

ACTA PROTOZOO- LOGICA

REDACTORUM CONSILIUM

E. M. CHEISSIN (LENINGRAD), S. DRYL (WARSZAWA), A. GRĘBECKI (WARSZAWA),
O. JÍROVEC (PRAHA), G. I. POLJANSKY (LENINGRAD), Z. RAABE (WARSZAWA),
K. M. SUKHANOVA (LENINGRAD)

VOLUMEN V

Fasciculi: 21—27

W A R S Z A W A

1 9 6 7 — 1 9 6 8

<http://rcin.org.pl>

INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ IM. M. NENCKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ACTA PROTOZOOLOGICA

Redaktor Naczelny:
ZDZISŁAW RAABE

Zastępca Redaktora Naczelnego:
STANISŁAW DRYL

Sekretarz Redakcji
STANISŁAW L. KAZUBSKI

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*. *Int. 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 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.

Anna CZAPIK

La famille *Tetrahymenidae* et son importance dans la systématique et l'évolution des ciliésRodzina *Tetrahymenidae* i jej znaczenie w systematyce i ewolucji orzęsków

J'ai eu l'honneur de commencer cet ouvrage sous la direction de Monsieur Fauré-Fremiet au Collège de France. Je lui adresse l'expression de ma gratitude et de mon respect le plus profond.

L'histoire des recherches

Il y a deux étapes dans les recherches sur la morphologie des ciliés. Dans la première, commencée par Leeuwenhoek 1676 qui découvrit ces animaux, on ne connaissait pas encore de méthodes qui permettraient de mettre en évidence les fines structures invisibles chez l'animal vivant. Au cours de cette période les chercheurs se limitaient à des descriptions et esquisses basées sur les observations faites sur l'animal vivant. Quand il s'agissait de formes grandes et caractéristiques ces descriptions et dessins étaient souvent suffisants pour reconnaître l'espèce décrite; les difficultés augmentaient quand on avait affaire aux formes petites dépourvues de caractères spécifiques distincts.

Bruno Klein inaugura en 1926 la deuxième étape, en publiant sa méthode d'imprégnation à l'aide d'une faible solution de nitrate d'argent. Cette méthode mettait en évidence ce qu'on appelle à présent le système argentophile, c'est-à-dire les corps basaux des cils — cinétosomes et les fibrilles longitudinales — cinétodesmes. Chatton et Lwoff 1930 inventèrent une nouvelle méthode perfectionnée d'imprégnation qui conserve la forme naturelle du corps de l'animal. Dans les dernières années les chercheurs appliquent de plus en plus la méthode de Bodian où AgNO_3 est remplacé par une solution de protargol.

La méthode d'imprégnation argentique révéla quelques faits importants. On a constaté que les cinétosomes sont présents au cours de toutes les périodes de la vie du cilié, même pendant l'enkystement quand les cils disparaissent; chaque espèce de cilié possède un système argentophile spécifique qui est constant et héréditaire; enfin on a prouvé que les systèmes argentophiles

des espèces apparentées se ressemblent. Cette constatation a fourni la clef de la phylogénèse des ciliés.

Il est devenu évident, que la description d'une espèce doit contenir la description de son système argentophile; il en résulte que toutes les formes décrites autrefois ont besoin d'une révision. Dans les dernières dizaines d'années on a révélé chez plusieurs espèces des ciliés l'existence du polymorphisme. Il s'est avéré que maintes formes décrites comme espèces particulières appartenaient à la même espèce et ne représentaient que diverses phases du cycle vital. Plusieurs espèces citées dans la grande monographie de Kahl 1932—1935 sont devenues douteuses et beaucoup d'autres après avoir été étudiées selon les méthodes modernes ont changé leur place dans le système.

La plus grande confusion se fit dans le groupe *Hymenostomata* parce que les formes qui y appartiennent sont petites, peu caractéristiques et leur cils adoraux ne sont pas bien visibles. On savait déjà autrefois que ces cils sont adhérents et forment de petites membranelles, mais leur structure étant inconnue on les considérait comme quelque chose de tout à fait différent des membranelles adoraux des ciliés plus évolués (*Spirotricha*).

Furgason 1940 publie son ouvrage sur la morphologie comparée de plusieurs clones déterminés comme espèces *Glaucoma pyriformis* Ehrbg., *Colpidium campylum* (Stokes) et *Saprophilus oviformis* Kahl. S'appuyant sur l'étude des préparations argentées l'auteur a prouvé que chez toutes ces espèces le cytostome est entouré de trois membranelles et d'une membrane ondulante. Ce type de ciliature préorale se répétant dans tous les clones étudiés, Furgason 1940 arrive à la conclusion que les formes examinées ne représentent pas des espèces différentes mais des clones d'une seule espèce qu'il nomma *Tetrahymena geleii*, en formant un nouveau genre et une nouvelle espèce dont le nom soulignait le "pattern" tetrahymenal de la ciliature buccale.

Plus tard on s'est aperçu que Furgason avait eu tort d'unir toutes ces formes dans un seul genre nouveau. Ses autres conclusions eurent par contre des conséquences décisives pour les recherches protozoologiques. D'après lui les membranelles des ciliés examinés seraient tout à fait homologues aux membranelles des *Spirotricha*, en d'autres termes il y aurait des *Holotricha* qui possèdent une véritable zone adorale des membranelles, bien que faiblement développée. Furgason supposait qu'une telle zone était largement répandue parmi les *Holotriches*.

L'ouvrage de Furgason resta d'abord méconnu jusqu'au moment où il attira l'attention de Fauré-Fremiet qui sut apprécier ses valeurs. En appliquant la méthode de Chatton, Fauré-Fremiet et ses collaborateurs (Mugard, Roques) ont entrepris des recherches sur les ciliés holotriches et ont constaté qu'en effet AZM existe chez plusieurs espèces. Ayant à sa disposition les données de la morphologie comparée et de la morphogénèse Fauré-Fremiet a étendu et développé la notion avancée par Furgason, considérant les *Spirotricha* comme dérivés des ciliés holotriches pourvus de la zone adorale des membranelles. Le fossé qui jusqu'à ce moment séparait les deux groupes disparut. La théorie de Furgason révolutionna les opinions, ouvrit des perspectives nouvelles et stimula les recherches morphologiques.

Comme on a dit ci-dessus Furgason introduit une confusion extrême englobant toutes les formes examinées dans une seule espèce. Enfin Corliss

1951 s'occupa de ce problème et c'est à lui qu'on en doit la solution. Corliss ne s'est pas contenté de rétablir aux genres mis en doute par Furgason leurs noms anciens (*Glaucoma*, *Saprophilus* et *Colpidium*) mais il a révélé que parmi les clones étudiés se trouvait encore une forme, bien différente de ces genres. Il l'a identifiée comme l'espèce *Leucophrys pyriformis* décrite par Ehrenberg et classée ensuite par Schewiakoff au genre *Glaucoma*. Le nom *Glaucoma pyriformis* était accepté par les chercheurs durant 50 ans, bien que Kahl 1932 ait déjà souligné que la bouche de cette espèce n'était pas typique pour *Glaucoma*. C'est Corliss qui a enfin tiré la question au clair en démontrant qu'on avait affaire à une espèce depuis longtemps connue, mais mal classée, qui se distingue sans doute du genre *Glaucoma*. Comme le nom générique "*Tetrahymena*" créé par Furgason soulignait très bien les caractères essentiels de cette forme, Corliss l'a laissé, se bornant à rétablir le nom d'espèce "*pyriformis*".

Il peut paraître étrange qu'il ait fallu tant d'efforts de plusieurs chercheurs pour établir la position systématique d'un seul animal. Pour l'expliquer il faut se rendre compte que les genres étudiés appartiennent parmi les ciliés aux groupes les plus difficiles; ils sont petits, relativement primitifs et leurs péristomes ayant toujours le même type tétrahymenal de ciliature différent pourtant par des détails qui ne peuvent être précisés qu'après un examen attentif des préparations argentées. A part cela le genre *Tetrahymena* présente des difficultés exceptionnelles à cause de son polymorphisme: selon le cycle vital le même individu au cours de deux phases diverses ne se ressemble guère et fait l'impression d'appartenir à deux espèces différentes.

Corliss 1952 a détaché de la grande famille *Frontonitidae* *Tetrahymena* et quelques autres genres les plus proches et il a créé la nouvelle famille *Tetrahymenidae* en précisant ses caractères:

1. L'appareil buccal se compose de trois membranelles (AZM), plus ou moins parallèles, situées à gauche et d'une membrane ondulante (UM) située à droite du cytostome
2. Il n'y a pas de vestibule devant le péristome
3. Une cinétie ou plus sont interrompues par la cavité buccale; celle, qui se trouve le plus loin à droite est stomatogène
4. La ciliature du corps est uniforme
5. Une seule vacuole contractile avec 1 ou plusieurs pores est localisée dans la partie postérieure du corps, du côté droit ou dorsal-droit
6. Les espèces qui y appartiennent sont de taille petite ou moyenne; elles sont pyriformes ou ovoïdes, libres, parfois parasites facultatifs.

Corliss a classé dans la famille *Tetrahymenidae* les genres suivants: *Colpidium* Stokes, *Deltopylum* F-F. et Mugard, *Glaucoma* Ehrenberg, *Loxoccephalus* Eberhard, *Saprophilus* Stokes, *Tetrahymena* Furgason, *Monochilum* Schewiakoff, *Dichilum* Schewiakoff et *Stegochilum* Schewiakoff.

Thompson 1963 remarque pourtant que trois de ces genres à savoir *Monochilum*, *Dichilum* et *Stegochilum* n'ont pas été redécrites jusqu'ici et il n'y a aucune donnée concernant la structure de leur péristome et de leur système argentophile; c'est juste, il faut plutôt les omettre jusqu'au moment où ils seront retrouvés et redécrits à l'aide de techniques modernes.

Jankowski 1964 a détaché le genre *Loxocephalus* des *Tetrahymenidae* et l'a scindé en deux: *Loxocephalus* et *Dexiotricha* en s'appuyant sur certaines différences dans la ciliature somatique. Il a créé pour ces deux genres la nouvelle famille *Loxocephalidae*. A mon avis ces différences dans la ciliature n'ont pas d'importance et la création de la nouvelle famille est sans fondement parce que *Loxocephalus* possède tous les caractères typiques de *Tetrahymenidae*. Je le discute plus amplement dans les chapitres suivants (p. 342 et 345).

Dans la famille *Tetrahymenidae* restent alors 7 genres: *Tetrahymena* Furgason, *Sathrophilus* Corliss, *Glaucoma* Ehrenberg, *Deltopylum* F-F. et Mugard, *Colpidium* Stokes, *Loxocephalus* Eberhard et *Paratetrahymena* Thompson décrit récemment.

Le grand intérêt qu'inspire la famille *Tetrahymenidae* s'exprime par une énorme quantité de publications qui ont paru dans les dernières années. Il y a deux raisons qui provoquent cet intérêt. D'abord l'importance théorique de ce groupe comme lien entre les ciliés inférieurs (*Holotricha*) et supérieurs (*Spirotricha*) et comme point de départ pour d'autres groupes. L'autre raison ce sont les propriétés spécifiques du genre *Tetrahymena*, qui ont fait de ce protozoaire l'animal expérimental par excellence, rendant d'énormes services pratiques dans les laboratoires.

Dans les dernières années ont paru plusieurs publications concernant l'ultrastructure des *Tetrahymenidae*. Ainsi Pitelka 1961 après avoir examiné au microscope électronique le système argentophile chez *Tetrahymena pyriformis*, *Colpidium campylum* et *Glaucoma chattoni* a constaté que ce dernier consiste en une mosaïque de vesicules plats, entourés de membranes dont les bords s'imprègnent à l'argent. A part cela il y a encore un réseau entier de fibrilles longitudinales et transversales qui n'est pas argentophile.

Cheissin and Mosevich 1962 ont étudié l'ultrastructure de la surface de *Colpidium colpoda* et ont constaté sous la pellicule la présence d'ampoules sécrétant une substance muqueuse qui sort par le pores de la pellicule et forme une membrane sur la surface du corps. Metz and Westfall 1954 ont examiné l'appareil buccal de *Tetrahymena pyriformis* et trouvé que la membrane ondulante consiste en une seule rangée de cinétosomes tandis que M_1 et M_2 ont au moins trois rangées. Miller and Stone 1963 étudiant les mêmes structures chez *T. patula* ont constaté que la base de UM est composée de deux rangées de cinétosomes situés en alternance; seule la rangée extérieure possède des cils. Les cinétosomes de la rangée intérieure plus profondément enfoncés dans le cytoplasme n'ont pas de cils. Chaque membranelle consiste en trois rangées de cinétosomes. En ce qui concerne les fibrilles fines qui sortent en éventail de UM vers le côté gauche du péristome, les auteurs sont d'accord avec Williams et coll. 1960, que c'est une structure pelliculaire.

Problème, matériel, méthodes

A présent la bibliographie de *Tetrahymenidae* est devenue si riche et si dispersée, qu'il est très difficile pour un protozoologue qui s'occupe d'autres groupes d'identifier une espèce de cette famille. D'autre part les caractères génériques dans cette famille ne sont pas suffisamment précisés. Dans ce travail j'ai essayé de faire une courte synthèse en prenant en considération

autant que possible tous les travaux concernant la morphologie et la biologie de *Tetrahymenidae*; en ce qui concerne les descriptions des espèces que je n'ai pas réussies à retrouver, je les cite d'après leurs auteurs. En vertu des recherches morphologiques je tâche de préciser les caractères qui distinguent les genres. J'ai prêté une attention particulière au genre *Sathrophilus* parce qu'il est très peu étudié et sauf deux ouvrages concernant l'espèce *S. muscorum* Kahl il n'y a aucune publication nouvelle traitant ce sujet. A la fin je présente des considérations évolutives basées sur *Tetrahymenidae*.

J'ai fait les préparations argentées d'après la méthode de Chatton, modifiée par Corliss 1953 en appliquant pourtant une plus forte solution de AgNO_3 (10%). En général les ciliés de cette famille sont difficiles à imprégner et ils doivent être tenus dans le nitrate d'argent plus longtemps que le suggère Chatton, à savoir d'une à plusieurs heures. Avant la fixation il fallait laisser les espèces histiophages 1—2 jours sans nourriture parce que autrement l'acide osmique noircissait les vacuoles digestives.

Parmi les individus imprégnés visibles sur les photos il y en a quelques uns qui proviennent de la culture des ciliés du laboratoire d'hydrobiologie du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette. La plupart (entre autres toutes les espèces de *Sathrophilus*) ont été trouvés en Pologne.

Tetrahymena Furgason, 1940

L'histoire des recherches sur le genre *Tetrahymena* commence peut-être à partir de Leeuwenhoek qui laissa une description de petits ciliés ressemblant à cette forme. Les premières informations plus précises viennent d'Ehrenberg, qui en 1830 décrit sous le nom *Leucophrys pyriformis* un cilié ovoïde avec le pôle antérieur aigu et postérieur arrondi. Schewiakoff 1889 eut le tort de placer cette forme dans le genre *Glaucoma* sans changer d'ailleurs le nom d'espèce "*pyriformis*". Ce nom était utilisé au cours de 50 ans et à présent encore il est le synonyme le plus fréquent de *Tetrahymena pyriformis*. Furgason 1940 comme il fut mentionné plus haut, créa un nouveau genre et une nouvelle espèce *Tetrahymena geleii*, dans laquelle il classe par erreur plusieurs formes différentes. Enfin Corliss 1952 donna la solution définitive du problème, en identifiant *Tetrahymena geleii* avec *Glaucoma pyriformis* et en rétablissant aux autres formes leurs noms anciens.

L'intérêt éveillé par ce cilié date de 1923 quand Lwoff cherchant une espèce qui se prêterait aux recherches biochimiques isola un clone qu'il déterminait comme *Glaucoma pyriformis*. Il a réussi à cultiver ce clone dans un milieu synthétique privé des bactéries. Ce fait attira l'attention de chercheurs américains et stimula une série de recherches sur la biologie et la physiologie de ce protozoaire.

En 1951 deux chercheurs américains Seaman et Slater indépendamment l'un de l'autre annoncèrent un succès considérable: ils avaient réussi à cultiver *Tetrahymena pyriformis* dans un milieu chimique exactement défini. C'est un animal unique qui peut vivre dans un milieu privé d'autres organismes. Le succès des chercheurs américains eut pour effet non seulement de faciliter les recherches sur le métabolisme du cilié même, mais aussi de fournir aux biochimistes et aux pharmaciens un outil extrêmement confortable pour les tests. N'est pas sans importance la circonstance que l'application des

protozoaires à la place des animaux supérieurs dans les recherches expérimentales où sont utilisés souvent des réactifs rares et précieux, diminue considérablement les frais (Kidder, Devey 1951). Il y a déjà des laboratoires où des rats et d'autres rongeurs classiques sont remplacés par *Tetrahymena*.

Il y a encore une autre raison qui décide de l'utilité pratique de ce cilié à savoir le rythme des divisions qui est le plus haut dans le monde animal. Prescott 1957 étudia la reproduction chez *Tetrahymena pyriformis* dans la marge de température comprise entre 14.4°C et 35.6°C et il constata que l'optimum se trouve à 32.5°C; dans ces conditions l'animal subit une division toutes les deux heures et 25 minutes.

A présent la littérature concernant le genre *Tetrahymena* est énorme: en 1963 seulement plus de 1300 publications ont apparues (Corliss 1964). L'espèce *Tetrahymena pyriformis* est étudiée le plus souvent. On peut distinguer dans cette quantité énorme de publications les orientations principales des recherches: cytologie, biochimie, physiologie, génétique, morphogenèse, parasitisme facultatif.

Les processus sexuels étaient longtemps inconnus chez *Tetrahymena*. C'est Corliss qui en 1951 découvrit l'autogamie chez *Tetrahymena rostrata* et ce n'est qu'en 1959, après 19 ans de recherches, qu'Elliot observa la conjugaison chez *T. pyriformis*. Cela paraît étonnant parce que normalement la conjugaison est fréquente chez les ciliés. Elliot élucida ce problème en constatant qu'à peu près la moitié des clones de *T. pyriformis* rencontrés dans la nature est privée du micronucleus. On ne sait pas encore comment se forment de tels clones.

La division chez *Tetrahymena* se passe en général à l'état actif mais il y a des espèces qui forment des kystes de division. Parfois chez la même espèce il y a les deux formes de division. Zeuthen and Scherbaum 1954 après avoir appliqué à *T. pyriformis* une série de chocs thermiques successifs interrompus par des périodes de température optimale ont obtenu une division synchronisée en masse (85% individus) pendant trois générations. Williams 1964 ayant répété cette expérience avec *T. vorax* reçut un index plus bas (40% individus).

Chez toutes les espèces appartenant au genre *Tetrahymena* on observe le phénomène du polymorphisme. Depuis longtemps on savait que sous l'influence d'une nourriture abondante le corps d'un cilié devient plus arrondi et ses mouvements lents mais "...it has been realized only recently how great the extent of changes may be in certain species. When different forms of the same organism are described as entirely separate species, then recognition of entire life cycles becomes of pertinent value from viewpoints of systematics, comparative morphology and evolutionary relationship..." (Corliss 1952). Fauré-Fremiet 1944, comparant le cycle d'un cilié prédateur *Enchelys mutans* Mermod à celui d'Ophryoglènes histiophages, a utilisé les termes "trophonte" et "tomonte" proposés par Chatton et Lwoff pour caractériser deux stades du cycle des Apostomes parasites, en y ajoutant le terme "théronte" pour caractériser le stade chasseur. Mugar 1948 a défini ces différents stades au cours du cycle des ciliés histiophages en général. Ainsi la forme fusiforme, "chasseur", qui montre une forte activité dans la recherche de la proie fut nommée "théronte". La forme arrondie, qui s'alimente est "trophonte". Celle-ci gorgée de nourriture devient "tomonte": sa taille

s'accroît considérablement, son corps devient ovoïde, ses mouvements se ralentissent. Le tomonte se divise une ou plusieurs fois de suite donnant de petites formes actives appelées "tomites".

Kidder, Lilly and Claff 1940 ayant étudié le polymorphisme chez *Tetrahymena vorax* ont constaté que le genre de nourriture influence fortement la taille et la forme de l'animal.

Corliss distingue trois degrés de polymorphisme chez *Tetrahymena*. Le polymorphisme limité (limited polymorphism) qui se manifeste dans le changement de la forme du corps selon la quantité de la nourriture absorbée. *T. pyriformis* en est l'exemple typique; l'individu repu, qui se nourrit des bactéries est pyriforme; l'individu affamé devient mince et prend la forme d'un cigare; s'il commence à s'alimenter de tissus le trophonte après quelques heures devient arrondi, sa taille augmente considérablement et le cytoplasme se remplit de nourriture sous la forme des boules foncées réfringentes (Fig. 1).

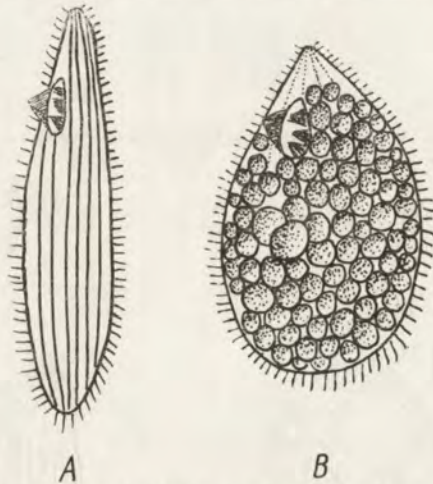


Fig. 1. Polymorphisme limité chez *Tetrahymena*. A — individu affamé, B — individu gorgé de nourriture (original)

Le polymorphisme adaptatif (adaptative polymorphism) se manifeste quand une espèce libre devient parasite facultatif d'un animal et par la suite subit certaines modifications morphologiques. L'exemple typique en est *Tetrahymena limacis* qui passant à la vie parasitaire augmente le nombre des cinéties. Kozloff 1956 en expérimentant avec cette espèce constata que le nombre de cinéties chez un clone parasitaire transféré dans un milieu nutritif diminue et qu'il augmente après sa retransplantation sur l'hôte. On observe le même phénomène chez *T. rostrata*.

Chez trois espèces à savoir: *T. vorax*, *T. patula* et *T. paravorax* à côté du polymorphisme limité apparaît aussi le polymorphisme distinct (pronounced polymorphism) qui ne forme pas pourtant comme chez les ciliés parasites un cycle régulier composé de stades définis mais se manifeste par l'existence de deux formes: macro- et microstome. *T. vorax* (Fig. 2) est rencontré dans la nature comme forme microstome dont la partie postérieure du corps est amincie formant une sorte de queue. On ne sait pas quelles circonstances dans le milieu naturel provoquent la transformation de la forme microstome

en macrostome. Au laboratoire ce phénomène a lieu si à la culture pure ou bactérienne de *T. vorax* on ajoute comme proie *T. pyriformis* ou *Colpidium campylum*. Au bout de quelques minutes la forme microstome se transforme alors en forme macrostome. La partie antérieure du corps s'élargit, les membranelles du péristome se déplacent vers l'arrière et la membrane ondulante se dilate; en conséquence la bouche augmente considérablement. En

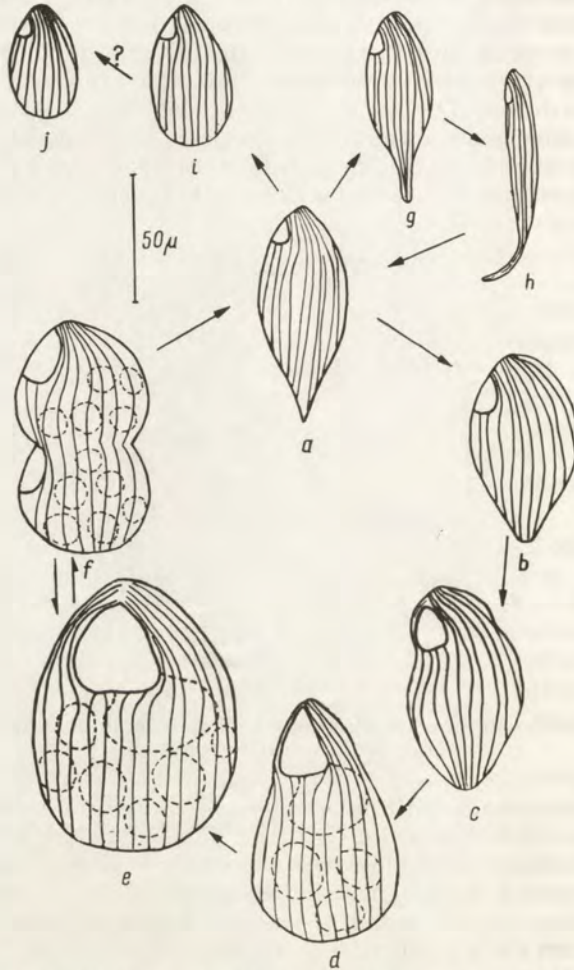


Fig. 2. Cycle de *Tetrahymena vorax*: a — forme microstome à queue, b—d — formes intermédiaires, e — forme macrostome mûre, f — la même forme en division, g, h — formes affamées, i — forme microstome sans queue, j — forme microstome pyriforme, morphologiquement identique avec les individus de *Tetrahymena pyriformis* (d'après Corliss)

même temps la queue disparaît. Le trophonte devient carnivore et très vorace. Cette phase de *T. vorax* ne peut pas être distinguée de la forme macrostome de *T. patula*. Parfois peut apparaître une forme encore plus large et arrondie dont la bouche est plus grande en largeur qu'en longueur.

