

ACTA PROTOZOO- LOGICA

REDACTORUM CONSILIUM

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

O. JIROVEC (PRAHA), G. I. POLJANSKY (LENINGRAD),

Z. RAABE (WARSZAWA)

VOLUMEN III

Fasciculi: 28—35

W A R S Z A W A 1 9 6 5

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 *Paramecium*körpers. *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 English and French papers text-figures should be determined — Fig., in German — Abb., and in Russian — Рис. 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.

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.

Zdzisław RAABE

The parasitic ciliates of gastropods in the Ohrid Lake

Orzęski pasożytujące w *Gastropoda* jeziora Ohrid

During my stay at the Hydrobiological Station in Ohrid on the Ohrid Lake (Macedonia — Yugoslavia), I took opportunity of collecting a fairly abundant material of ciliates, parasites or commensals in the mantle cavity of the local *Gastropoda* and *Bivalvia*. I was especially interested in the ciliate fauna of gastropods, the majority of them being endemic and highly specific forms. I wish to express here my gratitude to Prof. S. Stanković, the patron of the Station, to Dr J. Točko, its director, as well as to all colleagues for their sincere and fraternal friendship I met with. A special gratitude is due to Dr S. Hadžišće, conversant with the *Gastropoda* of the Ohrid Lake, for having devoted so much time and trouble for common excursions and determination of molluscs of which many forms were described by himself.

The specific fauna of the lake Ohrid — similarly as e.g. that of the Baikal or Tanganyika lakes — contains many endemic elements especially of *Gastropoda* (Radoman 1955, Hadžišće 1956, Hubendick 1958, Stanković 1962). The family *Hydrobiidae* with two subfamilies, *Hydrobiinae* and *Pyrgulinae* is here especially highly developed. After complementation the list presented by Stanković 1962 (not embracing the data of Hadžišće 1956), the situation may be characterized as follows:

In the Ohrid Lake and in adjacent waters (canals, small streams, sources) 70 species of *Gastropoda* occur, among them 45 species of *Prosobranchia* and 25 species of *Pulmonata*. In the lake itself, various authors have reported 50 species of *Gastropoda* — among them 37 *Prosobranchia* and 13 *Pulmonata*. Out of those lacustrine forms, 46 are endemic species: 35 *Prosobranchia* and 11 *Pulmonata*, consequently 95% of *Prosobranchia* and 85% of *Pulmonata* have been stated as endemic forms.

The share of *Hydrobiidae* in this fauna is imposing: there are 30 species of them in the lake, and 6 in the adjacent waters, all being endemic. *Hydrobiidae* make up 60% of the lacustrine *Gastropoda* and as much as 81% of lacustrine *Prosobranchia*.

The origin of the endemic fauna of the Ohrid Lake was for a long time the subject of controversial discussion, similarly as the fauna of the Baikal and Tanganyika lakes or similar isolated water bodies. The majority of recent authors are inclined to the view that the specificity of those faunistic complexes is the result of intralacustrine speciation. In the case of the Ohrid Lake, this might had been an evolution of forms originating very likely

from the tertiary Sarmatic Sea. I think as adequate to share this view which is represented by Stanković 1962 as well as by Hubendick 1958.

Besides this endemic fauna, in the Lake Ohrid widely spread species occur which presumably got secondarily into the lake, a long time after it was isolated from the Sarmatic Sea complex. They failed to change much in the lake itself. The ways of penetration of those forms to the lake are unknown, because the lake has only a few small affluents which are separated from other water complexes by a high watershed, and only one outflow, the river Drin, which discharges itself into the Adriatic Sea. Drin has some connections with the basin of Morava and Danube from one, and of Vardar (the Greek Axios) from the other side. The way by Drin is suggested for *Theodoxus fluviatilis* by Poliński 1932. It might be supposed that this way is possible also for other species. In the course of my research, over 1200 specimens of *Gastropoda* belonging to 23 species of *Prosobranchia* and to 10 species of *Pulmonata* had been examined. They originated either from the lake

Table 1

Investigated gastropods of the Ohrid Lake and their ciliate parasites

Hosts	Habitats and parasites	Springs	Depth			<i>Scyphidia</i>	<i>Trichodina</i>	<i>Ancistrumina</i>	<i>Anc-comidae</i>
			0—5 m	10—30 m	50—110 m				
<i>Pseudamnicola consociella</i> Frau.		100						×	×
„ <i>sturanyi</i> West.			140	35		×	×	×	×
<i>Horatia ochridana</i> (Pol.)			10	10		×	×	×	?
„ <i>brusinae</i> Radoman					1		×	×	
„ <i>pygmaea</i> (West.)		25					×		
<i>Ohridohoratia komareki</i> Hadž.			8						
<i>Lyhnia gjorgjevici</i> Hadž.		10					×	×	
„ <i>stankovici</i> Hadž.			12				×		
<i>Gocea ohridana</i> Hadž.			18				×	×	
<i>Ohrigocea samuili</i> Hadž.			10						
<i>Pyrgohydrobia grochmalickii</i> (Pol.)			50						
<i>Ginaia munda</i> Sturany				100		×			×
<i>Pyrgula polinskii</i> Rad.					6	×			
„ <i>sturanyi</i> Brusina			20	100		×			
„ <i>pavlovici</i> Pol.				40		×			
„ <i>dybowski</i> (Pol.)				15					
„ <i>macedonica</i> Brusina			40					?	
„ <i>stankovici</i> (Pol.)					5				
<i>Valvata stenotrema</i> Pol.			15	30		×	×		
„ <i>hirsutecostata</i> Pol.				5	3				
„ <i>relicta interlithonis</i> Hadž.			22						
<i>Viviparus viviparus</i> L.			100						
<i>Theodoxus fluviatilis dalmaticus</i> Sow.			20	5		×	×		
<i>Pulmonata</i> gen. gen., sp. sp.		160	82	2					

itself or from its bays or its auxiliary springs. Table 1 presents the list of *Prosobranchia* examined with references to their origin (depth) and to ciliates found in them. The following species of *Pulmonata* have been investigated: *Ancylus lapicidus* Hub. (10 specimens), *A. tapirus* Pol. (2), *Gyraulus albidus* Rad. (25), *G. crenophilus* Hub. Rad. (100), *G. trapezoides* Pol. (1), *G. lychnidicus* Hesse (5), *Batyomphalus contortus* L. (50), *Anisus planorbis* L. (10), *Radix ovata relicta* Pol. (35), *Lymnaea stagnalis* L. (6). In any representatives of those species parasitic or commensalic ciliates were not found.

In general, in the *Gastropoda* of the Ohrid Lake I failed to state genera or even any species of ciliates which would correspond by their specificity to the high specificity or endemity of their hosts. Their distinctness in some cases may be considered as a distinctness of a species range only.

The ciliates, exclusively found in *Prosobranchia*, belong to 5 genera: *Trichodina* and *Scyphidia* of *Peritricha*, and *Ancistrumina*, *Hypocomatophora* and *Heterocinetopsis* of *Holotricha-Thigmotricha*.

Trichodina baltica Quen., in the Ohrid Lake

Trichodina baltica from *Theodoxus fluviatilis* was described by Quennerstedt 1869 from brackish water of Baltic near Visby (Sweden) and found subsequently by J. et Z. Raabe 1959, 1961 in *T. fluviatilis* as well in the brackish waters of the southern Baltic coast, as in the shore lakes, as in the Polish lowland as — at last — in the mountain river Morača which discharges itself into the Skadarsko Lake in Yugoslavia. Although in some waters *Theodoxus* was free from *Trichodina* (e.g. in the Vistula near Warszawa), it may be concluded that *Trichodina baltica* Quen. is its specific and faithful parasite and accompanies it upon the whole territory of its occurrence, as well in brackish as in fresh waters, in stagnant pools and in current waters, in lowlands and in mountainous territories.

Specific conditions were stated by J. et Z. Raabe 1959 in the brackish waters of the southern Baltic bays. *T. fluviatilis* is there highly infected (100%). Sometimes a mass infection occurs. Nevertheless the authors found *Trichodina baltica* in other *Gastropoda* which live in the same or similar biotops as *Theodoxus* but its occurrence was less frequent and less abundant. This was the case in three representatives of the family *Hydrobiidae*: *Hydrobia ulvae*, *H. ventrosa*, *H. jenkinsi* (= *Potamopyrgus crystallinus*) and in the only living here representative of *Pulmonata*: *Lymnaea ovata baltica* Nilas. The authors concluded that "the especially strong infection of *Theodoxus fluviatilis*, and the rare and very mild infection of the remaining snails is an indication that *Theodoxus* is the main, typical host of *T. baltica* Quen., the remaining snails are therefore accessory, secondary hosts".

All the data indicate that in the Ohrid Lake a similar situation occurs. *Theodoxus fluviatilis dalmaticus*, found there in the littoral, is 100% infected with *T. baltica*. The characteristic features of the population of this ciliate exactly correspond to those which had been stated by J. et Z. Raabe 1959, 1961 for the populations from *T. fluviatilis*. *Trichodina* has been stated by me in the following *Gastropoda* species of the Lake Ohrid as well: *Pseudamnicola sturanyi*, *Horatia ochridana*, *H. brusinae*, *H. pygmaea*, *Lychnidia gjorgjevici*, *L. stankovici* and *Gocea ohridana* (all belonging to *Hydrobiidae*), and *Valvata stenotrema* (*Valvatidae*).

In all these molluscs, *Trichodina* occurred in moderate numerosity and in a comparatively low percentage of hosts. The low numerosity of populations may be accounted for by smaller body dimensions of *Hydrobiinae* than those of *Theodoxus*. The smaller extensiveness of infection can hardly be explained because the molluscs studied, e.g. *Pseudodamnicola sturanyi* lived in a considerable accumulation exceeding that of *Theodoxus* in those territories.

All the *Trichodina* populations found in *Gastropoda* of the lake Ohrid had similar morphological characters, concerning as well their dimensions as numeral features (Tab. 2). Differences between populations did not surpass those which had been stated for other hosts by J. et Z. Raabe. Therefore I do not hesitate to include all the representatives of the genus *Trichodina* found in *Prosobranchia* of the Ohrid Lake, to the species *T. baltica* Quen., even without necessity of distinction of any infraspecific taxonomic units or so called forms.

Table 2
Trichodina baltica Quen. in various hosts and localities

Host	Locality	Adh. disc diameter	Dent. ring diameter	Number of denticles	
<i>Limnaea ovata baltica</i>	Puck Bay	30—51	18—27	21—28	J.Z. Raabe 1959, 1961
<i>Hydrobia</i> sp. sp.	Puck Bay	41—48	21—28	24—30	
<i>Theodoxus fluviatilis</i>	Gulf of Gdańsk	30—55	16—31	22—30	
<i>Theodoxus fluviatilis</i>	Żarnow. Lake	32—52	16—30	21—29	
<i>Theodoxus fluviatilis</i>	Zeta — Yugosl.	40—53	19—34	21—33	
<i>Theodoxus fluviatilis</i>	Ohrid Lake	42—51	25—30	22—26	recent investig.
<i>Pseudamnic sturanyi</i>	Ohrid Lake	33—46	18—28	21—26	
<i>Horatia pygmaea</i>	Ohrid Lake	42—50	26—28	25—27	
<i>Horatia ochridana</i>	Ohrid Lake	42—48	25—28	25—26	
<i>Gosea ohridana</i>	Ohrid Lake	40—45	18—27	20—26	
<i>Valvata stenotrema</i>	Ohrid Lake	46—59	25—34	26—30	

The postulation that *Theodoxus fluviatilis* is the genuine and main host of *Trichodina baltica* Quen. in a broad geographical range and ascertaining that in the Ohrid Lake it is highly infected with this parasite — whereas the other molluscs species are infected much less — speaks in favour of the view that: *T. fluviatilis* brought along its own parasite *T. baltica* Quen. to the lake Ohrid. Here the parasite found another supplementary hosts among other *Gastropoda* similarly as it occurred in the brackish waters of the South Baltic Sea. It should be stressed that like *T. fluviatilis*, nearly all *Hydrobiidae-Hydrobiinae*, as examined by myself, were found infected. Free from infection were *Hydrobiidae-Pyrgulinae*, even those which live in similar conditions as the former subfamily. Like *Hydrobiinae*, *Valvata stenotrema* proved to be infected as well. Besides, no *Trichodina* was found in any of the *Pulmonata*

species studied, even in *Radix relicta* Pol. (= *Lymnaea ovata relicta*), although *Limnaea ovata baltica* in the Baltic was sometimes infected with *Trichodina baltica* (J. et Z. Raabe, 1959).

Ancistrumina limnica (Raabe) in the Ohrid Lake

The situation of the fresh-water representatives of the genus *Ancistrumina* Raabe (= *Ancistrina* Cheissin) is not sufficiently elucidated (Raabe 1959). The first species has been described by Cheissin 1931 from the Baikal Lake as *Ancistrina ovata* from *Prosobranchia* belonging to the endemic genera *Benedictia* and *Choanomphalus*. The fact of finding in the Baikal gastropods of two other representatives of the family *Hemispeiridae* (= *Ancistridae*) which has been considered as a marine family, namely: *Ancistrella* Cheissin, 1931 and *Tiarella* Cheissin, 1931 (= *Cheissinia* Chatton et Lwoff), should serve as evidence in favour of the marine origin of the Baikal fauna. Nevertheless Raabe 1947 described *Ancistrina limnica* from numerous *Planorbidae* and *Unionidae* of Polish fresh waters, and Raabe 1950 — *A. tihanyensis* from *Lithoglyphus* of the lake Balaton (Hungary) which occurs there together with *A. limnica*. The great variability of *A. limnica* indicates that perhaps *A. tihanyensis* is only its ecological form — but the question requires further study (Raabe 1959). It seems, however, that the representatives of the genus *Ancistrumina* — and may be only different forms of the variable species *A. limnica* — are more widely represented in the fresh waters of Palearctics than it seems to be and was documented up to date.

The representatives of the genus *Ancistrumina* have been found by me in the lake Ohrid in 6 species of *Hydrobiidae-Hydrobiinae*, as both in the spring species (*Pseudamnicola consociella* or *Lyhnia gjorgjevici*), in the littoral forms (*Pseudamnicola sturanyi*, *Horatia ochridana*, *Gocea ohridana*) and finally, in the benthic *Horatia brusinae*. A special attention is deserved by the occurrence of *Ancistrumina* in such a specific species from the so called interlithon (Hadžišće 1956), as *Gocea ohridana* with a despiralized mussel and a cone-shaped operculum. I found once *Ancistrumina* in *Pyrgula macedonica* — in the only specimen from a single fishing in which *P. sturanyi* was very abundant. The possibility of migration of the parasite into an unspecific host cannot be excluded in this case. It seems to be a striking fact that *Ancistrumina limnica* occurs in the same species of *Hydrobiidae* in which *Trichodina baltica* was also found.

All the *Ancistrumina* of the lake Ohrid — despite a certain population and individual variability — possess the characters of one species. These characters are in conformity with those which were by me attributed to *Ancistrumina limnica*. I include all of them to this species without finding necessity of distinguishing any forms characteristic for the lake Ohrid. The ubiquitous and cosmopolitan species *A. limnica* (Raabe, 1947) Raabe 1959 acquires new hosts and a new territory of occurrence.

Only *Ancistrumina* from *Horatia brusinae* seemed to differ slightly in their body outline which was more blunt at its posterior end. Perhaps this deviation is associated with the fact that *H. brusinae* is the only deep-water species among those studied by me. Unfortunately, my preserved material is not sufficient to support the observed difference by more exact data. The difference in the body outline only cannot be a sufficient argument for distinguish-

hing a taxonomic unit. This is proved by the data of Issel 1903 concerning the variability of *Ancistromina cyclidioides* (Issel) of different marine molluscs.

Ancistrocomidae of the Lake Ohrid

The representatives of the family *Ancistrocomidae* in the Ohrid Lake have been stated by me with no doubt in a high percentage in *Pseudamnicola sturanyi* and in *Ginaia munda* only, rarely in *Horatia ohridana* and in the spring form *Pseudamnicola consociella*. *Ancistrocomidae* seemed to occur in *Horatia ohridana*, in a low numerosity and in a low percentage of hosts, only then if this host was found together with *Pseudamnicola sturanyi*. It was possible that there occurs a transfer of the parasite from *P. sturanyi* already in the laboratory. The scarcity of material and the lack of suitable preparations were obstacles in my study on the representatives of *Ancistrocomidae* from *P. consociella* which were similar to those from *P. sturanyi*.

Ancistrocomidae (found in a sufficient number) may be included to two very similar and little precised genera: *Hypocomatophora* Jar. Raabe (= *Heterocineteta* Mawrodiadi — Jarocki 1934) and *Heterocinetopsis* Jarocki.

The type-species of the genus *Hypocomatophora* is *H. unionidarum* Jar. Raabe 1932, which was afterwards wrongly synonymized by Jarocki 1934 with the incorrectly described species *Heterocineteta anodontae* Mawrodiadi 1927: the synonymization was not accepted by Chatton et Lwoff 1950. Jarocki 1934, 1935 described some more species of the genus *Heterocineteta* from fresh-water *Gastropoda* of the environments of Warszawa. Not exact descriptions and lack of good drawings or photograms in the studies of Jarocki do not allow to evaluate the degree of distinctness of these species. Possibly some of them should be some time recognized as "forms" only.

The type-species of the genus *Heterocinetopsis* is *H. reichenowi* Jarocki 1935 from *Viviparus viviparus*. The feature distinguishing this genus from *Heterocineteta* (= *Hypocomatophora*) should be the unusual length of several (3) terminal kineties which form the left boundary of the thigmotactic area and beginning of all the kineties at the same distance from the "suctorial tentacle". Jarocki has failed to notice that the latter character occur just in *H. unionidarum* Jar. Raabe, and therefore is not distinctive. Jarocki has also overlooked that just in *H. reichenowi* not all of the kineties reach the tentacle — as it follows from his photograms — and form an only slightly marked "système secant".

The revision of the genera *Hypocomatophora*, *Heterocinetopsis* and *Hypocomella* will be discussed by me at another occasion. In the present considerations, I intend to analyse the similarity of the lake Ohrid forms to the typical species of *Hypocomatophora* and *Heterocinetopsis*.

Heterocinetopsis ohridanus sp. n.

As in the majority of *Ancistrocomidae*, the body is much elongated, banana-shaped, tapering at its anterior end, the posterior end being rounded and slightly bent. Body dimensions are: length 30—45 μ , width ca. 15 μ . The thigmotactic area is on the concave body part. Ma is ovoid, sometimes fusiform, its dimensions are 10 \times 6 μ . Close to it lies the small Mi, 3 μ in diameter. C. V.

is slightly marked and fairly active. It lies in the posterior body part. Concretion vacuoles often appear near it.

The ciliary system of the thigmotactic area consists of 9 kineties. The first kinety (starting from the right side of the area) describes an arch bent to the right, and reaches beyond the half of body length. The second kinety is of nearly the same length as the first one, the next 3 are gradually somewhat shorter and reach less far backwards. They initiate gradually farther from the base of the suctorial tentacle. On the left side, the system is closed by

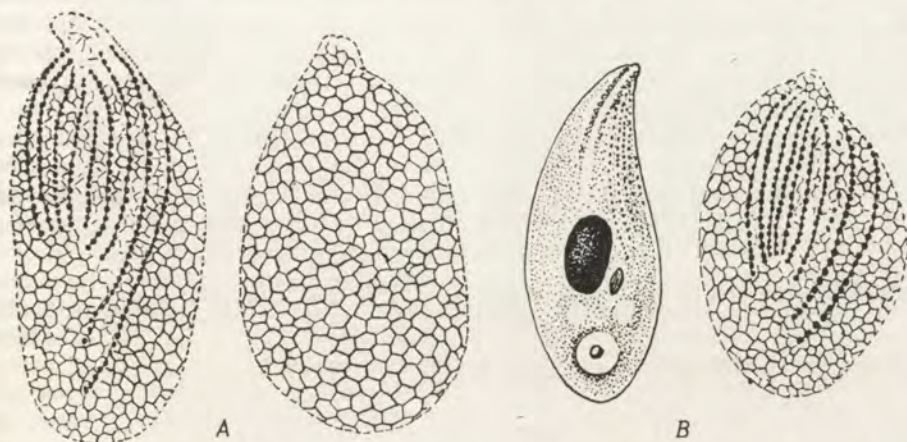


Fig. 1. *Ancistrocomidae* of the Ohrid Lake. A — *Heterocinetopsis ohridanus* sp.n. B — *Hypocomatophora makedonica* sp.n. After haematoxylin and silver-impregnated preparations

4 gradually longer kineties, bent left and less closely disposed. Especially two last of these kineties are distinctly longer so that the last one (the 9th) reaches nearly the body end. The whole naked body surface is covered by an argentophil network of a strikingly regular structure.

The similarity of *Heterocinetopsis ohridanus* sp. n. to the typical — and only yet — species of the genus consists in the distinct elongation of the body, conspicuous elongation of the last kineties of the thigmotactic system, constriction of kineties at the base of tentacle (overlooked by Jarocki 1935) and in formation of the parenthetical system ("système secant"). Jarocki stressed also the high regularity of the argentophil network. The two species differ in: the number of kineties (12 in *H. reichenowi*), some deviations in their system, body dimensions and other host specificity.

The host of *H. ohridanus* sp.n. is *Ginaia munda* Stur. from the lake Ohrid fished at the depth of about 15 m. In some populations of *Ginaia munda*, the parasite could not be found even if a considerable number of specimens was examined. It usually occurred together with *Scyphidia* sp.

Hypocomatophora makedonica sp. n.

The body is not much elongated, banana-shaped, rounded at its posterior end, tapering forwards. Dimensions: length 20—25 μ , width ca. 8 μ . The ciliated thigmotactic area lies on the concavity of the body. Ovoid or fusiform Ma

is situated in the middle body length and measures $10 \times 4 \mu$. Mi is often fusiform and is located on the side of Ma. It measures about 3μ . C.V. is slightly marked, lies posteriorly and is often accompanied by concretion vacuoles.

The ciliary system of the thigmotactic area consists of 9 kineties. The first (right) kinety is bent right as a slight arch. It reaches beyond the half of the body length. The next 5 kineties are nearly parallel to it, but become gradually shorter, so that the last one — the sixth — reaches scarcely as far as half of the body length. The system is closed by 3 kineties, bent leftwards, much longer than the others so that the last of them reach beyond $3/4$ of the body length. All the kineties initiate nearly at the base of the tentacle, rarely the fifth or the sixth one is slightly shifted. The naked body surface is coated by a fairly regular network.

Hypocomatophora makedonica sp.n. differs distinctly from the other species of the genus *Hypocomatophora* (or *Heterocinetia*) by a more plainly pronounced asymmetry of the ciliary system which is still more conspicuous than in e.g. *H. chattoni* (Jarocki 1934) from *Radix ovata*. The confusions in the taxonomy within this genus do not allow to analyse exactly these differences.

The host of *H. makedonica* sp.n. is *Pseudamnicola sturanyi* West. from the Ohrid Lake. It was found most frequently in snails of the shallow littoral, of the bottom overgrown by *Chara*, at the depth of about 5 m. It occurred together with *Trichodina*, *Scyphidia* and *Ancistrumina*.

Scyphidia sp. of the Lake Ohrid

The representatives of this genus, occurring in the lake Ohrid in many *Prosobranchia*, had not been investigated by me more exhaustively. *Scyphidia* are to be worked out and especially so is the problem of their species distinction and specificity to their hosts. The problems of range of *Scyphidia physarum* and of the specific appartenance of the common *Scyphidia* sp. occurring in *Theodoxus fluviatilis* are either not elucidated.

I found very numerous *Scyphidia* sp. in *Theodoxus fluviatilis* from the Ohrid Lake in all the individuals studied. Like in my previous study, I found it always in this mollusc species of the European lowland and in the river Morača which discharges into the Skadarsko Lake in the Crna Gora (South Yugoslavia). These *Scyphidia* were always high and cylindrical.

Similar *Scyphidia* sp. were found by me — less frequently — in *Valvata stenostrema*. The distribution of *Scyphidia* among *Hydrobiidae* is not regular. More common is their occurrence in *Pyrgulinae*. In *Pyrgula sturanyi* plump forms are found mostly on tentacles; in *P. pavlovici* — some similar but slightly smaller; in *P. polinskii* — huge specimens; in *Ginaia munda* — frequent and rather numerous. In *Hydrobiinae*, *Scyphidia* species are rare and not numerous. They were found in *Pseudamnicola sturanyi* and seemingly — in *Horatia ohridana*.

Conclusions

Among ciliates the parasites or symbionts of the mantle cavity of *Gastropoda* of the Lake Ohrid, forms highly specific — as specific as their hosts — fail to occur. There are neither forms which might indicate a connection with

the marine fauna — as the Baikal *Tiarella* = *Cheissinia* or *Ancistrella* may be considered (in a rather free interpretation).

Consequently it should be assumed that the endemic mollusc fauna of the lake Ohrid probably arose by intralacustrine speciation, and failed to produce equally specific forms among commensal or parasitic ciliates by a parallel evolution.

The ciliate parasites of the lake Ohrid molluscs seem to be rather late acquirement introduced to the lake Ohrid by ubiquitous mollusc species. Such a species introduced by *Theodoxus fluviatilis* seems to be *Trichodina baltica* Quen. which invaded some other *Gastropoda*, namely *Hydrobiinae* and *Valvata stenotrema* in the lake Ohrid. Possibly, the same way was passed along by *Ancistrumina limnica* Raabe, invading in the lake Ohrid the *Hydrobiinae* as well. May be *Scyphidia* sp. made their way together with *Theodoxus*, but in the Lake Ohrid they invaded first of all *Pyrgulinae* and *Valvata stenotrema*. The representatives of the family *Ancistruminae* occur in the lake Ohrid as distinguished forms of an insignificant — as it seems — ensemble of hosts.

Despite a suggestion of de Puytorac 1958 on the affinity of *Astomata* and *Hysteroconetidae*, parasitizing *Oligochaeta* in the Ohrid and Baikal lakes, no such convergence could be found among *Thigmotricha* and *Peritricha* living in *Gastropoda* of both lakes. The representatives of the genera *Trichodina*, *Scyphidia* and *Ancistrumina* occur both in fresh and brackish waters and in the seas of many places in the world, and their species occurring in the lake Ohrid are cosmopolitan. Similarly, the representatives of the genera *Hypocomatophora* and *Heterocinetopsis* occur in the molluscs of many fresh waters.

