorac: Quelques aspects de l'ultrastructure du Cilié: *Prorodon viridis* Ehrbg. Kahl [Some aspects of the fine structure of the Ciliate: *Prorodon viridis* Ehrbg. Kahl] 147
15. M. Wolska: Infraciliature of *Didesmis ovalis* Fior. and *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) — fam. *Buetschliidae* (*Ciliata*, *Rhabdophorina*) [Infraciliatura *Didesmis ovalis* Fior. i *Blepharozoum trizonum* (Hsiung) — fam. *Buetschliidae* (*Ciliata*, *Rhabdophorina*)] 153
16. S. L. Kazubski: Contribution to the study of the fauna of parasitic ciliates in the land snail *Poiretia algira* (Brug.) from Yugoslavia [Przyczynę do poznania fauny orzęsków pasożytujących u ślimaka lądowego *Poiretia algira* (Brug.) w Jugosławii] 159
17. Г. И. Сергеева: Активность кислой фосфатазы на разных стадиях жизненного цикла *Nyctotherus cordiformis* (Ehrbg.) Stein (*Ciliata*) [Activity of acid phosphatase at different stages of the life cycle of *Nyctotherus cordiformis* (Ehrbg.) Stein (*Ciliata*)] 163
18. А. В. Успенская: Запасные питательные вещества, РНК, ДНК и дыхательные ферменты на разных стадиях жизненного цикла *Ichthyophthirius multifiliis* [Reserve materials, RNA, DNA, and respiratory enzymes at different stages of the life cycle of *Ichthyophthirius multifiliis*] 175