Le trophonte se divise normalement sans kyste en donnant deux individus macrostomes. Dans des conditions favorables ce cycle se répète toujours. Quand les petits ciliés commencent à manquer dans le milieu et seules les bactéries restent, *T. vorax* revient graduellement au cours des divisions à la forme microstome. On ne sait pas jusqu'ici quelle est la nature du stimulant qui provoque la formation de la forme macrostome. Parfois apparaît dans les cultures une forme microstome pyriforme qui est impossible à distinguer de *T. pyriformis*. Ce stade n'est pas réversible: il ne peut passer ni en forme microstome à queue ni en forme macrostome. Williams 1961 expérimentait avec les deux formes de *T. vorax* en les installant dans de l'eau distillée. Il constata que les formes réagissent de la même manière à savoir elles forment des kystes transparents et se divisent en 2, 4, 8 ou 16 tomites.

Dans la nature on rencontre *T. patula* (Fig. 3) toujours sous la forme

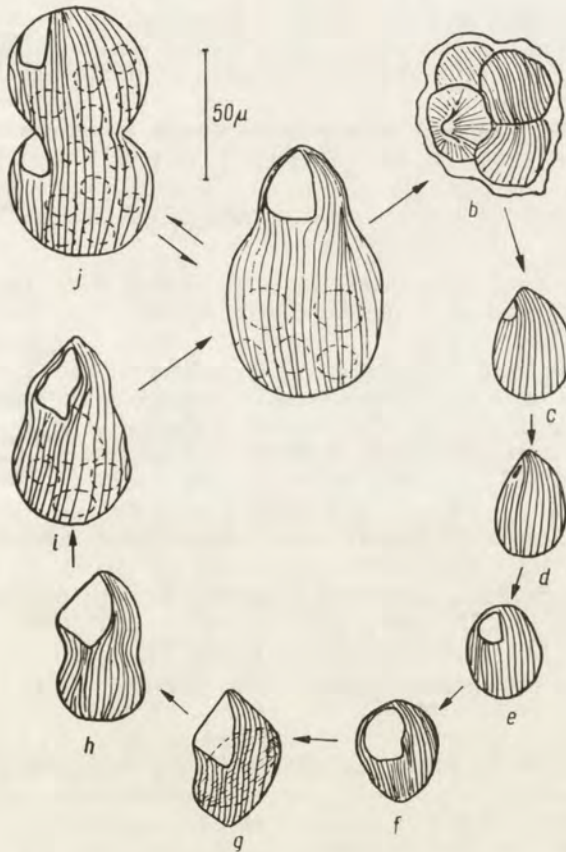


Fig. 3. Cycle de *Tetrahymena patula*: a — forme normale macrostome, b — formation des tomites dans le kyste dans la culture affamée, c—d — formes microstomes pyriformes, e—i — formes intermédiaires qui se sont développées après l'introduction de *Colpidium campylum* comme proie, j — forme macrostome en division (d'après Corliss)

macrostome qui dans les conditions ordinaires au laboratoire ne change pas. C'est un prédateur qui chasse les ciliés plus petits et ne change pas de forme au cours de l'alimentation. En général la forme du corps et celle de la bouche montrent une ressemblance frappante à la forme macrostome de *T. vorax* avec cette différence pourtant, que *T. patula* possède un nombre presque double des cinéties et une très grande poche pharyngienne. Après la division les individus sont toujours macrostomes. La forme macrostome affamée ou placée dans de l'eau distillée s'entoure d'une mince membrane presque invisible, résorbe son appareil buccal et subit 2—4 divisions de suite en formant de petits tomites microstomes, qui ressemblent à *Tetrahymena pyriformis* mais qui ont un plus grand nombre des cinéties. Si à une culture contenant des formes microstomes on ajoute d'autres ciliés, alors, de même que chez *T. vorax*, on voit paraître la forme macrostome dont la bouche est beaucoup plus grande, puisqu'elle dépasse parfois la longueur du corps, ce qui permet à l'animal d'avaler une proie plus grande que lui-même. "...Sous l'action du chlorure de lithium la multiplication palintomique se produit en présence de nourriture (*Colpidium* ou cerveau) et donne naissance aux individus microstomes stables; la transformation de ceux-ci en macrostomes se produit seulement si on les transporte dans un nouveau milieu dépourvu de lithium..." (Fauré-Fremiet 1949). Williams 1960 a constaté que la transformation de la forme microstome en macrostome peut s'accomplir non seulement par la dilatation de l'AZM mais aussi par la résorption du vieil appareil buccal qui sera remplacé par la bouche nouvelle, plus grande, formée par le champ anarchique de cinétosomes.

Les espèces de *Tetrahymena* sont fréquentes dans tous les types de réservoirs d'eau douce ainsi que dans le sol humide. Elles peuvent s'alimenter de bactéries, de tissus d'animaux, parfois elles deviennent prédatrices, souvent elles pénètrent dans la cavité du corps de différents animaux où elles vivent en parasites. On les a rencontrées dans les escargots, oligochaetes, gammars, les larves des mosquitos et Chironomides, les poissons, les salamandres et une fois même dans un oiseau. Probablement ce protozoaire peut s'adapter à presque chaque hôte de même que le sporozoaire *Eimeria*. On a obtenu aussi des résultats positifs en inoculant artificiellement *Tetrahymena* dans la cavité du corps de différents animaux. Les insectes sont considérés comme les meilleurs hôtes, les formes adultes ainsi que les larves. En ce qui concerne les vertébrés on a réussi seulement à infecter le petit poisson *Lebistes* et le têtard de la grenouille par *Tetrahymena corlissi* (Thompson 1958). Jusqu'ici on ne sait pourtant pas par quelle voie ces ciliés pénètrent dans le corps des animaux dans les conditions naturelles. Nigrelli and Jakowska 1955 les ont trouvés sur des poissons exotiques blessés (*Lebistes reticulatus*) où ils s'alimentaient de mucus et de sang. Stout 1954 a trouvé l'espèce *Tetrahymena rostrata* dans la cavité du corps des *Enchytraeidae*; il estime que l'infection s'accomplit par les vésicules d'où poussent les soies; celles-ci de temps en temps tombent et d'autres repoussent à cette place. Une fente qui s'ouvre dans la cuticule pendant ce processus permet peut-être aux ciliés de pénétrer dans le ver. Ici le cilié se divise toutes les 3—4 heures (à 20—25°C). Un ver qui mesure environ 4 mm contient souvent plus de 200 parasites et est dévoré en 25 heures. Seules les soies et la cuticule restent intactes. En ce qui concerne sa répartition géographique *Tetrahymena* est cosmopolite, recontré dans toutes les parties du monde.

Le genre *Tetrahymena* possède les caractères spécifiques suivants précisés par Corliss:

1. La forme fondamentale pyriforme du corps avec la partie antérieure pointue et la postérieure arrondie change considérablement selon la quantité de nourriture absorbée: de l'individu affamé en forme de cigare jusqu'à l'individu repu ovoïde, presque noir. Les mouvements subissent les mêmes changements: très rapides chez les individus affamés ils deviennent de plus en plus lents pendant l'alimentation.

2. Le péristome est pyriforme, toujours parallèle à l'axe longue du corps. Le bord droit plus arrondi. Les membranelles sont situées obliquement par rapport à la membrane ondulante (Fig. 4).

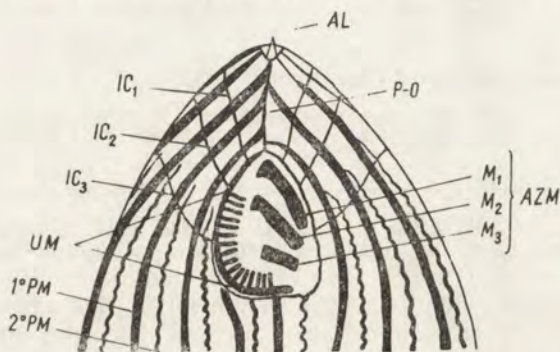


Fig. 4. Structures buccales et apicales chez *Tetrahymena pyriformis*: AL — noeud apical, IC — connectives intermédianales, 1°PM — partie principale de la cinétie, 2°PM — partie secondaire de la cinétie, PO — suture préorale (d'après Corliss)

Tous les auteurs soulignent que la distinction des espèces de *Tetrahymena* est très difficile. Même les préparations argentées ne donnent pas une réponse décisive parce que dans chaque espèce le nombre des cinéties oscille dans certaines limites qui se superposent. Pour déterminer une espèce il faut alors prendre en considération à part la morphologie les caractères biologiques comme la formation des kystes et le polymorphisme. Le tableau suivant a pour but de donner une orientation générale avant d'aborder les descriptions détaillées.

A. Formes pourvues du cil caudal*

<i>T. rostrata</i>	le stade libre possède 28—37 cinéties, le stade parasitaire 41—58. Il y a des kystes de division et de repos. Autogamie en kystes.
<i>T. setifera</i>	22—36 cinéties. Il n'y a pas de kystes.
<i>T. corlissi</i>	27—31 cinéties. Kystes de division.
<i>T. paravorax</i>	23—30 cinéties. Dymorphisme comme chez <i>T. vorax</i> .

B. Formes sans cil caudal

<i>T. pyriformis</i>	15—25 cinéties. Parties secondaires des cinéties distinctes. Il n'y a pas de kystes.
<i>T. vorax</i>	17—26 cinéties. Parties secondaires des cinéties fragmentaires ou absentes. Dymorphisme: forme micro- et macrostome.

* Les espèces considérées comme incertaines portent le point d'interrogation.

- Un stade de la forme microstome identique morphologiquement avec *T. pyriformis*.
- T. patula* 23—45 cinéties. Dymorphisme. Kystes de division.
- T. chironomi* 24—28 cinéties. Il n'y a pas de kystes. Morphologiquement identique avec *T. pyriformis* mais il n'y a pas de parties secondaires des cinéties.
- T. limacis* le stade libre a 25—32 cinéties, le stade parasitaire 32—40. Il n'y a pas de kystes.
- T. stegomyiae* 25—30 cinéties. Il y a des kystes. Morphologiquement identique avec *T. pyriformis*.
- T. faurei* ? 32—37 cinéties. Il n'y a pas de kystes.
- T. parasitica* ? 24—29 cinéties. Morphologiquement identique avec *T. pyriformis*.

Tetrahymena pyriformis (Ehrenberg, 1830)

Synonymes: *Leucophrys pyriformis* Ehrbg., 1830, *Glaucoma pyriformis* Sche-wiakoff, 1889, *Colpidium glaucomaeforme* Gelei, 1938, *Tetrahymena gelei* Furgason, 1940

Le corps en principe pyriforme subit des changements selon le degré d'alimentation (polymorphisme limité): ovoïde chez les individus repus, en forme de cigare chez les individus affamés. Longueur moyenne 50 μ , les extrêmes 26—100 μ . D'après Corliss le nombre de cinéties oscille entre 17 et 23; d'après les données les plus nouvelles (Loeffer, Small, and Furgason 1966) ce nombre peut osciller dans des limites plus vastes à savoir 15—25. Il y a des parties secondaires des cinéties. En moyenne 2 parfois 3 cinéties postorales. Le macronucleus ovoïde ou irrégulièrement sphérique mesure 9 μ de long. Le péristome typique, pyriforme mesure environ 10,5 μ de long sur 6 μ de large. Le pôle antérieur est entouré du noeud apical sous la forme d'une mince fibrille. Sur le côté ventral la suture préorale s'étend du noeud apical au sommet du péristome (Fig. 4). D'après Corliss la vesicule contractile possède en règle deux pores, dont un est situé à gauche du premier et l'autre à gauche du 6-ème méridien. Néanmoins selon des recherches plus récentes (Naney 1966) le nombre et la situation du CPV change selon le nombre de cinéties (Fig. 5 A). Parmi les 10 clones examinés on a distingué au moins trois types.

T. pyriformis vit dans les eaux douces du monde entier: dans les étangs, rivières, mares, sources chaudes (jusqu'à 40°C) ainsi que dans le sol et les excréments des animaux. Dans les conditions naturelles il s'alimente de bactéries ou de tissus animaux. Dans les laboratoires il se laisse cultiver dans le milieu synthétique. Transplanté artificiellement dans la cavité du corps de certains animaux ce cilié s'y développe très bien surtout dans les larves des insectes en provoquant la mort de l'hôte.

Cette espèce, qui ne forme aucun kyste montre cependant une certaine aptitude pour l'anabiose (Corliss 1953): si le substrat où elle vit garde un peu d'humidité, les ciliés aplatis et immobiles peuvent rester longtemps vivants et si l'on verse un peu d'eau ils se raniment toute de suite.

Tetrahymena setifera Holz et Corliss, 1956

La forme du corps et du péristome chez cette espèce est identique avec celle de *T. pyriformis*. Ce cilié possède cependant le cil caudal; les parties secondaires des cinéties, si elles existent, sont fragmentaires. La taille moyenne

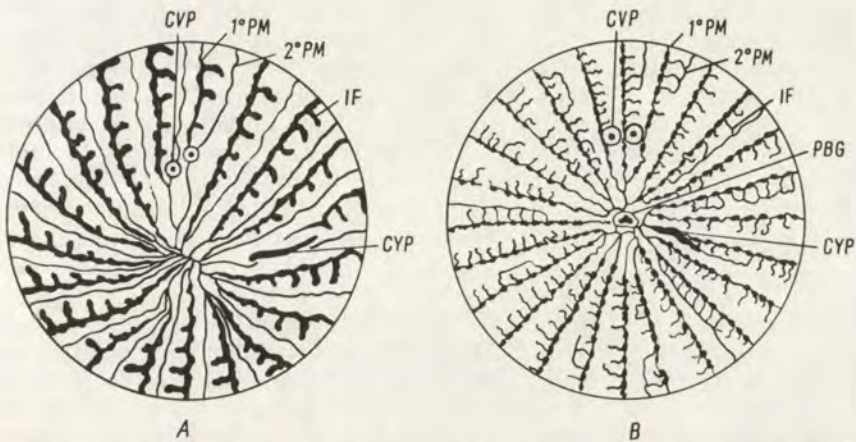


Fig. 5. Différences et analogies entre deux espèces voisines: *Tetrahymena pyriformis* (A) et *Tetrahymena setifera* (B). Le pôle postérieur du corps (imprégné selon la méthode de Klein). CVP — pore de la vacuole contractile, CYP — cytophyge, PBG — grain basal du cil caudal avec les fibrilles entourants, IF — fibrille intermédiaire, 1°PM — partie principale de la cinétie, 2°PM — partie secondaire de la cinétie (d'après Holz et Corliss)

mesure 40 μ de long sur 25 μ de large; le longueur oscille entre 18 et 60 μ . Il y a 22—26 cinéties, le plus souvent 23 ou 24. Le cil caudal est un peu raide, situé obliquement par rapport à l'axe longue du corps; 1—4 pores de la vacuole contractile sont situés dans les environs du 6-ème et 10-ème méridien (Fig. 5 B, Pl. 1, 2).

Cette espèce fut trouvée par les auteurs dans l'eau d'étang. Elle ne forme aucun kyste. Dans les conditions naturelles elle s'alimente de bactéries et de tissus animaux. Les cas de parasitisme n'ont pas été observés. Ce cilié peut être cultivé dans le milieu synthétique, seulement ses exigences sous ce rapport ne sont pas les mêmes que chez *T. pyriformis*.

Tetrahymena paravorax Corliss, 1957

Morphologiquement cette espèce ressemble tout à fait à *T. pyriformis* dont elle se distingue par la présence du cil caudal ainsi que par un nombre plus élevé des cinéties (23—30). En ce qui concerne le cycle vital cette forme se rapproche de *Tetrahymena vorax* en manifestant le même polymorphisme distinct. La longueur du corps chez la forme microstome atteint 115 μ , le nombre moyen des cinéties est 24. La forme macrostome mesure 200 μ environ de long et possède en moyen 28 cinéties. Il y a 1—6 pores de la vacuole contractile (en moyenne 3—4). Dans les conditions naturelles ce cilié se nourrit de bactéries, tissus animaux, éventuellement il dévore d'autres ciliés; on a observé aussi le cannibalisme. Dans le laboratoire il se laisse cultiver dans le milieu synthétique. Je n'ai pas retrouvé cette espèce.

Tetrahymena chironomi Corliss, 1960

Cette espèce trouvée par l'auteur dans les larves de *Chironomus plumosus* ressemble fort en ce qui concerne sa taille, la forme du corps et la structure du péristome à *T. pyriformis*, dont elle se distingue par le nombre un peu plus grand de cinéties et par le manque des parties secondaires des cinéties.

La taille moyenne mesure 40μ de long sur 23μ de large. Les individus vivant librement sont un peu plus grands. Le nombre des cinéties oscille entre 24 et 28 chez les individus parasitaires ainsi que libres. Cette espèce ne forme pas de kystes. Dans les larves de *Chironomus plumosus* elle apparaît souvent avec *T. pyriformis*. Une larve fort infectée contient 100 000—2 000 000 de ciliés, qui remplissent l'haemocoel entier. Les protozoaires provoquent la mort de leur hôte, malgré qu'ils n'attaquent jamais le tube digestif. Probablement ils s'alimentent du corps adipeux. Ils pénètrent dans la cavité du corps probablement au cours de la mue par les fentes formées dans les parois du corps.

Tetrahymena corlissi Thompson, 1955

La forme du corps chez cette espèce est variable, les deux pôles sont aigus. Le corps mesure environ 50μ de long, le nombre des cinéties oscille entre 25 et 31. Il y a deux pores de la vacuole contractile près de la cinétie 1. Il y a le cil caudal. L'animal forme les kystes de division, il n'y a pas de kystes de repos. Cette espèce était trouvée surtout dans les amphibiens et les poissons morts ou affaiblis, parfois aussi dans la mousse. *T. corlissi* est parasite facultatif mais la voie de pénétration reste inconnue. Selon un auteur seulement les poissons blessés peuvent être infectés.

Tetrahymena vorax (Kidder, Lilly, Claff, 1940)

Cette espèce décrite sous le nom *Glaucoma vorax* fut rattachée par Corliss au genre *Tetrahymena*. On observe chez cette espèce un polymorphisme distinct, qui se manifeste par l'existence de deux formes: micro- et macrostome (Fig. 2). Chez la forme microstome on peut distinguer deux stades: l'un à corps allongé, dont le bout forme une queue, mesure 30 — 115μ de long; la taille moyenne a 80μ de long sur 40μ de large. Cette forme se nourrit normalement des bactéries. L'autre stade est pyriforme et ressemble tout-à-fait à *Tetrahymena pyriformis*. Sa taille moyenne mesure 51μ de long sur 30μ de large, la longueur du corps oscille entre 28 — 80μ . Cette forme s'alimente de tissus animaux. Le péristome chez les deux stades de la forme microstome mesure 10.5μ de long sur 5.5μ de large. Il y a 17—23 cinéties, le plus souvent 19—21, 2—6 pores de la vacuole contractile. Le macronucleus est comme chez *T. pyriformis*.

La forme macrostome est largement pyriforme, son pôle postérieur fort élargi et arrondi. Le corps mesure 67 — 140μ de long mais d'après Kidder on rencontre des individus qui atteignent 250μ . La taille moyenne est de $105 \times 70 \mu$. Le macronucleus possède la même forme que chez la forme microstome, il est de seulement plus grande taille. Le péristome mesure 30μ de long sur 23μ de large. Il y a 19—26 cinéties. La vacuole contractile a 2—6 pores. La forme macrostome est prédatrice et s'il n'y a pas dans le milieu d'autres ciliés certains individus passent au cannibalisme et les autres après quelques divisions rentrent au type microstome. Je n'ai pas trouvé cette espèce.

Tetrahymena patula (Ehrenberg, 1830)

Cette espèce décrite par Ehrenberg comme *Leucophrys patula* fut rattachée par Corliss au genre *Tetrahymena*. On observe ici un polymorphisme distinct, qui se manifeste par l'existence de deux formes: micro- et macrostome (Fig. 3). Dans la nature seulement la forme macrostome apparaît. La forme microstome ne se forme que dans les conditions artificielles où

laboratoire, quand il n'y a pas d'autre nourriture que les bactéries. Cette dernière forme est typiquement pyriforme; affamée elle a la forme de concombre. La taille moyenne mesure $45\ \mu$ de long sur $28\ \mu$ de large. Le péristome a $10 \times 5\ \mu$. Il y a 2—4 pores de la vacuole contractile. La forme macrostome est plus large, irrégulièrement pyriforme ou en forme de sac avec le pôle postérieur arrondi (Pl. I 3). La taille moyenne mesure $95\ \mu$ de long sur $54\ \mu$ de large mais on a rencontré des individus qui atteignaient $150\ \mu$ de longueur. Il y a 36—42 cinéties. Le péristome mesure en moyenne 29—21 μ . Il y a 2—6 pores de la vacuole contractile. Le macronucleus irrégulièrement ovoïde mesure 40—27 μ . Cette forme est prédatrice.

J'ai trouvé cette espèce dans les environs de Cracovie dans une fosse contenant de l'eau de source où vivait *Gammarus pulex*. Le prélèvement de l'eau avec la vase au premier coup d'oeil ne contenait pas de protozoaires mais il suffisait de tuer un *Gammarus* et de l'y jeter; après quelques heures on apercevait sur son corps les petits ciliés du genre *Glaucoma* et *Sathrophilus* ainsi que les premiers, d'abord très petits individus de *T. patula* qui avalant sans cesse les autres ciliés augmentaient rapidement de taille et se divisaient. Quand il n'y avait plus de nourriture *T. patula* s'enkystait et dans une membrane mince et transparente se divisait, formant 4 petits tomites.

Tetrahymena rostrata (Kahl, 1926)

Cette espèce décrite comme *Paraglaucoma rostrata*, fut examinée par Corliss et rattachée au genre *Tetrahymena*. Le corps typiquement pyriforme avec le pôle antérieur formant un rostrum subit des changements selon la quantité de nourriture absorbée. La taille moyenne mesure environ $50\ \mu$ mais les individus repus atteignent des dimensions de $90\ \mu$ de long sur $56\ \mu$ de large. Le péristome mesure 4—5 μ de long. Les individus libres possèdent 28—37 cinéties, les parasites 41—58. Le cil caudal est présent. Le macronucleus ovoïde mesure $8 \times 5\ \mu$. La vacuole contractile chez le stade libre a 2—4 pores, chez le stade parasitaire elle en a 3—6.

Cette espèce manifeste un polymorphisme limité et adaptatif. Dans des conditions favorables le cilié se divise en état actif mais s'il manque de nourriture il forme des kystes de division qui sont ronds, entourés d'une membrane mince et ont environ $60\ \mu$ de diamètre. Le cilié se divise en général une fois. Corliss 1952 découvrit chez cette espèce l'autogamie qui a lieu aussi dans les kystes. *T. rostrata* forme aussi des kystes de repos, ovales, à membrane plus épaisse, qui mesurent $45 \times 33\ \mu$.

C'est une espèce plutôt édaphique, trouvée souvent dans le sol, litière, mousse et lichens. En principe libre (elle se nourrit alors des bactéries et de tissus animaux) elle peut devenir parasite facultatif des escargots (parfois en même temps que *T. limacis*) et des Enchytraeides. J'ai trouvé cette espèce plusieurs fois en Pologne.

Tetrahymena limacis (Warren, 1932)

Warren trouva cette espèce dans le foie de l'escargot *Deroceras agreste* et la décrit sous le nom *Paraglaucoma limacis*. Elle fut rattachée au genre *Tetrahymena* par Kozloff, d'après lequel je cite la description. C'est une espèce édaphique, rencontrée dans les mêmes milieux que *T. rostrata*. Le corps a la forme de concombre, le pôle antérieur est aigu, le postérieur arrondi (Fig. 6). La longueur oscille entre 28—68 μ , la taille moyenne mesure $50\ \mu$ de long sur $30\ \mu$ de large. Le macronucleus est irrégulièrement ovale; dans sa dépression

est situé le micronucleus rond. La vacuole contractile a 2—4 pores situés au bout de la 6, 7 et 8-ème cinéties. Les formes cultivées dans les milieux nutritifs ressemblent tout-à-fait à *Tetrahymena pyriformis*. Dans la nature on rencontre *T. limacis* plus souvent comme parasites qu'individus libres. Ils pénètrent dans les escargots probablement avec la nourriture par le tube digestif. Ils ne sont pas dangereux pour leur hôte. Ils ne forment pas de kystes.