Summary

Peritricha and *Thigmotricha* were found in numerous and mostly endemic *Prosobranchia* of the lake Ohrid. Among these ciliates, there are no specific forms to such a degree as it is the case among their hosts; these are rather forms introduced by their ubiquitous hosts. The author is of the opinion that *Theodoxus fluviatilis* introduced here *Trichodina baltica* Quen. which transferred itself on numerous *Hydrobiidae-Hydrobiinae* and *Valvata stenotrema*, as well as *Scyphidia* sp. which infected here rather *Hydrobiidae-Pyrgulinae* and *V. stenotrema*. *Ancistrumina limnica* Raabe occurs in *Hydrobiinae* and does not infect *Pulmonata*, although it does infect *Pulmonata* in the European Lowland. The representatives of *Ancistrocomidae*, *Hypocomatophora makedonica* sp.n. and *Heterocinetopsis ohridanus* sp.n. only slightly varying from known forms, occur in *Hydrobiidae*.

STRESZCZENIE

Zbadano ponad 1200 egzemplarzy ślimaków jeziora Ohrid, należących do 23 gatunków *Prosobranchia* i 10 gatunków *Pulmonata*. W *Pulmonata* nie stwierdzono pasożytnych orzęsków, zarażone okazały się natomiast *Prosobranchia*. Wśród orzęsków tych brak jest form wybitniejszych specyficznych w takim stopniu, jak specyficzni są endemiczni ich żywicieli; brak jest również form, które nawiązywałyby do fauny morskiej. Stwierdzone pasożytne *Ciliata* ślimaków jeziora Ohrid wydają się formami wprowadzonymi do jeziora przez ubikwistyczne gatunki żywicieli.

Gatunkiem wprowadzonym przez *Theodoxus fluviatilis* wydaje się *Trichodina baltica* Quen., która w jeziorze Ohrid przeniosła się na niektóre inne *Gastropoda*,

a mianowicie *Hydrobiidae-Hydrobiinae* (ale nie *Pyrgulinae*) i *Valvata stenotrema*. Podobną drogę odbyła też pewnie *Ancistrumina limnica* Raabe, opanowując w jeziorze Ohrid również *Hydrobiinae*. Być może drogę wraz z *Theodoxus* odbyła też *Scyphidia* sp., która jednak opanowała przede wszystkim *Pyrgulinae* i *Valvata stenotrema*. Przedstawiciele rodziny *Ancistrocomidae* występują w jeziorze Ohrid w postaci odrębnych, ale bardzo zbliżonych do innych, gatunków o niewielkim, jak się wydaje, zespole żywicieli; są to *Hypocomatophora makedonica* sp.n. i *Heterocinetopsis ohridanus* sp.n. — oba gatunki z *Hydrobiidae*.

W faunie orzęsków, pasożytujących u ślimaków w jeziorze Ohrid nie widać żadnej wyraźnej zbieżności z tymi organizmami z jeziora Bajkał — przedstawiciele wszystkich spotkanych tu rodzajów spośród *Peritricha* i *Thigmatricha*, a nawet identyczne gatunki, występują w wodach słodkich, słonawych i morskich wielu okolic świata.

REFERENCES

- Chatton E. et Lwoff A. 1950: Recherches sur les Ciliés Thigmatriches. II. Arch. Zool. Expér. Gén. 86, 393—485.
- Cheissin E. 1931: Infusorien *Ancistridae* und *Boveriidae* aus dem Baikalsee. Arch. Protist., 73, 280—304.
- Hadžišće S. 1956: II. Beitrag zur Kenntnis der Gastropodenfauna des Ohridsees. Arch. Hydrobiol., 51, 496—499.
- Hadžišće S. 1956: III. Beitrag zur Kenntnis der Gastropodenfauna des Ohridsees. Recueil des travaux, Station Hydrobiologique — Ohrid, 4, 57—107.
- Hubendick B. 1960: *Ancylidae* of Lake Ochrid and their bearing on intralacustrine speciation. Proc. Zool. Soc. London, 133, 497—529.
- Jarocki J. u. Raabe Z. 1932: Ueber drei neue Infusorien-Genera des Familie *Hypocomidae* (*Ciliata Thigmatricha*). Parasiten in Süßwassermuscheln. Bull. Acad. Polon. Sci. Lettr., B. Sci. Nat. (II), 29—45.
- Jarocki J. 1934: Two new hypocomid ciliates, *Heterocineta janickii* sp.n. and *H. lwoffii* sp.n., ectoparasites of *Physa fontinalis* (L.) and *Viviparus fasciatus* Müller. Mém. Acad. Polon. Sci. Lettr., B. Sci. Nat., 167—187.
- Jarocki J. 1935: Studies on Ciliates from fresh-water Molluscs. I.... Bull. Acad. Polon. Sci. Lettr., B. Sci. Nat. (II), 201—230.
- Issel R. 1903: Ancistridi del Golfo di Napoli. Mitt. Zool. Stat. Neapel, 16, 60—108.
- Poliński W. 1932: Die reliktnäre Gastropodenfauna des Ochrida-Sees. Zool. Jahrb. Abt. Syst., 62, 611—666.
- Puytorac, de P. 1958: Comparaison de la faune infusorienne endoparasite des Oligochètes du lac d'Ohrid et de ceux du Baikal. Recueil des travaux, Station Hydrobiologique — Ochrid, 6, 1—8.
- Raabe Z. 1947: Recherches sur les ciliés Thigmatriches (*Thigmatricha* Ch.Lw.). II. Espèce nouvelle d'eau douce du genre *Ancistrina* Cheissin. Annales Univ. M. Curie-Skłod., Sectio C, Lublin, 2, 111—120.
- Raabe Z. 1950: Recherches sur les ciliés Thigmatriches (*Thigmatricha* Ch.Lw.). V. Ciliés Thigmatriches du lac Balaton (Hongrie). Annales Univ. M. Curie-Skłod., Sectio C, Lublin, 5, 197—215.
- Raabe Z. 1959: Recherches sur les Ciliés Thigmatriches (*Thigmatricha* Ch.Lw.). VI. Sur les genres "*Ancistruma*", "*Ancistrina*" et les genres voisins. Acta Parasit., Polon., 7, 215—247.
- Raabe J. a. Z. 1959: *Urceolariidae* of molluscs of the Baltic Sea. Acta Parasit. Polon., 7, 453—465.
- Raabe J. a. Z. 1961: *Urceolariidae* from fresh-water and terrestrial molluscs in Poland. Acta Parasit. Polon., 9, 141—152.
- Radoman P. 1955: Recherches morphologiques et systematiques sur les hydrobiides du lac d'Ohrid. Srpsko Biološko Društvo — Posebna Izdanja I, Beograd, 106 p.
- Stanković S. 1960: The Balkan Lake Ohrid and its living world. W. Junk, den Haag, 356 p.

Maria WOLSKA

Remarks on the adoral ciliature in the order *Entodiniomorpha*Uwagi o orzęsieniu adoralnym w rzędzie *Entodiniomorpha*

Information based on the modern research methods about the ciliature of *Ophryoscolecidae* and of the type genus of the family *Cycloposthiidae* have been reported in the publications of Noirot-Timotheé 1956a, 1956b, 1960 and in those of Fernandez-Galiano 1958a, 1958b.

Those data may be supplemented by some details which possibly are of a certain importance.

In all the representatives of the family *Ophryoscolecidae* observed by me in silver impregnated preparations, occurrence of an adoral ciliature component has been stated which was not revealed as yet by silver impregnation. Its existence was just suspected by Noirot-Timotheé 1960 in her electron microscopic study. Certain peculiarity of formation of the adoral ciliature in the genus *Cycloposthium* Bundle have also been stated in the present study.

Material was supplied from the content of the cattle rumen and of the horse coeum sampled in the course of slaughter in the abattoir of Łódź. After fixation in 10% formalin, material was impregnated in the ammoniacal silver solution of Bielschowski (rumen) as well as that of Rio Hortega or Bielschowski (content of coeum) being covered previously on the slide by a layer of gelatin following Chatton. The impregnation with the ammoniacal silver solution — applied by Noirot-Timotheé and by Fernandez-Galiano — gave in this modification very good results. It enabled me to detect in *Ophryoscolecidae* a group of cilia, independent of the adoral zone of syncilia (Pl. I 1) described by the above mentioned authors. This group is composed of several rows of non adhering cilia which run along the posterior ventral margin of the syncilia zone, similarly as in *Cycloposthium* sp. according Fernandez-Galiano 1958b (Pl. I 2).

Noirot-Timotheé 1960 described an enigmatic ciliature on the ventral margin of ciliophore in *Entodinium medium medium*: "...une formation penicillée énigmatique dont d'explication nous sera fournie par l'étude ultramicroscopique". Analysing the ultramicrophotograms of the species studied, the author mentioned that sometimes some other peculiar cilia are observed on the exterior margin of the adoral ciliary zone. They penetrate into the folds of the pellicle. Some of them are of abnormal size. Noirot-Timotheé thinks that they are small brushes (formation pénicillé) seen sometimes on the ventral margin of the ciliophore but states that she failed to

reveal their infraciliature after silver impregnation. Author postulates that there are very few kinetosomes which might be overlooked because of their location on the ventral margin which is flattened laterally. Some of the peripheral cilia of the adoral zone, might become isolated from the next ones in the folds of the pellicle according to the opinion of Noirot-Timothée. This interpretation is opposed to the view of Gelei und Sebestyen 1932 who consider the adoral zone of *Ophryoscolecidae* as composed of three concentric stripes. The most exterior position is occupied by cilia which are located freely. They are followed by syncilia performing swimming. Syncilia driving food are located most anteriorly. This distribution is not seen on the level of the basal corpuscles — as stated by Noirot-Timothée — and such differentiation has not been observed in vivo. This author is inclined to postulate that the adoral zone forms a little bundle (touffe) lying on a small segment of the ventral side. This is indicated by the fact that the anlagen of ciliature during division show in this place the “baguettes infraciliaires” beneath the rows of the adoral zone of cilia — much longer than in other places.

The position of this ciliary group in the infraciliature, as stated in the present study, indicates that this group of cilia is the same structure which is mentioned by Noirot-Timothée. Nevertheless my preparations prove that those are not single kinetosomes detached from the adoral zone or a bundle being the continuation of some rows of the zone. The “enigmatic cilia” occur permanently in all the individuals, present an independent group composed of several rows of rather big kinetosomes which run not in the same direction as the rows of the main adoral zone (Pl. I 4).

This characteristic of the kinetosomes in question is consistent with the description of the course and of the character of free ciliary rows reported by Fernandez-Galiano 1958b in *Cycloposthium edentatum*. The “enigmatic cilia” of *Ophryoscolecidae* are surely homologous to the free cilia of *Cycloposthium* described by Fernandez-Galiano. In *Cycloposthium* however those cilia are very distinct (Pl. I. 2), well impregnable and form rather long rows whereas in *Ophryoscolecidae* they are sometimes scarcely discernable. The course of those rows in *Ophryoscolecidae* is sometimes wavy, often the single rows encroach upon one another. Owing to the study of Noirot-Timothée this becomes comprehensible. Encroaching of rows upon one another is the result of their penetration inside the pellicle folds. Besides, all the group may lay oneself over the adoral syncilia zone when the zone is distended or when the ciliate is deformed by fixation or other treatment. Then the whole group of the kinetosomes becomes poorly visible on the background of the dense rows of the main zone (Pl. I 3). Nevertheless this structure may be doubtlessly stated in adequately and finely stained preparations.

Not everything is clear. Some preparations seem to suggest presence of connecting fibers on a certain distance between the free cilia and the syncilia zone. But those may also be some rows of kinetosomes bent towards the zone, closely adhering to one another after folding of the pellicle. This usually occurs in the genus *Epidinium*.

The „enigmatic cilia” are not exactly similar in all the representatives of different genera. In the genus *Entodinium*, only two or three rows are present composed of few kinetosomes (Pl. I 5, 6). In *Epidinium* sp. several rows

occur, possibly some of them branch off and run towards the syncilia zone, or perhaps bind themselves with the syncilia zone by means of fibers (Pl. I 3, II 7) which cannot be definitely stated. This structure is most distinct in the species of the *Diplodinium* group, in the form of rather long rows of big kinetosomes usually well visible (Pl. II 8, 9). The genus *Ophryoscolex* failed to occur in my material, however the study of Noïrot-Timotheé indicates that the cilia under discussion occur in this genus since the electron microscopic study of kinetosomes lying beyond the syncilia zone had been executed on *Ophryoscolex* sp. (in any case besides other forms).

The distinctness of this ciliary group is proved also by the pictures of their formation in the opisthe during division. They arise backwards of the syncilia zone, at a certain distance from it, at once in the form of rows, with a course more or less perpendicular to rows of the zone. It is difficult to postulate the function of those cilia. They are weaker than those of the adoral ciliary zone, so their share in the process of taking food or in motion is presumably insignificant. This concerns mostly the genus *Entodinium* in which this ciliary group is very small, perhaps vestigial — as suggested by Fernandez-Galiano 1958 b for *Cycloposthium*. This author considers the free cilia of *Cycloposthium* as the vestigial somatic ciliature. Its presence — besides some other characters — places according to Fernandez-Galiano the family *Cycloposthiidae* at a lower level of the phylogenetic tree than the family *Ophryoscolecidae* — as found by Gelei und Sebestyen 1932 — can be families is more conspicuous than it could be assumed as yet.

No differentiation of the infraciliature of the adoral syncilia zone, in *Ophryoscolecidae* — as found by Gelei and Sebestyen 1932 — can be detected, whereas in *Cycloposthiidae* (exactly: in *Cycloposthium* sp.) it seems to exist really. Three stripes not sharply delimited (Pl. III 12) may be distinguished. The most posterior marginal stripe is composed of the longest rows, the median one — of at least by half shorter rows, intensely impregnable, the rows of the third stripe are still shorter and less impregnable. This differentiation might be of little importance if not the suggestion of morphogenesis which seems to indicate that every one of these stripes arises separately at another period. Subsequently they all become unified. First the median stripe is formed, composed of regular parallel rows (Pl. II 10). Then, backwards from it, arises the stripe of longest rows separated from the former by a gap which remains for a certain time (Pl. II 11). The stripe of the shortest rows arises the last. The two rows which appear earlier, increase in size and fuse together. Finally a fully compact zone is constituted but the boundaries of the layers remain. Such a picture is the result of studying the silver impregnated material. The problem however needs further study and support by evidences. The free cilia arise — as it seems — before formation of the last stripe of the zone.

My observations of the living material gave impression (however not certitude) that at least two stripes of syncilia exist. The free cilia of *Cycloposthium* sp. have also been observed in vivo. Having in view the suggestion of differentiation of the syncilia zone in *Cycloposthium* sp. I tried to examine the problem of the adoral zone formation in *Ophryoscolecidae*. Unfortunately the results were far not so suggestive as in *Cycloposthium* sp.

Fernandez-Galiano 1958b described the third component of the adoral ciliature in *Cycloposthium*. It is a series of short kineties which

describe an open ellipse (in its general outline) dorsally from the syncilia zone, its ends touch the interior side of the ciliophore (Pl. I 2). Fernandez-Galiano determined it as a zone of adoral membranelles.

This series of short kineties form an entity but in division it arises, of two separate anlagen — as it could be observed by me. One long segment is formed on the left side, at a considerable distance from the ciliophore, another short one, at the right margin of the ciliophore. In the subsequent course of morphogenesis, the left segment approaches the left margin of the ciliophore with its one end whereas its another end twists and touches the end of the right segment. They both form a common stripe (Pl. III 13, 14).

This process resembles the formation of two anlagen of the adoral syncilia zone in *Ophryoscolecidae* as described by Noirot-Timothee 1960. This author added to the characteristics of the family *Ophryoscolecidae*: "Nous ignorons si un phénomène analogue existe dans les autres familles de l'ordre".

It seems that formation of compact ciliary structures from more than one anlage, has a broader range not only as the family *Ophryoscolecidae* but as the order *Entodiniomorpha* as well. As example (my unpublished data) formation of the fully uniform anterior ciliary zone in *Didesmis* sp. of *Gymnostomata* may be pointed out.

Summary

A new component of the adoral ciliature in *Ophryoscolecidae* has been described, as well as new data concerning the morphogenesis of the adoral ciliature in *Cycloposthium* sp. Those observation stress the great similarity of the adoral ciliature of *Ophryoscolecidae* and that of *Cycloposthiidae*.

STRESZCZENIE

Autorka opisuje nowy składnik orzęsienia adoralnego u *Ophryoscolecidae* i podaje nowe dane dotyczące morfogenezy orzęsienia adoralnego *Cycloposthium* sp. Te spostrzeżenia podkreślają wielkie podobieństwo orzęsienia adoralnego *Ophryoscolecidae* i *Cycloposthiidae*.

REFERENCES

- Fernandez-Galiano D. 1958a: La infraciliación en *Polyplastron multivesiculatum* y su génesis durante la division del ciliado. Bol. Real. Soc. Esp. Hist. Nat. 56, 89—102.
- Fernandez-Galiano D. 1958b: La infraciliación en *Cycloposthium edentatum* Strelkow. Bol. Real. Soc. Esp. Hist. Nat. 57, 139—150.
- Gelei J. und Sebestyen O. 1932: Einige Bemerkungen zum Bau und Funktion der Syncilien bei den Darmciliaten, besonders der *Entodiniomorpha*. Acta Biol. 2, 141—161.
- Noirot-Timothee C. 1956a: Les structures infraciliaires de *Ophryoscolecidae* (infusoires Oligotriches). I. Étude du genre *Epidinium* Crawley. C. R. Acad. Sc. 242, 1076—1078.
- Noirot-Timothee C. 1956b: Les structures infraciliaires des *Ophryoscolecidae* (Infusoires Oligotriches). Étude du genre *Ophryoscolex* Stein. C. R. Acad. Sc. 242, 2865—2867.
- Noirot-Timothee C. 1960: Étude d'une famille de ciliés: Les "*Ophryoscolecidae*". Structures et ultrastructures. Ann. Sc. Nat. Zool. Ser. 12. 2, 527—718.

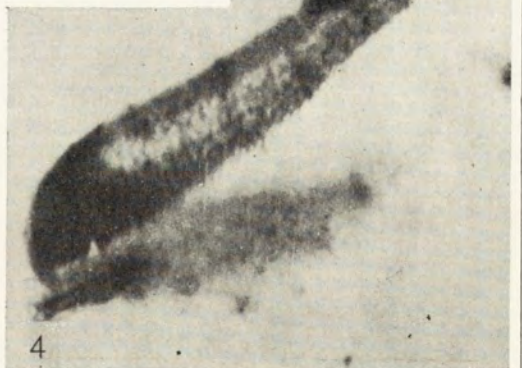
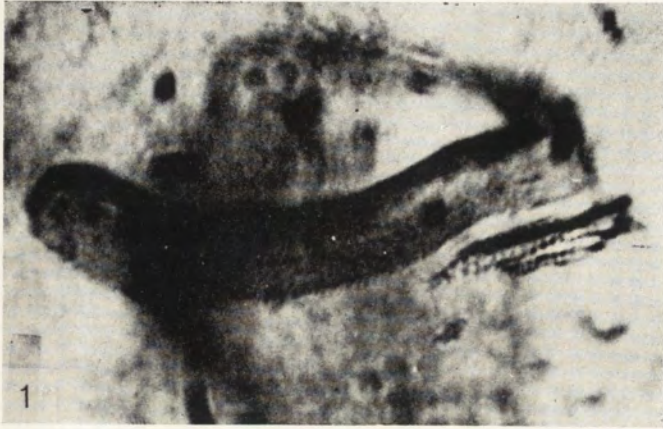
EXPLANATION OF PLATES I—III

- 1: *Diplodinium* sp. Segment of adoral syncilia zone; below the rows of free kinetosomes
- 2: *Cycloposthium* sp. On the left of the adoral syncilia zone (left side of the photograph) are rows of free kinetosomes, on the right a stripe of adoral "membranelles"
- 3: *Epidinium* sp. Rows of free kinetosomes are seen on the background of adoral syncilia zone
- 4: *Diplodinium* sp. Anlage of the adoral zone of the opisthe, left side view. Beneath the zone and partly on its background, rows of free kinetosomes are seen
- 5—6: *Entodinium* sp. Two short rows of free kinetosomes beneath the adoral syncilia zone
- 7: *Epidinium* sp. Rows of free kinetosomes
- 8: *Diplodinium* sp. Rows of free kinetosomes
- 9: *Diplodinium* sp. View from anterior pole
- 10: *Cycloposthium* sp. in division. Anlage of the adoral zone of syncilia, middle stripe
- 11: *Cycloposthium* sp. in division. Two stripes of adoral zone of syncilia are not fully fused
- 12: *Cycloposthium* sp. in division. Adoral syncilia zone of the opisthe completely formed, composed of 3 stripes
- 13: *Cycloposthium* sp. in division. The left anlage of adoral "membranelles"
- 14: *Cycloposthium* sp. in division. Two segments of the adoral "membranelles" are seen, their ends approach each other

[All photomicrographs represent the silver impregnated material.
Magnification — 2000 × (except 3 which is 2600 ×)]

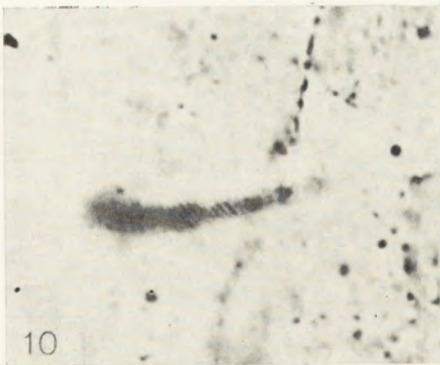
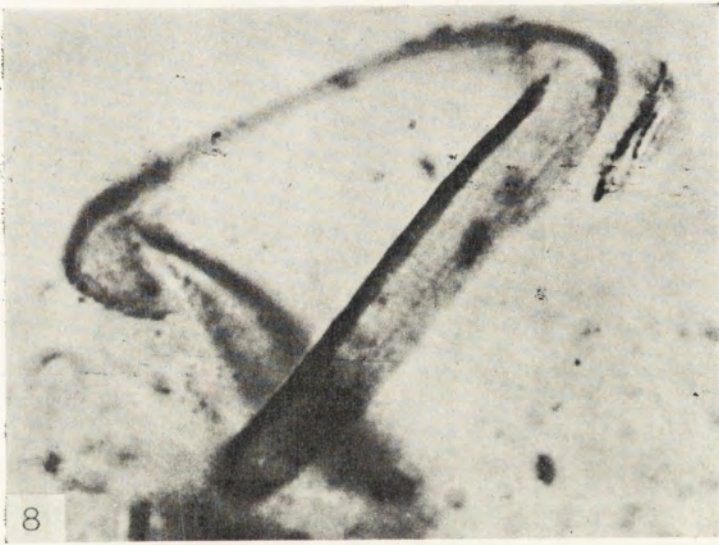
EXPLANATION OF TABLE I-III

1. The first column of the table shows the number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases, the number of cases in the first group, the number of cases in the second group, and the number of cases in the third group. The fourth column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group. The fifth column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group. The sixth column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group. The seventh column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group. The eighth column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group. The ninth column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group. The tenth column shows the total number of cases in each of the four groups, namely, the total number of cases in the first group, the total number of cases in the second group, the total number of cases in the third group, and the total number of cases in the fourth group.



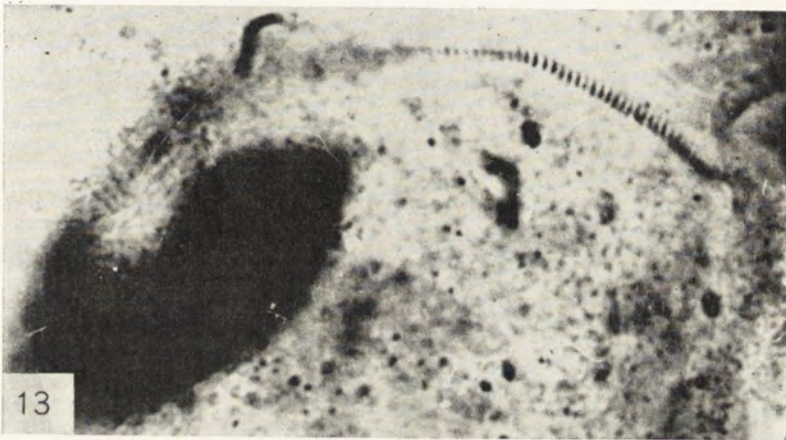
M. Wolska

auctor phot.



M. Wolska

auctor phot.



M. Wolska

auctor phot.

Лаборатория зоологии беспозвоночных, Биологический Институт Ленинградского Государственного Университета, Ленинград B-164
Laboratory of Invertebrate Animals, Biological Research Institute of Leningrad State University, Leningrad B-164

Л. Н. СЕРАВИН, И. И. СКОВЛО и И. Г. БАГНЮК
L. N. SERAVIN, I. I. SKOBLO and I. G. BAGNJUCK

Механизм сокращения мионем инфузории *Spirostomum ambiguum*

Mechanism of contraction of myonemes in the ciliate *Spirostomum ambiguum*

Хорошо известно, что сокращение клеток самого различного типа (от фибробластов до мышечной клетки), а также их изолированных структур (ресничек, митохондрий и т. п.) происходит благодаря взаимодействию актомиозиноподобных белков с АТФ¹ (Сент-Джорджи 1947, Weber 1958, Hoffmann-Berling 1958 a, Иванов и Юрьев 1961, Ohnishi and Ohnishi 1962, Simard-Duquesne and Couillard 1962 a, b, Казаков и Нейфах 1963). Однако постепенно начинают накапливаться факты, показывающие, что по крайней мере у некоторых типов клеток в цитоплазме имеются белки, для сокращения которых АТФ не нужен. Так, ныне установлено, что сокращение стебелька круглоресничных инфузорий происходит под влиянием ионов кальция и стронция; аденозинтрифосфат (в присутствии ионов магния) вызывает ослабление стебелька (Levine 1956, Hoffmann-Berling 1956 b, Серавин 1963). Нити, приготовленные из гепатогистона ядер печени человека, сокращаются при действии АТФ, однако сильное их укорочение могут вызвать также некоторые двухвалентные катионы солей (Збарский и Перевощикова 1948, 1951). Сакаи (Sakai 1962 a, b) установил, что из дробящихся яиц морских ежей в период анафазы можно экстрагировать КС1-растворимый белок, который обладает сократимостью. Впрыскивая в охлажденный ацетон раствор этого белка, Сакаи получал желатинизованные нити, которые сокращались под влиянием двух- и трехвалентных катионов солей (но не АТФ). Укорочение нитей происходило также при действии на них веществ, которые окисляют сульфгидрильные группы.

Все это показывает, что в некоторых клетках имеются контрактивные белки, существенно отличающиеся по своим биохимическим свойствам от актомиозина мышечных клеток. Исследование механизма сокращения таких белков безусловно представляет интерес для сравнительной биохимии.