Fig. 6. *Tetrahymena limacis*. Pôle postérieur (d'après Kozloff).

Kozloff constata ici un polymorphisme adaptatif: les individus passant à la vie parasitaire augmentent le nombre de cinéties; le stade libre en possède 25—32, le stade parasitaire 32—40. La formation des cinéties nouvelles a lieu dans la région postorale. Leur disparition par contre, qui commence quand l'individu revient à la vie libre, a lieu dans toutes les régions du corps.

Tetrahymena stegomyiae (Keilin, 1921)

Lamborn trouva cette espèce dans les larves d'*Aedes* (*Stegomyia*); Keilin l'examina et la décrit comme *Lambornella stegomyiae*. Morphologiquement cette forme ressemble à *T. pyriformis* mais son corps est plus long: 60—100 μ et la ciliature plus dense: 25—30 cinéties. Le macronucleus est rond, son diamètre mesure environ 3 μ . Cette espèce forme des kystes. Les deux chercheurs estiment que c'est un parasite constant plutôt que facultatif. D'après Keilin le parasite pénètre dans l'hôte par le tube digestif, d'après Lamborn par les fentes dans la cuticule et d'ici dans l'haemocoel. Ce protozoaire tue son hôte. D'après Corliss qui a rattaché cette forme au genre *Tetrahymena*, c'est plutôt un parasite facultatif.

Tetrahymena parasitica (Penard, 1922)

Cette espèce fut trouvée par Penard 1922 sur les branchies de *Gammarus* du lac de Genève et nommé *Glaucoma parasiticum*. D'après la description assez vague, la ciliature est ici plus dense que chez *Tetrahymena pyriformis*. Une forme semblable trouvée par Barthelmes 1960 dans les larves des *Chironomidae* fut classée par Corliss à cette espèce. Cette forme mesure 40—60 μ de long et possède 24—29 cinéties. D'après Corliss *Glaucoma parasiticum* Penard serait peut-être identique avec *Tetrahymena chironomi* mais jusqu'à l'examen détaillé de l'espèce qui parasite sur les Gammarides du lac de Genève on ne peut rien dire de sûr.

Tetrahymena faurei Corliss, 1952

L'auteur découvrit cette espèce dans le liquide cérébral et les muscles caudaux de l'embryon d'une truite élevée au laboratoire. Dans les conditions naturelles ce cilié s'alimente probablement des bactéries et de tissus frais; dans le laboratoire il se laisse cultiver dans les milieux synthétiques. La forme du corps est typique, variable. La taille moyenne mesure environ 50 μ . Cette espèce ne se distingue de *T. pyriformis* que par un nombre plus grand des cinéties: 32—37. Il y a 2 ou 3, parfois 4 pores de la vacuole contractile. La formation de kystes n'a pas été observée. Selon Corliss même, c'est une espèce incertaine; il serait souhaitable de la retrouver.

Deltopylum Fauré-Fremiet et Mugard, 1946

Les auteurs n'ont trouvé qu'une espèce, qui dès lors n'a été retrouvée par personne. Le péristome a la forme d'un triangle rectangle. Les membranelles sont sigmoïdes, situées obliquement envers la membrane ondulante. Le trait le plus spécifique de ce genre qui le distingue bien des autres *Tetrahymenidae* c'est la structure du macronucleus, qui consiste en plusieurs globules et qui subit des forts changements au cours de la division.

Deltopylum rhabdoides Fauré-Fremiet et Mugard, 1946

Cette espèce fut trouvée dans l'eau d'une rivière aux environs de Paris. "... L'aspect caractéristique de *D. rhabdoides* est montré par les individus thérontes; ceux-ci sont des Infusoires régulièrement cylindroïdes, allongés, mesurant 150 à 180 μ de long et 40 à 45 μ de diamètre; l'extrémité postérieure est arrondie; l'extrémité antérieure, faiblement atténuée s'incurve légèrement du côté dorso-latéral droit. La bouche est située ventralement dans le quart antérieur du corps; elle apparaît comme une dépression dont la forme serait à peu près celle d'un triangle rectangle"... (Fig. 7). La ciliature buccale comporte une membrane ondulante et trois membranelles adorales dont les bases contournées plongent dans le cytostome. La ciliature somatique comporte environ 70 cinéties; deux de celles-ci sont postorales. La vesicule contractile est située au milieu du corps, sur le côté droit. Le macronucleus se compose de plusieurs globules dispersées dans le protoplasme. Parmi eux se trouvent 4—5 petits, ronds micronuclei. Ce cilié manifeste un polymorphisme limité de même que *Tetrahymena*. Comme théronte il nage très vite en tournant sur lui-même suivant un trajet hélicoïde; c'est un histiophage typique: il ne mange ni de bactéries ni de petits ciliés; il est attiré exclusivement par les tissus frais. Quand il les trouve il commence à s'alimenter intensivement et devient traphonte. Le corps se remplit de nourriture sous forme de boules réfringentes et augmente sa taille jusqu'à 230×140 μ . Gorgé de nourriture le trophonte devient ovoïde et sa longueur peut dépasser 300 μ . Ses mouvements deviennent lents et l'appareil buccal se différencie. Ainsi il devient tomonte. Après 12 heures environ l'animal en nageant toujours se divise deux fois de suite, donnant 4 tomites qui parfois demeurent quelques temps associés en chaînes. Avant la division le macronucleus du tomonte s'entasse en prenant la forme d'un ruban ramifié et ensuite celle d'une masse ovoïde. Après la formation de la bouche chez la deuxième génération des tomites le macronucleus reprend sa forme primaire. Les tomites sont régulièrement

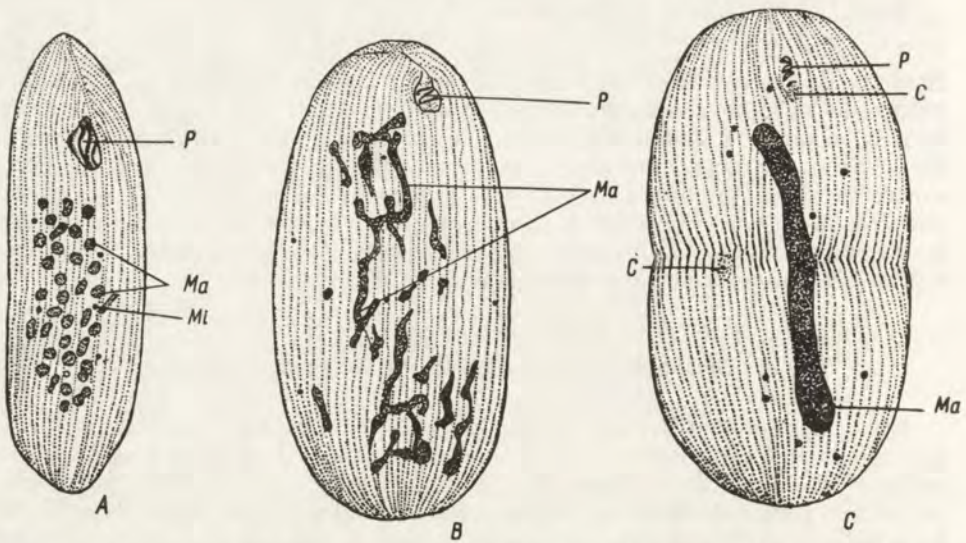


Fig. 7. *Deltopylum rhabdoides*. A — théronte: P — péristome, Ma — globules du macronucleus, Mi — un des micronuclei; B — avant la première division: P — les membranelles buccales se tronçonnent, Ma — le macronucleus se condense en un long ruban ramifié; C — première division: P — les membranes buccales disparaissent, c — champ de cinétosomes, Ma — le macronucleus est condensé en une seule masse (d'après M u g a r d)

ovoïdes et mesurent environ $100\ \mu$ de long sur $50\ \mu$ de large. La cinétie 1-ère et 2-ème donnent l'origine au champ des cinétosomes, qui reconstruisent l'appareil buccal. Les tomites achèvent la digestion de la nourriture avalée par le trophont; leur protoplasme devient transparent et le corps s'allonge reprenant l'aspect caractéristique du théronte.

Paratetrahymena Thompson, 1963

L'auteur ne précise pas suffisamment les caractères génériques qui distinguent cette forme des autres *Tetrahymenidae*. On sait seulement que le péristome est ici plus large que celui de *Tetrahymena*, pyriforme ou ovale. Sa structure est la même que chez *Tetrahymena*. Ce genre ne contient qu'une espèce à savoir

Paratetrahymena wassi Thompson, 1963

Je cite la description d'après l'auteur qui trouva cette espèce dans l'embouchure saumâtre d'une rivière en Virginie (USA). Le corps de ce cilié est allongé, l'extrémité antérieure légèrement atténuée, l'extrémité postérieure arrondie (Fig. 8). La taille moyenne mesure $55\ \mu$ de long sur $22\ \mu$ de large. Le nombre des cinéties oscille entre 22—26. Il y a un cil caudal. Le péristome est largement pyriforme jusqu'à ovale et se trouve tout près du pôle antérieur. Il mesure $11\ \mu$ de long sur 8.5 de large. M_1 et M_2 sont situées dans la partie haute du péristome obliquement par rapport à UM. M_3 est située dans la partie basse du péristome, tout près du cytotome.

La vacuole contractile se trouve près du pôle antérieur. Le macronucleus est sphérique ou ovoïde, son diamètre mesure environ 5 μ .



Fig. 8. *Paratetrahymena wassi* (d'après Thompson, schématisé)

C'est dommage, que l'auteur ne donne dans la description aucune information sur la biologie de l'animal qui était pourtant cultivé dans le laboratoire (la nourriture? le polymorphisme?)

Sathrophilus Corliss, 1960

Synonyme: *Saprophilus* Stokes, 1887

Stokes créa ce genre en décrivant la forme *Saprophilus agitatus*. Corliss 1960 ayant constaté que ce nom était déjà pris l'a changé en *Sathrophilus*.

Les ciliés appartenant à ce genre sont au premier coup d'oeil difficiles à distinguer de *Tetrahymena*. Le corps est plus ou moins ovoïde, son pôle antérieur aigu peut s'allonger un peu pendant l'alimentation en forme de rostrum. Le péristome possède en principe la même structure que chez *Tetrahymena*: une membrane ondulante du côté droit du péristome est située parallèlement à l'axe longue du corps; trois membranelles du côté gauche du péristome sont situées obliquement envers UM (Fig. 9). La première différence qu'on peut apercevoir en observant les animaux vivants c'est qu'ils ne montrent aucun polymorphisme. L'animal affamé ou repu ne change pas sa forme essentielle; son cytoplasme devient plus ou moins transparent comme chez tous les ciliés mais jamais la nourriture avalée ne prend la forme de boules réfringentes comme chez *Tetrahymena*. Le côté ventral est aplati et le péristome déplacé un peu à droite; grâce à cela chez les

animaux observés entre lame et lamelle on peut voir distinctement la membrane ondulante qui s'échappe du péristome.

Chez maintes formes les fibrilles transversales entre les cinéties sont tellement fortes qu'on peut les apercevoir chez l'animal vivant. Toutes les espèces redécrites jusqu'ici possèdent le cil caudal.

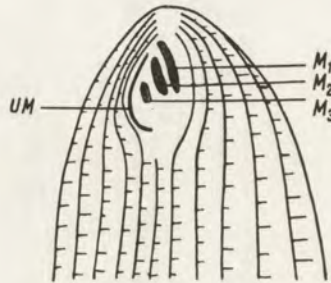


Fig. 9. Structures buccales chez *Sathrophilus* (schématisé) (original)

Les ciliés appartenant à ce genre sont petits: ils ne dépassent pas $60\ \mu$. A l'exception de *Sathrophilus muscorum* toutes les autres espèces étaient rencontrées dans l'eau en présence de tissus pourrissants des animaux ou des plantes. Ils se divisent toujours à l'état actif.

Sathrophilus agitatus (Stokes, 1887)

Ce cilié décrit en 1887 par Stokes n'a pas été retrouvé jusqu'ici. C'est une espèce caractéristique, relativement facile à reconnaître (Fig. 10 B). Le corps est fort aplati, les deux extrémités sont un peu amincies. Le cytoplasme est clair, transparent. Le corps est très flexible: il peut s'allonger, s'amincir, se plier quand l'animal rampe sur le substrat. Il mesure $40\text{--}50\ \mu$ de long. Les cils sont rangés en $24\text{--}26$ cinéties. Dans la partie antérieure de la cinétie les cinétosomes sont plus serrés que dans la postérieure, mais toujours rangés très régulièrement. (Pl. II. 9, 10). Sur le pôle postérieur il y a un cil caudal, court et raide. Le péristome est large, très bien visible chez l'animal vivant avec la membrane ondulante vibrant rapidement. L'animal qui s'alimente

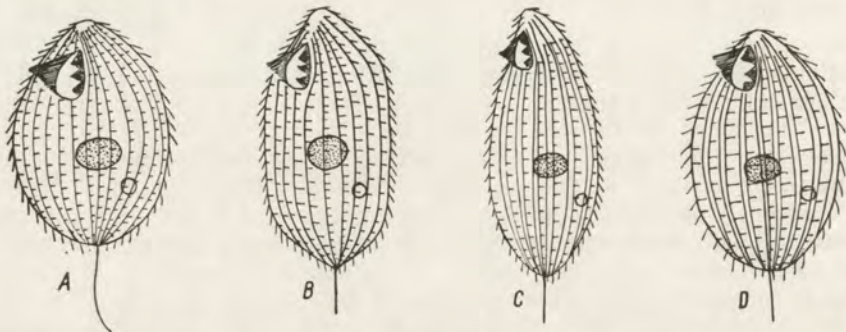


Fig. 10. A — *Sathrophilus putrinus*, B — *S. agitatus*, C — *S. granulatus* D — *S. ovatus*. (original)

rampe sur le substrat; les individus qui cherchent la nourriture nagent très vite en tourbillonnant. Ils sont tellement mobiles qu'en masse ils ressemblent à un essaim d'abeilles. Stokes exprima très juste ce caractère dans le nom d'espèce. Ce sont des histiophages typiques, attirés par les tissus frais. J'ai trouvé cette forme dans l'eau d'étang. Elle se laisse cultiver très facilement et se multiplie rapidement. Elle ne forme pas de kystes.

Sathrophilus muscorum (Kahl, 1930)

Cette espèce a été redécrite à l'aide de techniques modernes par Thompson et Cone 1962. Le corps est ovale et aplati; il mesure 25—30 μ de long et 15—20 μ de large. Le péristome a 10 μ de long sur 5 μ de large. Les cils sont rangés en 15—17 cinéties dont une postorale. Les cils sont relativement longs (8 μ). Sur le pôle postérieur il y a un long (23 μ) cil caudal. Cette espèce forme des kystes de repos. C'est une forme édaphique, rencontrée dans le sol et la litière. Elle se nourrit de bactéries, de flagellés et de levures.

Sathrophilus putrinus (Kahl, 1926)

Cette espèce n'a pas été redécrite jusqu'ici à l'aide de techniques modernes. Le corps est largement ovoïde, le côté ventral aplati, l'extrémité antérieure aigüe, l'extrémité postérieure arrondie. Le corps a 30—45 μ de long. Le cytoplasme est clair, on peut apercevoir les cinéties et même les fibrilles transversales chez l'animal vivant. Le nombre des cinéties oscille entre 23—25; une cinétie est postorale (Fig. 10A, Pl. I 4—8). Le cil caudal est long et souple. Le péristome est assez large et très bien visible chez l'animal vivant. Les mouvements de l'animal sont lents; il rampe sur le substrat, de temps en temps il s'en détache, nage un moment et retombe au fond. Il est commun, facile à trouver dans l'eau d'étang. Il se nourrit de bactéries ainsi que de tissus.

Sathrophilus ovatus (Kahl, 1926)

Cette espèce n'a pas été redécrite à l'aide de techniques modernes. Le corps est ovoïde, faiblement aplati et peu flexible. Il mesure 40—50 μ de long. Il y a un cil caudal sur le pôle postérieur. Le péristome est situé tout près du pôle antérieur. L'infracliatüre chez cette espèce est assez caractéristique, étant rangée en 19—20 cinéties, dont chacune possède une partie principale et secondaire. Les fibrilles transversales qui sortent de la partie principale viennent parfois jusqu'à la partie secondaire (Fig. 10 D, Pl. II 13). Cette espèce trouvée dans l'eau d'étang s'alimente de bactéries ainsi que de tissus animaux. Ses mouvements sont lents; il rampe sur le substrat.

Sathrophilus granulatus sp. n.

Le corps de ce cilié est allongé, aplati, il mesure 50—60 μ de long; l'extrémité antérieure est atténuée (Fig. 10 C, Pl. II. 11, 12). La ciliature est dense et courte. Les cils sont rangés en 21—22 cinéties composées de deux parties: principale et secondaire, situées l'une tout près de l'autre. La partie secondaire contient aussi des cinétosomes mais moins que la partie principale. Les cinétosomes sont rangés irrégulièrement. Sur le pôle postérieur il y a un court cil caudal. Le macronucleus est ovale; il est situé à peu près au milieu du corps. Le péristome est typique, sa longueur est égale à 1/5 de la longueur du corps. Chez cette espèce le cytoplasme a l'air bien caractéristique parce qu'il contient toujours des granules foncées qui ne disparaissent pas même chez les individus affamés. Ceux-ci sont un peu plus allongés et nagent très

vite. Après avoir trouvé la nourriture ils tombent au fond et commencent à ramper sur le substrat. J'ai trouvé cette espèce dans la mousse. On peut la cultiver très facilement sur l'extrait du foin contenant des bactéries ainsi que sur des tissus.

Glaucoma Ehrenberg, 1830

Le corps des ciliés appartenant à ce genre a la forme invariable grâce à la pellicule assez raide. Son extrémité postérieure ne s'allonge jamais en rostrum. La forme du péristome est ovale; il est situé plus ou moins obliquement par rapport à l'axe du corps. *Maupas* 1883 attira l'attention sur la structure spécifique de l'appareil buccal, qui selon lui se compose de "...deux membranes ou plutôt deux lèvres vibratiles..., assez épaisses..., agitées continuellement d'un mouvement vibratile... Elles saisissent ainsi toutes les particules nutritives..." *Kahl* 1930 donne une description beaucoup plus détaillée, comparable aux résultats obtenus à l'aide de techniques modernes: "Es ist ein Oblong, das stets im Winkel (etwa 45°) zur Längsachse, von vorn rechts nach hinten links gerichtet ist. Ausser der Vorderseite ist es von einem Ectoplasmasaum umgeben, der hinten die trichterartige nach links gerichtete Verlängerung der Grube überdeckt... Im Innern sind die Wimperorganellen inseriert: 1. Die "äussere Mbr. deckt zuckend und flackernd die äussere Mündung; sie steht links unter dem Saum. 2. Die dicke innere Mbr. darunter inseriert, auffallend durch ihren breiten freien Rand, der die Gestalt eines zum Schlunde weisenden Türkenschwertes hat; sie zuckt vor und zurück... 3. Ein dreireihiges Wimperfeld, das rechts neben der inneren Mbr. in den Trichter fährt..." La "membrane extérieure" correspond alors à M_1 , la membrane intérieure à M_2 et le champ ciliaire à M_3 et UM (Fig. 11). Sur



Fig. 11. Structures buccales chez *Glaucoma* (schématisé) (original)

les préparations argentées on voit en effet que M_2 chez toutes les espèces connues est la plus large. Elle consiste en plusieurs rangées de cinétosomes dont le nombre varie selon l'espèce. M_3 est la plus faible; il paraît, qu'elle est formée de deux rangées de cinétosomes. Il est évident que deux "lèvres" décrites par *Maupas* très bien visibles en effet chez l'animal vivant correspondent à M_1 et M_2 . Toutes les trois membranelles sont presque aussi longues que le péristome entier et plus ou moins parallèles à la membrane ondulante.

Ces ciliés s'alimentent de bactéries. Le polymorphisme n'est connu que chez une seule espèce (*G. frontata*).

Glaucoma scintillans Ehrenberg, 1830

Cette espèce est le représentant le plus typique du genre. Le corps est largement ovale, le côté ventral aplati, le côté dorsal convexe. La ciliature se compose de 33—40 cinéties dont 7—9 sont postorales. Il y a les parties secondaires des cinéties sous forme de faibles lignes légèrement ondulées, courant entre les cinéties principales. Le corps mesure 40—70 μ de long. Le péristome est typique, situé au milieu du corps, assez loin du pôle antérieur (Pl. II 14, 15). Le cytoplasme ainsi que les vacuoles digestives sont claires. Ce cilié s'alimente des bactéries et vit dans des milieux abondant en matière organique pourrissante.

Il faut considérer comme une espèce douteuse *Glaucoma macrostoma* Schewiakoff qui doit se distinguer de *G. scintillans* par un péristome plus grand (1/3 du longueur du corps) ainsi que par le pôle postérieur, plus arrondi. Kahl 1932 suppose, que ce n'est qu'une modification de *Glaucoma scintillans*; Corliss 1954 la tient pour une espèce indépendante. Je n'ai pas trouvé cette forme.

Glaucoma chattoni Corliss, 1959

Cette espèce d'après la description de Corliss se distingue de *G. scintillans* par la forme du corps, qui est plus ovoïde, avec la partie antérieure amincie, ainsi que par la position du péristome qui est situé tout près du pôle antérieur. Il y a 22—30 cinéties. Leur parties secondaires sont très faibles, parfois elles manquent. Il y a 5—6 cinéties postorales. Le corps mesure environ 50 μ de long. Je n'ai pas retrouvé cette forme.

Glaucoma reniformis Schewiakoff, 1893

La partie antérieure du corps chez cette espèce est atténuée, le côté ventral dans la région du péristome concave; en conséquence l'animal vu de profil est réniforme. Le péristome est situé tout près du pôle antérieur. Le corps mesure 35—50 μ de long. La ciliature comporte 26—29 cinéties, dont en moyenne 5 postorales. (Pl. II 16).

Les individus argentés visibles sur 1 a photo 16 proviennent de la culture à Gif-sur-Yvette.

Glaucoma kirki Bary, 1950

Je cite la description de cette espèce d'après l'auteur qui la trouva dans les eaux douces de la Nouvelle Zelande.

Le corps est ovoïde, le plus large dans la région au-dessous de l'équateur; les individus affamés sont plus elliptiques. Le corps mesure 25—45 μ de long et 24 μ de large. La ciliature se compose de 30 cinéties environ, dont 5—6 postorales. Dans la partie antérieure du corps les cinéties sont distinctes et les distances qui les séparent, régulières. Dans la partie postérieure les cinéties sont moins distinctes et irrégulièrement réparties.

Les caractères qui distinguent cette espèce des autres: 1. Le macronucleus est très grand — son diamètre égale aux 2/3 du longueur du corps dans la région la plus large. 2. Sur le pôle antérieur à gauche du péristome se trouve un petit processus en forme de coupole.

Glaucoma myriophylli Penard, 1922

Cette espèce découverte par Penard n'a pas été redécrite jusqu'ici à l'aide de techniques modernes. Corliss 1954 citant les espèces "certaines" du genre *Glaucoma* ne la prend pas en considération, malgré que Kahl 1930 annonce que cette forme est assez fréquente dans les environs de Hamburg. C'est un cilié très caractéristique, à corps largement ovoïde, mesurant 100—140 μ . (Pl. III 17—21, IV 22, 23). Le côté dorsal est fort convexe, ventral plat. La ciliature est dense — il y a environ 100 cinéties dont à peu près 10 postorales. Penard 1922 décrit les fortes fibrilles transversales entre les cinéties et Kahl remarque, qu'elles forment de petits champs carrés sur la pellicule, non complètement fermés. D'après mes propres observations plusieurs fibrilles transversales viennent jusqu'à la cinétie voisine et forment de cette façon de petits champs fermés. Les autres, plus courts, n'atteignent pas la cinétie laissant de petits champs inachevés. La pellicule porte donc une structure reticulée distincte (Pl. IV 22). En examinant la bouche de cet animal du côté ventral on ne voit que deux membranelles très épaisses. Après avoir examiné une série de préparations j'ai trouvé un individu situé obliquement d'une telle manière, que le pôle apical du corps était visible ainsi que le côté latéro-ventral. Dans cette position toutes les structures de la bouche étaient parfaitement visibles (Fig. 12). Toutes les trois membranelles sont

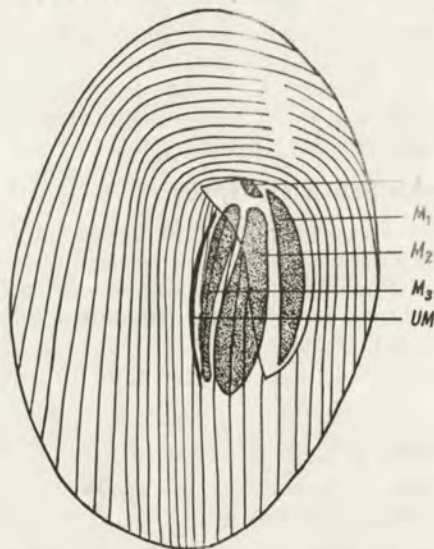


Fig. 12. Appareil buccal de *Glaucoma myriophylli*. \times — structure énigmatique (dessiné à l'aide de l'appareil d'Abbe) (original)

à peu près de la même longueur et sont situées parallèlement. M_3 est la plus mince. Celle-ci, ainsi que la membrane ondulante (UM), ne sont pas visibles du côté ventral, cachées par la puissante M_2 , la plus épaisse. Au-dessus de cette dernière se trouve, une structure conique analogue à celle qu'a trouvée Corliss 1954 chez *Glaucoma frontata*. Il est évident, que chez l'animal vivant ainsi que sur les préparations argentées examinées du côté ventral

on voit exclusivement les deux premières membranelles, très fortes, à l'aide desquelles le cilié ramasse les bactéries. Les cinétosomes des membranelles ne sont pas bien visibles. Il paraît que M_1 et M_3 en ont trois rangées environ tandis que M_2 en a au moins six.