¹ Принятые сокращения: АТФ — аденозинтрифосфат, НАД — никотинамидадениндинуклеотидфосфат, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота (двунариевая соль).

Среди одноклеточных организмов встречаются виды, обладающие хорошо сократимым телом. В протоплазме таких простейших обычно имеются специальные структуры — мионемы, совокупность которых образует сократительную систему тела этих микроскопических животных. В настоящее время есть все основания утверждать, что сократительная система возникает в процессе эволюции независимо в различных группах простейших (Догель, Полянский и Хейсин 1962). Поэтому можно ожидать, что у одноклеточных животных будет найдено известное разнообразие биохимических механизмов, осуществляющих сокращение их тела.

В настоящей работе излагаются данные, полученные в опытах на клеточных моделях, приготовленных из инфузорий *Spirostomum ambiguum*; основная цель — показать своеобразие сократительного механизма мионем этой инфузории.

Материал и методика

Spirostomum ambiguum Ehrbg. очень крупная инфузория, достигающая более двух миллиметров в длину. Ранее было установлено, что деятельность ресничек у спиростомумов осуществляется в результате взаимодействия контрактильных белков этих органелл с АТФ (Серавин 1961). При действии различных раздражителей тело спиростомума сильно сокращается вдоль продольной оси.

Строение мионем *S. ambiguum* исследовали многие авторы (Randall 1957, Yagi and Shigenaka 1963, Finley, Brown and Daniel 1964 и другие), биохимический механизм сокращения этих органелл до сих пор еще никем не изучался. Мы проводили свои исследования на клеточных моделях, приготовленных из *S. ambiguum* с помощью сапонинового метода Гофман-Берлинга (Hoffmann-Berling 1958 b). Спиростомумов помещали из культуры в экстрагирующий раствор следующего состава: 0.12 М КС1, 0.004 М ЭДТА, 0.01 М фосфатный буфер рН 7.0, 3.5% поливинилпирролидон, 0.02% дигитонин. Экстрагирование проводили при температуре 0—4°C в течение 30—40 мин. После окончания экстрагирования инфузорий отмывали в рабочем растворе: 0.12 М КС1, 0.01 М фосфатный буфер (или трис-малеиновый буфер) рН 7.0, 3.5% поливинилпирролидон при комнатной температуре (20—22°C). Вводя в рабочий раствор различные вещества, мы изучали условия, вызывающие сокращение моделей. Присутствие поливинилпирролидона в экстрагирующем растворе совершенно необходимо для получения клеточных моделей из спиростомумов; присутствие этого вещества в рабочем растворе, однако, не является обязательным. Все вещества, употреблявшиеся в опытах, готовили на рабочем растворе, рН этих растворов приводили к 7.0 с помощью КОН или НС1, за исключением тех случаев, когда изучалось влияние различных рН среды на сокращение моделей, а также в экспериментах по действию на модели трипсина. Актин получали из мышц кролика по Штраубе (см. Иванов и Юрьев 1961). Фактор расслабления экстрагировали из мышц лягушки по Бендалу (Bendall 1954); этим же способом получали экстракт из спиростомумов. В статье указаны конечные концентрации применявшихся химических агентов.

Результаты исследования

Спиростомумы, помещенные в экстрагирующий раствор при $0-4^{\circ}$, погибают в течение 10—15 мин; через 30—40 мин после начала экстракции цитоплазма инфузорий выглядит коагулированной, в ней хорошо виден четкообразный макронуклеус; реснички не работают. В ответ на механические раздражения инфузории не сокращаются. Если перенести таких спиростомумов в культуральную жидкость, они не только не оживают, но и очень быстро (через 1—2 мин) разрушаются. В рабочем растворе целостность тела у цитоллизированных инфузорий сохраняется в течение нескольких часов, однако у них не возобновляется биение ресничек, не происходит восстановление сократимости тела. Спиростомумы мертвы.

У моделей спиростомумов, помещенных в рабочий раствор, содержащий ионы магния ($1 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$), при добавлении АТФ ($5 \cdot 10^{-4}$ М — $1 \cdot 10^{-3}$ М) происходит возобновление биения ресничек. Некоторые из цитоллизированных спиростомумов даже начинают медленно ползать. Однако сокращение тела простейших при этом не происходит. Если к рабочему раствору, в котором находятся модели спиростомумов, добавить не АТФ, а ионы кальция ($1-5 \cdot 10^{-3}$ М $CaCl_2$), цитоллизированные инфузории энергично сокращаются; однако их реснички остаются неподвижными.

У ползающих в рабочем растворе после добавления АТФ моделей спиростомумов можно вызвать сокращение тела, подействовав на них дополнительно хлористым кальцием ($5 \cdot 10^{-3}$ М). Напротив, у сокращенных кальцием моделей можно вызвать биение ресничек, если в рабочий раствор добавить ионы магния ($1 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$) и АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$ М). Эти опыты, на наш взгляд, довольно четко показывают, что биохимические механизмы, обеспечивающие биение ресничек и сокращение тела спиростомума, различны.

Дальнейшие наши эксперименты показали, что сокращение моделей инфузорий могут вызвать (в отсутствия АТФ) самые различные катионы солей: Mg^{++} , Ba^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} , Al^{+++} (взятые в виде хлоридов или сульфатов, в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М). Наиболее чувствительны модели к Ca^{++} ; хлористый кальций вызывает их сокращение даже в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М. В большинстве случаев вслед за сокращением у цитоллизированных инфузорий происходит хотя бы слабое частичное расслабление. Этого не наблюдается только в опытах с Mg^{++} , Ba^{++} , Fe^{+++} и Al^{+++} . Сильное сокращение моделей вызывает НАД (7 мг/мл). Восстановленный НАД (7 мг/мл) никакого влияния на цитоллизированных инфузорий не оказывает. Вещества, ингибирующие или окисляющие сульфгидрильные группы белков: моноацетат, цистин, H_2O_2 — не вызывают сокращения моделей в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ М. Не эффективными оказались и различные восстановители: цистеин, гидрохинон, аскорбиновая кислота, α -нафтол и диметил-*p*-фенилдиамин. Вызвать сокращение моделей невозможно и при действии таких агентов как 10%-ый и абсолютный уксус, конгорот (в любых концентрациях) и дистиллированная вода. Изменяя рН рабочего раствора от 5.5 до 9.0 или повышая концентрацию KCl в нем до 0.6 М, также нельзя вызвать укорочение мионом цитоллизированных спиростомумов. Таким образом, только поливалентные катионы солей и НАД вызывают быстрое сокращение моделей, внешне напоминающее сокращение живых спиростомумов.

Несмотря на многочисленные попытки, получить достаточно выраженное расслабление предварительно сокращенных ионами кальция или магния про-

стейших нам не удалось. Известно, что модели мышечных клеток расслабляются при действии ЭДТА (Иванов и Юрьев 1961), высоких концентраций АТФ (Perry 1956), 6%-го раствора мочевины (Bolzer 1951), 10%-го раствора ацетона (Ebashi and Ebashi 1959). Из мышц высших животных выделен специфический фактор расслабления (фактор Марша-Бендала, который в присутствии АТФ вызывает расслабление моделей мышечных клеток (Bendall 1952).

Наши опыты показали, что ЭДТА в концентрации $2-4 \cdot 10^{-3}$ М полностью препятствуют сокращению цитоллизированных простейших при действии на них поливалентных катионов солей. Однако вызывать расслабление уже сокращенных кальцием или магнием моделей никогда не удается. При действии 10%-го раствора ацетона (как в присутствии АТФ, так и в его отсутствии) модели спиростомумов лишь усиливают свое сокращение. 6%-ый раствор мочевины также не оказывает расслабляющего действия на цитоллизированных простейших. Фактор расслабления, приготовленный из мышц лягушки, и экстракт, полученный из живых спиростомумов по методу Бендала (Bendall 1952), в присутствии АТФ тоже оказался неэффективным. Не вызывает расслабления моделей спиростомумов и аденозинтрифосфат, взятый в высоких концентрациях ($1-5 \cdot 10^{-2}$ М).

Полученные данные можно предположительно объяснить тем, что при сокращении цитоллизированных спиростомумов происходит деструкция мионем, и поэтому воспроизвести расслабление нельзя. Возможно, однако, и другое объяснение: биохимические механизмы сокращения и расслабления мионем спиростомума настолько отличаются от соответствующих механизмов мышечных клеток, что факторы, вызывающие расслабление актомиозинового комплекса, не могут индуцировать расслабление мионем цитоллизированных инфузорий. Приведенные ранее эксперименты показывают, что сокращение моделей спиростомумов также происходит при действии факторов, которые никогда не вызывают работу моделей ресничек или сокращению моделей мышечных клеток. Следовательно, можно предположить, что сократимые белки мионем не являются актомиозином. В таком случае существуют по крайней мере три возможности: а. сократимые белки мионем представляют собой миозин, б. сократимые белки мионем являются актином, или в. деятельность мионем обеспечивается каким-то другим, пока еще неизвестным нам белком. Свойства миозина и актина в настоящее время хорошо изучены. Это позволяет в опытах на клеточных моделях экспериментально проверить, какое из этих трех предположений является правильным.

Миозин, соединяясь с актином, образует актомиозин, который способен сокращаться под влиянием АТФ (Сент-Джорджи 1947). Аналогичным же свойством обладает и комплекс конгорот-миозин (Ашмарин 1951). Мы держивали модели спиростомумов в течение 10—15 мин² в рабочем растворе с кроличьим актином или в рабочем растворе, содержащем 0.5% конгорота. Затем модели отмывали в чистом рабочем растворе и действовали на них АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$ М— $5 \cdot 10^{-3}$ М) и $MgCl_2$ ($1 \cdot 10^{-3}$ М). Однако в этом случае модели не сокращались, хотя при добавлении $1 \cdot 10^{-3}$ М $CaCl_2$ или $5 \cdot 10^{-3}$ М $MgCl_2$ происходило быстрое сокращение инфузорий. В 0.5—0.6 М растворах КСl миозин бы-

² Модели спиростомумов сохраняют способность сокращаться под влиянием кальция или магния даже через 30 мин. пребывания в рабочем растворе при комнатной температуре.

стро экстрагируется из мертвых клеток (Сент-Джорджи 1947). Мы выдерживали цитоллизированных спиростомумов 10—15 мин в растворе Вебера (см. Иванов и Юрьев 1961) или в рабочем растворе, содержащем 0.6 М КСl. Затем переносили их в обычный рабочий раствор. При действии АТФ ($1 \cdot 10^{-3}$ М) и $MgCl_2$ ($1 \cdot 10^{-3}$ М) реснички не возобновляли свою деятельность, поскольку миозин был экстрагирован из них. Однако модели, обработанные таким образом, по-прежнему энергично сокращались в ответ на действие ионов кальция и магния. Все это показывает, что контрактильные белки мионом не содержат миозин.

Известно, что актин имеет ряд характерных особенностей. Он осаждается в 2%-ом растворе КСl и в средах, имеющих рН ниже 4.7. При высоких значениях рН среды (рН 10.3) и при действии анионов J^- или SCN^- происходит деполимеризация актина (Bárány, Bigó und Molnar 1954). Интересно было проверить, какое влияние окажут эти факторы на модели, приготовленные из спиростомумов. Мы уже отмечали, что даже длительное выдерживание моделей в такой концентрации КСl как 0.6 М не вызывает их сокращения, однако если содержание этой соли в рабочем растворе поднять до 2 М, цитоллизированные инфузории сокращаются. Модели спиростомумов сохраняют неизменными линейные размеры своего тела при колебаниях рН рабочего раствора от 5.5 до 9.0. В рабочем растворе с рН 4.7 или 10.4 цитоллизированные простейшие сразу же начинают укорачиваться. Сокращение моделей в этом случае происходит очень медленно; весь процесс длится более минуты, тогда как при действии кальция или магния он протекает в течение 1—2 сек. Под влиянием анионов J^- и SCN^- (KJ $5 \cdot 10^{-3}$ М и $KSCN$ $5 \cdot 10^{-3}$ М) модели также медленно сокращаются; затем происходит частичное расслабление. Чтобы выяснить, в самом ли деле деполимеризация сократительного белка мионом может привести к сокращению, а затем и к частичному расслаблению тела спиростомума, были поставлены следующие опыты. Модели инфузорий инкубировали при температуре 30°C в рабочем растворе, содержащем 0.1 мг/мл трипсина; рН раствора 8.9. В течение первых 5 мин опыта модели очень медленно сокращались, в дальнейшем происходило их медленное расслабление. Модели, предварительно сокращенные ионами магния, с самого начала инкубации в присутствии трипсина начинали сразу же медленно расслабляться. Проведенные эксперименты дают основание предполагать, что контрактильные белки мионом спиростомума по своим свойствам близки к полимеризованному актину.

Обсуждение результатов

Физиологические эксперименты на живых спиростомумах показали, что двигательная (ресничная) и сократительная (миономная) системы этих инфузорий обладают разной чувствительностью к одним и тем же химическим агентам (Сервин 1961 b, 1962). Поэтому действуя некоторыми веществами можно получить хорошо сокращающихся, но неподвижных спиростомумов, или же, напротив, полностью подавить сократимость мионом у активно плавающих инфузорий.

Факты, полученные в опытах на сократимых клеточных моделях спиростомумов, хорошо объясняют причины различий в устойчивости двух этих систем к одинаковым агентам: а. контрактильные белки мионом и ресничек имеют разную природу, б. биохимический механизм, обеспечивающий работу мионом, и биохимический механизм, обеспечивающий работу ресничек, у спиростомума

различны. Биение ресничек происходит благодаря взаимодействию актомиозиноподобных белков с АТФ (Child 1961, Серавин 1961). Имеющиеся в настоящее время данные показывают, что сократительные белки мионем не являются актомиозином или миозином.

Поскольку агенты, вызывающие осаждение или деполимеризацию F-актина, приводят к сокращению моделей, мы предполагаем, что мионемы спиростомумов содержат белки, по своим свойствам близкие к полимеризованному актину. Однако агенты, вызывающие деполимеризацию актина, производят очень медленное несхожее с естественным сокращением моделей *S. ambiguum*. Это заставляет думать, что агенты, индуцирующие сокращение мионем живой инфузории, имеют иную природу, а естественный механизм сокращения мионем не связан с деполимеризацией сократительных белков.

Поливалентные катионы солей вызывают сокращение моделей спиростомума, по скорости и по форме подобное сокращению живой инфузории. У нас нет никаких данных, которые позволили бы сказать, какой именно из катионов является физиологическим агентом, вызывающим сокращение мионем живой инфузории. Возможно, что, как и у сувоек, это кальций (Hoffmann-Berling 1956 b), а, возможно, какой-нибудь органический катион.

Как бы то ни было, сократимую белковую молекулу, входящую в состав мионем, можно представить в виде полиэлектролитной цепочки, при нейтрализации отрицательных зарядов которой происходит ее укорочение (сокращение). К сожалению, нам пока не удалось воспроизвести полный цикл работы сократимых элементов мионем спиростомума. Это, безусловно, затрудняет анализ механизма циклической работы мионем.

Усилиями японских ученых были изучены механохимические свойства полимеризованного актина мышц (Asakura, Taniguchi and Oosawa 1963); установлено, что при определенных условиях F-актин обладает АТФазными свойствами. Японские исследователи создали первую теоретическую модель циклически работающей „F-актиновой мышцы”. К сожалению, эта модель не может объяснить работу мионем спиростомума. Поэтому мы считаем необходимым рассмотреть другой теоретически возможный вариант активного сократительного механизма.

Можно представить такую гипотетическую модель примитивной сократительной системы, которая способна работать циклически без прямого контакта сократимых белков с АТФ. Уровень свободной энергии такой системы под влиянием фактора сокращения (например, поливалентного катиона) сильно изменяется, в результате происходит сокращение системы. При удалении фактора сокращения и при связывании сократимых белковых молекул с фактором расслабления происходит восстановление свободной энергии сократительной системы, а, следовательно, и ее расслабление. Энергия АТФ в этом случае будет расходоваться лишь на аккумуляцию и транспорт факторов. Собственно говоря, практическая проверка того, что такая модель сократительной системы может работать, уже произведена. Так, Гофман-Верлинг (Hoffmann-Berling 1958 b) показал, что сокращение стебелька сувойки может быть вызвано ионами кальция, а последующее расслабление происходит при действии на стебелек ЭДТА. Ни кальций, ни ЭДТА — оба эти вещества не имеют макроэргических связей, однако они могут изменять свободную энергию сократительной системы стебелька сувойки. Экспериментатор в этом случае, производя смену растворов, как бы выполняет функцию транспортной системы клетки. Кун (Kuhn 1960) приготовил синтетическую механо-химическую модель мышцы

из полимеров винилалкоголя и алилаллоксана, которую он назвал редокс-мышцей. Модель расслаблялась в том случае, когда аллоксановый компонент окислялся до диалуровой кислоты, и сокращалась, когда эта кислота вновь восстанавливалась до аллоксана. Опять-таки экспериментатор, производя изменения среды, выполнял функцию транспортной системы, подводящей к модели окислители и восстановители.

В процессе эволюции наиболее широкое распространение у живых организмов и клеток получил актомиозиновый механизм сокращения, при котором контрактильный белок, обладающий АТФазной активностью, непосредственно использует для своей рабочей деятельности энергию АТФ. Однако этот тип механизма сокращения, по-видимому, не является единственным (Weber 1958, Hoffmann-Berling 1958 a). Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, насколько широко используются в живой природе иные биохимические механизмы сокращения. Не исключена возможность, что представления некоторых старых авторов (Meuer und Mark 1930), пытавшихся объяснить сокращение и расслабление мышечных клеток на основе взаимодействия контрактильных белков с ионами, окажутся относительно справедливыми в отношении примитивных контрактильных систем.

Резюме

В опытах на клеточных моделях, приготовленных из инфузорий *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. сапониновым методом, установлено, что работа двух контрактильных систем этих простейших, а именно: ресничной системы и мионемной системы, обеспечивается двумя разными биохимическими механизмами. Биение ресничек происходит в результате взаимодействия актомиозиноподобных белков с АТФ. Сокращения мионем вызывают поливалентные катионы солей: Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Mn^{++} , Fe^{+++} , Al^{+++} , взятые в виде хлоридов или сульфатов в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. Сокращение мионем индуцирует также НАД (7 мг/мл). ЭДТА, высокие концентрации АТФ, фактор расслабления Марша-Бендала, 6%-ый раствор мочевины и 10%-ый раствор ацетона (в присутствии АТФ) не приводят к расслаблению мионем моделей спироостомума. Предварительная обработка моделей раствором Вебера или 0.6 М раствором KCl не препятствует сокращению цитолизированных инфузорий, вызываемому поливалентными катионами. Мионемы спироостомума, по-видимому, состоят в основном из актиноподобного белка, поскольку агенты, вызывающие осаждение (2 М KCl , среда с рН 4.7) или деполимеризацию F-актина (J^- , SCN^- , среда с рН 10.4), индуцируют медленное сокращение моделей. Высказывается предположение, что примитивные контрактильные системы могут производить механическую работу, не используя непосредственно энергию АТФ.

SUMMARY

It was found in the cellular models of the ciliate *Spirostomum ambiguum* Ehrbg., performed with the saponine method, that the action of two contractile systems of this organism, i.e. of ciliary apparatus and myonemes, follows different biochemical principles. The ciliary stroke is effected due to the interaction of actomyosin-like protein and ATP. The myonemes contraction is evoked by inorganic polyvalent cations: Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++} , Co^{++} , Cd^{++} , Mn^{++} , Fe^{+++} , Al^{+++}

applied as chlorides or sulphates, in concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ M. NAD (7 mg/ml) also induces the contraction of myonemes. EDTA, ATP in high concentration, Marsh-Bendall relaxation factor, urea (6%) and acetone (10%) are not able to induce a relaxation of myonemes model in *Spirostomum*. Pretreatment of the models with Weber solution or with KCl 0.6 M is not inhibiting their contraction evoked by polyvalent cations. It seems that the myonemes of *Spirostomum* contain merely an actin-like protein, since the models contract slowly under action of factors inducing the precipitation of F-actin (KCl 2 M, acid media of pH 4.7) or its depolymerization (J^- , SCN^- , alkaline media of pH 10.4). Assumption is made that the primitive contractile systems may perform the mechanical work with no direct use of the ATP energy.

ЛИТЕРАТУРА

- Asakura S., Tanigushi M. and Oosawa F. 1963: Mechano-chemical behavior of G-actin. *J. Mol. Biol.* 7, 55—69.
- Ашмарин И. П. 1951: Изучение свойств сократительных белков мышц при помощи новых методических приемов. *Биохимия* 16, 269—279.
- Bárány M., Biró N. A. und Molnar J. 1954: Über die Reaction zwischen Actin und zweiwertigen Kationen. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 5, 63—78.
- Bendall J. R. 1952: Effect of the "Marsh factor" on the shortening of muscle fibre models in the presence of adenosine triphosphate. *Nature* 170, 1058—1060.
- Bozler E. 1951: Mechanism of relaxation in extracted muscle fibers. *Amer. J. Physiol.* 167, 276—283.
- Child F. M. 1961: Same aspects of the chemistry of cilia and flagella. *Exp. Cell Res. (Suppl.)* 8, 47—53.
- Догель В. А., Полянский Ю. И. и Хейсин Е. М. 1962: Общая протозология. Академия Наук СССР, Москва-Ленинград.
- Ebashi S. and Ebashi F. 1959: Relaxation of glycerol-treated muscle fibres by acetone. *Nature* 183, 687—688.
- Finley H. E., Brown C. A. and Daniel W. A. 1964: Electron microscopy of the ectoplasm and infraciliature of *Spirostomum ambiguum*. *J. Protozool.* 11, 264—280.
- Hoffmann-Berling H. 1958a: The role of cell structures in cell movements. In: *Cell, organism and milieu*, N. Y., 45—62.
- Hoffmann-Berling H. 1958b: Der Mechanismus eines neuen, von der Muskelkontraktion verschiedenen Kontraktionszyklus. *Biochim. Biophys. Acta* 27, 247—255.
- Иванов И. И. и Юрьев В. А. 1961: Биохимия и патобиохимия мышц. Медгиз, Москва.
- Казакова Т. Б. и Нейфах С. А. 1963: Механохимическая активность мембран митохондрий нормальной и опухолевой клетки. *Докл. АН СССР* 152, 471—474.
- Kühn W. 1960: Prinzip der Erzeugung mechanischer Energie durch makromolekulare Systeme. *Macromol. Chem.* 35, 200—212.
- Levine L. 1956: Contractility of glycerinated vorticellae. *Biol. Bull.* 111, 319.
- Meyer K. H. und Mark H. 1930: Der Aufbau der hochpolimeren Betrachtungen. Leipzig.
- Ohnishi T. and Ohnishi T. 1962: Extraction of contractile protein from liver mitochondria. *J. Biochem.* 51, 380—381.
- Perry S. 1956: Relation between chemical and contractile function and structure of the skeletal muscle cell. *Physiol. Rev.* 36, 1—76.
- Randall J. T. 1957: The fine structure of the protozoan *Spirostomum ambiguum*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 10, 185—198.
- Sakai H. 1962a: Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin egg. IV. Contractile properties of the thread model of KCl-soluble protein from the sea urchin egg. *J. Gen. Physiol.* 45, 411—425.

- Sakai H. 1962b: V. Change in contractility of the thread model in relation to cell division. *J. Gen. Physiol.* 45, 427—438.
- Сент-Джорджи А. 1947: О мышечной деятельности. Медгиз, Москва.
- Серавин Л. Н. 1961а: Роль аденозинтрифосфата в биении ресничек инфузорий. *Биохимия* 26, 160—164.
- Серавин Л. Н. 1961b: Действие летальных концентраций химических агентов на ресничную и сократительную системы *Spirostomum ambiguum*. Научн. докл. высшей школы, Биол. науки. 3, 65—67.
- Серавин Л. Н. 1962: Особенности развития общего наркоза у *Spirostomum ambiguum*. *Цитология* 4, 52—58.
- Серавин Л. Н. 1963: Новые методы приготовления сократимых моделей из стебельков сувоек. *Биохимия* 28, 606—611.
- Simard-Duquesne N. and Couillard P. 1962a: Ameboid movement. I. Reactivation of glycerinated models of *Amoeba proteus* with adenosintri-phosphate. *Exp. Cell Res.* 28, 85—91.
- Simard-Duquesne N. and Couillard P. 1962b: Ameboid movement. II. Research of contractile proteins in *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.* 28, 92—98.
- Weber H. H. 1958: The motility of muscle and cells. Harvard Univ. Press, Cambridge Mass.
- Yagi R. and Shigenaka Y. 1963: Electron microscopy of the longitudinal fibrillar bundle and the contractile fibrillar system in *Spirostomum ambiguum*. *J. Protozool.* 10, 364—369.
- Збарский И. Б. и Перевощикова К. А. 1948: О некоторых свойствах белков клеточных ядер. Докл. АН СССР 60, 77—80.
- Збарский И. Б. и Перевощикова К. А. 1951: О природе сократительной субстанции клеточного ядра. *Биохимия* 16, 547—555.

B. R. SESHACHAR

The fine structure of the nuclear apparatus and the chromosomes of *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

Die Ultrastruktur des Nuklearapparates und die Chromosomen von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.

The question of the occurrence and arrangement of chromosomes in the ciliate macronucleus and their distribution during its amitotic division is of more than of passing interest and has a bearing on the general problem of nuclear dimorphism in the ciliate protozoa. Chromosomes of the conventional kind have been reported in the macronucleus of several ciliates, especially in the early stages of its development (Grell 1962; Raikov 1962), but information regarding their origin from, and relationship with, those of the micronucleus, their distribution within the macronucleus and their segregation during its division is still lacking. Photometry, electron microscopy and cytochemistry have however revealed that the macronucleus has large amounts of DNA, and that there are a number of nucleoli, contributing to its large RNA content. A few years ago, the author (1958, 1960) found evidence of organized chromosomes inside the vegetative macronucleus of two ciliates, *Blepharisma* and *Spirostomum*, in the form of greatly elongated and tangled filaments which could be released by simple methods like centrifugation or mechanical treatment in addition to treatment by despiralizing agents like KCN. A recent electron microscope study (Seshachar 1964) of the macronucleus of *Blepharisma intermedium* (*Spirotricha*) lent further support to the conclusion that the chromosomes of the macronucleus of this ciliate were greatly elongated Feulgen-positive filaments disposed inside the membrane in all directions. The present paper extends these studies to another ciliate, *Spirostomum ambiguum*.

Material and methods

Spirostomum ambiguum is a large freshwater ciliate, from 1 to 3 mm in length. It has a long beaded macronucleus occupying the greater part of the length of the cell (Pl. I 1). The number as well as size of the nodes is highly variable and one often finds from a dozen to as many as fifty nodes. There is some relationship between the age of the animal and its macronucleus, young exconjugants displaying a smaller macronucleus with fewer nodes, but conjugation in this species is so infrequent that it has been difficult to establish a clear correlation. Nor has a study been made how the nodes increase in

number or the nucleus in volume during life. The individual nodes are connected by fine strands. Both the nodes as well as the connecting strands are highly Feulgen positive. The micronuclei are numerous, spherical structures, from a dozen to a hundred or more, found close to the macronucleus. Each is 1.5μ in diameter.

For electron microscopy, spirostoma were isolated and grown in hay infusion with addition of Horlick's malted milk. Animals were fixed in cold buffered (pH. 7.2) osmic acid at 5°C for 45 minutes and passed through graded alcohols and propylene oxide. Embedding was done in Epon resin 812. Sections were cut of whole animals in a modified Porter-Blum microtome, stained with uranyl acetate and examined with Philips 100 B electron microscope.

Spirostomum is a large animal, and holding one end of it down on a slide with a needle, it is possible, with another needle, sharply to draw off the other end, when the macronucleus stretches out to a considerable length. It is interesting that in this process, the great lengthening of the nucleus takes place at the expense of the beaded swellings, resulting in a uniformly stretched strand (Pl. III 6). Interesting properties were displayed by the animal under centrifugal action. A few hundred animals were centrifuged at about $2000 \times g$. Centrifugation lasting five to ten minutes causes precipitation of the macronucleus into a mass lying at the centrifugal end of the cell. Continued centrifugation over longer periods breaks up the cell liberating the macronucleus and putting it directly under the action of the centrifugal force. The macronuclear membrane breaks up liberating the contents as masses of filaments, often of considerable length and tenuity. These were fixed in Carnoy's fluid and stained with the Feulgen reagent; they gave a brilliant positive reaction.

Electron microscopy

The macronucleus is bounded by a double membrane with pores. The thickness of each membrane is of the order of $75\text{--}100 \text{ \AA}$ and the space between the two individual membranes is about 150 \AA . The macronucleus contains bodies of two sizes (Pl. I 2 and Pl. II. 3). The smaller of these fills the macronuclear cavity and varies in diameter from 0.05μ to 0.3μ . Many of them could be traced over a considerable length and are here regarded as cut-ends of filaments traversing the macronuclear cavity in all directions (Pl. I 2 and Pl. II 3). Under high magnification, each filament appears to me made of bundles of fibrils about 150 \AA thick, which in sections, are cut in different planes.

Scattered among the filaments are large bodies with more or less regular outlines generally exhibiting greater electron density. They can easily be distinguished from the cut-ends of the filaments which form the "small" bodies on account of these features alone, but an added diagnostic feature is the almost invariable association of small highly electron dense particles with them. These are the nucleoli (Pl. I 2 and Pl. 3, 4).

The electron dense particles associated with the nucleoli were noticed in *Blepharisma* also (Seshachar 1964). They range from extremely minute granules to large bodies and also aggregations of them. Their number in the nucleoli varies greatly from one or two to many. In several instances, they display an internal structure and appear to be made of smaller granules (Pl. II 4).

Spirostomum ambiguum is multimicronucleate and as many as a hundred or more micronuclei have been counted in some animals. Several good micrographs were obtained of the micronucleus (Pl. II 5). It is also bounded by a double membrane. Its contents are of two kinds: one is in the form of an electron dense frame-work, in which the other, less dense material, is disposed.

Centrifugation

The effects of centrifugation on *Spirostomum ambiguum* are interesting. At about $2000 \times g$ over periods of an hour or more, many macronuclei display a condition similar to that noticed when they are stretched. The nodes are pulled apart and eventually disappear altogether (Pl. III 6, 7). Continued centrifugation yields masses of filaments of varying lengths. These are Feulgen positive and are made up of many extremely fine sub-units placed parallel to one another. The filaments are of great length. It has been possible to make some measurements and single continuous filaments of a length of nearly a centimeter have often been obtained from the macronucleus of *Spirostomum*.

Discussion

The ciliate macronucleus offers an unique example of differentiation. The development, in a single cytoplasmic milieu, of two types of nuclei, with differences in size, structure, chemical composition, mode of division and function is of the greatest interest to both the protozoologist as well as the cell biologist. A possible parallel is offered by the *Foraminifera* where Grell 1964 has reported a similar situation in a number of species. However, the heterokaryote condition in ciliates is more widespread and more complex than in the *Foraminifera*. With the exception of *Stephanopogon*, originally described by Lwoff 1936, every euciliate is heterokaryote with a macronuclear system and a micronuclear system.

A point of special interest in regard to the structure of the macronucleus relates to the occurrence and distribution of its chromosomes. That it is highly polyploid is shown by DNA measurements, which may vary from 430 times that of the micronucleus in *Paramecium* (Woodard, Gelber and Swift 1961) to 2500 times in *Bursaria* (Ruthmann und Heckmann 1961). The manner in which this DNA is organized is not clear. Attempts at finding chromosomes in the ciliate macronucleus have met with only partial success. In a few cases, chromosomes have been reported but it is by no means clear how they are arranged and distributed in the macronucleus or how they are segregated during division. This division has been termed "amitotic", but the elaborate changes that often precede the process lead one to agree with Grell 1964 that it is by no means as simple as it looks. Several attempts have been made to study the ciliate macronucleus with the light as well as the electron microscope. The light microscope shows it as a deeply staining Feulgen positive body. A number of Feulgen negative nucleoli are invariable seen. Study of sections of the macronucleus does not advance our knowledge further. Earlier attempts to understand its structure with the aid of the electron microscope also have not met with satisfactory results. *Spirostomum* has been studied by Finley 1955, 1960, Randall 1957 and Inaba 1960, and apart from the observation that the macronucleus is bounded by a mem-

brane and contains in it bodies of more than one size, no conclusions have been drawn in regard to its chromosomes — their number, size, arrangement or distribution during division. Study of other ciliates has also been made (Rudzinska 1956; Randall and Jackson 1958; Roth and Minick 1961; Elliott, Kennedy and Bak 1962; Jurand, Beale and Young 1962, 1964; Kluss 1962) and in every case, bodies of different sizes were noticed in the macronucleus, without attempts being made to reconcile them with the number, size, form and structure of the chromosomes of the micronucleus from which they are admittedly derived.

The finding that the macronucleus of *Spirostomum* could be stretched mechanically, and that by centrifugation, its contents express themselves as a system of long Feulgen positive filaments makes it possible to interpret the findings under the light and electron microscope regarding the chromosomes of the macronucleus. It is now possible to say that the "small" bodies seen under the electron microscope are sections of the fine filaments traversing the macronuclear cavity in all directions. The entire cavity of the macronucleus is filled with these filaments, except for the nucleoli. In the normal vegetative macronucleus, the filaments are so compactly and tightly wound that their identity and arrangement are not clear and the contents of the macronuclear "bead" present, under the light microscope, the appearance of a network. Stretching the nucleus mechanically or by centrifugation loosens the filaments and also aligns them in parallel bundles. Further extension straightens them and brings them together, giving rise to the long threads we see with maximum centrifugation, or stretching.

The electron micrographs of sections of the macronucleus of *Spirostomum* illustrating Inaba's 1960 paper do show bodies resembling those described here. However, that these could be cut-ends of filaments disposed in all directions in the macronucleus was not appreciated by Inaba since this author was not aware of the extensile and filament producing properties of the macronucleus. Conditioned by the observations in other ciliates, this author saw no more than that the macronucleus contained a number of discrete particulate elements.

It is also of interest that in another ciliate, *Mesnilella*, whose ultrastructure has been recently described by Puytorac 1963, sections of the macronucleus show filaments cut in various planes and resemble those of *Spirostomum* figured in this paper and of *Blepharisma* figured in an earlier one (1964). It would be of considerable interest to see if in this ciliate also, filaments of the type obtained from *Blepharisma* and *Spirostomum* could be drawn by simple methods like stretching and centrifugation.

Of special interest in this connection are the changes taking place in *Spirostomum* during binary fission. The macronucleus loses its beaded appearance and becomes stretched into a long uniform thread which, at the point of cytokinesis, becomes thinned out and finally severed into two parts (Pl. III 8). Examination of the macronucleus at this stage shows that it is made up of a large number of parallel aligned filaments, similar to those seen in the stretched macronucleus. Evidently, the filaments inside the macronucleus, which, during the vegetative stages, are disposed in all directions, become, during binary fission, aligned in parallel bundles, like those obtained when the macronucleus is stretched mechanically.

These filaments are regarded as the chromosomes of the macronucleus.

It is now clear that in the macronucleus of *Spirostomum* and also of *Blepharisma* studied earlier by the author, there are no other claimants to the status of the chromosomes than the filaments seen under the electron microscope and obtained by centrifugation. They show an ultrastructure corresponding to that reported for chromosomes of other organisms. It would however seem that the long filaments of the macronucleus have little in common with the chromosomes seen in micronuclear mitosis. In *Spirostomum*, it has been possible to count between 20 and 30 small chromosomes on the mitotic spindle of the micronucleus and there is no manner in which these small structures, almost at the level of resolution in the light microscope, could be expected to give rise to the greatly elongate filaments one sees in the macronucleus. That the macronucleus has enormous amounts of DNA, from a few hundred to several thousand times that of the micronucleus, has been established (Woodard, Gelber and Swift 1961; Ruthmann und Heckmann 1961). While the present study indicates that this DNA is organized in the form of greatly elongate filaments, a reconciliation of the appearance and structure of these filaments with those of the mitotic chromosomes of the micronucleus must await further study.

The ultrastructure of the micronucleus does not seem to provide an answer to this question. Electron microscope pictures of it in both *Spirostomum* and *Blepharisma* provide no more information than that the contents of the micronucleus consist of two moieties, one of which is more electron dense, forming a basket-like network, in whose meshes the other less dense material exists. The structural relationships between the micronucleus and macronucleus should await a study of the changes, at the ultrastructure level, in the macronuclear anlagen during their development.

Observations on the developing macronuclear anlagen offer some points of interest. Recently, it has been possible to examine, under the light microscope, the development of the macronuclear anlagen after conjugation in *Spirostomum ambiguum*. The synkaryon passes through two mitotic divisions giving rise to four bodies, two of which grow into macronuclei. The macronuclear anlagen enlarge but apparently do not synthesize DNA at the same rate as the volume increases, with the result that they appear pale. This has been noticed in other ciliates also (see Seshachar 1950). However, quite soon, in each anlage appears a number of discrete rounded Feulgen-positive bodies, each of the size and appearance of a micronucleus (Pl. III 9). They rapidly increase in number and the anlage is filled with them. As many as 200 or more could be counted in some anlagen.

The later history of the anlagen shows that each of these bodies put out fine filaments which pervade the entire anlage, and fusing with other filaments, produce the appearance of the network. While it is admitted that the true nature of the changes taking place inside the macronuclear anlagen can be determined only after an ultrastructure study, the observations under the light microscope that micronuclei-like structures make their appearance, multiply and accumulate in the macronuclear anlage during early stages of its development is highly interesting and calls for investigation at levels other than that of the light microscope.

A discussion on the nucleoli of the macronucleus and the electron dense particles in them was included in an earlier paper on *Blepharisma* (Seshachar 1964) where also similar structures were present. Apart from the

interesting fact that these two genera display striking similarities in this regard, no comments can be offered on them, pending the application of cytochemical methods for their analysis.

Grateful thanks are due to Dr. Dan Moore of the Rockefeller Institute, New York, for providing facilities to work in his laboratory and to Mr. Donald Orlic for help with electron microscopy. The visit to the U.S. was made possible by a grant from the Rockefeller Foundation.

Summary

The macronucleus of *Spirostomum ambiguum* is a long beaded structure extending over the greater part of the length of the animal. The micronuclei are numerous, often as many as a hundred, small bodies. Electron microscopy of the macronucleus shows that within its double-walled membrane, there is a large number of long ramifying filaments disposed in all directions. They can be expressed from the nucleus by mechanical stretching and centrifugation, and they form parallel bundles of Feulgen positive filaments. The filaments are regarded as the chromosomes of the macronucleus. The fine structure of the micronucleus presented in this study does not provide a clue to the origin of the chromosomes of the macronucleus, but light microscope observations show that in the developing macronuclear Anlagen, a multiplication and accumulation of micronuclei-like structures occur. These later break up and release the fine filaments which form the internal constituents of the macronucleus.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Ma von *Spirostomum ambiguum* ist ein länglich eingebogenes Gebilde, ausgestreckt über den grösseren Teil der Körperlänge des Tieres. Die Mi sind zahlreiche, oft bis hundert, kleine Körperchen. Das Elektronmikroskopische Bild des Ma zeigt, dass innerhalb einer zweischichtiger Membran, eine grosse Zahl langer, verzweigter Faser sich befindet, die in alle Richtungen durchlaufen. Man kann sie durch mechanisches Ausstrecken und Zentrifugieren frei legen; sie bilden parallele Bündel von Feulgen positive Faser. Sie werden als Chromosomen des Ma betrachtet. Die, in dieser Arbeit dargestellte feine Struktur des Mi, liefert uns keine Erklärung über die Herkunft der Chromosome des Ma, jedoch Beobachtung mittels optisches Mikroskop zeigt, dass in den Ma Anlagen, findet eine Multiplikation und Akkumulation gewisser Mi-ähnlichen Strukturen statt. Diese zerfallen später in Stücke und bringen zur Erscheinung feine Faser, welche die inneren Bestandteile der Ma bilden.

REFERENCES

- Elliott A. M., Kennedy J. R. and Bak I. J. 1962: Macronuclear events in synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 12, 512—532.
 Finley H. E. 1955: Electron microscopical observations on *Spirostomum ambiguum*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 62, 229—246.
 Finley H. E. and Brown C. A. 1960: Ultrastructure in a ciliated Protozoan. *Norelco Reporter.* 7, 24—28.

- Grell K. G. 1962: Morphologie und Fortpflanzung der Protozoen. Fortschr. der Zool. 14, 1—85.
- Grell K. G. 1964: The Protozoan Nucleus. In: The Cell. Vol. 6. Ed. J. Brachet and A. E. Mirsky. New York (Academic Press).
- Inaba F. 1960: The fine structure of the nuclei of *Spirostomum ambiguum* seen by electron microscope. Biol. J. Nara Women's University. 10, 26—29.
- Jurand A., Beale G. H. and Young M. R. 1962: Studies on the macronucleus of *Paramecium aurelia*. I. J. Protozool. 9, 122—131.
- Jurand A., Beale G. H. and Young M. R. 1964: Studies on the macronucleus of *Paramecium aurelia*. II. Development of Macronuclear Anlagen. J. Protozool. 11, 491—497.
- Kluss B. C. 1962: Electron microscopy of the macronucleus of *Euplotes eurystomus*. J. Cell Biol. 13, 462—465.
- Lwoff A. 1936: Le cycle nucléaire de *Stephanopogon mesnili* Lw. (cilié homo-caryote). Protistologica, 61, 117—132.
- Puytorac P. de 1963: Observations sur l'ultrastructure du cilié astome: *Mesnilella trispiculata* K. J. Microsc. 2, 189—196.
- Raikov I. B. 1962: Der Kernapparat von *Nassula ornata* Ehrbg. (*Ciliata, Holotricha*). Arch. Protistenk. 105, 463—488.
- Randall J. T. 1957: The fine structure of the protozoan *Spirostomum ambiguum*. Symposia of the society for Experimental Biology. 10, 185 (Cambridge University Press).
- Randall J. T. and Jackson S. F. 1958: Fine structure and function in *Stentor polymorphus*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 807—830.
- Roth L. E. and Minick O. T. 1961: Electron microscopy of nuclear and cytoplasmic events during division in *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 8, 12—21.
- Rudzinska M. A. 1956: Further observations on the fine structure of the macronucleus in *Tokophrya infusionum*. J. Biophys. Biochem. Cytol. (Suppl). 2, 425—430.
- Ruthmann A. und Heckmann K. 1961: Formwechsel und Struktur des Makronucleus von *Bursaria truncatella*. Arch. Protistenk. 105, 313—340.
- Seshachar B. R. 1950: The nucleus and nucleic acids of *Chilodonella uncinatus* Ehrbg. J. Exp. Zool. 114, 517—541.
- Seshachar B. R. 1958: The macronucleus of *Spirostomum*. Nature. 182, 1614—1615.
- Seshachar B. R. 1960: Effect of centrifugation on the macronucleus of *Spirostomum* and *Blepharisma*. Nature. 186, 333—334.
- Seshachar B. R. 1964: Observations on the Fine Structure of the Nuclear apparatus of *Blepharisma intermedium* Bhandary (*Ciliata: Spirotricha*). J. Protozool. 11, 402—409.
- Woodard J., Gelber B. and Swift H. 1961: Nucleoprotein changes during the mitotic cycle in *Paramecium aurelia*. Exp. Cell. Res. 23, 258—264.

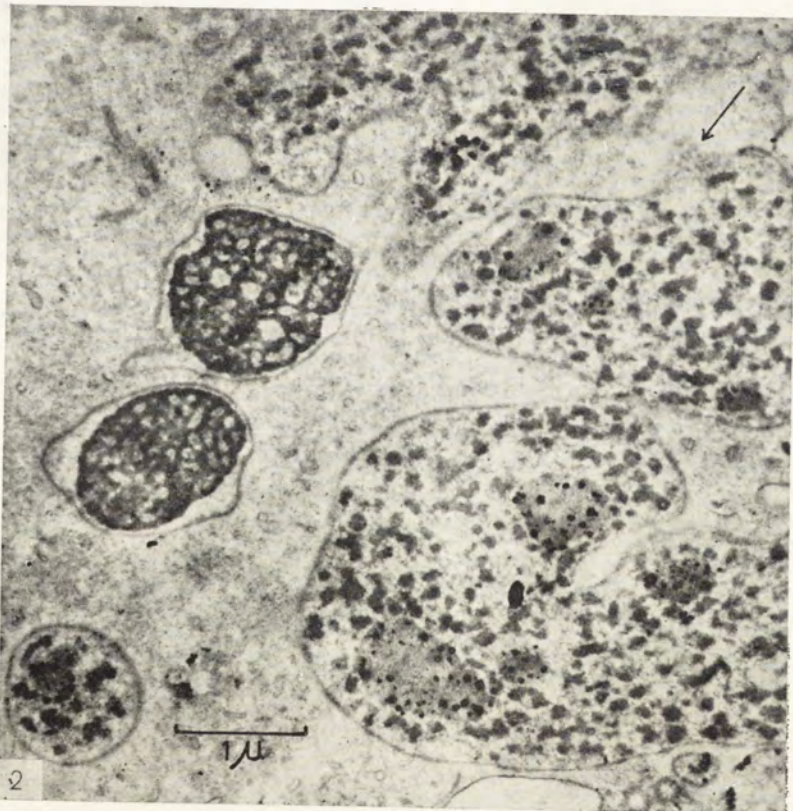
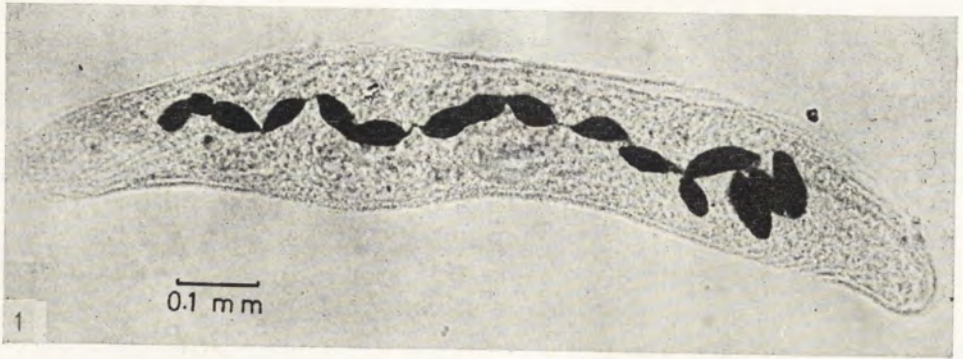
EXPLANATION OF PLATES I—III

- 1: *Spirostomum ambiguum* stained to show the macronucleus. Feulgen
- 2: Low power electron micrograph showing macronuclear nodes and two micronuclei. Arrow marks pores of the macronuclear membrane in tangential section. At lower left is cross section of internodal connection
- 3: Electron micrograph of portion of macronucleus showing its ultrastructure. The double membrane, sections of chromosomal filaments and nucleoli are seen
- 4: Nucleoli showing electron dense particles
- 5: Micronucleus
- 6: *Spirostomum ambiguum* centrifuged to show two stretched macronuclei. Feulgen
- 7: Filament obtained from a single macronucleus on centrifugation. Feulgen
- 8: Macronucleus during binary fission. Feulgen
- 9: Macronuclear anlagen showing granular bodies. The two dark bodies are fragments of the old macronucleus. Feulgen

Griff, R. H. 1963. Morphology and distribution of the ...
 Griff, R. H. 1964. The ...
 Griff, R. H. 1965. The ...
 Griff, R. H. 1966. The ...
 Griff, R. H. 1967. The ...
 Griff, R. H. 1968. The ...
 Griff, R. H. 1969. The ...
 Griff, R. H. 1970. The ...
 Griff, R. H. 1971. The ...
 Griff, R. H. 1972. The ...
 Griff, R. H. 1973. The ...
 Griff, R. H. 1974. The ...
 Griff, R. H. 1975. The ...
 Griff, R. H. 1976. The ...
 Griff, R. H. 1977. The ...
 Griff, R. H. 1978. The ...
 Griff, R. H. 1979. The ...
 Griff, R. H. 1980. The ...
 Griff, R. H. 1981. The ...
 Griff, R. H. 1982. The ...
 Griff, R. H. 1983. The ...
 Griff, R. H. 1984. The ...
 Griff, R. H. 1985. The ...
 Griff, R. H. 1986. The ...
 Griff, R. H. 1987. The ...
 Griff, R. H. 1988. The ...
 Griff, R. H. 1989. The ...
 Griff, R. H. 1990. The ...
 Griff, R. H. 1991. The ...
 Griff, R. H. 1992. The ...
 Griff, R. H. 1993. The ...
 Griff, R. H. 1994. The ...
 Griff, R. H. 1995. The ...
 Griff, R. H. 1996. The ...
 Griff, R. H. 1997. The ...
 Griff, R. H. 1998. The ...
 Griff, R. H. 1999. The ...
 Griff, R. H. 2000. The ...

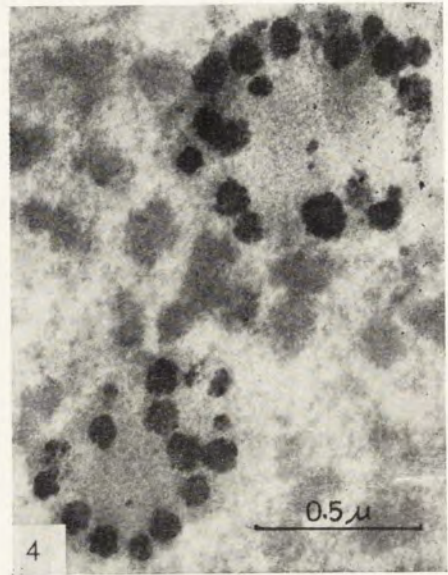
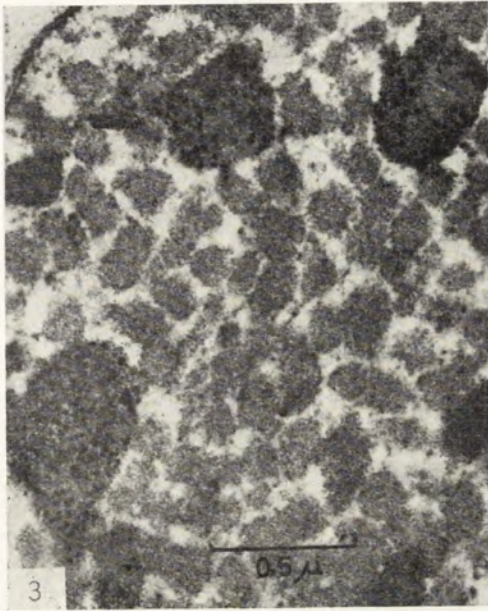
EXPLANATION OF PLATE III

1. Photomicrograph showing the ...
2. Low power electron micrograph showing the ...
3. Electron micrograph showing the ...
4. Micrograph showing the ...
5. Micrograph showing the ...
6. Micrograph showing the ...
7. Micrograph showing the ...
8. Micrograph showing the ...
9. Micrograph showing the ...
10. Micrograph showing the ...



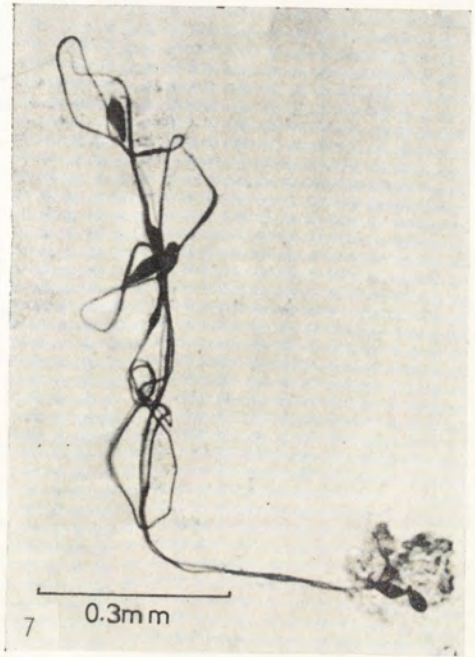
B. R. Seshachar

auctor phot.