En ce qui concerne l'écologie de cette espèce Penard écrit que "...Ce *Glaucoma* ne s'est rencontré que dans le *Myriophyllum*... et on se demande s'il y aurait quelque organisme ou microbe spécial lui-même à ce genre de végétaux, dont l'Infusoire serait particulièrement friand..." Kahl éclaircit ces doutes en constatant que cette espèce vit exclusivement dans le milieu sapropélique ou elle s'alimente de bactéries du groupe *Beggiatoa*; les granules noirs réfringentes visibles dans les vacuoles digestives de ce cilié sont justement les grains de sulfure. Kahl 1935 annonce avoir rencontré cette forme dans le détritit d'un étang c'est-à-dire dans un milieu mezosaprobio-tique. Les individus de *Glaucoma myriophylli* trouvés dans ce milieu étaient plus minces mais toujours faciles à reconnaître d'après la structure reticulée à mailles rectangulaires de la pellicule.

Je n'ai trouvé cette espèce que dans les milieux sapropéliques: dans un égout à Forges-les-Bains aux environs de Paris où les parois du réservoir

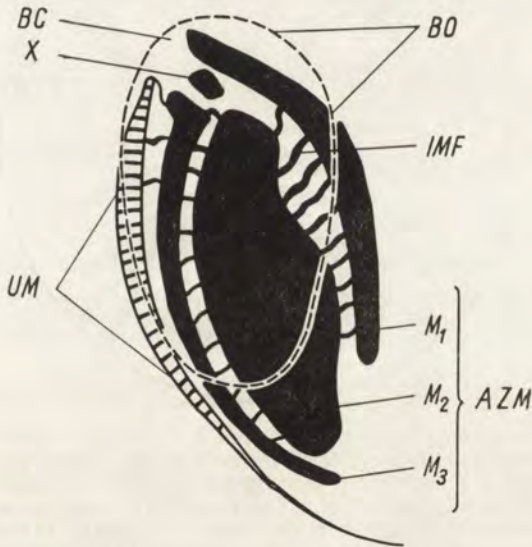


Fig. 13. Appareil buccal de *Glaucoma frontata*: IMF — fibrilles entre les membranelles, BC — cavité buccale, BO — marge de l'ouverture buccale, x — structure énigmatique (d'après Corliss)

étaient couvertes de *Beggiatoa* et ensuite en Pologne dans une petite rivière Kruszwica, polluée par les eaux résiduelles d'une brasserie; les pierres dans cette rivière étaient aussi couvertes de *Beggiatoa*.

Glaucoma frontata (Stokes, 1886)

Stokes décrit cette espèce sous le nom *Diplomastax frontata*; peu après il la plaça dans le genre *Diplomestoma* et enfin *Dallasia*. Da Cunha 1913

la décrit de nouveau comme *Glaucoma frontatum*. Kahl 1931 a corrigé ce nom en *G. frontata*.

Le corps de ce cilié est allongé, la partie postérieure forme une sorte de "queue", le pôle antérieur est arrondi. La ciliature comporte environ 40 cinéties, dont 7—9 postorales. La structure du péristome fut étudiée en détail par Corliss 1954 à l'aide de la technique d'imprégnation (Fig. 13). La deuxième membranelle est ici exceptionnellement forte, ayant pour base environ 15 rangées de cinétosomes; elle mesure 22 μ de long et 9 μ de large. Entre M_2 et les deux membranelles voisines courent les fibrilles transversales. Entre les extrémités antérieures de M_1 et M_2 se trouve une structure énigmatique. La membrane ondulante a comme base une rangée de courtes stries parallèles.

Cette espèce a un cycle vital distinct décrit par Calkins and Bowling 1928 (Fig. 14). La forme principale dont le corps est allongé en queue est



Fig. 14. Cycle de *Glaucoma frontata*. 1 — forme à queue, 2 — forme en navette avant formation de la queue, 3 — division de la forme à queue, phase précoce, 4 — individu dégénéré de la forme à queue dont peut se développer la forme amoéboïde 4 a, 5, 6 — division de la forme à queue; phase avancée, 7 — conjugaison, 8, 9 — après la conjugaison les individus rentrent à la forme à queue, 10 — forme en navette typique qui apparaît dans la culture en 2—3 jours, 11 — première division de la forme à queue, 12 — deuxième division de la forme à queue, 13 — troisième division de la forme à queue donnant 8 individus, 14, 15 — quatrième division de la forme à queue et copulation des gamètes qui forment huit zygotes, 16 — développement de la zygote en un jeune individu, 17 — jeunes formes intermédiaires (d'après Calkins et Bowling)

relativement grande; sa taille oscille dans les limites de 105 μ de long sur 22 μ de large jusqu'à 140 μ de long sur 36 μ de large. Elle a l'air d'un requin microscopique. La longueur et la forme de la queue sont variables; chez les individus repus elle peut disparaître tout à fait. De tels individus sont lourds, souvent ils s'attachent à l'aide de l'extrémité postérieure au substrat et dans cette position exécutent avec l'extrémité antérieure des mouvements

circulaires. Cette forme subit la conjugaison. Sous l'influence de facteurs encore inconnus au cours d'un certain nombre de générations la queue peu à peu disparaît et les ciliés prennent la forme de navette. Ces formes ne s'attachent pas au substrat et nagent avec une rapidité stupéfiante. Après 24 heures environ la plupart se divisent quatre fois en donnant l'origine aux 16 petites cellules. Les individus formés au cours de la première division (gamontes I) sont petits (21—25 μ), ellipsoïdes et plus calmes — ils ont tendance à se poser sur le fond. Après la deuxième division les gamontes peuvent bouger encore mais leurs mouvements sont irréguliers et spasmodiques. La troisième division forme des cellules immobiles (gametocytes), qui restent suspendues dans l'eau à deux. La quatrième division donne l'origine aux petits gamètes immobiles entourés à deux d'une membrane fine. L'individu d'une telle paire mesure 12 μ environ. Les individus dans la membrane copulent et leur noyaux forment la zygote, qui ensuite donne l'origine à la petite forme à queue. Ce cycle a quelque chose d'exceptionnel à savoir deux manières de fécondation: conjugaison et copulation.

Je n'ai pas réussi à retrouver cette espèce.

Colpidium Stein, 1860

Le corps ovoïde de ce genre est latéralement comprimé et sa partie antérieure incurvée vers le côté ventral. Dans la dépression formée de cette manière est situé le péristome dont la forme est triangulaire (Fig. 15). La

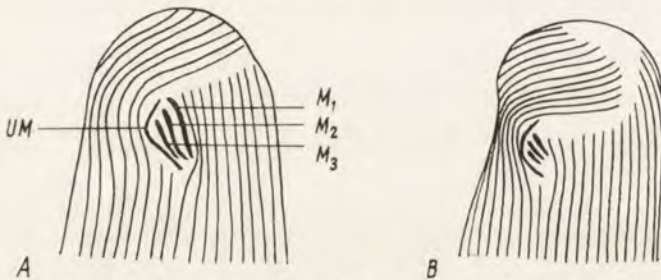


Fig. 15. Infraciliature de la région buccale chez *Colpidium* (schématisé) A — côté ventral, B — côté latéral (original)

membrane ondulante forme ici un arc, dans l'intérieur duquel sont situées les trois membranelles. M_1 et M_2 ont à peu près la même longueur, M_3 est la plus courte. La ciliature de la partie antérieure du corps forme un dessin très caractéristique à savoir les cinéties rangées à droite du péristome se courbent au-dessus de lui vers la gauche en formant une bande transversale préorale et laissent sur le pôle antérieur un petit champ ovale privé de cils. Sur le pôle postérieur il y a quelques cils caudaux.

Toutes les espèces qui appartiennent à ce genre ont la même forme fondamentale du corps et ne se distinguent que par la taille et le nombre des cinéties. Elles sont toutes exclusivement bactériophages et apparaissent en masse dans les eaux polluées.

Corliss 1953 distingue cinq espèces à savoir:

Colpidium colpoda (Ehrenberg, 1831)

C'est l'espèce la plus grande, mesurant 90—120 μ . Les cils rangés en 50—60 cinéties. La torsion préorale des cinéties est accentuée. Le pore de la vacuole contractile se trouve sous l'équateur près des cinéties 14—16. (Pl. IV 24).

Colpidium striatum Stokes, 1886

La forme du corps plus svelte, l'animal mesure 75—95 μ ; il y a 32—40 cinéties. La torsion est moins accentuée. Le pore de la vacuole contractile se trouve dans la moitié postérieure du corps près des cinéties 8—10. (Pl. IV 25).

Colpidium colpidium (Schewiakoff, 1889)

Le corps allongé mesure 65—85 μ ; 24—33 cinéties, la torsion faible. Le pore de la vacuole contractile dans le dernier tiers du corps près de la cinétie 5.

Colpidium campylum Stokes, 1886

Le corps est mince — sa largeur s'égale à 1/3 de sa longueur; il mesure 55—70 μ . Il y a 20—24 cinéties. La torsion faible. Le pore de la vacuole contractile près du pôle postérieur, dans la région de la cinétie 5.

Colpidium truncatum Stokes, 1885

Le corps trapu, son pôle antérieur un peu tronqué. 22—27 cinéties. La torsion très faible. Le pore de la vacuole contractile dans le dernier quart du corps près de la cinétie 5.

Loxocephalus Eberhard, 1867

En 1867 Eberhard décrit sous le nom *Loxocephalus luridus* un cilié saprobiotique pourvu de caractères bien distincts. Après vingt ans environ Stokes découvrit dans le même milieu une forme pareille montrant pourtant certaines petites modifications de la ciliature. Il l'a nommée *Dexiotricha plagia*. Les chercheurs suivants en décrivant les espèces voisines utilisaient le nom *Loxocephalus*. Kahl 1932 qui disposait déjà d'un vaste matériel comparatif a rattaché *Dexiotricha plagia* Stokes à ce genre comme *Loxocephalus plagius*. Jankowski 1964 après avoir examiné à l'aide de la technique d'imprégnation quatre espèces a scindé de nouveau ce genre en *Loxocephalus* et *Dexiotricha* à cause d'insignifiantes différences dans la ciliature à savoir: chez *Loxocephalus luridus* le corps entier est couvert de cils et sur le pôle postérieur se trouve un faisceau de cils caudaux. *Dexiotricha plagia* possède seulement un cil caudal et sur le pôle antérieur un champ rond privé de cils. Or, un petit champ dépourvu de cils et plusieurs cils caudaux au lieu d'un ne sont pas des caractères suffisants pour créer un genre nouveau. A part cela Jankowski disposait d'un matériel beaucoup moins ample que Kahl; ce dernier a trouvé dans les eaux saumâtres d'Oldesloe une forme aux caractères mélangés (le pôle antérieur privé de cils, plusieurs cils caudaux) et l'a nommée *Loxocephalus intermedius*. Il est évident qu'il n'y a même pas une limite distincte entre ces deux types, considérés par Jankowski

comme genres particuliers. Les changements de noms taxonomiques sans fondement sérieux n'apportent à la science rien sauf la désorientation; il paraît que dans cette situation le plus raisonnable serait de rétablir le nom *Loxocephalus* pour toutes les formes, comme Kahl l'avait fait, d'autant plus que les caractères essentiels sont communs à savoir:

Les ciliés appartenant au genre *Loxocephalus* ont le corps fusiforme et dans la région du péristome les cinéties transversales. Il y a un ou plusieurs cils caudaux. La pellicule possède une structure réticulée. L'endoplasme est rempli de petits grains réfringents qui provoquent une coloration foncée, parfois presque noire de l'animal. Le péristome est très petit par rapport à la taille du corps et sa structure est identique chez toutes les espèces; en principe il ressemble au péristome de *Tetrahymena*: trois petites membranelles, dont la plus grande est M_2 et la plus petite M_3 sont situées obliquement en rapport à la membrane ondulante qui se trouve à droite du péristome et s'incurve en bas vers le côté gauche¹. Toutes les formes qui appartiennent à ce genre vivent dans le milieu sapropélique et s'alimentent de bactéries. On peut supposer que les rangées transversales des cils facilitent l'alimentation en provoquant des tourbillons supplémentaires de l'eau. Cette supposition est confirmée par le comportement des animaux qui pendant l'alimentation restent sans bouger près du substrat en battant des cils.

Loxocephalus luridus Eberhard, 1867

Cette espèce a été redécrite à l'aide de la technique d'imprégnation par Jankowski 1964. Le corps fusiforme mesure 120—160 μ de long et est presque noir grâce aux grains réfringents dispersés abondamment dans l'endoplasme. La pellicule a une structure réticulée à mailles hexagonales; seulement dans la région de la bouche ceux-ci sont rectangulaires. Les cils sont rangés en 120 cinéties qui sur le côté dorsal et ventral gauche sont situées parallèlement, tandis que sur le côté ventral droit, obliquement; en conséquence elles n'atteignent pas toutes le pôle postérieur. La ciliature de la partie antérieure du corps a l'air très caractéristique car les cinéties situées à gauche du péristome s'incurvent au-dessus de lui à droite et passent transversalement en laissant une bande étroite libre de cils qui les sépare des cinéties du côté droit. Cela ressemble fort à la ciliature de *Colpidium* avec cette différence que dans cette dernière les cinéties du côté droit du péristome passent à gauche. A part cela du côté droit du péristome il y a 9 rangées transversales de cils. (Fig. 16 A). Le péristome est remarquablement petit en comparaison avec la taille du corps, le plus petit des péristomes parmi *Tetrahymenidae*. L'appareil nucléaire situé au milieu du corps est formé par le macronucleus, grand et rond et 4—5 micronuclei. La vacuole contractile est située au-dessous du noyau.

Loxocephalus plagius (Stokes, 1885)

Cette espèce décrite sous le nom *Dexiotricha plagia* a été redécrite à l'aide

¹ Il reste encore à tirer au clair ce que Jankowski appelle "additional membrane" — une courte rangée de cinétosomes au-dessus de la membrane ondulante. D'après mes propres observations il s'agit simplement de l'extrémité de la première cinétie à droite du péristome qui n'est pas rompue comme on voit sur les dessins de Jankowski mais continue avec les cinéties suivantes jusqu'au champ nu sur le pôle antérieur (voir Pl. IV 28). Jankowski a dû se baser sur des préparations mal imprégnées.

de techniques modernes par Jankowski 1964. Le corps fusiforme $61 \times 27 \mu$, les deux pôles sont arrondis; le pôle antérieur est dépourvu de cils et sur le postérieur il y a un cil caudal. Chez l'animal vivant on voit que la partie antérieure du corps est légèrement courbée à gauche. Sous un faible grossissement l'animal est brunâtre ou presque noir grâce aux grains réfringents.

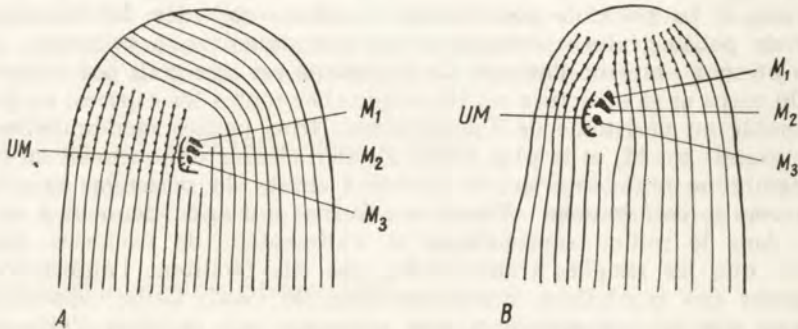


Fig. 16. Infraciliature de la région buccale chez *Loxocephalus luridus* (A) et *Loxocephalus granulatus* (B) (schematisé) (original)

A droite du péristome 7 cinéties transversales prennent leur commencement. La pellicule a une structure réticulée à mailles rectangulaires. Le macro- et micronucleus sont situés au milieu du corps au même niveau que la vacuole contractile. Les cils sont rangés en 38 cinéties, parallèles sur le côté dorsal et se rencontrant sous un certain angle sur le côté ventral; par conséquent elles n'atteignent pas toutes le pôle antérieur. Il y a trois cinéties postorales.

Loxocephalus raikovi (Jankowski, 1964)

Selon l'auteur in vivo impossible à distinguer de l'espèce précédente: la forme et la couleur du corps, la position du noyau et de la vacuole contractile sont identiques. Pourtant les dimensions du corps sont plus petites ($50 \times 23 \mu$) ainsi que le nombre des cinéties: 20—22.

Loxocephalus colpidiopsis Kahl, 1926

Selon Jankowski qui a redécrit cette espèce la forme et les dimensions du corps (51×24) ressemblent à ceux de *L. raikovi* mais l'appareil nucléaire et la vacuole contractile sont situés près du pôle postérieur au niveau du cytophyge. Il y a 24 cinéties, toutes parallèles, dont 3 postorales.

Loxocephalus granulatus Kent, 1882

Cette espèce observée in vivo ressemble au premier coup d'oeil à *Colpidium campylum* grâce à la courbature spécifique de la partie antérieure du corps. Le pôle antérieur est nu et obliquement tronqué. L'animal a 45—60 μ de longueur. Il possède 30—32 cinéties parallèles dont 3 postorales (Fig 16 B Pl. IV 26—28). La pellicule a la même structure réticulée à mailles rectangulaires que les espèces précédentes (Pl. IV 29). La vacuole contractile est située

dans le dernier quart du corps. Les cils des rangées transversales, dont il y a sept, sont forts, bien visibles sur l'animal vivant. J'ai trouvé cette espèce dans l'infusion pourrissante du foin.

Conclusions

Après cette revue systématique revenons encore à la caractéristique de la famille formulée par Corliss à laquelle Jankowski, qui tâchait d'opposer ses *Loxocephalidae* aux *Tetrahymenidae*, ajoute: "absence of pelticular rectangular argentophilic structures." Comme nous savons, *Loxocephalus* scindé par Jankowski en deux genres: *Dexiotricha* et *Loxocephalus*, possède une structure réticulée de la pellicule. Jankowski remarque qu'une pareille structure rectangulaire se trouve chez le genre *Uronema* et prétend que "*Uronema* closely resembles *Dexiotricha* on impregnated mounts" et que "*Uronema* is related to *Dexiotricha* as well as to *Cyclidium*". Or, quant à la structure réticulée, ses commencements apparaissent chez le genre *Sathrophilus* dont l'existence est visiblement ignorée par Jankowski parce qu'il ne le cite même pas parmi les genres appartenant aux *Tetrahymenidae*. Chez quelques espèces de ce genre l'infraclivature est plus dense grâce aux parties secondaires des cinéties. Les fibrilles transversales sortant des cinéties principales atteignent souvent leurs parties secondaires en formant de petits champs carrés. Ce n'est pas un réseau régulier comme chez *Loxocephalus* mais c'est une tendance vers un tel type de structure. Chez *Glaucoma myriophylli* ces fibrilles transversales forment un réseau de petits champs distincts. Il est vrai, que cette structure ne se trouve que chez la seule espèce de *Glaucoma*. Néanmoins elle attira l'attention de chercheurs aussi remarquables que Pénard et Kahl. Après avoir pris en considération ces faits il faut rejeter de la caractéristique des *Tetrahymenidae* ce que Jankowski y a ajouté et laisser la définition de Corliss qui est parfaite.

Ce problème a d'ailleurs un aspect plus général. Comme il résulte des recherches de Raabe 1959, en étudiant les espèces voisines on peut trouver chez l'une la structure réticulée de la pellicule qui manque chez l'autre. La formation d'une telle structure peut avoir lieu si les cinéties s'écartent ou bien si leur nombre diminue. Cela prouve qu'on ne peut pas prendre ces structures comme base des considérations phylogénétiques car elles n'ont qu'une importance secondaire. Le critère le plus important reste la structure de l'appareil buccal et de ce point de vue la conclusion de Jankowski à propos de la ressemblance entre *Uronema* et *Loxocephalus* est étonnante. Visiblement elle est le résultat de l'ignorance de la structure du péristome chez *Uronema*, ce que prouve d'ailleurs le dessin où les membranelles sont mal marquées. Jankowski appliqua la méthode de Klein, dont j'ai eu moi-même l'occasion de me convaincre qu'elle donne de mauvais résultats chez ce cilié. Sur le dessin de Jankowski on voit nettement que seule la membrane ondulante s'est argentée, les membranelles ayant été dessinées par l'auteur ultérieurement. La preuve en est la photo où à la place du péristome on ne voit qu'une tache noire. La méthode de Chatton donne cependant des images très distinctes. Chez *Uronema* ce n'est pas seulement le cytostome qui se déplace vers l'arrière mais l'arrangement des membranelles qui change. Elles sont rangées linéairement et parallèlement à UM. M₁ se

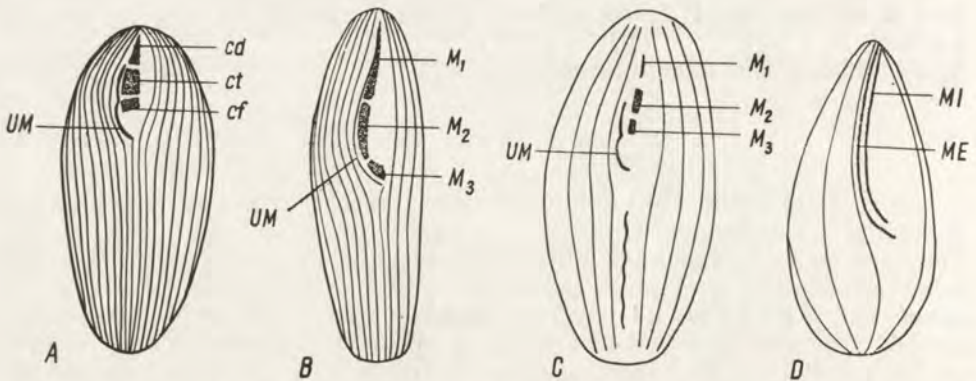


Fig. 17. Structures buccales des autres *Tetrahymenina*: A — *Philasterides armata* (*Philasteridae*): cd — champ deltoïde, ct — champ trapezoïde, cf — champ falciforme B — *Anophrys salmacida* (*Cohnilembidae*), C — *Uronema marinum* (*Uronematidae*), D — *Pseudocohnilembus persalinus* (*Pseudocohnilembidae*): MI — membrane intérieure, ME — membrane extérieure (A et B d'après Mugar, D d'après Evans et Thompson)

trouve tout près du pôle antérieur; UM ne commence que dans le deuxième quart du corps à peu près de la moitié de M_2 (Fig. 17). Chez *Loxocephalus* par contre la structure du péristome est tout à fait pareille à celle qu'on voit chez *Tetrahymena* ou *Sathrophilus*. Deux conclusions résultent de ces faits: 1. il n'y a pas de parenté proche entre *Uronema* et *Loxocephalus*, 2. la formation de la nouvelle famille *Loxocephalidae* n'est pas justifiée parce que le caractère phylogénétique le plus important, c'est à dire la structure du péristome, correspond chez *Loxocephalus* au schéma général de *Tetrahymenidae*.

Fauré-Fremiet et avec lui la plupart de chercheurs considèrent *Tetrahymenidae* comme Hymenostomes les plus primitifs et comme point de départ des autres groupes. Raabe 1963 présente un autre point de vue: examinant les tendances évolutives chez les *Thigmotricha* il constate que chez les formes les plus spécialisées les cinéties adorales deviennent plus courtes et le cytostome se déplace vers le pôle antérieur. Il en conclut, que le cytostome situé chez les ciliés les plus primitifs sur le pôle antérieur s'est déplacé au cours de l'évolution vers l'arrière et alors seulement quand il se trouvait près du bout du corps il pouvait engager à son service les cinéties adorales; celles-ci, très longues d'abord, se raccourcissaient entraînant le cytostome en avant. Il faudrait en conclure que le péristome situé dans la partie postérieure du corps représente le type le plus primitif. Sans dire que ce raisonnement s'appuie sur des données prises d'un groupe parasitaire fort modifié, la logique nous obligerait de reconnaître *Pleuronematina* comme Hymenostomes libres les plus primitives parce que la situation de leur péristome les approche le plus de *Thigmotriches*. Une telle conclusion serait pourtant contraire à la réalité puisque ce sont des animaux fort spécialisés du point de vue de la morphologie et de la physiologie; ainsi la forme du corps est stable grâce à la pellicule raide; les cils montrent une spécialisation assez haute: il y a des cils somatiques très longs et raides à l'aide desquels l'animal peut se déplacer par bonds ou, les déployant, rester immobile sus-

pendu dans l'eau (*Cyclidium*); il y a un champ de cils thigmotactiques et une membrane ondulante exceptionnellement grande; il y a enfin la spécialisation dans la nourriture qui est constituée exclusivement de bactéries.