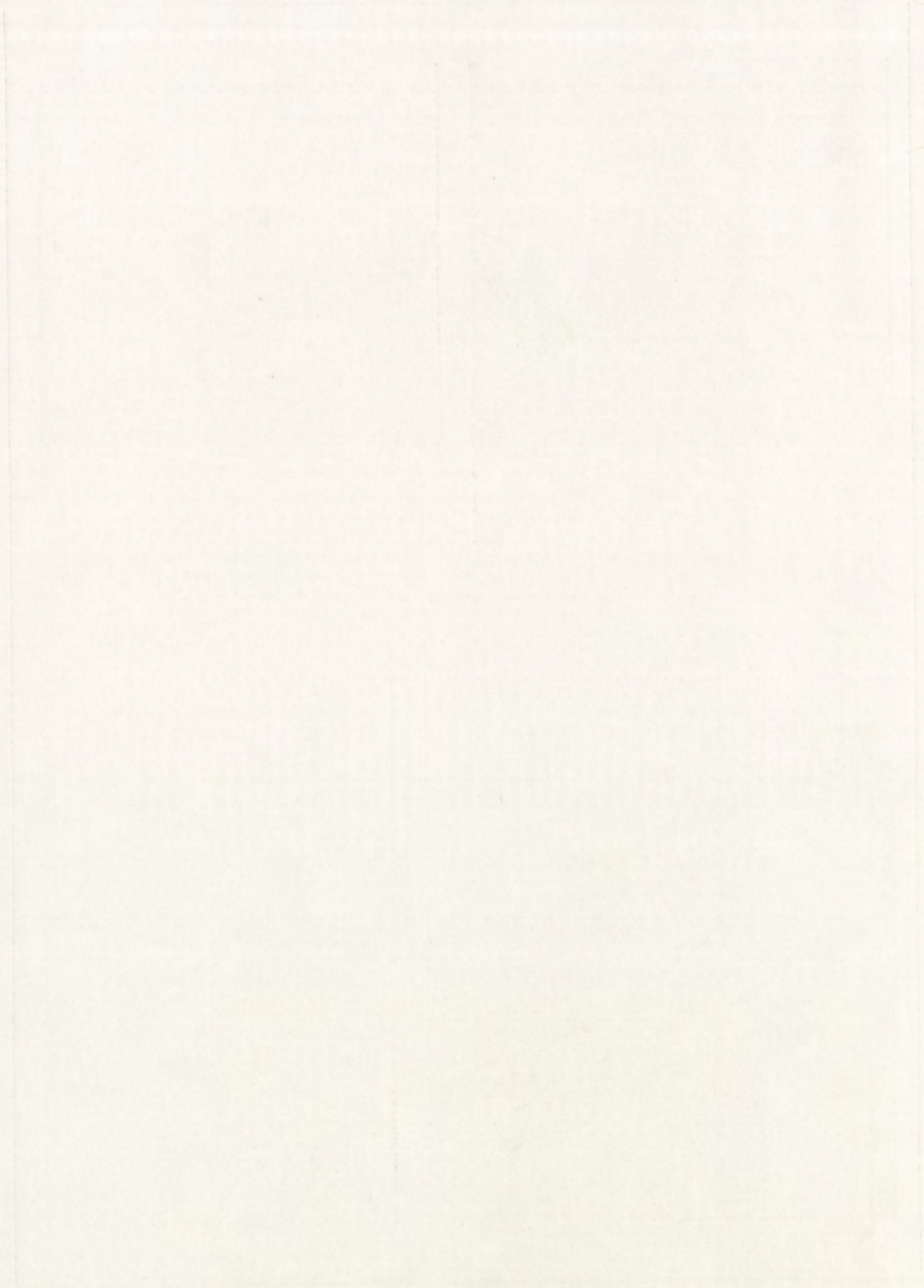
B. R. Seshachar

auctor phot.



B. R. Seshachar

auctor phot.



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

Maria JERKA-DZIADOSZ

Morphogenesis of ciliature in division of *Urostyla weissei* Stein

Morfogeneza orzęsienia w podziale *Urostyla weissei* Stein

Urostyla weissei has been described by Stein 1859. It is a ciliate belonging to the order *Hypotrichida*, with a disposition of cirri on the ventral body side which is typical for this group. A similar species has been described by Wrzeźniowski 1864 as *Urostyla flavicans*. The differences between both species are very insignificant. The ciliate investigated in the present study reveals a structure which is similar as well to *U. flavicans* as to *U. weissei*. Since some difficulties were found in determination of the ciliate under study, a detailed analysis of descriptions of the species *Urostyla weissei* Stein 1859, and *Urostyla flavicans* Wrzeźniowski 1867 proved to be indispensable.

The ciliate under study has been determined by me as *Urostyla weissei* Stein.

Material and methods

Urostyla weissei was found in a small pool near the manor of Królikarnia in the southern part of Warsaw. This ciliate was also found in water of a pool of Sadyba in Warsaw, in the river Jeziora in Zalesie Dolne, district of Piaseczno as well as in the water brought from Toporowy Staw in the Tatra Mountains. The culture was started from one individual. As culture medium, the sterilized Pringsheim's fluid was applied, as nutrient — *Tetrahymena pyriformis* grown on dry hen yolk.

For determination of the ciliate, the nuclear apparatus was stained after Feulgen's method. The cirri system in adult individuals and the course of morphogenesis of ciliature were studied on fixed preparations executed with the method of P á r d u c z 1952.

For revealing the silver impregnable system, the method of Klein modified by Turner 1933 was followed.

The morphogenetic processes and the division of macronucleus were also examined on fresh material in a suspended drop.

Morphology

Urostyla weissei Stein belongs to the family *Urostylidae*, suborder *Stichotrichina*, order *Hypotrichida* according to the taxonomy suggested by Fauré-Fremiet 1961.

In a well fed culture, the length of the ciliate fluctuates from 200 to 300 μ , the width in the widest place is 90—100 μ . Ciliates are motile, of a greenish-brown tint. The body is elongate, elliptical, more motile in its anterior part (Fig. 1), flattened dorso-ventrally.



Fig. 1. *Urostyla weissei* Stein. Fixed preparation

Peristome reaches as far as $1/4$ of the body length (Fig. 1, and Pl. I 4). The right margin of the peristome is constituted by the adoral zone of membranelles — AZM, the left one — by the waving membrane UM (membranella undulans). In the frontal area, on the left side of the peristome, 8 frontal cirri, and behind them four or five longitudinal rows of ventral cirri are located.

In the posterior part of body behind the ventral cirri, an oblique row of transversal cirri is present. Their number is most frequently 8, in some individuals — 10 and even 12. The sides and the posterior part of the body are surrounded by the marginal cirri. The frontal and transversal cirri are longer than all others.

On the dorsal body side 5 rows of setae occur (Pl. I 2). In the anterior part, the side rows of setae bent arch-like towards the middle of the anterior body margin. The base of each seta is surrounded by a crown of several pro-trichocysts (Pl. I 1). In living ciliate they are seen as greenish granules, which are impregnable with AgNO_3 .

Protrichocysts are present also on the ventral surface of the body. They surround the bases of cirri.

The nuclear apparatus of *Urostyla weissei* consists of two macronuclei and four micronuclei (Pl. I 3). Individuals with 5 Mi were found as well. Macronuclei are ovoid, elongated, lying one on the top of the other, the anterior one near the peristome, the posterior beyond the middle of the body. Mi are spherical and lie by two near each Ma.

The body dimensions are as follows: length — 180.6μ , width — 37.8μ , the distance between peristome and the anterior body end — 12.6μ length of the posterior marginal cirri — 10.5μ , macronucleus $23.0 \mu \times 3.35 \mu$, the diameter of micronucleus — 3.15μ .

Those dimensions ascertained on fixed and stained material are smaller than in the living ciliates because of shrinkage involved by technic.

Morphogenesis

In the division process 8 stages have been distinguished based on the morphological changes of the macronucleus which are clearly seen in living ciliates. *Urostyla* at a definite stage was fixed and stained after Párducz's method. When well fed, *Urostyla weissei* divides 1—3 times within 24 hrs. at the temp. $18-20^\circ\text{C}$. The division lasts about 180 min.

At the first stage of division, (Fig. 2 I) ciliates differ only slightly from the normal interdivision individuals. Their anterior body part is more spherical and the median part is broader. Macronuclei are enlarged. The first alteration in the surface structures of the ciliate is the appearance of a stripe of tiny cilia between the ventral and marginal cirri on the right side and outside the peristome (Pl. I 5). Towards the front those cilia became disposed so as to form membranelles of the future opisthe. About that time the UM disappears.

At the second stage of division (Fig. 2 II), migration of both Ma begins towards the middle of the body. At that time on the ventral surface near and left of the posterior AZM part of proter as well as near the anterior part of AZM of opisthe a ciliary area of the cirri primordia appears. Both areas are similar and the development of cirri in proter occurs in the same way as in the opisthe. The division area consists of 7 rows of tiny cilia placed tightly one close to another (Pl. II 6). Closely to AZM of the proter and opisthe, run slightly wider stripes of tiny cilia; those are primordia of UM. Towards the conclusion of the second stage, on the right side of AZM of the proter and opisthe arise separate rows of cilia. These are the primordia of marginal cirri of the right body side.

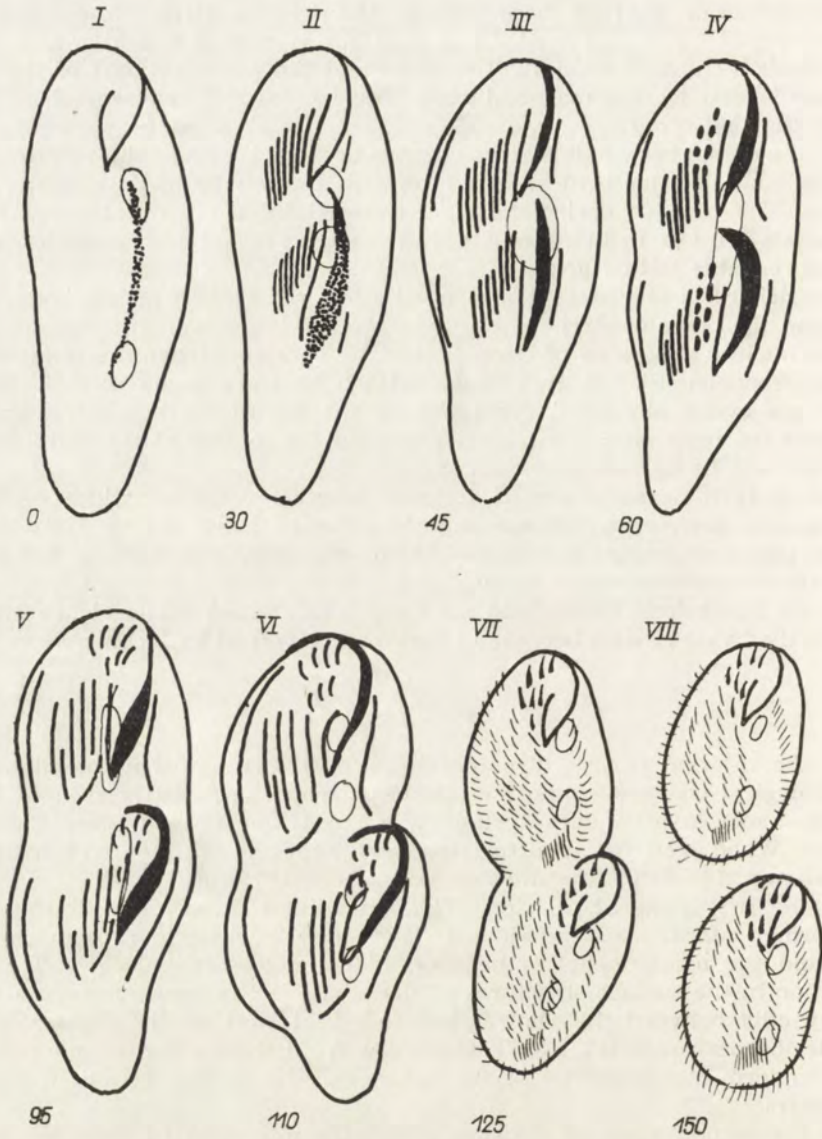


Fig. 2. Scheme of formation of cirri in division. Numbers below drawings indicate the initial time of division in min

The third division stage is the phase of condensed nucleus. Both *Ma* fuse together producing a single mass. At that time the rows of cirri primordia grow proceeding anteriorly and posteriorly as well as towards the body sides (Fig. 2 III). On the left body margin beyond the marginal cirri, two ciliary stripes arise — primordia of the marginal cirri of the left body side of the proter and opisthe. Ciliates of this stage are easily distinguishable

among the others owing to their distinct condensed nucleus and their body shape which is plainly changed: their anterior body end is more spherical and the anterior part of the ciliate is widened, while the posterior one is narrowed and elongated backwards.

The next, fourth stage is a period in which following changes occur in the ciliate: Ma begins to divide, the division furrow appears, the differentiation of cirri from the division area as well as resorption of the old ciliature initiate (Fig. 2 IV).

The spherical condensed mass of Ma elongates and assumes a rod-shaped form, and subsequently a constriction in its median part appears. The division furrow is being formed as a depression in the left margin in the middle of the ciliate body. The AZM of the opisthe bends and forms an arch towards the right body margin. Simultaneously UM joins AZM in the posterior part. In the ciliary areas occur following changes: the two first (beginning with AZM) ciliary rows break up, the neighbouring cilia approach one another, their bases fuse together and form cirri. The first row forms the frontal cirri and the second one the transversal cirri. In each row, 8 cirri are formed most frequently. In the first place arise the cirri of the anterior part of the area. Simultaneously the sixth ciliary row of the area begins to shift slightly backwards.

At the fifth stage of division Ma has been already divided into two. On the right body side the division furrow is deeper and lies further onwards than of the left body side (Fig. 2 V). Therefore the division plane is slightly oblique. The AZM of the opisthe forms an arcuated bent forwards and sideways. The frontal cirri migrate towards the anterior part of the daughter individuals and gradually occupy their final position. Transversal cirri shift backwards (Pl. II 8), past the ventral cirri. The sixth row of the ciliary area shifts backwards, the seventh one — forwards, till they meet and produce one row. Further atrophy of the old ciliature occurs.

At the next stage (Fig. 2 VI), both Ma divide, the division furrow deepens. The right side of the opisthe becomes gradually convex, its AZM shifts towards the body margin. The transversal cirri take their final position. Remainder of the old opisthe ciliature shift to the elongated caudal part of the ciliate. The old frontal cirri of the proter become resorbed at their usual places (Pl. II 9).

In the next stage of division, the final resorption of the remaining old ciliature follows, posterior part of the opisthe becomes rounded. The division furrow deepens till the complete separation of the daughter individuals. Ciliates, being rounded after division, reassume their normal elongated form within next 15—30 min. (Fig. 2 VII, VIII).

Discussion

Stein 1859 reported following diagnostic characters of the species *U. weissei*: body elongated, elliptical, slightly wider in the middle, tapering towards both ends, the ends regularly rounded. Dorsal side convex, ventral — flat. Number of frontal cirri — 3—5, number of transversal cirri — 7—8, five rows of ventral cirri, 3 of them passing upon the frontal area (Fig. 3A). Two Ma.

The structure of the species examined in the present study corresponds to the description reported by Stein concerning as well the above mentioned characters as other details of the structure which were considered in the description of the species. These characters are: structure of the peristome, of the contractile vacuole and the characteristic change of shape in the dividing individuals. A controversial problem is the number of the frontal cirri. Stein reported their number as 5. Kahl 1932 in his key for determination of *Protozoa* writes that *Urostyla weissei* has 8 frontal cirri. Since the anterior cirri of the ventral rows, which encroach upon the frontal area, are thicker and longer than the others, they may be assumed as frontal cirri.

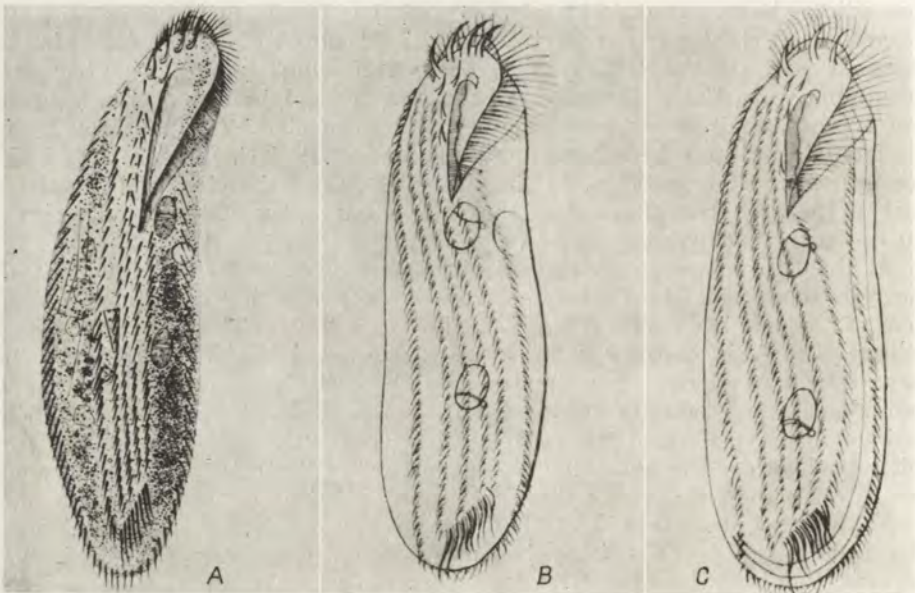


Fig. 3. A — *Urostyla weissei* Stein 1859. B and C — *Urostyla flavicans* Wrzeźniowski 1867. Reproductions of author's drawings

In the present study of division morphogenesis of ciliature the number of the frontal cirri proved to be 8 (Pl. II 9). In adult individuals, the limit between the frontal and ventral cirri is vague and this may involve discrepancy between the description of Stein and of Kahl.

According to Stein, *Urostyla weissei* has 5 rows of ventral cirri. My observations proved that there may be 4 or 5 rows of them. In division, the area of the ventral cirri primordia consists of 7 rows of cilia. The two first rows (on the peristome side) form frontal and transversal cirri, the other 5 rows give origin to ventral cirri. In course of advancing morphogenesis, the fourth row shifts backwards and very often joins the fifth one. In this way the adult individual possess 4 rows of ventral cirri only. It occurs sometimes that the 4th row fails to shift entirely but is just pushed backwards. In this case, the adult individual has 5 rows of ventral cirri, the fourth and fifth of them being shorter than the remaining ones. Kahl 1935 presents his own drawing of *U. weissei*, in which the pattern of ventral cirri is the fol-

lowing: ventral rows are 5, the fourth being shifted backwards and the fifth — forwards similarly as it is marked in the Fig. 1, VIII.

According to Stein the nuclear apparatus is constituted of two Ma. They both are ovoid with a distinct fissure placed approx. in the middle. According to the observations of author, an adult living *Urostyla weissei* has a homogenous nucleus with no "fissure". Before division however, a clear area appears in the middle, deprived of chromatin as proved by the Feulgen reaction. This is probably the reorganization band corresponding to similar structures described in division of Ma in *Euplotes* by Gall 1959 and in *Urostyla grandis* by H. Raabe 1947.

Wrzeźniowski 1867 described the species *Urostyla flavicans* from the environment of Warsaw. This species is strikingly similar to *U. weissei*. *Urostyla flavicans* has 8 frontal and 8 transversal cirri. The distribution of the ventral ciliature is very similar to that in *U. weissei*. Wrzeźniowski reported that he observed two forms of *U. flavicans* (Fig. 3 B and C) — one with four, another with five rows of ventral cirri, similarly as it was found in *U. weissei*. The nuclear apparatus of *U. flavicans* is identical with that in *U. weissei* as described by Stein.

The distinction characters of *U. weissei* and *U. flavicans* are: the structure of the contractile vacuole and position of the marginal cirri.

The contractile vacuole of *U. flavicans* consists of a vesicle situated on the right side of the peristome and of two canalicules, the posterior one different from the canaliculus in *U. weissei*: it reaches as far as the posterior body part, here it twists and passes upon the right body side. *Urostyla flavicans* was found by Wrzeźniowski in a small pool near a tannery. Probably the high development of the contractile vacuole was connected with the presence of sewer material from the tannery in the medium.

The marginal cirri in *U. flavicans* differ from that in *U. weissei* being pushed aside from the margins towards the middle of the body.

Considering that authors often report a variable number of cirri as well as a certain lability in the pattern of ciliature — the differences between *U. weissei* and *U. flavicans* seem not to provide reason for considering those ciliates as separate species.

In 1930 Chia-Chi Wang described a ciliate *Urostyla paragrandsis* from the environment of Nankin. This species is identical with *U. weissei* Stein. Kahl 1935 recognized *U. paragrandsis* as synonym of *U. weissei*.

The division morphogenesis of *U. weissei* and *U. flavicans* strictly corresponds to the scheme characteristic for all the *Hypotricha*. The whole ciliature arises de novo and the old one undergoes resorption.

The process of division occurs in two phases. The first is the phase in which all the superficial structures arise de novo and exist in their embryonic form. This phase is preceded by the reorganization of the nuclear apparatus and terminates with the condensation of Ma. At the moment when the condensed Ma begins to divide, its fission initiates the second phase of division, which is the period of differentiation of the primordia and of redifferentiation of the old ciliature. At this phase of division, cilia begin to fuse and to form cirri, they migrate to their final place, the division furrow appears and the old ciliature is resorbed. Resorption of ciliature was not observed prior to formation of the division furrow or before condensation of Ma.

The period of condensed Ma is a point at which the dedifferentiation of the old ciliature joins the differentiated old cilature. Possibly this stage may be compared to the "stabilization point": found by Frankel 1962 in the morphogenesis of *Tetrahymena pyriformis*.

The pattern of distribution of the division primordia in *U. weissei* resembles those in *Urostyla cristata* as reported previously (Jerka-Dziadosz 1964). The FVT cirri (fronto-ventralo-transversal) arise in the middle of the body and the marginal cirri on the sides near the maternal primary ones. In *U. weissei* the number of rows of cirri as well as the total number of cirri is lower than in *U. cristata*. In *U. weissei* the division area consists of 7 rows in the initial phase whereas in the adult individual only 5 and even 4 meridional rows of cirri are present. The primordia of ciliature appear as cilia which subsequently fuse together and form cirri. So in the ontogenesis of *U. weissei* characters of more primitive *Hypotricha* are manifest in which the ciliature consists of a much higher number of rows of cirri. Formation of cirri from cilia has been ascertained in *Urostyla grandis* (Jerka-Dziadosz 1963), in *Urostyla cristata* (Jerka-Dziadosz 1964) and also in *Urostyla weissei* which indicates once more the rather primitive character of this group within *Hypotricha*.

Summary

In the morphogenesis of the ciliate *Urostyla weissei* Stein, similarly as in all other *Hypotricha*, all the cirri arise anew and the old ones undergo resorption. In the course of ontogenesis the number of rows of the cirri primordia is reduced. Cirri arise by fusion of cilia.

The descriptions of species *Urostyla weissei* Stein 1859 and *Urostyla flavicans* Wrześniowski have been analyzed. Those ciliates are recognized by the author as one species *Urostyla weissei* Stein 1859 (= *U. flavicans* Wrześniowski 1867, *U. paragrands* Wang 1930).

STRESZCZENIE

Zbadano morfogenezę wymoczka *Urostyla weissei* Stein. Tak jak u innych *Hypotricha* wszystkie cirri powstają na nowo a stare ulegają resorpcji. W trakcie ontogenezy następuje redukcja ilości rzędów zawiązków cirri. Cirri powstają przez zlewianie się rzęsek.

Po przeanalizowaniu opisów gatunków *Urostyla weissei* Stein 1859 oraz *Urostyla flavicans* Wrześniowski autorka uważa te wymoczki za jeden gatunek *Urostyla weissei* Stein 1859 (= *U. flavicans* Wrześniowski 1867, *U. paragrands* Wang 1930).

REFERENCES

- Fauré-Fremiet E. 1961: Remarques sur la morphologie comparée et la systématique des *Ciliata-Hypotrichida*. C. R. Acad. Sci. 252, 3515—3519.
 Frankel J. 1962: The effects of heat, cold, and p-fluorophenylalanine on morphogenesis in synchronized *Tetrahymena pyriformis* GL. C. R. Lab. Calsberg 33, 1—52.
 Gall J. 1959: Macronuclear duplication in the ciliated protozoan *Euplotes*. J. Bio-phys. Biochem. Cytol. 2, 295—308.

- Jerka-Dziadosz M. 1963: Morphogenesis in division and regeneration of *Urostyla grandis* Ehrbg. Acta Protozool. 1, 43—54.
- Jerka-Dziadosz M. 1964: *Urostyla cristata* sp. n. (Urostylidae, Hypotrichida); the morphology and morphogenesis. Acta Protozool. 2, 123—128.
- Kahl A. 1932: Die Tierwelt Deutschlands. Teil 25. *Ciliata. Spirotricha*. Jena.
- Párducz B. 1952: Eine neue Schnellfixierungsmethode in Dienste der Protistenforschung und des Unterrichts. Ann. Muz. Nat. Hung. 2, 5—12.
- Raabe H. 1947: L'appareil nucléaire d'*Urostyla grandis* Ehrbg. Partie II. Appareil macronucléaire. Ann. Univ. Curie Skłodowska, S. C 1, 133—170.
- Stein F. 1859: Der Organismus der Infusionsthier. Leipzig.
- Turner J. P. 1933: The external fibrillar system of *Euplotes* with notes on the neuromotor apparatus. Biol. Bull. 64, 53—66.
- Wrzeźniowski A. 1867: Przyczynek do historii naturalnej wymoczków. Rocznik Towarzystwa Naukowego Krakowskiego 12, 231—342.
- Wang Ch. 1930: Notes on some new and rare species of Hypotrichous infusoria. Science Soc. Zool. 6, 2, 9—18.

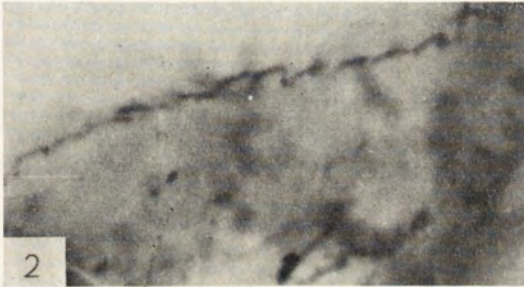
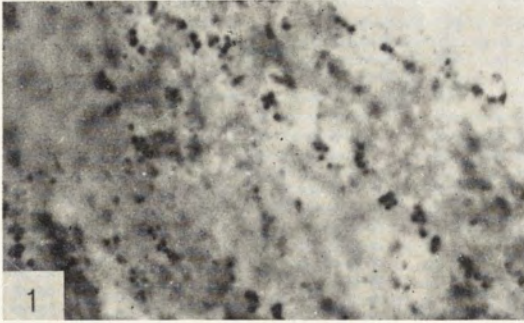
EXPLANATION OF PLATES I—II

- 1: Protrichocysts on the dorsal body side. AgNO₃ (15 × 100)
 - 2: Setae on the dorsal body side. Parducz (15 × 100)
 - 3: Nuclear apparatus. Feulgen (15 × 25)
 - 4: Disposition of cirri on the ventral body side (15 × 25)
 - 5: Primordium of AZM in the opisthe (15 × 25)
 - 6: Division area of the cirri primordia in proter and opisthe (15 × 25)
 - 7: Accumulation of cilia and formation of cirri (15 × 25)
 - 8: Migration of transversal cirri (15 × 45)
 - 9: The 7th division stage (15 × 25)
- [Microphotograms 4—9 are of preparations executed with the method of Parducz]

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work of the Commission. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments during the year. The report concludes with a summary of the work done and a statement of the Commission's views on the future of the country.

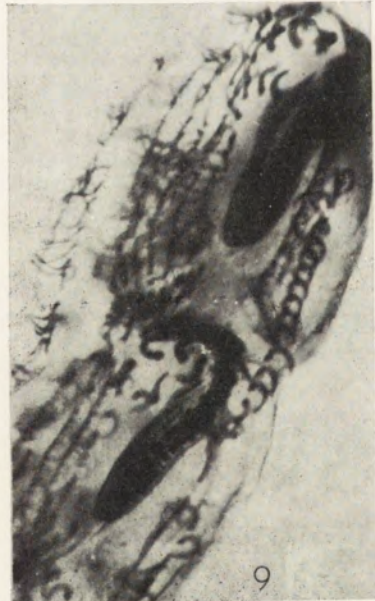
STATEMENT OF THE COMMISSION

1. The Commission has the honor to acknowledge the receipt of the report of the Government on the work done during the year 1911.
2. It is a pleasure to note that the Government has made considerable progress in the various departments during the year.
3. The Commission has also to report that it has completed its work in each of the various departments.
4. It is a pleasure to note that the Government has made considerable progress in the various departments during the year.
5. The Commission has also to report that it has completed its work in each of the various departments.



M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.



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 of *Stylonychia mytilus* (O.F.M.) evoked by action of thermic shocks

Duplety *Stylonychia mytilus* (O.F.M.) powstałe w wyniku działania szoków termicznych

For continuation of the study on regeneration and morphogenesis of the double forms in *Stylonychia*, a method of experimental inducing the doublet formation had to be found. In the first experiments of this line, application of chemical factors was tried. The method of Fauré-Fremiet (1945, 1948) based on action of low concentrations of formalin on dividing ciliates failed to give satisfactory results. The division of the *Stylonychia* cell damaged by formalin could proceed and regeneration of both individuals occurred only after their separation. Similar effects were noticed in experiments with nicotine and colchicine.

Doublets were obtained only when *Stylonychia* individuals were exposed in the course of cell division to thermic shocks. In this case the method of Frankel (1962) was followed. After the first preliminary experiments, doublets of various form appeared. The subsequent investigation allowed to establish the optimal conditions in which formation of double form was possible.

Material and methods

Clones of *Stylonychia* were cultivated on *Tetrahymena pyriformis* G. L. in 20—30 ml of the Pringsheim's solution medium. Thermic shocks were applied in thermostate. The initial temperature of 20°C was raised up to 33—34°C. The time of exposure was 20—60 min.

Experiments embraced two groups of ciliates:

1. individuals in the interdivision stage,
2. individuals in division stage.

Observations and photographs were executed under the microscope using the phase contrast optics. Material was stained with the Parducz's haematoxylin and after Feulgen.

Results

Reaction to the thermic shock

In course of the gradual rise of temperature (27—30°C), an increase of number of the swimming individuals was observed, while in normal conditions, the majority of *Stylonychia* individuals rest on the bottom. During the beginning of stimulation by the shock, the movement of animal is violent and chaotic, with frequent change of direction. When the effective temperature is reached (approx. 32—34°C), the ciliates begin to fall to the bottom and their movement ceases nearly completely. The animals swell and become round. The further rise of temperature over 35°C causes desintegration and death of ciliates.

If the rise of temperature is too abrupt — and this was observed when the experiment was performed in too small amount of culture medium — the cells fail to swell but show the symptoms of damage. Desintegration concerns in the first place AZM and the anterior part of the cell.

Consequences of the thermic shock

Ciliates in the interdivision stage

About 30 minutes after conclusion of the shock, the first reorganization of the cell takes place. Morphogenetic areas arise and changes in the nuclear apparatus occur, similar to those reported during regeneration process (Dembowska 1925, 1938). After 4—5 hrs. a gradual return to norm takes place. Ciliates reconstitute their normal shape and movement.

Ciliates in the course of cell division

The reaction to the thermic shock is not the same in all the individuals even within one experiment despite comparatively uniform conditions. The changes in the body shape evoked by stimulus (swelling and spherical form of cell) are usually not accompanied by any visible changes within cytoplasm or nuclear apparatus. After completion of the shock, similarly as in the group of non-dividing ciliates, the shape of the cell gradually returns to its initial form. Despite its retardation (sometimes up to several hours) the division comes normally to its conclusion. Several hours after completion of the shock the developmental anomalies assuming the form of doublets of different type were noted. Out of 65 thermic shocks applied — 26 evoked formation of doublets.

Doublets are forms which arose of non-separated sister-cells. They possess a double nuclear apparatus, a double assembly of trophic organelles — which are not always equally developed in both individuals of the doublet — and a double system of ventral cirri which is sometimes not complete.

The doublets

Two main types of structure may be distinguished in doublets: 1. Regular spherical doublets, 2. Irregular flat doublets.

Regular spherical doublets

This type of doublet consists of two individuals of a shape and of proportions similar to that of single normal individuals. Connection of both cells runs on the dorsal side. Owing to its specific manner of connection, the

spherical doublet forms a three-dimension spherical system which resembles a 4-armed star when seen from the anterior pole. This form is identical with the doublet form which had arisen after conjugation of *Stylonychia* as described previously (T o t w e n - N o w a k o w s k a 1964).

The process of formation of the spherical doublets has not been sufficiently investigated although a series of observations were carried out at different periods of time after completion of the shock. The author failed to distinguish stages earlier than the definitely formed doublet. Since this form may be observed comparatively soon after completion of the shock in the time limits in which the division should occur, presumably the early stage of the doublet arises at the very beginning of division. The spherical doublets occur rather rarely. Out of 26 shocks after which double forms appeared, only in 3 cases formation of doublets of this type was stated.

Irregular flat doublets

This form described first by Stein 1859 and Tchang Tso-run 1964 has a flat structure in its general outline. The connection of both individuals of this doublet is very strong, and the border line between them can hardly be stated. The double nuclear apparatus of this doublet is of a normal structure.

The irregular doublets are formed gradually in course of several hours. As an effect of the shock, the cell division is impaired — as result — the division furrow develops irregularly. It is very distinct on the ventral side incising gradually deeper whereas the dorsal side of the ciliate remains smooth. In conclusion of this process, the opisthe shifts its position. It is initially on the same axis as the proter; however, in subsequent stages it takes a position at an angle towards the proter (Fig. 1 A, B, C, D) and in the conclusive phase it shifts to the anterior pole at right margin of the anterior individual.

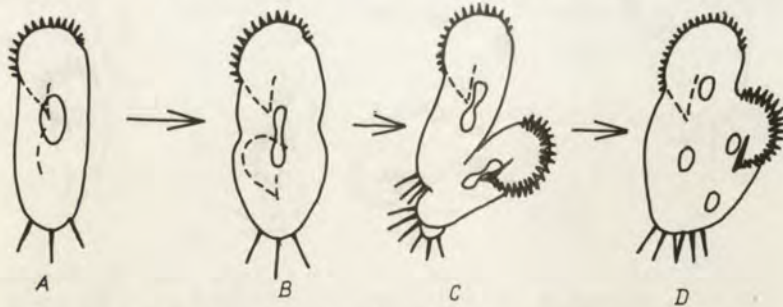


Fig. 1. Formation of the irregular flat doublet. A and B. *Stylonychia mytilus* in the course of cell division. C. The opisthe shifts its position at an angle towards the proter. In the conclusive phase it shifts to the anterior pole of the anterior individual. D. Irregular flat doublet

Thus, the irregular flat doublet consists of two individuals connected together: left-anterior and right-posterior — when looking to dorsal side of animal. The right-posterior individual remains always shifted towards the posterior part of the left-anterior individual. Disposition of both partners develops concurrently with the changes in the nuclear apparatus and in the

system of cirri. Those correspond to the normal division process. After their completion the reorganization may be repeated: nuclei and the system of cirri undergo the division cycle again. In reorganization of the doublet — similarly as in single *Stylonychia* — a vesicle with 3 caudal cirri is formed in right-posterior animal. It is much bigger than the normal one and during the resorption of cirri, a part of cytoplasm of the posterior individual becomes resorbed also. Therefore in the irregular doublet, the anterior individual is — as a rule — bigger than the posterior one.

Persistence and multiplication of doublets

Both forms of doublets described above have a permanent form. They multiply by transverse division, producing the next generation of doublets.

Together with divisions occurs the process of return to the single form in a certain number of doublets. In regular spherical doublets the return to single form occurs by gradual longitudinal separation which begins at anterior part of body and continues to posterior part till the definitive disruption (Totwen-Nowakowska 1964).

In the flat irregular doublets, the right-posterior individual shifts gradually to the posterior part of the left-anterior one and finally they both assume a disposition on one axis, being oriented in opposite directions. Sometimes instead the whole posterior individual, only its part with one Ma and AZM becomes separated, and the remainder is resorbed by the anterior individual (Fig. 2 A, B, C, D). The resorption of the whole individual with its AZM has never been stated.

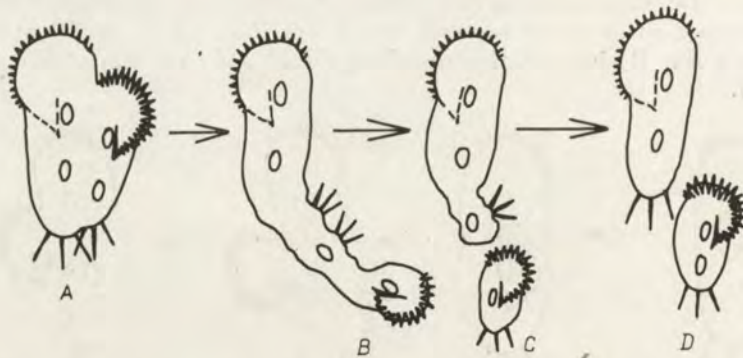


Fig. 2. Return of the irregular flat doublet to the single form. A. Irregular flat doublet. B. Fission of doublet. The right posterior individual shifts gradually to the posterior part of the left anterior one. Finally they both assume a disposition along the one axis being oriented in opposite direction. C. The definitive disruption of the doublet. D. Two single individuals after reorganisation: The bigger one derives from the left anterior individual, the smaller from the right posterior one

Doublets are very sensitive to underfeeding or starvation (even when it is shortlasting), to contamination of medium, to changes of temperature and to some factors which cannot be precised but exert an unfavorable influence upon ciliates. This is manifest in mass separation of doublets and their return to single forms. This process should be eliminated or at least

diminished after an accurate study of those factors to which the doublets are so sensitive. In normal conditions the division process compensates the number of doublets which returned to their single form, so it may be anticipated that an adequate culture method would enable to keep alive the double forms of both types for an unlimited period of time.

Discussion

The disturbances in cell division may proceed in different directions. This may be manifest in regression of division process, in return to the interphase stage, in deficiency of some cellular elements or structural systems and in their multiplication until forms arise constructed of two or of a higher number of individuals joint together into one organism.

Regression of division processes occurs — among others — in *Tetrahymena pyriformis* after thermic shocks (Frankel 1962), in *Stentor* (Tartar 1961) after inoculation of inhibitor and in *Urostyla grandis* (Fauré-Fremiet 1910) after merotomy.

Formation of doublets after conjugation was observed in *Euplotes* (Kimball 1941, Katashima 1953), in *Paramecium* (Hanson 1962), in *Stylonychia* (Totwen-Nowakowska 1964). Doublets were also obtained experimentally in *Urostyla grandis* (Fauré-Fremiet 1945), in *Leucophrys* (Fauré-Fremiet 1948) and in *Dileptus* (Doroszewski unpublished) after the action of weak solutions of formalin, in *Stentor* after the action of LiCl (Tartar 1961), in *Urostyla cristata* after operations (Jerka-Dziadosz unpublished). Cases are known when the same stimulus evokes different reactions, depending on the method of its application. As an example, the experiments of Frankel with thermic shocks may be cited. Single shocks caused regression of the initiated division processes in *Tetrahymena pyriformis* as well as resorption of just arising oral organelles (Frankel 1962), repeated application of this factor (Frankel 1965) led to formation of forms resembling the structure of *Paramecium* monsters (Balbiani 1891) with several assemblies of oral organelles.

In the case of *Stylonychia*, regression of division processes has not been stated. Dembowska 1925 performed operations on *Stylonychia* during cell division. Despite impairment of cell, the division was accomplished. Regression of division as a result of thermic shocks has never been observed either. The division disturbances of cell in *Stylonychia* are mostly expressed in formation of doublets. They arise spontaneously (Stein 1859, Totwen-Nowakowska 1964), or under the influence of chemical factors (alcohol) or operation (Tchang Tso-run 1964) and after the above described thermic shocks as well.

Doublets of both structural types — regular spherical and irregular flat represent permanent forms which reproduce and keep their feature for several months. The possibility of inducing doublets experimentally will enable to continue the investigations on their morphogenesis, regeneration and physiology compared with those processes in single forms of *Stylonychia*.

I wish to express my thanks to Dr M. Doroszewski for his help and guidance during the course of work and to Miss K. Golińska for executing illustrations of this article.

Summary

Thermic shock consisting in the rise of temperature from 20° to 33—34°C was applied to *Stylonychia mytilus* cultures. As result doublets appeared of two different types: 1. regular spherical doublets consisting of two individuals of a similar structure, joint together by their dorsal side, and 2. irregular flat doublets composed of individuals of uneven dimensions and shape, connected by their sides. Both forms of doublets possess a double normal nuclear apparatus. They reproduce by transversal cell division and may be maintained in culture for many generation, i.e. for several months.

STRESZCZENIE

Pod wpływem szoku termicznego, polegającego na ogrzewaniu środowiska z dzielącymi się *Stylonychia mytilus* o 13—14°C (przy temperaturze wyjściowej równej 20°C, podczas szoku temperatura osiągnęła 33—34°C) powstawały dublety o dwóch formach: regularnej sferycznej, zbudowane z dwóch wymoczków o podobnej budowie, zrosniętych ze sobą dorsalnie oraz nieregularnej płaskiej, utworzone z osobników o niejednakowych wymiarach i kształcie, połączonych ze sobą bocznie. Obie formy dubletów posiadały normalnie zbudowany podwójny aparat jądrowy. Dzieląc się poprzecznie dublety tworzyły przez szereg miesięcy następne pokolenia form podwójnych.

REFERENCES

- Balbiani E. G. 1891: Sur la formation des monstres doublets chez les infusoires. *J. Anat. Physiol.* 27, 169—196.
- Dembowska W. S. 1925: Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*. *Arch. Micr. Anat.* 104, 185—209.
- Dembowska W. S. 1938: Körperreorganisation von *Stylonychia* beim Hungern. *Arch. Protistenk.* 91, 89—105.
- Fauré-Fremiet E. 1910: La division de l'*Urostyla grandis*. Expériences de mérotomie. *Bull. Sci. Fr. Belg* 44, 215—219.
- 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.
- Frankel J. 1962: The effect of Heat, Cold and p-Fluorophenylalanine on Morphogenesis in synchronized *Tetrahymena pyriformis* GL. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg.* 33, 1—52.
- Frankel J. 1964: Cortical Morphogenesis and Synchronisation in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Exp. Cell. Res.* 35, 349—360.
- Frankel J. 1964: Morphogenesis and Division in Chains of *Tetrahymena pyriformis* GL. *J. Protozool.* 11, 514—526.
- Hanson E. D. 1962: Morphogenesis and regeneration structures in *Paramecium aurelia*: An analysis of intracellular development. *J. Exp. Zool.* 150, 45—66.

- Katashima R. 1953: Studies on *Euplotes*. II. Macronuclear reorganisation 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.
- Párducz B. 1952: Uj gyögrítő eljárás a volyikutatás és aktatos szalgasatában. *Ann. Muz. Nat. Hung.* 2, 5—12.
- Stein F. 1859: *Der Organismus der Infusionsthiere*. Leipzig.
- Totwen-Nowakowska I. 1964: Doublets in a clone of *Stylonychia mytilus* (O.F.M.) *Acta Protozool.* 2, 137—146.
- Tchang Tso-run N., Shi Xin-bai, Pang Yan-bin 1964: An Induced monster Ciliate transmitted through three hundred and more Generations. *Sci. Sin.* 13, 850—853.
- Tartar V. 1961: *The Biology of Stentor*. Pergamon Press.

Roman JANISCH

Regeneration of surface structures in *Paramecium caudatum*Regenerace povrchových struktur u *Paramecium caudatum*

The regeneration processes in *Protozoa* became the subject of studies almost a century ago. But only little attention was paid to the problem of reproduction of cortical structures during regeneration. Bütschli 1887—1889 recorded an interesting observation on *Prorodon* sp.: under the impact pressure, the entire pellicular layer together with the cilia separated from the body and were quickly replaced by regenerated structures. Balbiani 1893 have observed that fragments of *Loxodes rostrum* regenerate as a rule and the restoration of missing structures appeared to take place directly at the cut surface. Tartar's 1938 work on *Paramecium multimicronucleatum* indicates, in all instances the missing parts were formed also directly at the cut surface. Of recent authors, Ehret and de Haller 1963 explain the developmental origin of the pellicle system and cilia and ciliary corpuscles from preorganelles.

At present, it is not known in which way the restoration of new surface of *Paramecium* is provided after damage. Whether the new surface regenerates only from remained pellicula or whether it can also differentiate de novo — from cytoplasm. The present paper is an attempt to answer the above question and to show some mechanical properties of surface precipitation membrane covering the gap in pellicula.

Material and methods

Experiments were carried out on *Paramecium caudatum* clone cultivated on Vileneuve—Brachon's medium with wheat corn. The defect in pellicula of *Paramecium* was made in such a way that the front or back part (about 0.25 of cell) was removed (Fig. 1). For mechanical damage of the ciliate a tiny microscalpel made of splinter of a razor-blade was used. Sections were made free hand, using microscope magnification of about $\times 100$. Since we needed a great amount of fragments of ciliates, sectioning was made in the mass. About 100 ciliates were concentrated in a small drop of nutrient medium and the majority of the dissected by repeated cutting with the minute microscalpel. The fragments in good condition and desirable size were transferred by means of glass capillary.

Regenerating fragments were kept on slides with microchambers in drops of medium inoculated with *Aerobacter aerogenes*. At different times (1, 5 mi-

nutes, 1.00, 2.15, 3.00, 4.20, 4.50, 5.30, 5.40, 7.00, 24.00 hours) after cutting, the state of ciliary apparatus was examined by means of opal blue negative staining, following the method of Bresslau (Pl. I 1). In spite of the fact that more precise pictures could have been obtained by other staining or impregnating methods, the Bresslau's technique reveals the changes of surface during

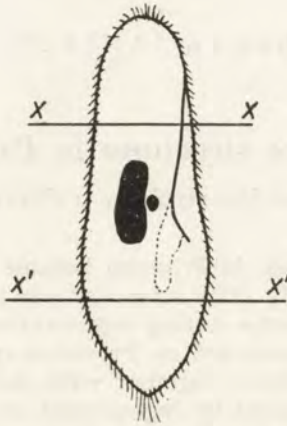


Fig. 1. Scheme indicating the levels of transections. X—X — frontal part is removed. X'—X' — rear part is removed

regeneration and the distribution of cilia of injured part of pellicula. We can obtain by this technique also some information about mechanical properties of regenerating surface. There is a disadvantage of Bresslau's method; we cannot study by this technique the changes progressing in the same object, because the staining causes the killing of fragments. The Bresslau's procedure was applied to some hundreds of fragments in each interval quoted above.

Results

An artificially obtained defect in the surface of *Paramecium caudatum* is within a short time covered with a surface precipitation membrane that prevents the outflowing of the cell content and its mixing with the external medium. When examining the appearance of fragments stained by Bresslau's method a few minutes after traumatization, a distinct difference was observed between normal undamaged pellicula and this newly formed surface precipitation membrane covering the cytoplasm in the place of lesion (Pl. I 2). The undamaged pellicula presents a regular pattern consisting of uniformly distributed membrane bounded alveoli from which the cilia protrude. The surface precipitation membrane is perceptible as a smooth unstructural surface, without interruption linked with the remaining healthy pellicula. Neither the regular sculpture which is characteristic of normal healthy pellicula, nor cilia were observed. We can see breaches in this membrane but they are artifacts and arise when the object is getting dry, sometimes even in the undamaged pellicula.

Table 1
Gradual decrease of convexity of the damaged surface

Time of regeneration	Absolute amount		%	
	unconvex surface	convex surface	unconvex surface	convex surface
1 min.	0	291	0	100.0
5 min.	0	187	0	100.0
1 hr.	45	557	7.5	92.5
2.15 hrs.	226	394	36.4	63.6
3.00 hrs.	344	480	41.7	58.3
4.20 hrs.	242	264	47.9	52.1
4.50 hrs.	218	200	52.2	47.8
5.50 hrs.	342	260	56.8	43.2
7.00 hrs.	504	334	60.1	39.9
24.00 hrs.	563	126	81.7	18.3

The conspicuous differences between the appearance of the fragments stained a few minutes after section and the appearance of the fragments regenerating for a longer time (5 hrs.) were found. The wound covered with surface precipitation membrane of fragments stained in a short time after cutting is usually considerably convex (Pl. I 2). When the object is getting dry in the course of staining an increase in the convexity of part covered with surface precipitation membrane is seen. On the other hand, the convexity covered with the surface precipitation membrane is considerably decreased

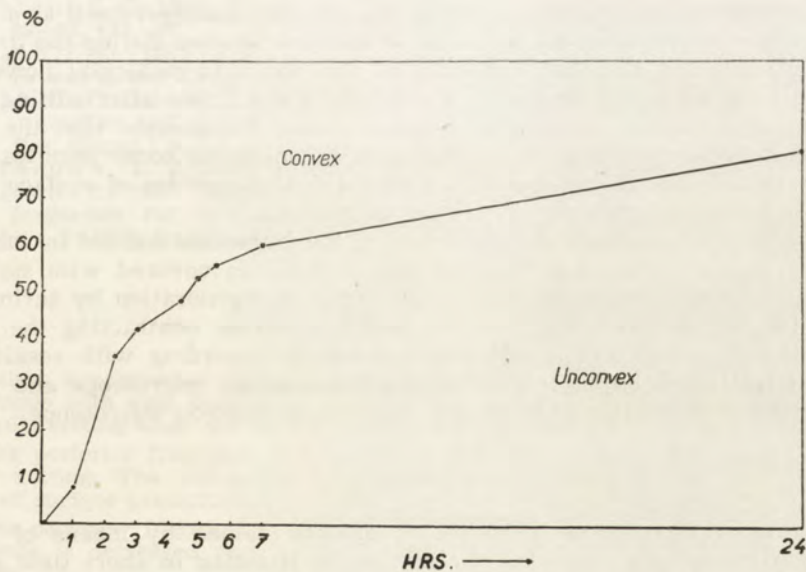


Fig. 2. The relation between the time of regeneration and percentage of fragments with convex and unconvex damaged part

in fragments regenerating for a longer time (5 hrs.) and in most cases is not pushed out the contour of the undamaged surface (Pl. II 3). The relation between the time of regeneration and percentual representation of both above mentioned types of fragments is shown in Table 1 and Fig. 2.

Sometimes, when fragments regenerated for some hours we were able to observe that the gap in pellicula covered with the surface precipitation membrane is considerably decreased and a mere scar remains (Pl. II 4). In these cases the pellicula is arranged in its characteristic manner. The rows of cilia are directed to the middle of the scar and pellicula is frilled around it.

Discussion

A great number of factors influence the shape of damaged part of *Paramecium* fragments, stained by Bresslau's technique with opal blue, especially its convexity. First of all the structural building of surface precipitation membrane, that is different from remaining pellicula, occurs. Its relatively big thickness — 50 m μ (Janisch 1965) indicates it is neither a mere physical membrane at the boundary-line of two phases, nor a lipoprotein unit membrane the thickness of which is 75 Å. According to Heilbrunn 1928 the surface precipitation reaction can perhaps play some role in its rising. We can also consider the eventual thickening of membrane by means of precipitation of material taken from the environment.

The different mechanical properties of surface precipitation membrane follow from its structural specificity. The shape of damaged part can depend on the changes of cytoplasm turgor, on contraction of remaining pellicula or on the changes of the osmotic state of the cell. When the wound in pellicula is made, the border of the lesion shrinks and in this way the cell content is compressed. If the newly formed surface is endowed with a less mechanical resistance, the increased pressure inside the cell may manifest itself as a convexity of the less resistant surface. The artificial conditions during the drying of object influence also the convexity of the lesion in pellicula; however, they are the same in the fragments stained for a short time after cutting and in those stained some hours after traumatization. We assume that the different shape of damaged part in fragments regenerating some minutes and some hours depends on changes in the mechanical properties of surface precipitation membrane covering the lesion in pellicula.

We suggest, on the basis of comparison of the fragments stained in various time intervals after cutting, that the gap in pellicula covered with surface precipitation membrane decreases in the course of regeneration by shrinking and shifting of the remaining healthy pellicula and by contracting the borders of the wound. These conclusions are also in accordance with results of our investigation of living fragments in phase-contrast microscope and with the results of the studies of ultra-thin sections in electron microscope.

Summary

A distinct difference between the fragments stained by means of opal blue negative staining following the method of Bresslau in short time after section and the fragments stained some hours after cutting is seen. For a short time after traumatization, the damaged part of body, covered with the surface

precipitation membrane, is convex. When the fragments regenerate longer than 5 hours the area covered with surface precipitation membrane usually is not pushed out the contour of the remaining surface. It is often decreased to mere scar in pellicula. This decrease of convexity can be explained as the result of changes of mechanical properties of surface precipitation membrane covering the gap in pellicula.

Our findings support the opinion that the healing of the wound in pellicula of *Paramecium caudatum* is achieved by shifting and shrinking of the remaining pellicula.

SOUHRN

Po obarvení fragmentů *Paramecium caudatum* opálovou modří dle Bresslauea v různých časových intervalech po mikrurgickém zákroku jsou patrný výrazné rozdíly ve vzhledu fragmentů barvených krátce (několik min.) po sekci a fragmentů regenerujících déle než 5 hodin. U fragmentů obarvených ihned po sekci je defekt pokrytý povrchovou precipitační membránou ve většině případů značně vyklenutý. Naproti tomu u fragmentů regenerujících déle než 5 hod. nepřesahuje defekt nivo ostatního povrchu a často bývá zmenšen na pouhou jizvu v pelikule.

Postupnou změnu vzhledu defektu v průběhu regenerace vysvětlujeme během regenerace měnicími se mechanickými vlastnostmi membrány pokrývající defekt.