L'opinion de Raabe représente donc une conception intéressante mais qui n'est pas suffisamment appuyé par les faits.

La théorie de Fauré-Fremiet fondée sur la rangée naturelle des formes représentant successivement les degrés toujours plus hauts de développement fait dériver les Hymenostomes des Trichostomes dont le péristome situé au-dessous du pôle antérieur est entouré de cils spéciaux allongés, qui ne forment pourtant pas de membranes. En raisonnant logiquement, le degré suivant de l'évolution devrait être représenté par des formes possédant une ciliature primitive, dont le cytostome situé toujours près du pôle antérieur serait déjà entouré par de petites et faibles membranelles formées par les cils; ce sont *Tetrahymenidae* qui possèdent un tel péristome simple auquel ils doivent leur position clef dans les discussions contemporaines sur la phylogénèse. Si l'on admet de plus l'universel principe biologique selon lequel une haute plasticité de l'animal et son manque de spécialisation sont une preuve de degré primitif de son développement, *Tetrahymena* serait à ce point de vue le membre le plus primitif de cette famille et par cela même de tous les Hymenostomes. L'organisme qui selon les circonstances peut se nourrir de bactéries, de tissus frais, vivre dans un milieu synthétique, devenir parasite éventuellement, en conditions favorables, se transformer en prédateur prouve qu'il est extrêmement plastique physiologiquement et en conséquence possède de grandes possibilités évolutives.

Il faut se demander maintenant si l'on peut remarquer parmi les *Tetrahymenidae* une tendance vers une spécialisation ou une parenté avec les autres familles de *Tetrahymenina*. *Sathrophilus* est sans doute le plus proche de *Tetrahymena*. La structure du péristome est identique, le corps très flexible, la nourriture est faite des bactéries ainsi que de tissus frais; seul le polymorphisme n'apparaît plus. *Deltopylum* s'approche physiologiquement des *Ophryoglenidae*; c'est un histiophage typique, incapable d'absorber une autre nourriture. Le polymorphisme limité chez lui est plus accentué que chez *Tetrahymena*; les stades sont plus différenciés; le tomonte grand et lourd qui se divise deux fois de suite ressemble au tomonte d'*Ophryoglena* avec cette différence qu'il ne forme pas encore de kyste de division.

Glaucoma représente un degré supérieur de différenciation. Le corps est plus raide, le côté ventral plus aplati et dans la structure du péristome des modifications considérables apparaissent. Chez certaines espèces comme *G. reniformis* il est situé de même que chez *Sathrophilus*, près du pôle antérieur, du côté droit du corps mais chez les autres il se déplace vers le milieu du corps. Le rapport de la membrane ondulante aux membranelles change; ces dernières sont plus longues, remarquablement épaisses et situées plus ou moins parallèlement à UM. M_1 et M_2 sont le mieux développées et forment deux lamelles épaisses à l'aide desquelles l'animal rampant sur le substrat ramasse les bactéries. On peut dire en général qu'il y a ici une tendance à prolonger et à grossir les membranelles donc à former le peniculus. En effet si l'on compare *Glaucoma scintillans* et *Frontonia marina* on aperçoit une certaine ressemblance générale dans la structure de leurs péristomes. Cela ne veut pas dire bien entendu que *Glaucoma* est une forme initiale pour *Frontonia*; les

différences sont trop grandes. Mais on peut supposer que chez *Glaucoma* une certaine tendance évolutive est apparue qui s'est maintenue et développée pour aboutir à former le groupe spécialisé de *Peniculina*. Ce serait donc la première ligne latérale. Peut-être un développement autrement orienté de la même tendance aboutit-il à la formation des organismes réunis à présent dans la famille *Philasteridae* où les champs deltoïde et trapezoïde correspondraient à M_1 et M_2 chez *Glaucoma* (Fig. 17).

Chez les deux derniers genres de cette famille c'est-à-dire *Colpidium* et *Loxocephalus* la structure du péristome reste à peu près la même que chez *Sathrophilus* mais la ciliature somatique devient plus variée. Chez *Colpidium* une partie des cinéties situées à droite du péristome s'incurve au-dessus de lui à gauche en formant une bande transversale de cils. On observe une image semblable mais inverse chez une des espèces de *Loxocephalus* à savoir *L. luridus* où les cinéties du côté gauche du péristome passent au-dessus de celui-ci à droite. A part cela du côté droit du péristome il y a des rangées transversales de cils présentes chez toutes les espèces de *Loxocephalus*. Comme toutes les formes appartenant à ces deux genres sont exclusivement bactériophages, on peut voir dans ces modifications des cils somatiques une adaptation tout à fait différente de celle qu'on rencontre chez *Glaucoma* et qui permet d'absorber d'une autre manière une nourriture semblable.

Le péristome des *Tetrahymenidae*, triangulaire ou ovale, est toujours court et chez aucune espèce il ne montre de tendance à s'allonger. Il paraît donc peu vraisemblable qu'une parenté proche puisse exister entre eux et les autres familles de *Tetrahymenina* au péristome fort allongé c'est-à-dire *Uronematidae*, *Cohnilembidae* et *Pseudocohnilembidae*. Si l'on prend en considération l'infaciliature somatique on aperçoit une certaine ressemblance dans la structure réticulée de la pellicule entre *Loxocephalus* et *Uronema* mais comme nous savons, de telles structures n'ont qu'une importance secondaire dans la phylogénèse; la structure la plus importante, c'est-à-dire le péristome, montre chez *Loxocephalus* une tendance opposée à celle des *Uronematidae* parce qu'il est le plus petit de tous les péristomes de *Tetrahymenidae*. Ainsi, à présent il serait difficile de préciser l'origine de la deuxième ligne évolutive conduisant à de forts changements dans la structure du péristome qui se manifestent dans son déplacement vers l'arrière et l'arrangement linéaire des membranelles. L'accroissement de ces caractères aboutit au cours de l'évolution à la formation du groupe *Pleuronematina*.

La ligne menant vers *Pleuronematina* a joué un rôle important dans les considérations évolutives des dernières années. Fauré-Fremiet aperçut une évidente ressemblance entre *Pleuronematina* et *Thigmotricha* qui se manifeste dans la structure et la position du péristome ainsi que dans la formation des cils thigmotactiques. Cette ressemblance est la plus nette quand on compare les formes de la famille *Pleuronematidae* avec les représentants les plus primitifs de *Thigmotricha*. Fauré-Fremiet en conclut que *Pleuronematina* étaient probablement les ancêtres des *Thigmotricha*. Raabe 1963 lui opposa un argument emprunté à la morphogénèse en soulignant le fait que pendant la division et la reconstruction des structures buccales chez *Thigmotricha* quatre stries transversales se forment contre trois chez les *Pleuronematina*. Il en conclut que les *Thigmotriches* ont dû avoir d'autres ancêtres dont le péristome était pourvu de quatre membranelles qui ont laissé une trace dans leur ontogénèse. Il estime aussi qu'il y a, ou du moins qu'il y

avait, des systèmes de AZM comportant différentes quantités de membranelles, tetrahymenium étant un de ces systèmes; il propose l'introduction d'un terme général ambihymenium comportant une UM et un certain nombre variable de membranelles. A mon avis l'admission qu'il y a et de toute façon qu'il y avait des systèmes de AZM contenant plusieurs membranelles s'impose, car comment pourrait-on autrement s'imaginer l'évolution de *Spirotricha*?. Pour le moment pourtant nous ne connaissons qu'un cas concret, c'est-à-dire tetrahymenium et rien d'autre; le seul nom ambihymenium ne nous fait pas progresser. En ce qui concerne l'argument emprunté à la morphogénèse les recherches sur celle-ci chez les ciliés ne sont pas encore assez nombreuses pour qu'on puisse constater avec certitude qu'un détail donné de la stomatogénèse reflète une étape de la phylogénèse. La formation de quatre stries pendant la reconstruction de l'appareil buccal ne prouve pas irréfutablement la descendance des ancêtres pourvus de quatre membranelles, qui d'ailleurs restent jusqu'ici inconnus. Personne n'ignore non plus que dans le développement embryonnaire des animaux supérieurs apparaissent parfois des structures passagères qu'on ne retrouve ni chez l'animal adulte ni chez ses ancêtres. Tant que nous n'aurons pas réuni des faits plus nombreux sur la morphogénèse des ciliés on peut considérer cette question comme ouverte; de toute façon à l'étape présente les conclusions tirées de la morphologie comparée sont les plus sûrs.

Fauré-Fremiet poursuit ses considérations en faisant une comparaison entre *Thigmotricha* et *Peritricha* dont il conclut que la scopula chez ces derniers correspond au champ des cils thigmotactiques, la polycinétie adorale présente un organelle homologue à AZM et la haplocinétie à UM chez *Thigmotricha* et *Hymenostomata*. En d'autres termes la ciliature adorale chez *Peritricha* ne serait rien d'autre qu'un tetrahymenium multiplié. En effet l'ordre *Peritricha* fut rattaché à la sous-classe *Holotricha*. Fauré-Fremiet créa un arbre généalogique des ciliés qui éveilla un grand intérêt parce que c'était le premier essai depuis Kent 1880. La ligne évolutive court ici de *Tetrahymena* à travers *Pleuronematina* et *Thigmotricha* jusqu'aux *Peritricha*. Corliss 1956 s'occupa de cette conception en développant plus amplement les arguments de Fauré-Fremiet. L'idée de résoudre le problème de la phylogénèse des ciliés à l'aide de tetrahymenium multiplié fit naître une vive discussion; il y a plusieurs protistologues qui n'approuvent pas le classement des *Peritricha* parmi les *Holotricha*. Raabe 1964 précise les objections suivantes: les cinéties chez *Peritricha* sont arrangées d'une façon tout-à-fait différente que chez les autres ciliés et forment des cercles parallèles à la bande aborale des cils; la division chez eux, au contraire des autres ciliés, est longitudinale; enfin les *Thigmotricha* et surtout la famille qui montre la plus grande ressemblance avec *Peritricha* sont des formes parasitaires fort spécialisées; il est donc douteux qu'elles puissent donner origine à un groupe particulier d'animaux libres. Cette dernière objection est sans doute la plus grave. Fauré-Fremiet 1965 précisa son point de vue en s'appuyant sur les résultats des dernières recherches qui ont montré que ce qu'on tenait pour cinétosomes chez *Peritricha* n'était que pores cuticulaires; donc il n'y a pas chez eux de cinéties formant des cercles; "... leur apparente polarité antéro-postérieure étant considérée comme une acquisition secondaire, leur face péristomienne comme leur face ventrale, leur scopula comme un organit dorsal; le plan de bipartition se retrouve

alors transversal, conformément à la règle... Par conséquent la ceinture locomotrice peut être considérée comme localisation sur des cinéties disparues..." En considérant la ciliature adorale chez *Peritricha* comme un tetrahymenium multiplié Fauré-Fremiet suggère leur origine, polyphyletique peut-être, de *Hymenostomata* et non de *Thigmotricha*. La voie évolutive n'irait donc pas tout droit comme dans la version première mais donnerait deux branches: une vers *Thigmotricha*, l'autre vers *Peritricha*.

Les recherches sur l'ultrastructure de l'haplocinétie de *Peritricha* ont démontré que celle-ci consiste en deux rangées de cinétosomes situés en alternance; seules les cinétosomes de la rangée extérieure ont des cils; les autres, plus profondément enfoncés dans le cytoplasme en sont dépourvus (Noirot-Timothee et Lom 1965). Miller and Stone 1963 ont obtenu des résultats analogues en étudiant la membrane ondulante de *Tetrahymena patula*. Donc la ressemblance dans la structure entre UM des *Tetrahymenidae* et l'haplocinétie des *Péritricha* et en conséquence la parenté entre ces deux groupes est hors de doute. Néanmoins les différences entre *Hymenostomata* et *Peritricha* restent considérables et l'inclusion de ces derniers à *Holotricha* n'a pas rencontré l'accord de plusieurs protistologues (Bradbury 1961, Cheissin and Poljansky 1963, Finley et coll. 1959, Raabe 1964). Il paraît que Noirot-Timothee et Lom ont bien formulé l'opinion générale en termes suivants: "... les Péritriches dérivent très vraisemblablement des Tetrahymeniens, ou possèdent avec ceux-ci des ancêtres communs; mais ils ont subi une longue histoire évolutive qui les a nettement isolés de la souche ... Compte tenu de ces faits, il paraît justifié de conserver aux Péritriches le rang de sous-classe..."

La discussion sur l'importance de la famille *Tetrahymenidae* dans l'évolution des ciliés est loin d'être terminée. Plusieurs problèmes attendent leur solution. Les recherches futures montreront dans quel degré les branches principales de l'arbre généalogique des ciliés ébauché par l'auteur de l'hypothèse sont justes.

R é s u m é

L'auteur présente une monographie de la famille *Tetrahymenidae* qui depuis plusieurs années réveille un intérêt général à cause de son importance pratique ainsi que théorique. La première partie contient l'histoire des recherches et une revue systématique. Les caractères génériques sont précisés en vertu des imprégnations argentiques. La famille enferme à présent 7 genres décrits d'après les techniques modernes: *Tetrahymena* Furgason, *Sathrophilus* (Kahl), *Paratetrahymena* Thompson, *Deltopylum* Fauré-Fremiet et Mugard, *Glaucoma* Ehrenberg, *Colpidium* Stokes et *Loxocephalus* Eberhard. Dans la deuxième partie sont discutées les conceptions évolutives fondées sur *Tetrahymenidae*.

STRESZCZENIE

Niniejsza praca, dotycząca rodziny *Tetrahymenidae*, jest próbą rewizji i syntezy, w której starałam się uwzględnić możliwie wszystkie prace dotyczące morfologii i biologii tej rodziny, oraz na podstawie badań morfologiczno-porównaw-

czych sprecyzować cechy rodzajowe a także wprowadzić gatunki nie opisane dotąd przy pomocy techniki srebrowej.

Charakterystyka sformułowana przez Corliss'a 1952 brzmi następująco: aparat gębowy składa się z trzech membraneli (AZM) mniej lub więcej równoległych, leżących po lewej stronie i jednej błony falującej (UM) po prawej stronie cytostomu. Nie ma przedstonka przed peristomem. Jedna lub więcej kinet jest przerwanych przez peristom; ta z nich, która leży najdalej na prawo jest kinetą stomatogenną. Orzęsienie ciała jest równomierne. Pojedyncza wodniczka tętniąca z jednym lub kilkoma otworami leży zwykle po prawej lub grzbietowo-prawej stronie ciała w jego tylnej połowie.

Trzy z zaliczonych do *Tetrahymenidae* przez Corliss'a rodzajów pominięto (*Monochilum*, *Dichilum* i *Stegochilum* opisane przez Schewiakoffa) ponieważ nie zostały one do tej pory odnalezione i nie ma żadnych danych o budowie ich peristomu oraz systemu srebrochlönnego. W obrębie rodziny pozostaje zatem 7 rodzajów: *Tetrahymena*, *Sathrophilus*, *Deltopylum*, *Paratetrahymena*, *Glaucoma*, *Colpidium* i *Loxocephalus*.

Tetrahymena Furgason, 1940

Ciało z przodu zaostrzone, z tyłu zaokrąglone, ulega bardzo silnym zmianom zależnie od ilości pobranego pożywienia, od cygarowatej formy wygłodniałej do ovoidalnej formy najedzonej. Ruchy, bardzo szybkie u osobników wygłodzonych, stają się coraz powolniejsze w miarę żerowania. Peristom jest kształtu gruszkowatego, zawsze równoległy do długiej osi ciała (Fig. 4).

U wszystkich gatunków należących do tego rodzaju występuje zjawisko polimorfizmu. Corliss 1952 wyróżnił trzy jego odmiany. Polimorfizm ograniczony (limited polymorphism) polega na zmianie kształtu i barwy, zależnie od ilości pochłoniętego pożywienia (np. *Tetrahymena pyriformis*). Polimorfizm przystosowawczy (adaptative polymorphism) pojawia się w wypadku, kiedy gatunek wolno żyjący staje się pasożytem warunkowym i w związku z tym ulega pewnym modyfikacjom morfologicznym, wzrasta np. liczba kinet (*Tetrahymena limacis*). Polimorfizm wyraźny (pronounced polymorphism), który polega na istnieniu dwóch form: o małym i dużym peristomie. (*T. vorax*, *T. paravorax* i *T. patula*. Fig. 2 i 3).

Rozróżnianie poszczególnych gatunków należących do rodzaju *Tetrahymena* jest bardzo trudne, ponieważ liczba kinet w obrębie każdego z nich waha się w pewnym zakresie, a zakresy te niejednokrotnie na siebie zachodzą.

Deltopylum Fauré-Fremiet et Mugard, 1946

Jedyny gatunek tego rodzaju ma bardzo charakterystyczny aparat jądrowy: macronukleus składa się z wielu kuleczek rozsianych w plaźmie, które podczas podziału łączą się, tworząc owalną masę. Peristom ma kształt trójkąta prostokątnego, membranelle esowate. Forma ta jest typowym histofagiem, o silniej niż u *Tetrahymena* zaakcentowanym polimorfizmie ograniczonym.

Paratetrahymena Thompson, 1963

Rodzaj ten, znaleziony w wodzie słonawej, wymaga bardziej dokładnego opisu, a szczególnie sprecyzowania czym różni się od *Tetrahymena*, ponieważ z opisu autora wiadomo tylko, że ma szerszy peristom. Brak również danych biologicznych.

Sathrophilus Corliss, 1960

Formy należące do tego rodzaju są na pierwszy rzut oka trudne do odróżnienia od *Tetrahymena*. Ciało jest ovoidalne, przedni biegun zaokrąglony, budowa peristomu w zasadzie taka sama jak u *Tetrahymena* (Fig. 9), zupełnie jednak brak polimorfizmu. Strona brzuszna jest spłaszczona a peristom przesunięty nieco w prawo. Włókienka poprzeczne między kinetami silne. Należą tu orzęski niewielkie (ok. 50 μ), które żywią się bakteriami i tkankami zwierzęcymi.

Glaucoma Ehrenberg, 1830

Ciało owalne, mało metaboliczne dzięki dość sztywnej pelikuli, przód nie wyciąga się nigdy w rostrum. Peristom jest owalny, ustawiony nieco ukośnie do długiej osi ciała. Membranelle są stosunkowo długie, ułożone równoległe do UM i uderzająco grube (Fig. 11); mają one postać sztywnych płytek poruszających się ruchem wibrującym. Orzęski żywią się wyłącznie bakteriami.

Colpidium Stein, 1860

Przednia część ciała lekko ale wyraźnie wygięta ku stronie brzusznej. W tak utworzonym zagłębieniu leży trójkątny peristom (Fig. 15). Kinyty biegnące po prawej stronie peristomu zaginają się ponad nim w lewo, tworząc poprzeczny pas preoralny i zostawiają na biegunie przednim małe półko wolne od rzęsek. Formy należące tutaj żywią się bakteriami i często występują masowo w wodach zanieczyszczonych.

Loxocephalus Eberhard, 1867

Jankowski 1964 opierając się na nieznacznych różnicach w orzęsieniu ciała rozbił ten rodzaj na dwa (*Loxocephalus* i *Dexiotricha*), co autorka uznaje za nie słuszne. Wszystkie zasadnicze cechy są bowiem wspólne a mianowicie: gatunki należące tu mają ciało wrzecionowate a w okolicy peristomu poprzeczne rzędy rzęsek. Jest jedna lub kilka rzęsek ogonowych. Peristom jest bardzo mały w stosunku do wielkości ciała i zbudowany w zasadzie tak samo jak u *Tetrahymena* (Fig. 16). Orzęski żyją w środowisku sapropelowym i żywią się wyłącznie bakteriami.

Fauré-Fremiet, a z nim większość badaczy, uważa *Tetrahymenidae* za najbardziej prymitywne *Hymenostomata* i za punkt wyjścia dla innych grup. Koncepcja Faure-Fremiet'a oparta na naturalnym szeregu form, przedstawiających coraz wyższy stopień rozwoju, wyprowadza *Hymenostomata* z grupy *Trichostomata*, u których w służbę cytostomu położonego poniżej bieguna przedniego wchodzi już specjalne wydłużone rzęski, nie tworzące jednak błonek. Logicznie biorąc następny szczebel powinny tworzyć formy o prymitywnym orzęsieniu, których cytostom leży jeszcze blisko bieguna przedniego a rzęski utworzyły małe, słabe jeszcze membranelle. Taki najprostszy peristom posiadają właśnie *Tetrahymenidae* i jemu zawdzięczają swoją kluczową pozycję we współczesnych rozważaniach filogenetycznych. Jeżeli przyjmiemy przy tym powszechną zasadę biologiczną, że wysoka plastyczność zwierzęcia i brak specjalizacji dowodzą jego

pierwotności, to *Tetrahymena* musi zostać uznana za najbardziej prymitywnego przedstawiciela rodziny, a tym samym wszystkie *Hymenostomata*. Organizm, który zależnie od warunków może żywić się bakteriami, tkankami zwierzęcymi, wyżyć na syntetycznej pożywce, stać się pasożytem, ewentualnie, jak niektóre gatunki, przemienić się w sprzyjających warunkach w drapieźnika, dowodzi niezwyklej plastyczności fizjologicznej, a co za tym idzie ma wielkie możliwości ewolucyjne.

Nasuwa się pytanie, czy w obrębie rodziny *Tetrahymenidae* można dopatrzeć się powiązań z innymi rodzinami. *Deltopylum* fizjologicznie zbliża się do rodziny *Ophryoglenidae*: jest to histofag niezdolny do pobierania innego pożywienia, o silnie zaakcentowanym polimorfizmie niż u *Tetrahymena*. U *Glaucoma* widać wyraźną tendencję do wydłużenia a zarazem pogrubienia membranelli, czyli do wytworzenia peniculus. Być może ta tendencja rozwojowa, która się tu pojawiła, w drodze dalszej ewolucji doprowadziła do powstania wyspecjalizowanej grupy *Peniculina*. Nieco odmienny rozwój tej samej tendencji dał może początek formom zebranym obecnie w rodzinę *Philasteridae* (Fig. 17).

Peristom *Tetrahymenidae*, trójkątny czy owalny, jest zawsze krótki i u żadnego gatunku nie zdradza skłonności do wydłużania się. Nie wydaje się zatem, żeby mogło istnieć bezpośrednie pokrewieństwo pomiędzy nimi a pozostałymi rodzinami *Tetrahymenina* o peristomie silnie wydłużonym to znaczy *Cohnilembidae*, *Pseudocohnilembidae* oraz *Uronematidae*. Ta ostatnia rodzina stoi na linii rozwojowej wiodącej do *Pleuronematina*. Linia ta odegrała wielką rolę w spekulacjach ewolucyjnych ostatnich lat. Fauré-Fremiet zwrócił uwagę na fakt, że pomiędzy *Pleuronematina* a *Thigmotricha* istnieją duże podobieństwa wyrażające się w podobnej budowie i położeniu peristomu oraz wykształceniu rzęsek tigmotaktycznych i wysnuł z tego wniosek, że przodkami *Thigmotricha* musiały być *Pleuronematina*. W wyniku dalszych badań porównawczych przeprowadził podobną analogię pomiędzy *Pleuronematina* a *Peritricha* i doszedł do wniosku, że scopula tych ostatnich stanowi odpowiednik pola rzęsek tigmotaktycznych; polykinetę adoralną uznał za organellum homologiczne z AZM a haplokinetę z UM *Hymenostomata*. Innymi słowy orzęsienie adoralne *Peritricha* nie byłoby niczym innym jak zwielokrotnieniem prymitywnego tetrahymenium. W ostatnich latach badania nad ultrastrukturą orzęsków przyniosły dowody na poparcie teorii Fauré-Fremiet'a (Noirot-Timotheé et Lom 1965 u *Peritricha*, Miller and Stone 1963 u *Tetrahymena patula*). Podobieństwo w budowie między UM *Tetrahymenidae* a haplokinetą *Peritricha*, a co za tym idzie pokrewieństwo między obu grupami, nie ulega już wątpliwości. Niemniej jednak dyskusja nad rolą rodziny *Tetrahymenidae* w ewolucji orzęsków daleka jest od zakończenia i cały szereg problemów czeka jeszcze na rozwiązanie.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaronson S. 1961: Protozoan pharmacodynamics: the use of Protozoa to study the cellular action of drugs. Progress in Protozoology, Proc. First int. Congr. Protozool., Prague 1961, Publ. House Czechoslov. Acad. Sci. Prague 1963, 175—176.
- Barthelmes D. 1960: *Tetrahymena parasitica* (Penard, 1922) Corliss, 1952 als Parasit in Larven von *Chironomus plumosus*-Typ. Z. Fischer., 9, 273—289.
- Bary B. 1950: Four new species of fresh-water Ciliates from New Zealand. Zool. Publ. Victoria Univ. Coll., 2, 1—19.
- Bradbury P. 1961: The infraciliature and argyrome of *Opisthionecta henneguyi* Fauré-Fremiet. J. Protozool., 8, suppl. 15.