Naše nálezy podporují domněnku, že k zacelování rány u *Paramecium caudatum* dochází přesouváním a koncentrickým zaškrcováním zbývající zachovalé pellikuly.

REFERENCES

- Balbani E. G. 1893: Mérotomies des infusoires ciliés. *Ann. Micrograph.* 5, 1—25, 49—84, 113—37.
- Bütschli O. 1887—1889: *Protozoa. Infusoria* und System der *Radiolaria*. In: Bronn, *Klass. Ordn. Thier-Reichs*, I (Abt. 3), 1098—2035.
- Ehret C. F. and de Haller G. 1963: Origin, development, and maturation of organelles and organelle systems of the cell surface in *Paramecium*. *J. Ultrastr. Res.* (Suppl.) 6, 1—42.
- Heilbrunn L. V. 1928: *The colloid chemistry or protoplasm*. Berlin.
- Janisch R. 1965: Regeneration of *Protozoa*. I. Preparation and cytology of fragments. *Fol. Biol.* (in press).
- Tartar V. 1938: Regeneration in genus *Paramecium*. *Dissertation* (Yale University).

EXPLANATION OF PLATES I—II

- 1: Ciliary apparatus of *Paramecium caudatum* after negative staining by Breslau's technique with opal blue. The region of vestibulum and the artificial breaches in pellicula arising when the preparation is getting dry, are clearly seen ($\times 560$)
- 2: The posterior fragment of *P. caudatum* stained with Breslau's method, 1 min. after cutting. The difference is seen between undamaged pellicula and newly formed surface precipitation membrane ($\times 560$)
- 3: The posterior fragment of *P. caudatum* stained 1 hrs. after cutting. The gap in pellicula is decreased and does not overpass the contour of undamaged surface ($\times 560$)
- 4: The scar which remains after the wound in pellicula. The fragment stained 7 hrs. after section ($\times 560$)

...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...

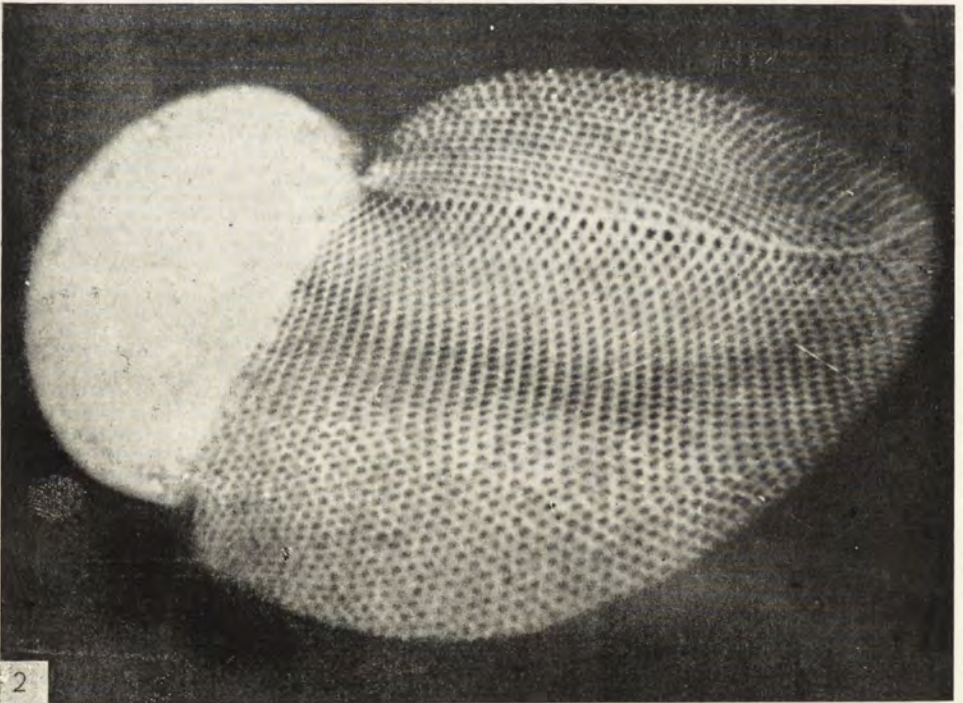
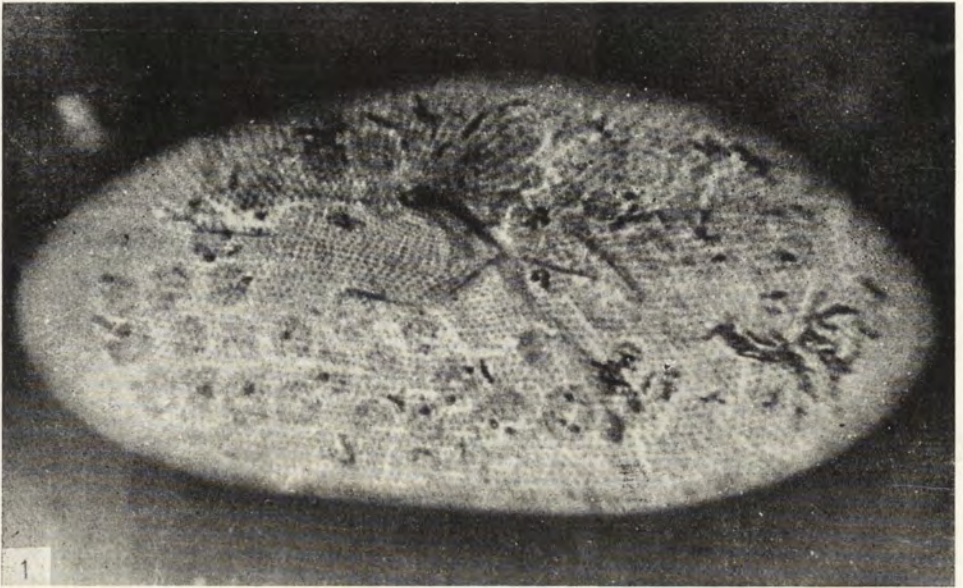
...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...

...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...

...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...

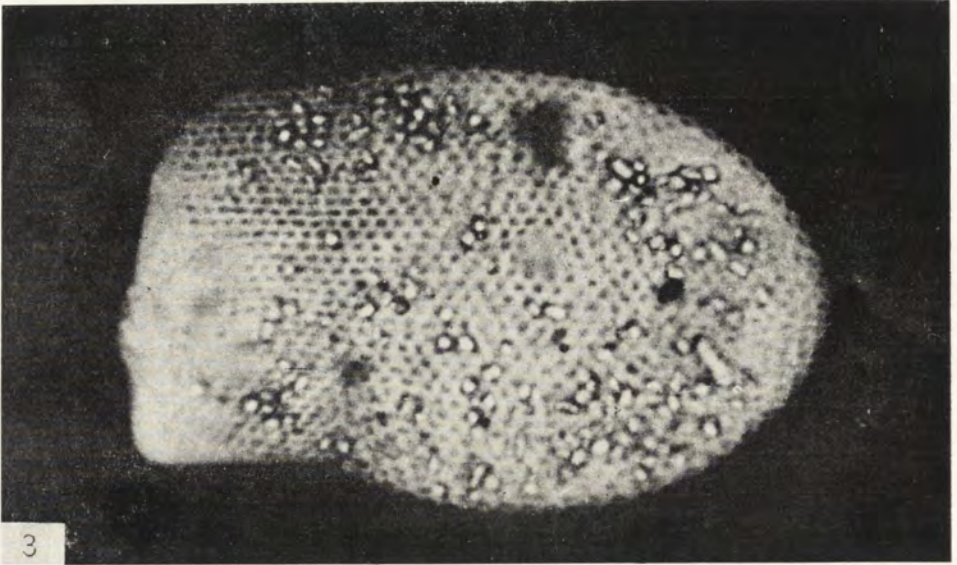
...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...

...the ... of ...
 ...the ... of ...
 ...the ... of ...



R. Janisch

auctor phot.



Всесоюзный научно-исследовательский институт по болезням птиц,
Ленинград М-6, Московский пр. 99

All-union Research Institute of Birds Diseases, Leningrad M-6, Moskovskij pr. 99

М. В. КРЫЛОВ

M. V. KRYLOV

Развитие *Nuttallia tadzhikistanica* Krylov et Zanina, 1962 в клеще *Hyalomma anatolicum*

The development of *Nuttallia tadzhikistanica*
Krylov et Zanina, 1962 in the tick *Hyalomma anatolicum*

Развитие различных пироплазмид в клещах изучено еще не достаточно полно. Имеются данные по развитию нескольких видов *Piroplasma* (*P. bigeminum*, *P. canis*, *P. caballi*) и *Babesiella bovis* (= *divergens*). Специальных исследований по развитию *Nuttallia* в клещах нет. Имеется лишь короткое упоминание Цапруна 1957 о том, что *N. equi* размножается в клещах так же, как и *P. caballi*. До настоящего времени идут споры о том, развиваются ли пироплазмы в клещах с участием полового процесса, или же в их цикле развития этот процесс отсутствует и происходит только агамное размножение паразита. Одни исследователи (Christophers 1907, Марциновский и Белицер 1907, 1908, Denis 1932, Петров 1938, 1939, Цапун 1952, 1954, 1957, Riek 1964) считают, что в цикле развития имеется половой процесс в виде изогамной или анизогамной копуляции. Однако никто из исследователей не приводит убедительных доказательств наличия этого процесса. Другие исследователи (Koch 1906, Grawley 1915, Ли 1956, 1957) не приводят фактов наличия полового процесса, но и не отрицают возможность его существования. Третья группа исследователей (Regendanz u. Reichenow 1933, Reichenow, 1935, Regendanz 1936, Shortt 1936, Полянский и Хейсин 1959, Хейсин и Муратов 1959, Муратов и Хейсин 1959) отрицают существование полового процесса у пироплазмид, так как не находят каких-либо стадий развития, которые можно бы принять за половые. Они считают, что пироплазмы размножаются только агамным путем.

Совершенно ясно, что для того, чтобы приблизиться к решению этого вопроса, нужны дополнительные исследования на новых объектах.

В 1963 году нами (Крылов и Занина) был описан новый вид *Nuttallia tadzhikistanica* из краснохвостой песчанки (*Meriones erythrourus*). Было выяснено, что переносчиком нутталлии является клещ *Hyalomma anatolicum* (Крылов 1963). Описанный вид нутталлий оказался весьма удобным для изучения, так как позвоночный хозяин легко разводится в лабораторных условиях, а клещи культивируются в течение года и относительно легко заражают-

ся на позвоночном хозяине. В данной работе приводятся некоторые результаты исследования развития *Nuttallia tadjhikistanica* в клещах *Hyalomma anatolicum*.

Материал и метод

Песчанки для опытов выращивались в лабораторных условиях. Клещи культивировались при 25—23°C. Личинки клещей питались на спленэктомированных песчанках с большим количеством паразитов в периферической крови. Только при сильной паразитарной реакции удавалось заразить большинство личинок клеща. Однако не у всех клещей, питавшихся кровью сильно зараженного хозяина, при микроскопии можно было видеть множество паразитов. В некоторых клещах паразитов удавалось найти с большим трудом, так как их было ничтожное количество. Иногда нутталлии были многочисленны в первые часы после отпадения личинки от песчанки, а затем быстро исчезали, тогда как в других клещах большое количество паразитов обнаруживалось даже через 24 часа после отпадения от хозяина.

Изучение нутталлий в клещах производилось на срезах и в мазках. Для гистологических препаратов клещи фиксировались жидкостью Ценкера с формалином. Препараты окрашивались эозин-азуром II по Максиму и гематоксилин-эозином. Мазки приготавливались путем раздавливания целого клеща, а также из гемолимфы и слюнных желез. Окраска производилась по Романовскому-Гимза.

Личинки клещей исследовались полунапитавшимися и затем каждый час на протяжении 6 часов после отпадения. Далее исследование продолжалось каждые 24 часа до момента линьки. Всего было исследовано 9 серий личинок, в количестве около 1000, кормившихся на разных песчанках в разное время года. Нимфы, перелинявшие из зараженных личинок, исследовались голодными и питавшимися на стерильных в отношении нутталлиоза песчанках ежедневно в течение от 1 до 5 суток. Такие исследования повторялись 4 раза. Всего было исследовано 350 нимф. Помимо этого были сделаны препараты из 100 голодных нимф.

Для контроля приготавливались и изучались препараты из клещей, выведенных в лаборатории и питавшихся на стерильных в отношении пироплазмид песчанках, кроликах и белых мышах.

Параллельно с изучением морфологии нутталлий проводилось исследование инвазионной способности разных стадий развития этих паразитов. Для этого суспензия, приготовленная из 20—40 зараженных нутталлиями, только что отпавших личинок и через 24, 72, 144 и 216 часов после отпадения, была введена подкожно десяти песчанкам. С такой же целью растертые с физиологическим раствором нимфы, выведенные из личинок, зараженных нутталлиями, питавшиеся на кроликах в течение 1, 2, 3, 4 и 5 суток, были введены под кожу 6 стерильным спленэктомированным и 6 стерильным интактным песчанкам. Каждой песчанке вводилось подкожно от 4 до 22 растертых нимф. Во всех опытах мазки крови песчанок исследовались в течение 30—40 дней.

Стадии развития *Nuttallia tadjhikistanica* в личинках

В препаратах, приготовленных из неотпавших полунапитавшихся личинок (на 2-ой день после начала кровососания) или из сытых личинок, через 1—2 часа после отпадения, наряду с паразитами, включенным в эритроциты песчанки,

встречалось много нутталлий, уже вышедших из эритроцитов. Этот процесс осуществляется путем амебоидного движения, что наблюдалось при исследовании свежего содержимого кишечника клещей с фазовым контрастом.

В эритроцитах было видно много палочковидных, круглых, грушевидных и амбовидных нутталлий. Нередко встречались делящиеся формы в виде



Рис. 1. Одноядерные формы *N. tadjhikistanica*, вышедшие из эритроцитов в кишечнике личинки клеща *H. anatolicum*, и встречающиеся в течение 24 часов после начала кровососания
Fig. 1. Mononuclear forms of *N. tadjhikistanica* which have left the erythrocytes if the intestine of tick larvae *H. anatolicum* and occur during 24 hrs. after onset of blood sucking

„мальтийского креста”. Вне эритроцитов в содержимом кишечника можно видеть многочисленные одноядерные стадии развития нутталлий, весьма сходные с внутриэритроцитарными формами. Длина таких палочковидных или амбовидных стадий варьирует от 1,5 до 5,8 μ и ширина от 1 до 3,6 μ (рис. 1). Наряду с такими одноядерными стадиями, которые, вероятно, недавно покинули эритроциты, можно видеть дву-, трех- и четырехядерных нутталлий (рис. 2, 3). Четырехядерные имеют несколько большую величину, чем одноядерные. Длина их колеблется от 2 до 6 μ и ширина от 1,5 до 3,5 μ . Нередко встречаются почти округлые или неправильной формы 4-ядерные особи диаметром 4—5 μ . Весьма разнообразны двуядерные стадии (рис. 3). На них было обращено особое внимание, так как они могут быть определены либо как стадии деления, либо как стадии копуляции. Чаще всего встречались амбовидные формы с двумя ядрами, иногда наблюдались вытянутые, сигаровидные или овальные особи. Следует отметить, что форма двуядерных стадий весьма разнообразна, что свидетельствует об их значительной подвижности. Ядра у двуядерных



Рис. 2. Формы *N. tadjhikistanica*, размножающиеся в кишечнике личинки клеща *H. anatolicum*. 2—24 часа после начала кровососания

Fig. 2. Forms of *N. tadjhikistanica* multiplying in the intestine of tick larvae *H. anatolicum*, 2—24 hrs. after onset of blood sucking

стадий имеют одинаковые размеры и располагаются либо рядом друг с другом, либо, в продолговатых формах, на противоположных полюсах. Ядра одноядерных и двуядерных стадий имеют одинаковые размеры. Среди двуядерных особей встречаются формы с перетяжкой между ядрами и признаками перешнуровки тела. Форма тела четырехядерных стадий очень сходна с дву-

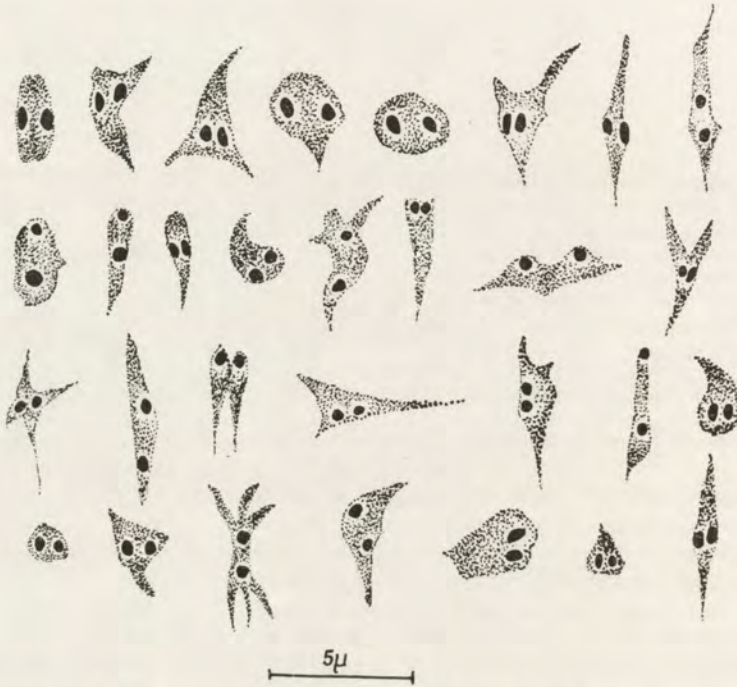


Рис. 3. Двуядерные формы *N. tadjikistanica* в содержимом кишечника личинки клеща *H. anatolicum*. 2—24 часа после начала кровососания

Fig. 3. Binuclear forms of *N. tadjikistanica* in the content of intestine of the tick larvae *H. anatolicum* 2—24 hrs. after onset of blood sucking

ядерными, но среди них чаще встречаются овальные или неправильной формы особи. Наличие трехядерных особей аналогичной формы и размеров свидетельствует о несинхронности делений ядер.

Такие стадии развития нутталлий были найдены и на протяжении последующих 24 часов. Интересно, что через сутки после отпадения личинок от песчанки в их кишечнике можно встретить интактные эритроциты, в которых остаются нутталлии, не претерпевающие развития. Возможно, что в дальнейшем они дегенерируют.

Наличие в кишечнике личинок через 24 часа одноядерных, дву-, трех- и четырехядерных нутталлий говорит о том, что в это время происходит размножение паразита.

В гемолимфе только что отпавших личинок так же, как и через 24 часа, встречаются стадии множественного размножения нутталлий (рис. 4). Довольно часто можно видеть разные стадии развития нутталлий. Они овальной, округ-

лой или неправильной формы и несколько напоминают небольших плазмодиев. Число ядер у них варьирует от 6 до нескольких десятков. Наряду с многоядерными паразитами встречаются группы тесно расположенных овальных или грушевидных трофозоитов, объединенных одной мембраной. Это сегмен-



Рис. 4. Размножение *N. tadjikistanica* множественным делением в гемоцитах и гемолимфе личинки клеща *H. anatolicum*. 4—24 часа после начала кровососания

Fig. 4. Reproduction of *N. tadjikistanica* by multiple division in haemocytes and in haemolymph of the tick larva *H. anatolicum* 4—24 hrs. after onset of blood sucking

тированные многоядерные плазмодии. Обычно встречались группы по 16—32 трофозоида. Иногда от многоядерного плазмодия отпочковывается несколько мелких трофозоитов. Сегментированные плазмодии достигают 24—28μ в диаметре. Образовавшиеся трофозоиты имеют в длину 1,5—2,0μ и в ширину 1—1,5μ. Многоядерные стадии встречаются свободно в гемолимфе или же их можно встретить в гемоцитах¹, где они занимают почти всю его цитоплазму (рис. 4). Повидимому, такие внутриклеточные нутталлии представляют собой нормальную стадию развития, аналогичную той, которая встречается в гемолимфе. Иногда в гемоцитах встречались слабоокрашенные многоядерные паразиты. Возможно, что это были фагоцитированные гемоцитом нутталлии, которые в дальнейшем погибают, не претерпев развития.

Через 48 часов после отпадения личинки, нутталлий становится меньше, чем их было раньше. Многоядерные стадии встречаются сравнительно редко. Так же трудно найти и ранние стадии размножения паразита. Многоядерные стадии продолжают встречаться до 72 часов после отпадения личинок от песчанки. Вероятно, размножение паразита не прекращается в течение нескольких суток, но его интенсивность резко падает. Об этом можно судить по малому количеству делящихся форм через 72—96 часов после отпадения личинок.

¹ О форменных элементах гемолимфы клещей написано у Цвиленовой 1961.

Наличие в личинках одномоментно различных стадий развития нутталлий связано, повидимому, с тем, что паразиты неодновременно попадают в кишечник клеща при кровососании, которое длится примерно 60—72 часа.

Незадолго до линьки (через 220—240 часов после отпадения личинок) отыскать нутталлий в личинках клеща становится очень трудно. В это время в гемолимфе встречаются одноядерные овальные или круглые особи длиной 2,4—7,2 μ и шириной 1,5—6 μ . По форме они похожи на трофозоитов, которые образуются после множественного деления, но имеют несколько большие размеры (рис. 5; А-Е). Повидимому, они образуются путем роста мелких особей. Стадий деления этих крупных трофозоитов обнаружить не удалось. В период линьки личинки они сохраняются в ее теле как бы в состоянии покоя (рис. 7; h). Точно такие же стадии развития нутталлий обнаруживаются и в голодных нимфах.

Развитие в нимфах

В голодных нимфах встречаются сравнительно редко одноядерные нутталлии округлой или овальной формы размером 2,4—7,2 \times 1,2—6 μ (рис. 5; А-Е). Все паразиты были найдены в гемолимфе, тогда как с слюнных желез они не обнаруживались.

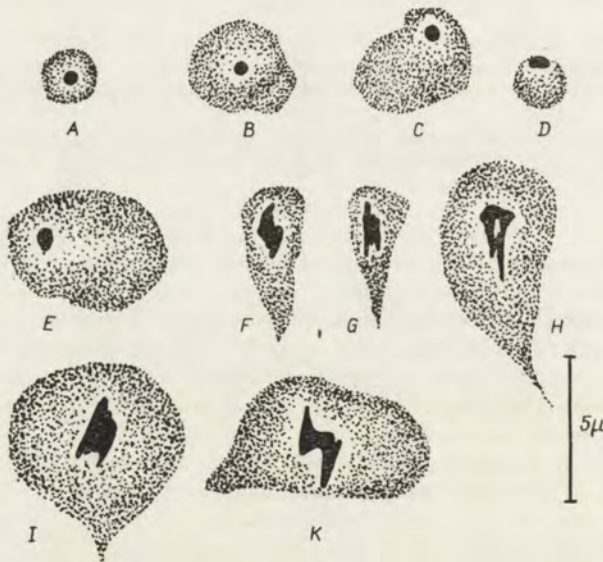


Рис. 5. А—Е — „покоящиеся” офрмы *N. tadjikistanica* в гемолимфе личинок через 96—240 часов после окончания питания и в гемолимфе голодных нимф клеща *H. anatolicum*; F—К — формы, встречающиеся в гемолимфе нимф через 24 часа после начала питания клеща

Fig. 5. A — E “resting” forms of *N. tadjikistanica* in haemolymph of larvae 96—240 hrs. after completion of feeding, and in haemolymph of starving nymphs of the tick *H. anatolicum*; F — K forms occurring in the haemolymph of nymphs 24 hrs. after onset of feeding the tick

Через 24 часа после начала питания нимф в их гемолимфе начинают встречаться более часто, чем ранее, неправильно овальной или округлой формы особи нутталлий (рис. 5; F-K) длиной 2—8 μ и шириной 1—7 μ . Между мелкими и крупными формами имеются переходные, что позволяет предположить о росте мелких нутталлий. Вероятно, в это время происходит и деление более крупных особей, так как количество паразитов увеличивается по сравнению с тем, что имело место в голодных нимфах.

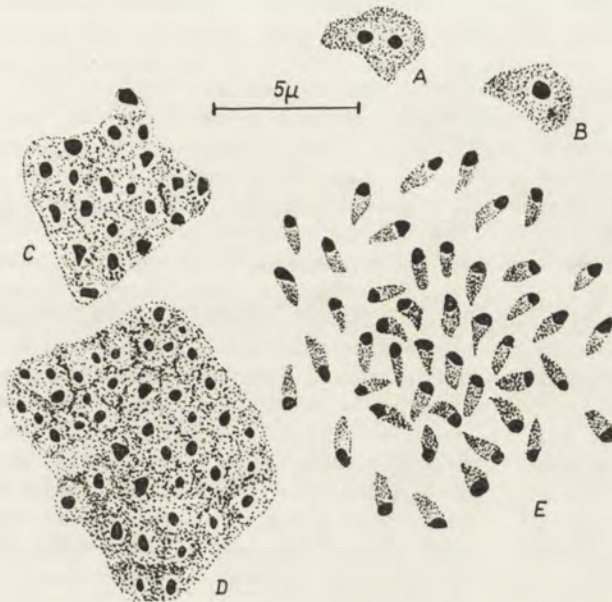


Рис. 6. Формы *N. tadzhikistanica*, развивающиеся в слюнных железах нимф при их питании: А—D — неинвазионные для позвоночного хозяина формы; Е — формы, инвазирующие позвоночного хозяина

Fig. 6. Forms of *N. tadzhikistanica* which develop in the salivary glands of the nymphs when fed: А — D forms not invasive for the vertebrate host; Е — invasive forms

Через 48 часов после начала питания нимф стадии развития нутталлий были впервые обнаружены в слюнных железах. Это были одноядерные стадии неправильно овальной формы размером 2,4—3,6 × 1,2—2,4 μ (рис. 6; В). Через 72 часа в слюнных железах встречались уже многоядерные плазмодии (рис. 6; А, С, D), часто заполняющие собой всю цитоплазму клеток слюнной железы. Количество ядер достигало нескольких сот. Через 96 часов были видны многоядерные плазмодии, распавшиеся на большое число грушевидных или палочковидных трофозоитов длиной 1,2—3 и шириной 0,6—1,4 μ (рис. 6; Е). Ядро у каждого трофозоида обычно располагается полярно, ближе к широкому концу. тие внеклеточно, в просвете кишечника. Оно осуществляется в первые часы

Инвазионность для песчанок стадий развития
нутталлий из личинок и нимф

Личинки клещей были накормлены на сильно зараженных песчанках. Затем свежеотпавшие личинки и через 24, 72, 144 и 216 часов после кормления были использованы для заражения стерильных в отношении нутталлиоза песчанок. В каждом опыте было взято по 20—40 личинок. Они растирались с физиологическим раствором и такая суспензия вводилась песчанкам подкожно. Суспензия из свежеотпавших личинок была введена 5 песчанкам. Из них две заболели нутталлиозом. 21 песчанке была введена суспензия из личинок, отпавших соответственно через 24—216 часов. Ни одна песчанка не заразилась. В контрольных личинках, исследованных микроскопически, были обнаружены стадии развития нутталлий, описанные выше.

Следует отметить интересный факт неудачи заражения песчанок суспензией личинок, взятых через 24 часа после отпадения. В этот период в личинках еще сохраняется много интактных эритроцитов с включенными в них паразитами. Повидимому, они теряют способность к развитию в позвоночном хозяине, а возможно, что они вообще нежизнеспособны.

Для того, чтобы выяснить, на какой день после начала кровососания нимф, последние способны заразить позвоночного хозяина, было поставлено несколько серий опытов. Из нимф, питавшихся на кроликах от 1 до 5 дней, были приготовлены суспензии, которые вводили подкожно песчанкам. Всего для заражения было использовано 12 интактных и спленэктомированных песчанок. Суспензия из 15—20 нимф, питавшихся 24, 48 и 72 часа была соответственно введена 8 песчанкам. Ни одна из них не заразилась. Суспензия из 5, 10 и 14 нимф, питавшихся 96 часов, была введена соответственно 3 песчанкам. Все они заразились нутталлиозом с характерной паразитарной реакцией на 20—25 день. Следовательно, только на 4 день после начала кровососания нимфы становятся инвазионными. Именно на 96 часу в слюнных железах образуются многочисленные мелкие трофозоиты, которые и являются инвазионной стадией развития нутталлий.

Обсуждение

На основании исследования нутталлий в личинках и нимфах *Hyalomma anatolicum* в разные сроки после окончания ими кровососания можно представить следующим образом развитие этого паразита (рис. 7). Внутриэритроцитарные стадии развития паразита, попадая в кишечник клеща при кровососании, сравнительно быстро покидают эритроциты и продолжают свое разви-

Fig. 7. Scheme of the development cycle of *Nuttallia tadzhikistanica*. I. Development in the vertebrate host: a — development in erythrocytes, b — stages of multiple division in blood plasma; II. Development in the invertebrate host (L — larva of the tick): d — forms which left the erythrocytes of the vertebrate host, e — agamic forms dividing into two, occasionally into four in the intestine of tick, f — agamic forms of multiple division in haematocytes, g — agamic forms of multiple division in haemolymph, h — "resting" forms in haemolymph of larvae; III. Development in the invertebrate host (N — nymph of the tick) h — "resting" forms in haemolymph of starving nymphs, i — agamic forms developing in haemolymph, 24 hrs. after onset of feeding the tick, k — agamic forms of multiple division non-invasive for the vertebrate hosts in the salivary glands l — trophozoits in salivary glands of the tick, non-invasive for the vertebrate host

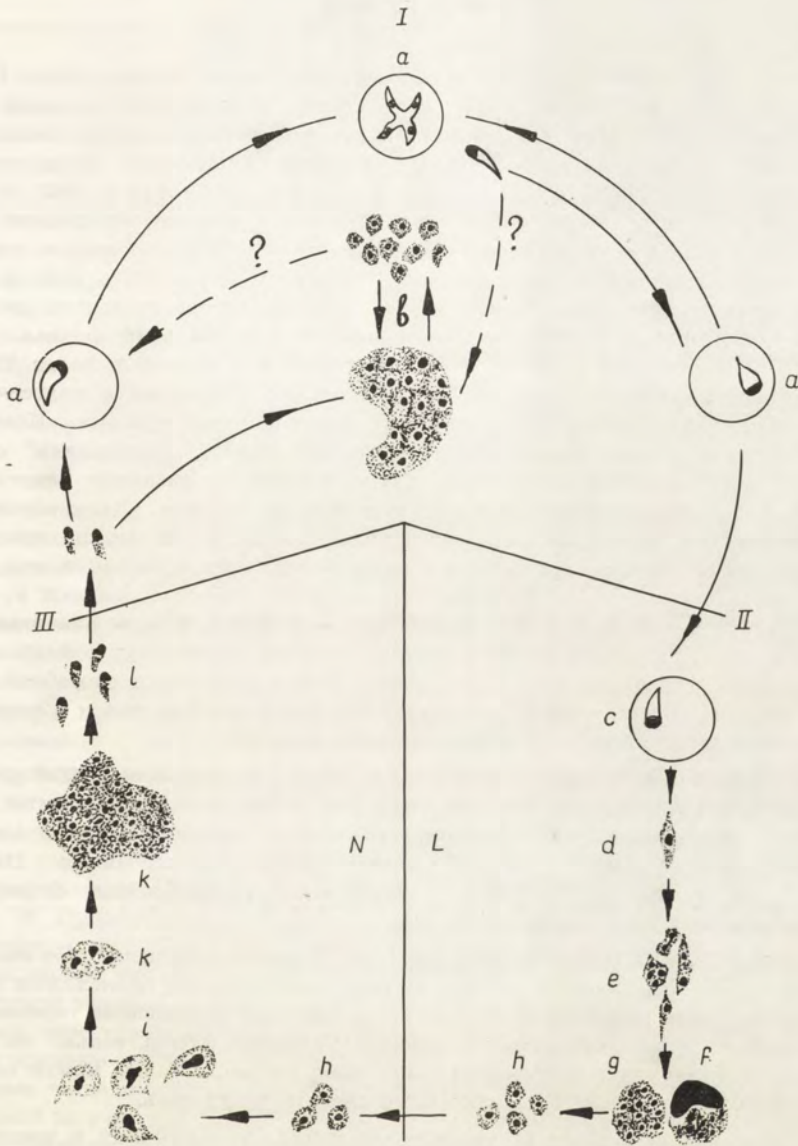


Рис. 7. Схема цикла развития *Nuttallia tadjikistanica*. I. Развитие в позвоночном хозяине: а — развитие в эритроцитах, б — стадии множественного деления в плазме крови; II. Развитие в беспозвоночном хозяине (L — личинка клеща): d — формы, вышедшие из эритроцитов позвоночного хозяина, e — агамные формы, делящиеся на два, реже на четыре в кишечнике клеща, f — агамные формы множественного деления в гемоцитах, g — агамные формы множественного деления в гемолимфе, h — „покоящиеся” формы в гемолимфе личинок; III. Развитие в беспозвоночном хозяине (N — нимфы клеща); h — „покоящиеся” формы в гемолимфе голодных нимф, i — агамные формы, развивающиеся в гемолимфе через 24 часа после начала питания клеща, k — агамные неинвазионные для позвоночного хозяина формы множественного деления в слюнных железах, l — инвазионные для позвоночного хозяина трофозоиты в слюнных железах клеща.

после начала кровососания путем деления на две или на четыре особи. В эпителии кишечника не удалось обнаружить стадии размножения паразита. Этим нутталлии отличаются от *P. bigeminum* и *P. canis*, которые претерпевают множественное деление в эпителиальных клетках кишечника (Regendan z u. Reichenow 1933, Муратов и Хейсин 1959, Riek 1964). Одноядерные трофозоиты, образовавшиеся в результате деления, проникают в полость тела клеща в течение первых суток после начала кровососания, где осуществляется их множественное деление. Это может происходить либо в гемолимфе, либо в гемоцитах. При этом делении образуется несколько десятков мелких одноядерных трофозоитов сигаровидной или овальной формы. Повидимому, множественное деление может повторяться. Примерно через 72 часа после отпадения личинки от песчанки количество нутталлий в полости тела клеща резко уменьшается по сравнению с более ранними сроками. Незадолго до линьки в личинках можно найти немногочисленные „покоящиеся” стадии овальной или амёбовидной формы. Такие же стадии развития встречаются и в голодных нимфах, развившихся из зараженных личинок. Дальнейшее развитие нутталлий в нимфах начинается только тогда, когда нимфа приступит к кровососанию. Число трофозоитов в полости тела клеща увеличивается и через 48 часов после начала кровососания нутталлии обнаруживаются в слюнных железах. Здесь происходит множественное деление, которое заканчивается через 96 часов образованием большого количества мелких грушевидных или палочковидных трофозоитов. В это время нимфа становится способной заражать песчанок. Все другие стадии нутталлий, как в нимфах, так и в личинках, не являются инвазионными для позвоночного хозяина.

Микроскопический анализ личинок и нимф, выведенных в лаборатории и питавшихся на кроликах, показал, что у них не встречаются паразиты, которые всегда обнаруживались в личинках и нимфах, заведомо зараженных нутталлиями, при кормлении первых на инвазированных песчанках. Поэтому имеются все основания считать описанные выше разнообразные формы как принадлежащие к *Nuttallia tadzhikistanica*.

Имеет ли место в цикле развития нутталлий половой процесс? По аналогии с *Haemosporidia*, образование гамет и их копуляция должны происходить в первые часы после попадания паразитов вместе с кровью в кишечник переносчика. Следовательно, можно ожидать, что именно у личинок клеща, только что насосавшихся крови, будут обнаружены какие-либо стадии, которые можно определить как гаметы и зиготы. Однако этого сделать не удалось.

На протяжении первых 24 часов после начала кровососания в кишечнике встречались неоднократно двуядерные стадии развития, которые можно было трактовать либо как стадии деления, либо как стадии копуляции амёбовидных изогамет. В пользу первого предположения говорят следующие факты. У двуядерных стадий часто можно заметить перетяжку как между ядрами, так и на поверхности тела. Кроме двуядерных, в то же время встречаются трех- и четырехядерные стадии развития примерно той же величины, что и двуядерные (рис. 2, 3). Поэтому можно думать, что двуядерные стадии не только делятся сами, но и могут представлять собой переходные стадии к четырехядерным. Последние могут распадаться на 4 трофозоида, которые снова растут и становятся четырехядерными, проходя при этом стадию двуядерности. Длительное существование в кишечнике таких стадий говорит скорее о том, что это делящиеся, а не копулирующие формы. Если представить себе, что двуядерные

стадии это соединившиеся при копуляции гаметы, то странным является весьма разнообразное взаимное положение ядер. При копуляции ядра должны были бы лежать обычно близко друг к другу, а не на противоположных концах тела, как это очень часто наблюдается у двуядерных стадий в кишечнике личинок клещей. Ясной картины слияния ядер не обнаружено. Ни разу не было найдено также и соединившихся одноядерных стадий, как это могло бы быть при их копуляции. Размеры ядер у одноядерных стадий, а также у двуядерных и четырехядерных оказались идентичными. Каких-либо стадий с более крупными ядрами, как этого следовало бы ожидать у „зигот“, обнаружено не было. Размеры одноядерных внеэритроцитарных стадий вполне совпадают с таковыми эритроцитарных стадий развития. Следовательно, можно считать, что внеэритроцитарные одноядерные стадии развития образовались из эритроцитарных, дву- и четырехядерные образовались из них путем агамного размножения. Множественное деление начинается в кишечнике личинки уже в первые 24 часа после отпадения. Если предположить, что множественное деление это „спорогония“, то странным является факт повторности этого процесса, не свойственной типичной „спорогонии“.

Таким образом, найденные стадии развития нутталлий в личинках клеща не могут быть интерпретированы как стадии полового процесса. Никто из исследователей других пироплазмид не привел прямых наблюдений полового процесса. Наиболее новые данные Riek 1964 об анизогамной копуляции у *Babesia bigemina* в клеще *Boophilus microplus* также являются спорными. Сам Riek не уверен в правильности своей трактовки обнаруженных им стадий развития пироплазмы.

Ряд исследователей считает (Петров 1938, 1939, Цапрун 1957, Riek 1964), что одним из доказательств наличия у пироплазмид полового процесса является факт гибели большого количества паразитов в организме клеща. По мнению этих исследователей погибают агамонты, а гаметоциты, попавшие с кровью позвоночного хозяина, сохраняются и претерпевают дальнейшее развитие. В *Hyalomma anatolicum* также происходит гибель нутталлий, так как постепенно количество паразитов уменьшается. Однако, если гибель и происходит, то она не наблюдается в начальный период развития нутталлий в клещах. Резкое уменьшение количества паразитов в личинках наблюдается обычно не ранее, чем через 48 часов после отпадения личинки от песчанки. За этот период времени происходит неоднократное множественное деление в гемолимфе. В первые часы после отпадения происходит увеличение количества паразитов в личинке за счет их размножения. В это время много дву- и четырехядерных стадий. Повидимому, в клеще погибают разные стадии размножения паразита в разное время, причем этот процесс, вероятно, обусловлен развитием защитных механизмов в организме клещей. Действительно, в одних личинках гибель нутталлий происходит в первые же часы после попадания их с кровью хозяина, в других этот процесс затягивается на более длительный срок. Если бы погибали, как считают некоторые исследователи, только агамонты, попавшие с кровью то этот процесс не мог бы нарастать количественно во времени, как это наблюдается у нутталлий в личинках *H. anatolicum*.

Таким образом, не имея каких-либо убедительных данных о наличии полового процесса, можно считать, что у нутталлий развитие в клещах происходит так же, как и у пироплазм, только агамным путем. У последних имеет место трансвариальная передача паразита, у нутталлий этого нет. Поэтому в их цикле развития имеются существенные различия. Для пироплазм характерно весьма

интенсивное размножение паразита, усиливающееся со временем в сытой самке. При этом образовывалась булавовидная стадия, обеспечивающая проникновение в яйца клещей. У нутталлий не наблюдается сильного накопления паразита в личинках, так как и при малом количестве паразитов в нимфе сможет образоваться необходимо число инвазионных стадий развития в слюнных железах. Отсутствует у нутталлий и булавовидная стадия, что, повидимому, ограничивает возможность трансовариальной передачи.

В заключение считаю своим приятным долгом выразить благодарность проф. Е. М. Хейсину за просмотр моих препаратов.

Резюме

Изучалось развитие *Nuttallia tadzhikistanica* в личинках и нимфах *Hyalomma anatolicum*. В первые часы после начала кровососания личинок на сильно зараженных песчанках (*Meryones erythrourus*) нутталлии выходят из эритроцитов, попавших в кишечник клеща и размножаются делением на две или четыре особи. Через 2—4 часа одноядерные трофозоиты встречаются в гемоцеле личинок клеща. Здесь происходит множественное деление. Многоядерные стадии развития нутталлий встречаются в гемоцеле на протяжении 24 часов после отпадения личинки от хозяина. Многоядерные стадии распадаются на 16—32 трофозоита. Иногда их образуется несколько десятков. Множественное деление, повидимому, может повторяться. Многоядерные стадии локализуются иногда в цитоплазме гемоцитов.

В течение 24 часов после начала кровососания в кишечнике личинки встречаются обычно двух- и четыре-ядерные нутталлии, которые представляют собой стадии деления. В это время не удалось обнаружить какие либо стадии развития нутталлий, которые можно было бы принять за гаметы или их копуляцию.

Через 48 часов количество нутталлий в личинках заметно уменьшается, а через 96—120 часов можно найти только амебоидной формы нутталлий, которые до линьки личинки не размножаются. Это покоящиеся стадии. Они видны и в голодных нимфах. Последующее размножение нутталлий в нимфах начинается только тогда, когда они приступают к кровососанию. Паразит проникает в слюнные железы, где в течение трех дней происходит его рост, сопровождаемый многократным делением ядер. На 4 день в слюнных железах образуется множество одноядерных палочковидных или грушевидных трофозоитов, которые являются инвазионными для позвоночного хозяина. Нимфа может заразить песчанку не раньше чем на 4 день кровососания. Эмульсия инвазированных нутталлиями личинок, приготовленная через 24—26 часов после окончания питания и введенная песчанкам, не вызывала заражения последних.

SUMMARY

The development of *Nuttallia tadzhikistanica* in the larvae and nymphae of *Hyalomma anatolicum* was followed. In the first hours after the larvae had begun blood sucking on infected specimens of *Meryones erythrourus*, *Nuttallia*, which had got into the intestine of the tick, leave erythrocytes and multiply by division into two or four individuals. 2 or 4 hrs. later, mono-nuclear trophozoites occur in the haemocoel of the tick. Here their multiple division occurs. Multinucleated

development stages of *Nuttallia* occur in the haemocoel during 24 hrs. after the larvae had got detached from the host. The multinucleated stages break down into 32 trophozoites. Sometimes several tens of them arise. The multiple division may evidently be repeated several times. The multinucleated stages are sometimes localized in the cytoplasm of haemocytes.

In course of 24 hrs. after beginning of blood sucking by the larvae in the intestine of the tick, two- or four-nucleated *Nuttallia* usually occur which represent the division stages. At that time, any development stages of *Nuttallia* which might be recognized as gametes or their copulation forms, failed to be revealed.

After 48 hrs. the number of *Nuttallia* individuals in the larvae considerably diminishes, and after 96—120 hrs. only the amoeboid forms of *Nuttallia* which do not reproduce till the moult of the larva are present. Those are resting stages. They also occur in starving nymphs. The subsequent multiplication of *Nuttallia* in the nymph starts only then when the latter had begun blood sucking. The parasite penetrates then into the salivary gland, here its growth takes place accompanied by multiple division of nuclei. On the 4th day, in the salivary glands a great number of rod-shaped or pear-shaped trophozoites are formed which represent invasive forms for the vertebrate host. The nymph may infect *Meryones* not sooner than on the 4th day of blood sucking. The emulsion of larvae infected with *Nuttallia*, prepared 24—26 hrs. after conclusion of blood sucking and introduced into *Meryones*, failed to evoke infection in the vertebrate.

ЛИТЕРАТУРА

- Цапрун А. А. 1952: Развитие возбудителей гемоспоридиозов лошадей в клещах-переносчиках. Труды Всесоюз. ин-та эксперимент. ветер. 19, 36—42.
- Цапрун А. А. 1954: Взаимосвязь между временем насыщения крови зараженными клещами *Dermacentor* и развитием у них в слюнных железах отдельных стадий возбудителя пироплазмоза лошадей — *Piroplasma caballi*. Сборн. научн. работ Сиб. научно-исслед. ветер. ин-та 5, 283—286.
- Цапрун А. А. 1957: Материалы по развитию *Piroplasma caballi* в клещах рода *Dermacentor*. Труды Всесозн. ин-та эксперимент. ветер. 21, 221—240.
- Хейсин Е. М. и Муратов Е. А. 1959: Исследования по цитологии булаво-видных форм *Piroplasma bigeminum*. Цитология 1, 127—132.
- Christophers S. R. 1907: Preliminary note on the development of the *Piroplasma canis* in the tick. Brit. med. J, 76—78.
- Цвиленева В. А. 1961: К сравнительной гистологии крови и соединительной ткани. Рыхлая соединительная ткань иксодовых клещей. Архив анат., гистол. и эмбриол. 15, 91—100.
- Dennis E. W. 1932: The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne) of Texas cattle fever in the tick *Margoropus annulatus* (Say). Univ. Calif. publ. Zool. 36, 263.
- Grawley H. 1915: Stage of *Piroplasma bigemina* in *Margoropus annulatus*. J. Parasitol. 2.
- Koch R. 1906: Beitrage zur Entwicklungsgeschichte der *Piroplasmen*. Zsch. f. Hyg. und Infectiönskr. 54, 1—7.
- Крылов М. В. 1963: Краснохвостая песчанка (*Meriones erythrourus*) как экспериментальная модель для изучения пироплазмозов. Материалы научн. конф. по пробл. протозоол. Самарканд-Тайляк, 61—62.
- Крылов М. В. 1964: О развитии некоторых пироплазмид в организме позвоночного хозяина. Acta Protozool. 2, 307—320.
- Крылов М. В. и Занина З. Л. 1963: *Smithia tadzhikistanica* sp. n. из краснохвостой песчанки (*Meriones erythrourus* Gray, 1842). Труды Ин-та зоол. и паразитол. АН Тадж. ССР 24, 169—170.

- Ли П. Н. 1956: Материалы для изучения цикла развития *Babesiella ovis* в клещах-переносчиках *Rhipicephalus bursa*. Труды II научн. конф. паразитол. УССР. Киев.
- Ли П. Н. 1957: О формах развития *Babesiella ovis* в личинках и нимфах *Rhipicephalus bursa*. Труды Укр. научно-исслед. ин-та эксперимент. ветер. 24, 283—287.
- Марциновский Е. М. и Белицер А. В. 1907: О развитии пироплазм в теле клеща. Ветер. жизнь 46, 696—697.
- Марциновский Е. М. и Белицер А. В. 1908: О развитии пироплазм лошади в теле клеща. Вестн. общ. ветер. 10, 444—445.
- Муратов Е. А. и Хейсин Е. М. 1959: Развитие *Piroplasma bigeminum* в клещах *Boophilus calcaratus*. Зоол. журн. 38, 970—986.
- Петров В. Г. 1938: Развитие *Babesiella bovis* в клещах *Ixodes ricinus* L. Автореф. Сов. ветер. 3, 51—52.
- Петров В. Г. 1939: К вопросу о развитии *Babesiella bovis* в организме клещей *Ixodes ricinus*. Труды Ленингр. пиропл. станции 1, 58—65.
- Полянский Ю. И. и Хейсин Е. М. 1959: Исследование цикла развития *Babesiella bovis* в клещах *Ixodes ricinus*. Изв. Карельского филиала ААН СССР 14.
- Regendanz P. und Reichenow E. 1933: Die Entwicklung von *Babesia canis* in *D. reticulatus*. Arch. f. Protistenk. 79, 50—71.
- Regendanz P. 1936: Über den Entwicklungsgang von *Babesia bigemina* in der Zecke *Boophilus microplus*. Z. Bact. und Infektionskr. Orig. 137, 423—428.
- Reichenow E. 1935: Übertragungsweise und Entwicklung der Piroplasmaen. Z. Bakt., Parasitol. und Infektionskr. Orig. I, 135, 107.
- Riek R. F. 1964: The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Austral. J. of Agricult. Research. 15, 5, 802—821.
- Shortt H. E. 1936: Life history and morphology of *Babesia canis* in the dog-titick *Rhipicephalus sanguineus*. Ind. J. Med. Res. 23, 885—920.

Fasciculi praeparati:

Z. Raabe: The parasitic ciliates of *Dreissensia polymorpha* and other *Bivalvia* in the Ohrid Lake [Orzeński pasożytniczy w *Dreissensia polymorpha* i innych małżach jeziora Ohrid] — M. Wolska: Division morphogenesis in the genus *Didesmis* Fior. of the family *Buetschliidae* (Ciliata, Gymnostomata) [Morfogeneza podziałowa w rodzaju *Didesmis* Fior. z rodziny *Buetschliidae* (Ciliata, Gymnostomata)] — J. Lipa: *Blastocrithidia rabei* sp. n., a flagellate parasite of *Mesocercus marginatus* L. (Hemiptera: Coreidae) [*Blastocrithidia raabei* sp. n., wiciowiec pasożytniczy w *Mesocercus marginatus* L. (Hemiptera: Coreidae)] — Н. Э. Ковалева и А. В. Янковский: Влияние ионизирующего излучения на процессы реорганизации *Paramecium putrinum*. II. Ядерные процессы у эксконъюгантов. [Effect of ionizing radiation on the processes of nuclear reorganization in *Paramecium putrinum*. II. Nuclear processes in exconjugants] — K. Golińska: Regeneration of anuclear fragments in *Dileptus cygnus* Clap. et Lachm. [Regeneracja fragmentów bezjądrowych u *Dileptus cygnus* Clap. et Lachm.] — В. Н. Кудрявцев: Changes of the DNA content in macro- and micronucleus of *Paramecium putrinum* in the interdivision phase [Изменение содержания ДНК в макро- и микронуклеусе *Paramecium putrinum* в период от деления до деления] — M. Gross, B. Skoczylas, W. Turcki: Purification and some properties of ribonucleases from *Paramecium aurelia* [Oczyszczanie i niektóre własności rybonukleaz *Paramecium aurelia*] — H. E. Finley: Cultivation of some *Peritrichida* [Culture de quelques *Peritrichida*] — T. V. Beyer and L. P. Ovchinnikova: A cytophotometrical investigation of the cytoplasmic RNA content in the course of oocyst formation in the intestinal rabbit coccidia *Eimeria intestinalis* Cheissin 1948 [Цитофотометрическое исследование количества цитоплазматической РНК в процессе образования ооцист у кишечной кокцидии кролика *Eimeria intestinalis* Cheissin 1948] — А. В. Упенская: О способе питания вегетативных стадий *Myxidium lieberkuhni* (Bütschli) [On the mode of nutrition of vegetative stages of *Myxidium lieberkuhni* (Bütschli)].

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.

Państwowe Wydawnictwo Naukowe
(PWN — Polish Scientific Publishers)
Warszawa

Fasciculi:

28. Z. Raabe: The parasitic ciliates of gastropods in the Ohrid Lake [Orzęski pasożytujące w <i>Gastropoda</i> jeziora Ohrid]	311
29. M. Wolska: Remarks on the adoral ciliature in the order <i>Entodiniomorpha</i> [Uwagi o orzęsieniu adoralnym w rzędzie <i>Entodiniomorpha</i>]	321
30. Л. Н. Серавин, И. И. Скобло и И. Г. Багнюк: Механизм сокращения мионем инфузории <i>Spirostomum ambiguum</i> [Mechanism of contraction of myonemes in the ciliate <i>Spirostomum ambiguum</i>]	327
31. B. R. Seshachar: The fine structure of the nuclear apparatus and the chromosomes of <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg. [Die Ultrastruktur des Nuklearapparates und die Chromosomen von <i>Spirostomum ambiguum</i> Ehrbg.]	337
32. M. Jerka-Dziadosz: Morphogenesis of ciliature in division of <i>Urostyla weissei</i> Stein [Morfogeneza orzęsienia w podziale <i>Urostyla weissei</i> Stein]	345
33. I. Totwen-Nowakowska: Doublets of <i>Stylonychia mytilus</i> (O.F.M.) evoked by action of thermic shocks [Duplety <i>Stylonychia mytilus</i> (O.F.M.) powstałe w wyniku działania szoków termicznych]	355
34. R. Janisch: Regeneration of surface structures in <i>Paramecium caudatum</i> [Regenerace povrchových struktur u <i>Paramecium caudatum</i>]	363
35. М. В. Крылов: Развитие <i>Nuttalia tadzikistanica</i> Krylov et Zanina 1963 в клеще <i>Hyalomma anatolicum</i> [The development of <i>Nuttalia tadzikistanica</i> Krylov et Zanina 1963 in the tick <i>Hyalomma anatolicum</i>]	369

With this issue the Volume III is complete