- Buhse H. 1960: Some properties of *Tetrahymena paravorax* Corliss, 1957 strain RP. J. Protozool., 7, suppl. 9—10.
- Calkins G., Bowling R. 1928: Studies on *Dallasia frontata* Stokes. I. Polymorphism. Biol. Bull., 55, 101—112.
- Calkins G., Bowling R. 1929: Studies on *Dallasia frontata* Stokes. II. Cytology, gametogamy and conjugation. Arch. Protistenk., 66, 13—32.
- Chatton E., Lwoff A. 1930: Imprégnation par diffusion argentique de l'infraction des ciliés marins et d'eau douce après fixation cytologique et sans dessiccation. C. r. Séanc. Soc. Biol., 104, 834—836.
- Cheissin E., Mosewich T. 1962: An electron microscopy study of *Colpidium colpoda* (Ciliata, Holotricha). Arch. Protistenk., 106 181—200.
- Cheissin E., Poljansky G. 1963: On the taxonomic system of Protozoa. Acta Protozool., 1, 327—352.
- Corbett J., Sweeney J. 1966: Antigenic differences among some classical *Tetrahymena pyriformis* and *T. vorax* strains. J. Protozool., 13, 359—366.
- Corliss J. 1952: Comparative studies of holotrichous Ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group. I. General considerations and history of strains in pure culture. Trans. Amer. microsc. Soc., 71, 159—184.
- Corliss J. 1952: Le cycle autogamique de *Tetrahymena rostrata*. C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris, 235, 399—402.
- Corliss J. 1952: Review of the genus *Tetrahymena*. Proc. Soc. Protozool., 3, 3.
- Corliss J. 1952: Characterization of the family *Tetrahymenidae* nov. fam. Proc. Soc. Protozool., 3, 4.
- Corliss J. 1953: Comparative studies on holotrichous Ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group. II. Morphology, life cycles and systematic status of strains in pure culture. Parasitology, 43, 49—87.
- Corliss J. 1953: Silver impregnation of ciliated Protozoa by the Chatton-Lwoff technic. Stain tech., 28, 97—100.
- Corliss J. 1953: Review of the genus *Colpidium* Stein, 1860 (family *Tetrahymenidae*). Proc. Soc. Protozool., 4, 3—4.
- Corliss J. 1954: The literature on *Tetrahymena*: its history, growth and recent trends. J. Protozool., 1, 156—169.
- Corliss J. 1954: Review of the genus *Glaucoma* Ehrbg., 1830 (family *Tetrahymenidae*). J. Protozool., 1, suppl. 1.
- Corliss J. 1956: Occurrence and study of autogamy in diverse strains of *Tetrahymena rostrata*. J. Protozool., 3, suppl. 3.
- Corliss J. 1957: *Tetrahymena paravorax* n.sp., the first caudal-ciliated member of the genus referable to the *vorax-patula* complex. J. Protozool., 4, suppl. 13.
- Corliss J. 1959: An illustrated key to the higher groups of ciliated protozoa with definition of terms. J. Protozool., 6, 265—281.
- Corliss J. 1959: Comments on the systematics and phylogeny of the Protozoa. Syst. Zool., 8, 169—190.
- Corliss J. 1959: Current composition of the genus *Tetrahymena* Furgason, 1940. J. Protozool., 6, suppl. 24.
- Corliss J. 1959: *Glaucoma chattoni* n.sp. an experimental organism which has been confused with the type species of the genus, *Glaucoma scintillans* Ehrbg., 1830. J. Protozool., 6, suppl. 24.
- Corliss J. 1960: *Tetrahymena chironomi* sp.n. a ciliate from midge larvae and the current status of facultative parasitism in the genus *Tetrahymena*. Parasitology, 50, 111—153.
- Corliss J. 1960: Evidence of "clonal decline" in *Tetrahymena rostrata* and the apparent effect of autogamy upon this decline. J. Protozool., 7, suppl. 18.
- Corliss J. 1960: The problem of homonyms among generic names of ciliated Protozoa with proposal of several new names. J. Protozool., 7, 269—278.
- Corliss J. 1961: The ciliated protozoa: characterization, classification and guide to the literature. Pergamon Press London.
- Corliss J. 1961: Natural infection of tropical mosquitoes by ciliated Protozoa of the genus *Tetrahymena*. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 55, 149—152.
- Corliss J. 1962: Facultative parasitism in Protozoa and its possible evolutionary significance. Parasitology, 52, 10.
- Corliss J. 1962: A species of *Tetrahymena* from the British garden slug *Milax budapestensis*. Nature, 196, 1008—1009.

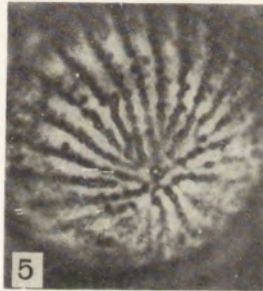
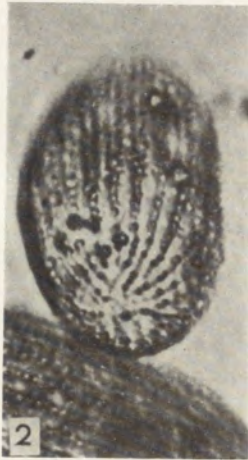
- Corliss J. 1963: Application of modern techniques to problems in the systematics of Protozoa. Proc. XVI int. Congr. Zool., Washington, 4, 97—102.
- Corliss J. 1965: *Tetrahymena*, a ciliate genus of unusual importance in modern biological research. Acta Protozool., 3, 1—20.
- Corliss J. 1965: L'autogamie et la senescence du cilié Hymenostome *Tetrahymena rostrata* (Kahl). Ann. Biol., 4, 49—69.
- Corliss J. 1967: An appeal for stabilization of certain names in the protozoan family *Tetrahymenidae* (subphylum *Ciliophora*, order *Hymenostomatida*), with special reference to the generic name *Tetrahymena* Furgason, 1940. Bull. zool., Nom. 24, 155—186.
- Dobrzańska J. 1959: The occurrence of ciliates of the genus *Tetrahymena* Furgason in fresh water mussels. Bull. Acad. pol. Sci., 7, 377—382.
- Elliot A. 1935: Characterization of species of *Colpidium* with special reference to *C. campylum* and *C. striatum*. Anat. Rec., suppl. 64, 108.
- Elliot A. 1959: A quarter century exploring *Tetrahymena*. J. Protozool., 6, 1—7.
- Elliot A. 1959: Biology of *Tetrahymena*. A. Rev. Microbiol., 13, 79—96.
- Elliot A., Kennedy J. 1962: The morphology and breeding system of variety 9, *Tetrahymena pyriformis*. Trans. Amer. microsc. Soc., 81, 300—308.
- Elliot A., Addison M., Carey S. 1962: Distribution of *Tetrahymena pyriformis* in Europe. J. Protozool., 9, 135—141.
- Elliot A., Brownell L., Gross J. 1954: The use of *Tetrahymena* to evaluate the effects of gamma radiation on essential nutrients. J. Protozool., 1, 193—199.
- Evans F., Corliss J. 1964: Morphogenesis in the hymenostome ciliate *Pseudocohnilembus persalinus* and its taxonomic and phylogenetic implications. J. Protozool., 11, 353—370.
- Evans F., Thompson J. 1964: *Pseudocohnilembidae* n.fam., a Hymenostome ciliate family containing one genus, *Pseudocohnilembus* n.g. with three new species. J. Protozool., 11, 344—352.
- Fauré-Fremiet E. 1944: Polymorphisme de *L'Enchelys mutans* (Mermod). Bull. Soc. zool. Fr., 69, 212—219.
- Fauré-Fremiet E. 1945: Polymorphisme du *Monodinium vorax* n.sp. Bull. Soc. zool. Fr., 70, 69—79.
- Fauré-Fremiet E. 1948: Doublets homopolaires et régulation morphogénétique chez le cilié *Leucophrys patula*. Arch. Anat. microsc., 37, 183—203.
- Fauré-Fremiet E. 1949: Action du lithium sur la stomatogenèse chez les ciliés. Journ. Cyto-embryol. belgo-néerland., 100—102.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Morphologie comparée et systématique des ciliés. Bull. Soc. zool. Fr., 75, 109—122.
- Fauré-Fremiet E. 1965: Morphologie comparée de Ciliés Peritrichida. Progress in Protozoology, Abstr. Second int. Conf. Protozool., London 1965, Excerpta med. Int. Congr. ser. No 91, 13—14.
- Fauré-Fremiet E., Mugard H. 1946: Sur un infusoire histiophage *Deltopylum rhabdoides* n. gen., n. sp., Bull. Soc. zool. Fr., 71, 161—164.
- Fauré-Fremiet E., Mugard H. 1949: Le dimorphisme de *Espeioia mucicola*. Hydrobiologia, 1, 379—389.
- Finley H., McLaughlin, Harrison D. 1959: Non-axenic and axenic growth of *Vorticella microstoma*. J. Protozool., 6, 201—205.
- Frank O., Baker H., Zifer H., Aarronson S., Hutner S., Leevy S. 1963: Metabolic deficiencies in Protozoa induced by thalidomide. Science, 139, 110—111.
- Frankel J. 1960: Morphogenesis in *Glaucoma chattoni*. J. Protozool., 7, 362—376.
- Furgason W. 1940: The significant cytostomal pattern of the "*Glaucoma-Colpidium* group" and a proposed new genus and species *Tetrahymena gelei*. Arch. Protistenk., 94, 224—266.
- Holz G. 1966: "Is *Tetrahymena* a plant?". J. Protozool., 13, 2—4.
- Holz G., Corliss J. 1956: *Tetrahymena setifera* n. sp. a member of the genus *Tetrahymena* with a caudal cilium. J. Protozool., 3, 112—118.
- Hutner S: Protozoa as toxicological tools. J. Protozool., 11, 1—6.
- Jankowski A. 1964: Morphology and evolution of *Ciliophora*. IV. Sapropelebionts of the family *Loxocephalidae* fam. nov., their taxonomy and evolutionary history. Acta Protozool., 2, 33—58.

- Kahl A. 1926: Neue und wenig bekannte Formen der holotrichen und heterotrichen Ciliaten. Arch. Protistenk., 55, 197—438.
- Kahl A. 1930-35: Wimpertiere oder Ciliata. Tierwelt Deutschlands, Jena.
- Kazubski S. 1958: *Trichia lubomirskii* Slos. (*Helicidae*) a new host of *Tetrahymena limacis* (Warren, 1932) Kozloff, 1946 and *Zonitoides nitidus* Müll. (*Zonitidae*), a new host of *T. rostrata* (Kahl, 1926) Corliss, 1952, in Poland. Bull. Acad. pol. Sci. Cl. II 6, 247—252.
- Kidder G., Devey V. 1951: The biochemistry of Ciliates in pure culture. In: Biochemistry and Physiology of Protozoa. New York 325—400.
- Kidder G., Lilly D., Claff C. 1940: Growth studies on ciliates. IV. The influence of food on the structure and growth of *Glaucoma vorax* sp. n. Biol. Bull. 78, 9—23.
- Klein B. 1926: Ergebnisse mit einer Silbermethode bei Ciliaten. Arch. Protistenk., 56, 243—279.
- Kozloff E. 1946: The morphology and systematic position of a holotrichous ciliate parasitizing *Deroceras agreste* (L.). J. Morph., 79, 445—466.
- Kozloff E. 1956: *Tetrahymena limacis* Warren from the terrestrial pulmonate gastropods *Monadenia fidelis*. J. Protozool., 3, 204—208.
- Kozloff E. 1956: A comparison of the parasitic phase of *Tetrahymena limacis* (Warren) with clones in culture with particular reference to variability in the number of primary ciliary meridians. J. Protozool., 3, 20—28.
- Kozloff E. 1956: Experimental infection of the garden slug *Deroceras reticulatum* (Müller) by the holotrichous ciliate *Tetrahymena pyriformis* (Ehrbg.). J. Protozool., 3, 17—19.
- Kozloff E. 1957: A species of *Tetrahymena* parasitic in the renal organ of the slug *Deroceras reticulatum*. J. Protozool., 2, 75—79.
- Kozloff E. 1962: Loss of ciliary meridians by parasitic species of *Tetrahymena* established in culture. J. Protozool., 9, suppl. 17.
- Loeffer J., Small E., Furgason W. 1966: Range variation in the somatic infraciliature and contractile vacuole pores of *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 13, 90—102.
- Lom J. 1959: *Tetrahymena* infection in the earthworm. J. Parasit., 45, 320.
- Maupas E. 1883: Contribution à l'étude morphologique et anatomique des infusoires ciliés. Archs. Zool. exp. gen., (sér. 2) 1, 427—664.
- Metz C., Westfall J. 1954: The fibrillar systems of ciliates as revealed by the electron microscope. II. *Tetrahymena*. Biol. Bull., 107, 106—122.
- Miller O., Stone G. 1963: Fine structure of the oral area of *Tetrahymena patula*. J. Protozool., 10, 280—288.
- Mugard H. 1947: Les infusoires hyménostomes histiophages. Bull. Soc. zool. Fr., 72, 62—67.
- Mugard H. 1948: Contribution à l'étude des infusoires hyménostomes histiophages. Anns. Sci. nat., Zool., 10, 171—268.
- Mugard H., Lorsignol L. 1956: L'étude de la division et de la régénération chez deux *Ophryoglenidae* d'eau douce: *Ophryoglena pectans* et *Deltopylum rhabdoides*. Bull. biol. France Belg., 90, 446—464.
- Nanney D. 1959: Vegetative mutant and clonal senility in *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 6, 171—177.
- Nanney D. 1966: Cortical integration in *Tetrahymena*: an exercise in cytogeometry. J. exp. Zool., 161, 307—317.
- Nigrelli R., Jakowska S., Padnos M. 1956: *Tetrahymena* as pathogenic epibiont in fishes and urodels. J. Protozool., 3, suppl. 10.
- Noirot-Timothee C., Lom J. 1965: L'ultrastructure de l'"haplocinétie" des Ciliés Péritriches. Comparaison avec la membrane ondulante des Hyménostomes. Protistologica 1, 33—40.
- Penard E. 1922: Etudes sur les Infusoires d'eau douce. Genève.
- Pitelka D. 1961: Fine structure of the silverline and fibrillar systems of three tetrahymenid ciliates. J. Protozool., 8, 75—89.
- Pitelka D. 1963: Electron-microscopic structure of Protozoa. London.
- Prescott D. 1957: Relation between multiplication rate and temperature in *Tetrahymena pyriformis*, strains HS and GL. J. Protozool., 4, 252—256.
- Raabe Z. 1959: Recherches sur les Ciliés Thigmotriches (*Thigmotricha* Ch. Lw.) VI. Sur les genres "*Ancistruma*", "*Ancistrina*" et les genres voisins. Acta parasit. pol., 7, 215—247.

- Raabe Z. 1963: La stomatogenèse chez *Conchophytirus* (Ciliata, Thigmotricha). Acta Protozool., 1, 139—146.
- Raabe Z. 1964: The taxonomic position and rank of *Peritricha*. Acta Protozool., 2, 19—32.
- Roque M. 1961: Recherches sur les infusoires ciliés: les Hymenostomes Peniculiens. Bull. Biol. 95, 431—519.
- Roque M., Savoie A. 1966: Trois espèces nouvelles d'*Ophryogènes*: *O. gelifera* n.sp., *O. mucosa* n.sp., *O. multimicronucleata* n.sp. (Ciliés Holotriches, Peniculiens). J. Protozool., 13, 12—20.
- Stout J. 1954: The ecology, life history and parasitism of *Tetrahymena rostrata*. J. Protozool., 1, 211—215.
- Stout J. 1956: *Saprophilus muscorum* Kahl, a tetrahymenal ciliate. J. Protozool., 3, 28—30.
- Suhama M., Yamataka S. 1960: On the cortex of *Tetrahymena*. I. The comparison between the silver-plated structures and the fine structures through the electron microscope in *Tetrahymena vorax*. II. The fine structures of cilia, kinetosomes and kinetodesmas in *T. vorax*. Zool. Mag. 69, 153—162.
- Thompson J. 1955: Morphology of a new species of *Tetrahymena*. J. Protozool., 2 suppl.
- Thompson J. 1958: Experimental infection of various animals with strains of the genus *Tetrahymena*. J. Protozool., 5, 203—205.
- Thompson J. 1963: The generic significance of the buccal infraciliature in the family *Tetrahymenidae* and a proposed new genus and species *Paratetrahymena wassi*. Va J. Sci., 14, 126—135.
- Thompson J. 1963: A redescription of *Uronema marinum* and a proposed new family *Uronematidae*. Va J. Sci., 15, 80—87.
- Thompson J. 1966: *Pseudocohnilembus marinus* n.sp., a hymenostome ciliate from the Virginia Coast. J. Protozool., 13, 453—465.
- Thompson J., Cone M. 1961: The buccal infraciliature of *Sathrophilus* (*Saprophilus*) *muscorum* (Kahl, 1931) Corliss, 1960. Va J. Sci., 12, 165.
- Thompson J., Cone V. 1962: A redescription of the hymenostome ciliate *Sathrophilus* (*Saprophilus*) *muscorum* (Kahl, 1931) Corliss, 1960 with particular attention to the buccal apparatus. Va J. Sci., 14, 16—22.
- Williams N. 1960: The polymorphic life history of *Tetrahymena patula*. J. Protozool., 7, 10—17.
- Williams N. 1961: Polymorphism in *Tetrahymena vorax*. J. Protozool., 3, 403—410.
- Williams N. 1964: Induced division synchrony in *Tetrahymena vorax*. J. Protozool., 11, 230—236.
- Williams N. 1964: Structural development in synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*. In: Synchrony in cell division and growth, 159—175.
- Williams N., Anderson E., Kessel R., Beams H. 1960: Electron microscope observations on synchronously dividing *Tetrahymena*. J. Protozool., 7, suppl. 27.
- Zeuthen E. 1964: The temperature-induced division synchrony in *Tetrahymena*. Synchrony in cell division and growth, 99—158.
- Zeuthen E. and Scherbaum O. 1954: Synchronous divisions in mass cultures of the ciliate protozoan *Tetrahymena pyriformis*, as induced by temperature changes. Colston Papers, 7, 141—156.

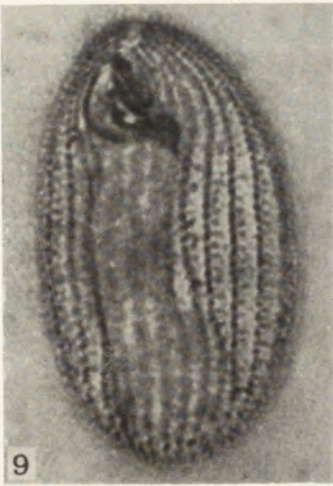
EXPLICATION DES PLANCHES I—IV

- 1: *Tetrahymena setifera*, côté ventral
- 2: *Tetrahymena setifera*, pôle postérieur du corps
- 3: *Tetrahymena patula*
- 3a: *Tetrahymena patula*, division
- 4: *Sathrophilus putrinus*, côté ventral
- 5: *Sathrophilus putrinus*, pôle postérieur du corps
- 6, 7, 8: *Sathrophilus putrinus*, division
- 9, 10: *Sathrophilus agitatedus*
- 11, 12: *Sathrophilus granulatus*
- 13: *Sathrophilus ovatus*
- 14: *Glaucoma scintillans*
- 15: *Glaucoma scintillans*, pôle antérieur du corps
- 16: *Glaucoma reniformis*
- 17: *Glaucoma myriophylli*
- 18: *Glaucoma myriophylli*, pôle antérieur du corps
- 19, 20, 21: *Glaucoma myriophylli*, division
- 22: *Glaucoma myriophylli*, structure de la pellicule
- 23: *Glaucoma myriophylli*, structures buccales (vue antéro-latéro-ventrale)
- 24: *Colpidium colpoda*
- 25: *Colpidium striatum*
- 26: *Loxocephalus granulatus*
- 27: *Loxocephalus granulatus*, partie antérieure du corps, côté dorsal
- 28, 29: *Loxocephalus granulatus*, région du péristome



A. Czapik

auctor phot.



9



10



11



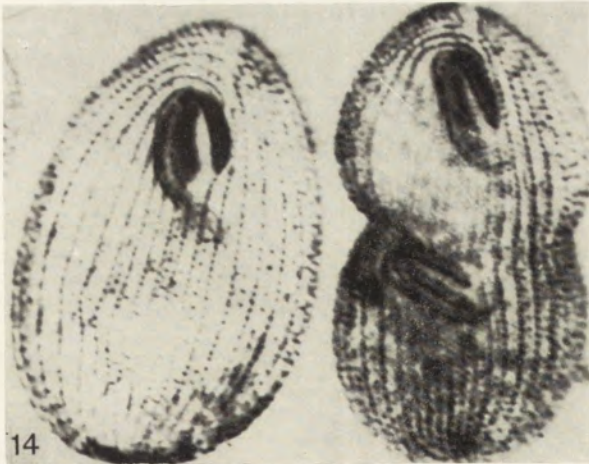
13



16



12



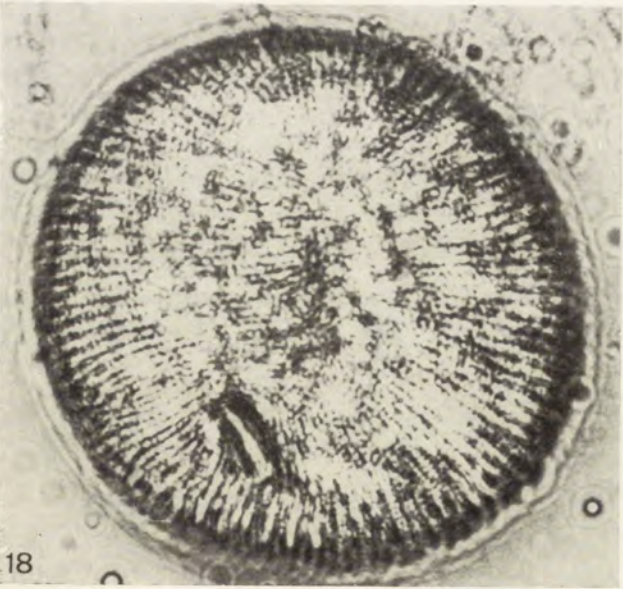
14



15

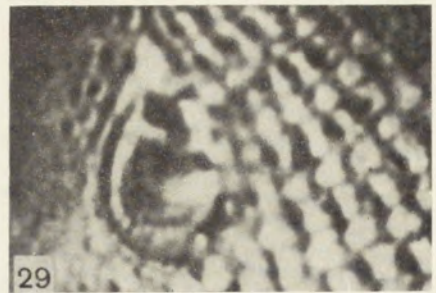
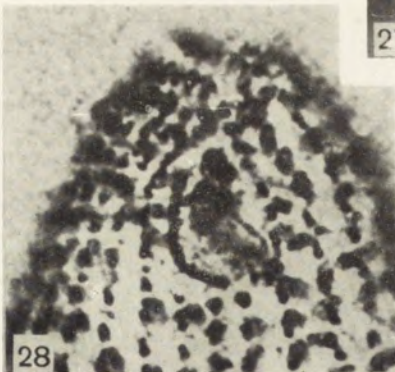
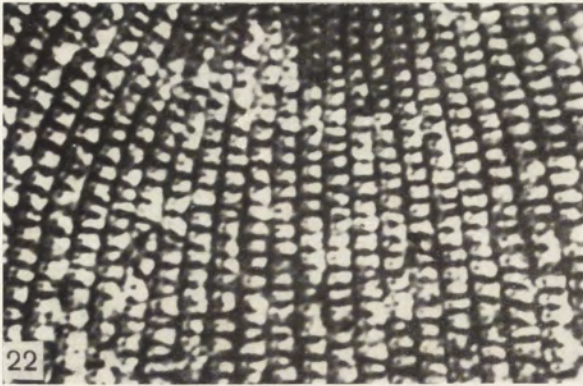
A. Czapik

auctor phot.



A. Czapik

auctor phot.



A. Czypik

auctor phot.

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

Maria JERKA-DZIADOSZ

Study on resorption of ciliature in *Urostyla* (*Hypotricha*)

Badania nad resorpcją orzęsienia u *Urostyla* (*Hypotricha*)

In *Hypotricha* two fundamental processes occur in the course of morphogenetic phenomena as division into progeny individuals or regeneration of fragment. One of those processes is the formation of primordia of the new ciliature, the second is the resorption of the old one.

In ciliates, the resorption may be evoked at any moment of the life cycle. Primordia may also be resorbed before they attain the form of fully developed organelles. For resorption of primordia, a stimulus from outside of the cell is indispensable. This process has been described in many ciliates. Frankel 1964 a and 1964 b described the resorption of the oral primordia in *Tetrahymena pyriformis* treated with thermic shocks. Primordia subjected to UV light become resorbed in *Euplotes* (Wise 1965 a) and in *Glaucoma* (Frankel 1960). Hashimoto 1961 ascertained the resorption of the AZM primordium in *Oxytricha fallax* at a very early stage, as result of a traumatic impairment of the cell outside the primordium. Similar results were reported by Eberhardt 1962 in *Spirostomum* and in *Blepharisma*. Frankel 1967 studied the maintenance and development of primordia in *Tetrahymena*.

In the adult individuals, ciliature may be resorbed during the encystation only, when the whole oral and somatic ciliature is resorbed, or in the case when the substitution material is arising i.e. when new primordia are developing. Tartar 1966 a ascertained that the old oral structures of *Stentor* being in reorganization may be resorbed even after the removal of the reorganization primordium.

The present study concerns the resorption of the old ciliature which occurs at the final stage of the morphogenetic processes in *Hypotricha*.

In the previous publications (Jerka-Dziadosz 1964, 1965, 1967), the course of formation of the new ciliature in division and regeneration in *Urostyla cristata* has been elucidated. It follows from those studies that the old ciliature begins being resorbed at the 4-th and 5-th stage of division when the new ciliature has been already fully formed and single cirri groups begin to shift to their final place.

The experiments presented in this publication had to solve the following problems: 1. Can the resorption of the old ciliature be not complete, i.e. will the deficient cirri categories be completed from the old ciliature assem-

bly in the case when the individual possesses incomplete primordia? 2. Does there exist a possibility of compensating the primordia within one cirri category? 3. Is the presence of nuclear apparatus indispensable for the resorption of the old ciliature?

Materials and methods

Experiments were executed on individuals of *Urostyla cristata* Jerka-Dzidosz, 1964 being in division. Ciliates were cultivated in Pringsheim's solution and fed with lettuce extract with *Aerobacter aerogenes*.

Two types of operations were carried out: 1. the transversal cirri from the median morphogenetic area were cut out by means of a special pipette with a diameter of 10–20 μ adjusted in a manual micromanipulator of the Singer type. In this case a definite area of the ventral pellicle was cut out with a small portion of endoplasm lying over it, and with a corresponding portion of the dorsal pellicle. Another type of operation was executed by means of a microknife prepared of a dentistic needle suitably flattened and sharpened. With the micro-knife, the anuclear fragments of the dividing individuals were cut off.

The operated individuals were at the 3-rd and 4-th stage of division. At this stage, the kinetosomes of the new ciliature are already formed, they are to be included into the cirri assembly of the progeny individuals. As already reported in the previous publication (Jerka-Dzidosz 1964), the frontal, ventral and transversal cirri — i.e. the assembly FVT — arise in the middle of the ventral body surface, to the right and near the AZM. The marginal cirri of the left body side (7 rows) arise on the left side of AZM and that of the right body side (7 rows) — on the right lateral margin together with the old marginal cirri (Pl. II 6).

In the 3-rd and 4-th division stage, the whole nuclear material (48 macronuclei) aggregate into one mass lying in the region of the future division furrow. The position of Ma, condensed in the central part of the cell (Pl. II 7), enables to obtain such operated fragments which embrace the primordia of the new ciliature, a part of the old one but not the nuclear apparatus.

The operated individuals were fixed at a precised time after operation. Ciliature was stained with iron haematoxylin after the procedure of Parducz. Nuclei were stained with methyl green (after a previous treatment with the Parducz's method) or the Feulgen reaction was applied.

Results

The course of resorption of cirri at the final stages of division

The resorption of the paternal ciliature begins at the 5-th division stage, about 40 min. prior to the fission of the progeny individuals. A series of preparations were executed at 10 min. intervals beginning with the moment of fission. At this moment, each of the progeny individuals possesses a complete set of the new ciliature as well as the partly resorbed old ciliature (Pl. I 1). The outer row of the frontal cirri becomes resorbed first, subse-

quently the remaining cirri are resorbed consecutively. 40 min after fission, the ciliates possess the new ciliature only.

The influence of removal of primordia upon the resorption of the old ciliature (Fig. 1)

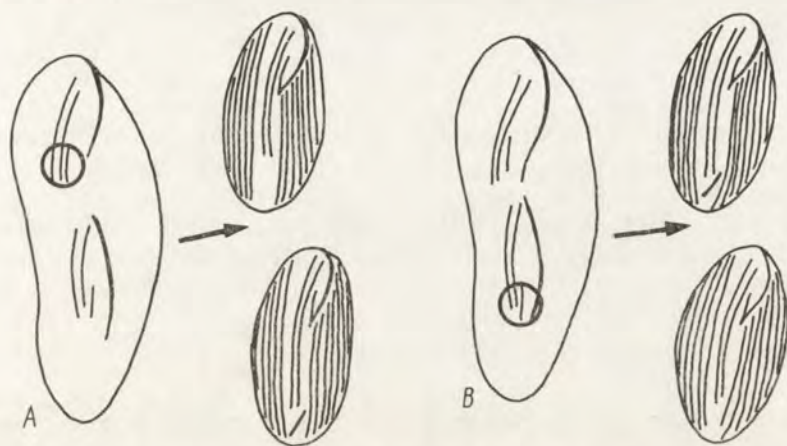


Fig. 1. Scheme of resorption of ciliature of *Urostyla cristata* after removal of primordia of transversal cirri. A—cutting out of primordia of transversal cirri in proter, B—cutting out of primordia of transversal cirri in opisthe

It was proved as result of the preliminary experiments, that the transversal cirri may serve as a good marker in the study of resorption of the old ciliature. In the adult individuals, those cirri occupy a characteristic position. They present an oblique row of big cirri which contrast distinctly with other cirri categories surrounding them as: the ventral ones situated in front of them and the marginal ones lying laterally and posteriorly. In division, the primordia of transversal cirri are organized the last. The position of the primordia of transversal cirri the dividers is also very favourable (Jerka-Dzidosz 1964) for operation because they may be removed without impairing the primordia of the other cirri in categories simultaneously. Control preparations of the operated individuals in division showed that by means of the methods applied, the primordia of all the transversal cirri may be removed together with only a few ventral ones. Cutting out small fragments of divider with a pipette involves no disturbances in the normal course of formation of the division furrow and in constriction of the progeny individuals. Such disturbances occur only in the case when a big fragment of dividing individuals has been cut off (Jerka-Dzidosz 1967).

Two series of experiments were carried out. In the first series (Fig. 1 A), the primordia of transversal cirri of the future proter were cut out by means of a pipette at an early stage of division prior to the condensation of Ma (Pl. 13). When division was accomplished, the progeny individuals were fixed and stained after the method of Parducz, at 10 min. intervals, beginning with the moment of fission. It was found that the resorption of the paternal ciliature occurs normally. The new ciliature occupies its normal position, just the site of the new transversal cirri remains empty. Those results were proved in 13 operated individuals.

It follows from the above experiments that after removal of the transversal cirri in proter, the eliminated cirri are not substituted by other cirri primordia from the fronto-ventro-transversal area (FVT). They are not substituted either by any cirri of the old ciliature assembly.

In the second series of operations (Fig. 1 B), the primordia of the transversal cirri of opisthe were cut out in 17 individuals. Similarly as in the first series, preparations were fixed every 10 min. since the moment of fission. The normal course of resorption of the old ciliature was stated. The ciliature becomes resorbed entirely within the normal time. In the adult individuals, 40 min. after division, similarly as in the proter operated previously, a naked area remains at the place where the transversal cirri should be located (Pl. I 2, II 4, 5).

This experiment indicates that the removed transversal cirri of the opisthe cannot be replaced by other cirri of the FVT streak and that the old transversal cirri become resorbed despite the fact that no element is present which might replace them.

Resorption of ciliature in fragments (Fig. 2)

In the third series of experiments the resorption of ciliature in the cut off fragments of dividers was studied. The morphological structure and the pattern of the division morphogenesis in *Urostyla cristata* make possible the study of the ciliature resorption in the following categories of fragments:

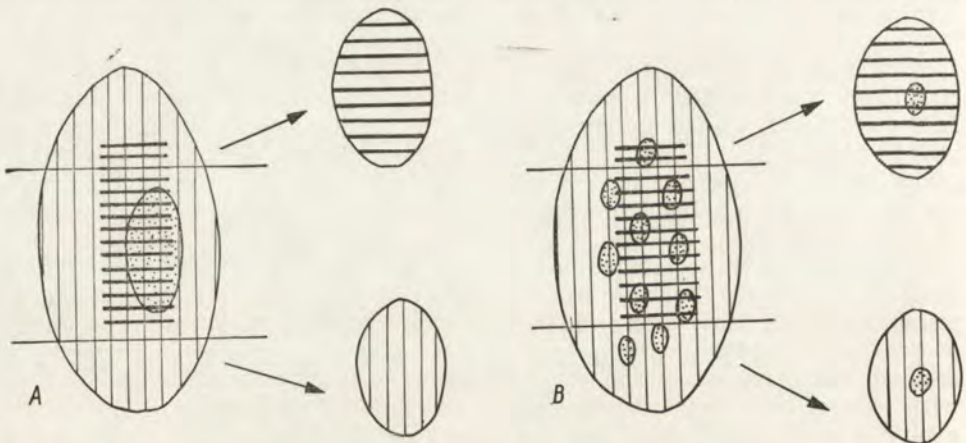


Fig. 2. Scheme of the new and old ciliature in fragments of dividers of *Urostyla cristata*. Vertical dash—old ciliature, horizontal dash—new ciliature, dotted area—nuclear apparatus. A—resorption of ciliature in anuclear fragments, B—resorption of ciliature in fragments containing the nuclear apparatus

1. those with the nuclear apparatus, with the old ciliature and with primordia of the new one, 2. with the nuclear apparatus and with the old ciliature but without the primordia of new ciliature, 3. fragments with the old ciliature and with primordia of the new one but without the nuclear apparatus.

Photograms 6 and 7 of the Plate II present an individual at the stage with condensed Ma. By operating the individual at this stage, comparatively big

anuclear fragments may be obtained. They contain a rather considerable part of the new ciliature.

The dividing individuals with condensed macronuclei may be distinguished in vivo from the other individuals and may be therefore isolated from the culture rather easily. The individuals studied were placed on a slide, the anuclear posterior or anterior fragments were cut off with the micro-knife, transferred upon a cover slip and observed in a suspended drop. The remaining nuclear part of the divider was immediately fixed and stained after Feulgen in order to ascertain whether the whole nuclear material has remained in the central cell part (Pl. IV 13).

The anucleated fragments studied were fixed for 4 hrs. after the operation and their ciliature was stained with the Parducz's method followed by methyl green for revealing the possible remainders of the nuclear apparatus. A portion of the operated individuals were stained 1 or 2 hrs. after the operation.

It has been stated that the fragments containing the new ciliature — in the nucleated (7) as well as in anuclear (12) ones — the resorption of the old ciliature occurs normally. The division primordia develop in the fragment and supersede the old ciliature which has been fully resorbed. It should be remarked that the division ciliature in the anucleated fragments fails to attain its normal size (Pl. III) and the whole fragment perishes after a few hours (compare Jerka-Dzidosz 1967).

Fragments without the primordia of the new division ciliature, the nucleated (5) as well as the anucleated (8) once, fail to resorb the old division ciliature. Phot. 14 and 15 in the plate IV represent the posterior fragment of the divider. It contains the nucleus but no primordia of the new ciliature. The marginal and transversal cirri of this fragment are unproportionally big when compared to the size of the fragment.

It follows from the above experiments that the nuclear apparatus — its presence or lack — have no decisive influence upon the resorption of the paternal ciliature. This is resorbed always in the case when at least a part of the new ciliature is present in the fragment. When the primordia of the new ciliature are lacking, the old ciliature is not resorbed.

Discussion

The dividing individuals of *Urostyla*, tolerate successfully the drastic microsurgical operations, not interrupting their morphogenetic division processes. It was ascertained in the previous article (Jerka-Dzidosz 1967), that in *Urostyla* such phenomena of division as: formation and development of primordia, formation of the furrow and constriction, are independent of one another. Tartar 1966 a and 1966 b stated in *Stentor* that the development of primordia and cytokinesis are separable processes and may proceed independently of one another in experimental conditions. The experiments of Tartar proved that the development of the division primordia is not indispensable for the occurrence of nuclear division and division of the cell. In the reorganizing stentor individuals, the old unimpaired oral parts are resorbed although the new primordia have been removed. The resorption occurs within the normal time. However the oral organelles

are never resorbed in the dividing stentors, they pass to the anterior dividing individual and constitute its oral apparatus. The removal of the oral primordium in the opisthe of stentor exerts no influence upon the old mouth parts which belong to proter. Those results may be compared to the results of removal of the transversal cirri primordia in *U. cristata*: elimination of those primordia in one of the future offsprings has no influence upon the development of the same primordia in the second offspring individual although normally they develop synchronously. As it was already stressed by Dembowska 1925, the physiological delimitation of the offsprings in *Hypotricha* occurs several hours prior to the appearance of visible symptoms of the proceeding division process.

In the previous publication (Jerka-Dziadosz 1967), in which the traumatic disturbances of division in *Urostyla* were analysed, the existence of a pre-division individualization process has been suggested. This process would be the organization of two individuals capable to produce their own primordium of ciliature, from a single individual.

In *Hypotricha*, the whole ciliature arises de novo i.e. all the cirri of the ventral body side, the dorsal bristles and the oral ciliature of the opisthe. In the process of individualization, the localization of the morphogenetic area is determined i.e. of some defined places on the surface where the primordia of various categories of cirri are to arise. After the full formation of the new primordia, the resorption of the old paternal ciliature set on.

As follows from the investigations reported in this article, as well as from the results of Tartar 1966a on stentor, the stimulus for the onset of resorption should be emitted at least at the moment of the formation of primordia. Therefore the removal of the more advanced oral primordia in the reorganizing stentor, or of a part of somatic primordia in *Urostyla* cannot prevent the resorption.

An important result of the present study is the fact that the complete primordia of the new ciliature are not indispensable for the process of resorption. Such a supposition has been arisen already in the course of the former study (Jerka-Dziadosz 1967). It was stated in the so-called pseudo-doublets of *Urostyla cristata* obtained after impairing the dividers by operation, that the lateral growing together of two individuals is blocking the formation of marginal cirri of the right body side in the left component of the doublet. After the reorganisation had been induced in this component, incomplete primordia (without the marginal cirri) were formed. Resorption however concerned the whole generation of the former cirri together with the marginal ones which had no elements for their substitution. In the present experiments only the transversal cirri were removed which does not interfere with the complete resorption of the former cirri. In this way, the lack of one cirri group (12 transversal cirri) or absence of all the marginal cirri on the right body side fails to disturb the resorption of the old ciliature.

Elimination of some primordia of the new ciliature in *U. cristata* involves their lack in the adult individuals. This proves that the other primordia from the FVT area—e.g. the ventral cirri, the nearest to the transversal ones—cannot occupy the position of the eliminated structure. Determination of the fate of primordia occurs at such an early stage that the removal of kinetosomes which have been already systematized cannot alter the path of the subsequent development of the other cirri.

Similar results were obtained by Suham a 1961. He removed a part of the primordia of oral membranelles in the regenerating individuals of *Condylostoma spatiosum* and stated a gap in the course of AZM of regenerated individuals. The operated protozoa underwent their regeneration again.

It has been ascertained in the present study that after a complete isolation of the new division ciliature in *Urostyla*, the old ciliature in the fragments remains not resorbed. This result is different from that of Tartar 1966 a gained in stentor after a complete removal of the reorganization primordium. The morphogenetic pattern in stentor differs from that of *Hypotricha* by the fact that in division only one mouth of the opisthe arises a-new whereas its somatic ciliature grows up to the state in which it was transmitted by the paternal cell after division. In *Hypotricha* not only a new oral apparatus of the opisthe arises but two sets of somatic ciliature — one for each offspring (Wallengren 1902, Wise 1966 a)— are formed a-new as well. For this reason only the stomatogenesis within *Spirotricha* may be compared (Corliss 1967). The comparison of morphogenesis of the somatic ciliature in *Hypotricha* with that in other *Spirotricha* and in the other ciliate groups is difficult because presently rather little is known about the reconstitution of the somatic ciliature in those groups. In stentor, as result of removal of the oral primordium, in the course of reorganization arises an astomatic form with a normal somatic ciliature (Tartar 1966 a). A fragment of *Urostyla* in division deprived of the division primordia, fails to resorb its present somatic ciliature. If the resorption has occurred, the fragment would be entirely deprived of any ciliature.

In the fragments of *Urostyla*, which are separated of the whole cell, occurs — similarly as prior to division — the process of organizing the parts into a new entity which will be able to produce new primordia. This process, corroborating with the other division phenomena occurring in the fragment, prevents the annihilation of the pre-existing ciliature up to the moment of formation of the new regeneration ciliature in the fragments which contain the nucleus.

The author did not succeed to obtain fragments in which, after conclusion of morphogenetic processes, two generations of cirri: the old pre-divisional and the adult new ones would exist. It may be stated in consequence that the ciliature in *Hypotricha* behaves like an integrated system: it arises as a complete assembly and disappears as such one.

The nucleus is indispensable for the formation of the new ciliature but not for the resorption of the old one. It follows from numerous investigations that many processes may develop without the action of Ma. Tartar 1956, 1961, 1966 c ascertained that anuclear fragments of stentor are capable to regenerate their tail, the contractile vacuoles, to heal the post-operation wounds and to reconstruct the normal surface pattern. Enucleation of the dividers or of reorganizing stentors exerts no influence upon the conclusion of the division or regeneration processes. Similar results have been reported by Suzuki 1957 in *Blepharisma* and by Nachtwey 1965 in *Tetrahymena pyriformis*.

Golińska 1966 ascertained the formation of mouth and of the cytopharyngeal complex in the anucleated fragments in *Dileptus*. They arose from the structural elements which are present in the cytoplasm of the fragment.

It follows from the above facts that the nuclear apparatus is not indispensable for the regulation processes i.e. such ones which consist in arranging the structures already present in the individual. Anuclear fragments are unable to new syntheses and especially to formation of new kinetosomes. They perish after a rather short time.

Summarizing the results of the present investigations, it may be stated that resorption is an "all-or-none" process, involved into motion together with the formation of new ciliature, the nuclear apparatus being not indispensable for resorption.

Summary

The resorption of ciliature which occurs in the final stages of division in *Urostyla cristata* was investigated. Portions of primordia of the new ciliature were cut out. It was ascertained that the transversal cirri removed by this operation were not replaced by any others, either of the old or of the new assembly of ciliature. In the adult individuals, their site remains empty.

Fragments of dividers were cut off and the resorption of their ciliature was followed. Fragments resorb their old ciliature only in this case when they contain some elements to replace it. Absence of the division primordia in a fragment inhibits the process of resorption of the old ciliature. The nuclear apparatus is not indispensable for resorption.

The conditions necessary for the resorption of ciliature in *Hypotricha* are discussed on the background of the morphogenetic patterns in *Spirotricha* as well as the role of the nuclear apparatus in this process.

STRESZCZENIE

Badano resorpcję orzęsienia występującą w końcowych etapach podziału *Urostyla cristata*. Wycinano części zawiązków nowego orzęsienia i stwierdzono, że wycięte cirri transversalne nie są zastępowane przez żadne cirri ze starego ani nowego kompletu orzęsienia. Miejsce ich u dorosłych osobników pozostaje puste.

Odcinano fragmenty podziałowców *Urostyla cristata* i badano u nich resorpcję orzęsienia. Fragmenty resorbują stare orzęsienie tylko wtedy, kiedy mają je czym zastąpić. Brak zawiązków podziałowych we fragmencie zatrzymuje proces resorpcji starego orzęsienia. Do resorpcji nie jest konieczny aparat jądrowy.

Dyskutuje się warunki konieczne do resorpcji orzęsienia u *Hypotricha* na tle wzorców morfogenetycznych u *Spirotricha* oraz rolę aparatu jądrowego w tym procesie.

REFERENCES

- Corliss J. O. 1967: An aspect of morphogenesis in the ciliate Protozoa. *J. Protozool.*, 14, 1—8.
- Dembowska W. S. 1925: Studien über die Regeneration von *Stylonychia mytilus*. *Arch. mikrosk. Anat. EntwMech.*, 104, 185—209.
- Eberhardt R. 1962: Untersuchungen zur Morphogenese von *Blepharisma* und *Spirostomum*. *Arch. Protistenk.*, 10, 241—341.

- Frankel J. 1960: Effects of localized damage on morphogenesis and cell division in ciliate *Glaucoma chattoni*. J. exp. Zool., 143, 175—194.
- Frankel J. 1964 a: The effects of high temperature on the pattern of oral development in *Tetrahymena pyriformis* GL. J. exp. Zool., 155, 403—436.
- Frankel J. 1964 b: Cortical morphogenesis and synchronization in *Tetrahymena pyriformis* GL. Exp. Cell Res., 35, 349—360.
- Frankel J. 1967: Studies on the maintenance of development in *Tetrahymena pyriformis* GL—C. I. An analysis of the mechanism of resorption of developing oral structures. J. exp. Zool., 164, 435—466.
- Golińska K. 1966: Regeneration of anuclear fragments in *Dileptus cygnus* Clap. et Lachm. Acta Protozool., 4, 41—49.
- Hashimoto K. 1961: Stomatogenesis and formation of cirri in fragments of *Oxytricha fallax* Stein. J. Protozool., 8, 433—442.
- Jerka-Dziadosz M. 1964: *Urostyla cristata* sp. n. (Urostylidae, Hypotrichida); the morphology and morphogenesis. Acta Protozool., 2, 123—128.
- Jerka-Dziadosz M. 1965: Morphogenesis of ciliature in the physiological and traumatic regeneration of *Urostyla cristata* Jerka-Dziadosz, 1964. Acta Protozool., 3, 345—353.
- Jerka-Dziadosz M. 1967: Traumatic disturbance of cell division and regeneration of fragments derived from dividing individuals of *Urostyla*. Acta Protozool., 5, 59—79.
- Nachtwey D. S. 1965: Division of synchronized *Tetrahymena pyriformis* after emacrouneclation. C. r. Trav. Lab. Calsberg, 35, 25—35.
- Suhama M. 1961: Experimental studies on the morphogenesis of *Condylostoma spotiosum* Ozaki & Yagiu. J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B. Div. 1, 20, 33—82.
- Suzuki Sh. 1957: Morphogenesis in the regeneration of *Blepharisma undulans japonicus* Suzuki. Bull. Yamagata Univ., 4, 85—358.
- Tartar V. 1956: Pattern and substance in *Stentor*. In: Cellular Mechanism in Differentiation and Growth. Ed. D. Rudnick, Princeton University Press. 73—100.
- Tartar V. 1961: Biology of *Stentor*. Pergamon Press.
- Tartar V. 1966 a: Fission after division primordium removal in the ciliate *Stentor coeruleus* and comparable experiments on reorganizers. Expl. Cell Res., 42, 357—370.
- Tartar V. 1966 b: Induced division and division regression by cell fusion in *Stentor*. J. exp. Zool., 164, 297—310.
- Tartar V. 1966 c: Stentors in dilemmas. Z. allg. Microbiol. 6, 125—134.
- Wallengren H. 1902: Zur Kenntnis der Neubildungs- und Resorptions-processe bei den hypotrichen Infusorien. Zool. Jb., Abt. Anat. der Thiere. 15, 1—58.
- Wise B. N. 1965 a: Effect of ultraviolet microbeam irradiation on morphogenesis in *Euplotes*. J. exp. Zool., 159, 241—268.
- Wise B. N. 1965 b: The normal morphogenetic cycle in *Euplotes eurystomus* and its bearing on problems of ciliate morphogenesis. J. Protozool., 12, 626—648.

EXPLANATION OF PLATES I—IV

The resorption of ciliature in *Urostyla cristata* Jerka-Dziadosz, 1964

- 1: Opisthe 10 min. after separation of offsprings. In the posterior part of the cell, old and new transversal cirri are seen
 - 2: Opisthe; transversal cirri are removed. Non-resorbed paternal ciliature is seen. No new transversal cirri
 - 3: Living divider. Primordia of transversal cirri are cut out. Post-operation wound is seen in the middle
 - 4: Opisthe. Transversal cirri are cut out after conclusion of resorption. Non-ciliated area is seen at the site of removed cirri
 - 5: Non-operated proter. Normal position of transversal cirri
 - 6: Individual dividing at the stage of condensed Ma. The position of new ciliature is seen
 - 7: Same individual as in 6. Cell interior with condensed Ma and Mi near it are seen
 - 8: Anterior fragment of dividing individual, 4 hrs. after operation. New ciliature is seen
 - 9: Same individual as in 8. Cell interior with Ma is seen
 - 10: Anterior anuclear fragment of the dividing individual 4 hrs. after operation. Frontal cirri are seen, old ciliature being resorbed
 - 11: Same individual as in 10. Cell interior with no Ma is seen.
 - 12: Anterior fragment of dividing individual, 1 hr. after operation. Old frontal cirri and primordia of new frontal cirri are seen
 - 13: A part of dividing individual, 1 hr. after operation, with condensed nucleus after removal of the anuclear fragment. Condensed Ma is seen
 - 14: Posterior fragment of divider without division primordia of ciliature, 4 hrs. after operation. Not resorbed marginal cirri, nucleus in the middle are seen
 - 15: Same fragment as in 14, in lateral view. Unresorbed transversal cirri are seen. Nucleus in the middle
- 1, 2, 4—7, 12 — stained with iron haematoxylin after Parducz, 8—11, 14, 15 — with iron haematoxylin after Parducz and methyl green, 13 — Feulgen reaction, 3 — photogram of fresh material



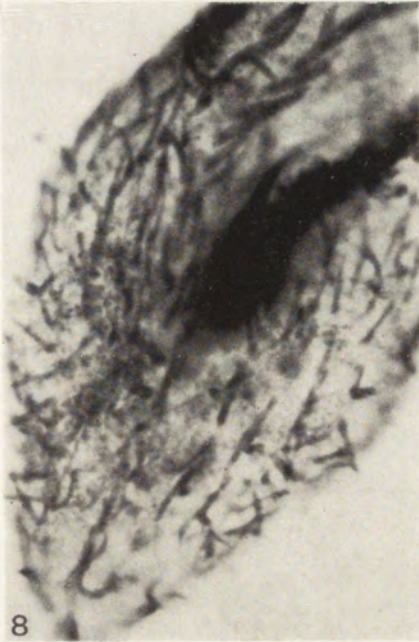
M. Jerka-Dziadosz

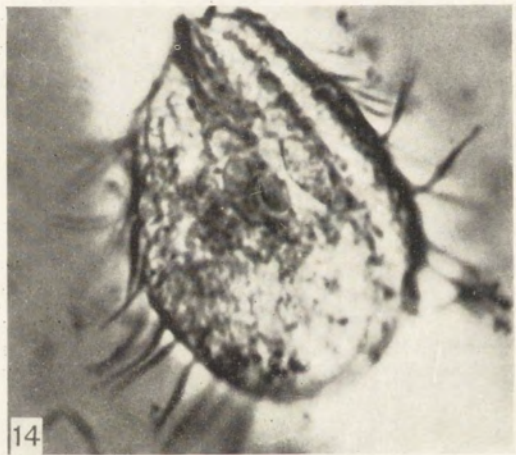
auctor phot.



M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.





M. Jerka-Dziadosz

auctor phot.

Jerzy J. LIPA

Nosema coccinellae sp. n., a new microsporidian parasite of
Coccinella septempunctata, *Hippodamia tredecimpunctata* and
Myrrha octodecimguttata

Nosema coccinellae sp. n., nowy gatunek pierwotniaka
z rzędu *Microsporidia* pasożytujący w *Coccinella septempunctata*,
Hippodamia tredecimpunctata i *Myrrha octodecimguttata*

Studies on pathogens of *Coccinellidae* are interesting because of many reasons. Many species of *Coccinellidae* are reared in mass for biological control purposes and the pathogens may greatly suppress their rearing. On the other hand, such pathogens may be of value against phytophagous *Coccinellidae* known as serious pests of plants.

Several authors recorded protozoan pathogens in *Coccinellidae*. Gregarines were recorded by Watson 1916, Foerster 1938, Lipa and Steinhaus 1959, 1962, Dellucchi 1954, Iperti 1964, Lipa and Semjanov 1967. Microsporidians were reported less frequently and recorded only by Lipa and Steinhaus 1959, 1962 and Lipa and Semjanov 1967.

While conducting extensive studies on infectious processes caused by protozoans in insects, we examined microscopically specimens of several species of *Coccinellidae* in order to obtain data whether they are infected by protozoans. The results of studies on gregarine infections have been published elsewhere (Lipa 1967). In this paper results of studies on microsporidian infections are included¹.

Material and methods

Specimens belonging to several species of *Coccinellidae* were collected in the following voivodeships and localities in Poland: Poznań — City of Poznań, Marcelin (Poznań County), Gola (Kępno County); Warszawa — City of Warsaw; Zielona Góra — Kałek, Ogardy (Strzelce Krajeńskie County); Koszalin-Niechorze, Mielno (Koszalin County). Besides, some *Coccinellidae* were collected in Luga of Leningrad Region (Soviet Union).

¹ This study was supported in part by a research grant FG-Po-112 from the United States Department of Agriculture (1961—1965). Some material and data were collected during the author's research trip to the Soviet Union under the joint fellowship of the Polish Academy of Sciences and the USSR Academy of Sciences.

Specimens of available *Coccinellidae* were microscopically examined and the infection level and tissues attacked were checked.

The life cycle of the parasites was studied on smeared preparations stained with 1% Giemsa's solution for 20 hours.

Results

Sixteen species of *Coccinellidae* were collected and microscopically examined, and only three were found to be infected with *Nosema coccinellae* sp. n. Results of this study are given in Table 1.

Table 1
A list of examined species of *Coccinellidae* on microsporidian infection with *Nosema coccinellae* sp. n.

Insect and locality	Number of specimens		Insect and locality	Number of specimens	
	examined	infected		examined	infected
<i>Adalia bipunctata</i> (L.)			<i>Exochomus quadripustulatus</i> (L.)		
Poznań 23.XII.1959	3	—	Marcelin 5.XII.1961	1	—
Warszawa 13.V.1962	19	—	Poznań 2.X.1962	38	—
<i>Adonia variegata</i> (Goeze)			Luga 30.X.1965	2	—
Luga 30.X.1965	2	—	<i>Hippodamia tredecimpunctata</i> (L.)		
<i>Anatis ocellata</i> (L.)			Marcelin 5.XII.1961	1	
Niechorze 15.IX.1963	2	—	Poznań 7.X.1962	18	1
<i>Calvia quatuordecimguttata</i> (L.)			Białowieża 10.VII.1964	40	1
Luga 30.X.1965	6	—	Luga 30.X.1965	5	
<i>Coccinella hieroglyphica</i> L.			<i>Myrrha octodecimguttata</i> (L.)		
Luga 30.X.1965	1	—	Luga 30.X.1965	23	2
<i>Coccinella quinquepunctata</i> (L.)			<i>Neomysia oblongoguttata</i> (L.)		
Ogardy 9.VIII.1963	2	—	Niechorze 15.IX.1963	2	—
Marcelin 5.XII.1961	4	—	<i>Platynaspis luteorubra</i> (Goeze)		
Luga 30.X.1965	83	—	Poznań 2.X.1962	2	—
<i>Coccinella septempunctata</i> L.			Białowieża 10.VII.1964	2	—
Marcelin 5.XII.1961	12	—	<i>Propylea quatuordecimpunctata</i> (L.)		
Marcelin 16.VIII.1962	12	—	Poznań 2.X.1962	2	—
Poznań 24.IX.1962	20	—	Białowieża 10.VII.1964	1	—
Goła 28.XI.1962	3	—	<i>Scymnus suturalis</i> Thunberg		
Poznań 8.IV.1963	9	3	Luga 30.X.1965	12	—
Ogardy 9.VIII.1963	24	1	<i>Synharmonia conglobata</i> (L.)		
Niechorze 15.IX.1963	58	—	Puławy 9.I.1960	2	—
Kałek 28.IV.1964	1	—	Poznań 3.III.1964	1	—
Mielno 26.VI.1964	4	—			
Białowieża 10.VII.1964	6	—			
Czarnków 31.VII.1965	3	1			
Poznań 3.IX.1965	9	1			
Luga 30.X.1965	201	50			

Nosema coccinellae sp.n.

Host insects: *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia tredecimpunctata* (L.) and *Myrrha octodecimguttata* (L.)

Infected tissues: mid-gut epithelium, Malpighian tubules, gonads, nerves, muscles.

Locality records: Poznań 8.IV.1963, 3.IX.1965, Ogardy 9.VIII.1963, Białowieża 10.VII.1964, Czarnków 31.VII.1965 (Poland); Luga 30.X.1967 (Leningrad Region, USSR).

Schizogony and sporogony

The life cycle of the microsporidian involved is typical for the genus *Nosema*. The schizonts are spherical with one or two red-stained nuclei in a blue-stained cytoplasm (Pl. I 1, 2). The uninucleate schizonts are up to 5 μ in diameter and their cytoplasm stains uniformly deep blue. The binucleate schizonts are up to 6 μ in diameter; their cytoplasm stains somewhat weaker and a very light area is seen around the nuclei (Pl. I 2). Tetranuclear schizonts were not seen in any of our preparations.

The young sporogonic stages stain similar to schizonts (Pl. I 3). However, older sporonts that are elongated and up to 6 μ long stain relatively light. Each sporont gives rise to one spore that characterizes the genus *Nosema*.

The spore

Spores are elipsoidal and relatively large (Table 2). Fresh spores are 4.4 to 6.7 μ long and 2.3 to 3.4 μ wide (Pl. I 4). Spores fixed in methyl alcohol and stained with Giemsa's solution are 3.6 to 6.2 by 2.0 to 3.6 μ wide (Pl.

Table 2

Frequency distribution of the length of one sample of 50 spores of *Nosema coccinellae* sp. n. compared with *Nosema hippodamiae* Lipa et Steinhaus

Microsporidians	Dimensionable groups (microns)						
	3.5-3.9	4.0-4.4	4.5-4.9	5.0-5.4	5.5-5.9	6.0-6.4	6.5-6.9
<i>Nosema coccinellae</i> sp. n.							
Polish strain: fresh spores*		1	25	13	8	2	1
stained spores*	4	12	8	18	2	6	
Rusian strain: stained spores*	1	7	14	19	3	6	
Stained spores**	1	12	7	18	7	5	
<i>Nosema hippodamiae</i> Lipa et Steinhaus							
stained spores***	9	15	12	11	2	1	1

* Host insect *Coccinella septempunctata*

** Host insect *Myrra octodecimguttata*

*** Host insect *Hippodamia convergens*

II 5). The polar filament is up to 170 μ long and is easily extruded by applying pressure on the cover glass (Pl. I 4, II 6).

Systematic position

Nosema coccinellae sp.n. described here cannot be identified with *Nose-*

ma hippodamiae described by Lipa and Steinhaus 1959. The later microsporidian was found in *Hippodamia convergens* Guerin collected in California and infected the mid-gut epithelium and fat body of its host, while *Nosema coccinellae* sp.n. has not infected the fat body of host insects. Furthermore, the size of spores of both microsporidians is different as spores of *N. coccinellae* sp. n. are on an average 1μ larger than spores of *N. hippodamiae*. For the reasons explained above I assume that the microsporidian described from *Coccinella septempunctata*, *Hippodamia tredecimpunctata* and *Myrrha octodecimguttata* is a new species and I propose the name *Nosema coccinellae* sp.n. for it.

Pathogenicity

Nosema coccinellae sp.n. invades various tissues of the host insects. The parasite was observed in the cells of the mid-gut epithelium, Malpighian tubules (Pl. II 7) gonads, muscles (Pl. II 8) and in nerves. In the most cases the infection is focal, that is only parts of the susceptible organs are infected. The infected parts of various organs show hypertrophy due to the huge number of spores that fill the cells.

There are some differences in the degree of infection of various organs of *C. septempunctata* and *M. octodecimguttata* by *Nosema coccinellae* sp.n. that was mentioned by Lipa and Semjanov 1967. In case of *C. septempunctata* the most intensive infection was observed in Malpighian tubules while in *M. octodecimguttata* in the gut epithelium. Therefore, the gut of *C. septempunctata* appears very frequently to be infected focally, while the gut of *M. octodecimguttata*—is frequently completely destroyed by the parasite.

In some adults of *M. octodecimguttata* the microsporidian was observed in female gonads.

Infection level and host specificity

Out of ten species of *Coccinellidae* collected in Poland only *Coccinella septempunctata* and *Hippodamia tredecimpunctata* were infected with *Nosema coccinellae* sp.n. (Table 1). The infection level, in the material collected in Poland, was not very high: out of nine beetles of *C. septempunctata* collected in Poznań on August 8, 1963 three were infected. The infection among beetles collected in Ogardy or in Poznań in 1965 was also very low.

In Luga (Soviet Union) *Coccinella septempunctata* collected in its overwintering places was infected in 24.1% (50 infected out of 207 examined beetles) and *Myrrha octodecimguttata* in 8.7% (2 infected out of 23 examined beetles) (Lipa and Semjanov 1967).

It is interesting to notice that all species coming from Luga were collected in one place (in an area of a few square meters) but only two species were infected.

Since no artificial infections were performed there are no experimental data on the host specificity of *Nosema coccinellae* sp.n.

Geographic distribution

Nosema coccinellae sp.n. was first found in 1963 in Poland and later in the Soviet Union that is in localities distant about 2000 km one from the other. It seems, therefore, quite probable that its distribution covers whole

Europe. However, from the data obtained in Poland it is evident that its distribution is disjunctive as it was recorded only in some localities (Poznań lies about 120 km from Ogardy and about 600 km from Białowieża). Insects collected in other parts of Poland were healthy. In the Soviet Union adults from one population at Luga (Leningrad Region) were checked and they were found to be infected.

Discussion

Although *Coccinellidae* were extensively studied due to their great importance there is very scanty information on protozoan infections especially on microsporidian. So far only Lipa and Steinhaus 1959, 1962 and Lipa and Semjanov 1967 have reported such findings. Ipertti 1964, in his detailed studies on parasites of *Coccinellidae* in France, recorded unidentified gregarines but no microsporidians.

There may be several reasons for the lack of our knowledge of microsporidian infections of *Coccinellidae* and one may be the resistance of these insects to them. As we can see from Table 1 out of sixteen examined species only *Coccinella septempunctata*, *Hippodamia tredecimpunctata* and *Myrrha octodecimguttata* were found to be hosts of *Nosema coccinellae* sp.n. It is especially interesting to notice that all beetles coming from Luga (Soviet Union) were collected in one place (on an area of several square meters). Therefore, one could expect, that under such conditions other species, besides *C. septempunctata* and *M. octodecimguttata*, should also be infected. However, it was not so and only two species out of nine were infected with *N. coccinellae* sp.n.

Some means to understand rare records of microsporidian infections among *Coccinellidae* is given in Table 1. When we examine data about localities where *C. septempunctata* was collected in Poland we can see that *Nosema coccinellae* sp.n. was recorded only in four localities at Poznań, Ogardy, Czarnków and Białowieża, while populations in other parts of Poland were free from infection. Even samples taken from a known infected population did not always contain diseased insects. It is understandable, therefore, that in order to secure the finding of microsporidians infecting *Coccinellidae*, as well as many other insects, the collection of hosts should be made on large scale and on a very large area.

Summary

A new microsporidian *Nosema coccinellae* sp.n. is described from *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia tredecimpunctata* (L.), and *Myrrha octodecimguttata* (L.). The parasite infects the midgut epithelium, Malpighian tubules, muscles, nerves and gonads. Spores are elipsoidal: fresh spores are 4.4–6.7 by 2.3–3.4 μ ; stained spores are 3.6–6.2 by 2.0–3.6 μ . The polar filament was up to 170 μ long. *Nosema coccinellae* sp.n. was recorded in Poland in three localities and in one locality in the Soviet Union (vicinity of Leningrad). The maximum infection level in the population of *C. septempunctata* was 24.1%, of *M. octodecimguttata* 8.7%, and of *H. tredecimpunctata* 2.5%. Thirteen other species of *Coccinellidae* were free from infections.

STRESZCZENIE

Opisano nowy gatunek pierwotniaka *Nosema coccinellae* sp. n. (*Microsporidia*) pasożytującego w biedronkach *Coccinella septempunctata* L., *Hippodamia tredecimpunctata* (L.) i *Myrrha octodecimpunctata* (L.). Pasożyt zaraża jelito środkowe, cewki Malpighiego, mięśnie, nerwy i gonady. Spory są elipsoidalne o wymiarach: żywe spory 4.4—6.7 μ długości i 2.3—3.4 μ szerokości; barwione spory 3.6—6.2 μ długości i 2.0—3.6 μ szerokości. Nić biegunowa ma długość 170 μ . Maksymalny procent zarażenia populacji *C. septempunctata* wynosił 24.1%, *H. tredecimpunctata* 2.5%, *M. octodecimpunctata* 8.7%, trzynaście innych badanych gatunków biedronek nie było zarażonych.

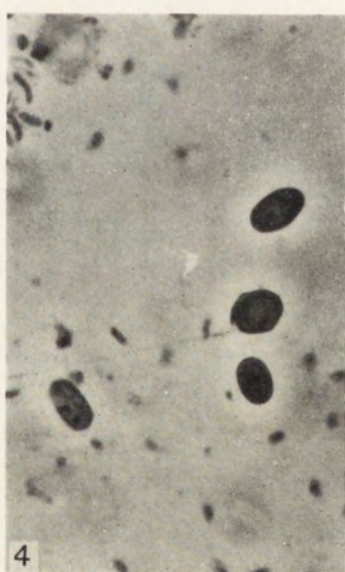
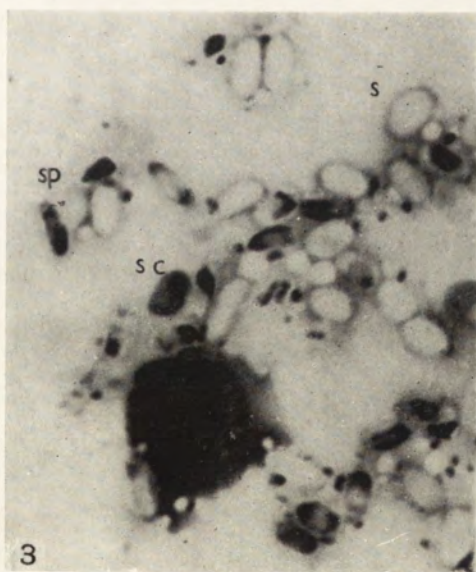
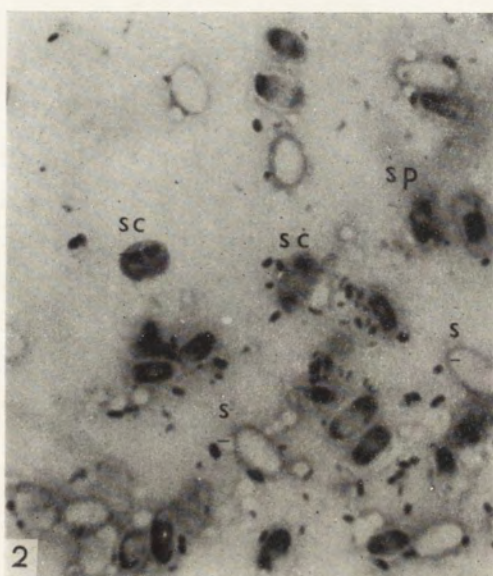
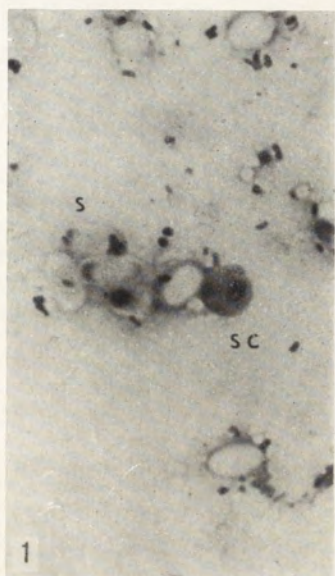
REFERENCES

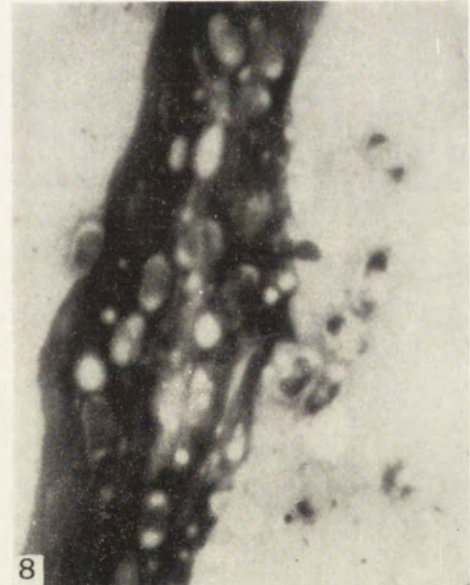
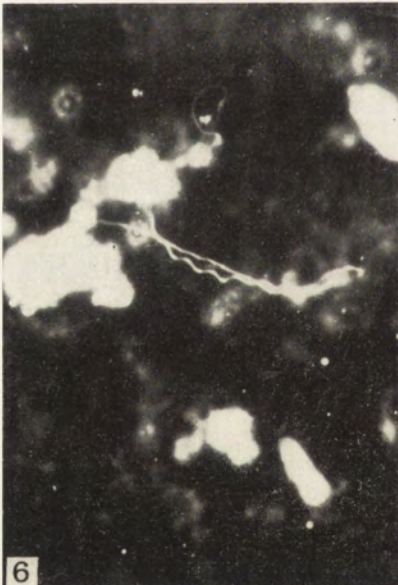
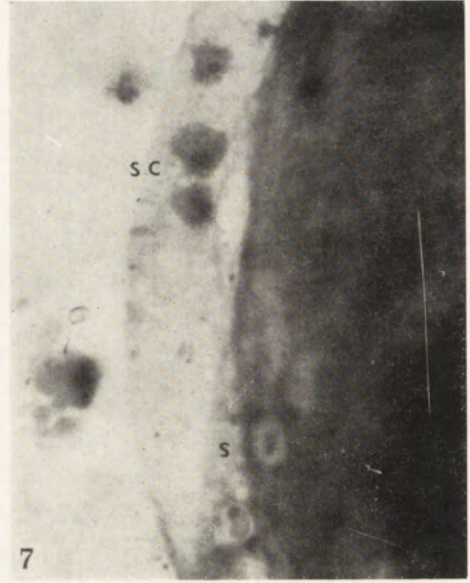
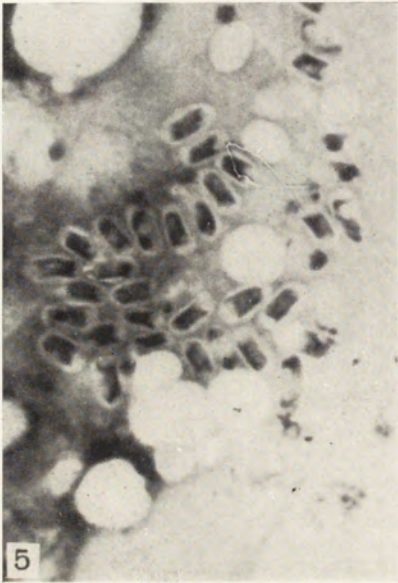
- Delucchi V. 1954: *Pullus impexus* Muls. (Col. Coccinellidae) a predator of *Adelges piceae* Ratz. (Hemipt. Adelgidae) with notes on its parasits. Bull. ent. Res., 45, 243—278.
- Foerster H. 1938: Gregarinen in schlesischen Insekten. Z. Parasitenk., 10, 649—673.
- Iperti G. 1964: Les parasites des coccinelles aphidiphages dans les Alpes-Maritimes et les Brasses-Alpes. Entomophaga, 9, 153—180.
- Lipa J. J. 1967: Studies on gregarines (*Gregarinomorpha*) of arthropods in Poland. Acta Protozool., 5, 97—179.
- Lipa J. J., Semjanov V. P. 1967: The parasites of the lady-birds (*Coleoptera*, *Coccinellidae*) in the Leningrad region. Ent. Obozr., 46, 75—80.
- Lipa J. J., Steinhaus E. A. 1959: *Nosema hippodamiae* n. sp., a microsporidian parasite of *Hippodamia convergens* Guerin (*Coleoptera*, *Coccinellidae*). J. Insect Path., 1, 304—307.
- Lipa J. J., Steinhaus E. A. 1962: Further report on identification of Protozoa pathogenic for insects. Acta parasit. pol., 10, 165—175.
- Watson M. E. 1916: Some new gregarine parasites from *Arthropoda*. J. Parasit., 2, 27—36.

EXPLANATION OF PLATES I—II

Nosema coccinellae sp. n.

- 1: Uninucleate schizont (sc) and spores (s). 1200 \times
- 2—3: Sporonts (sp), schizonts (sc) and spores (s). 1200 \times
- 4: Living spores seen under phase contrast, notice a spore with extruded polar filament
- 5: Stained spores; notice well stained sporoplasm
- 6: Polar filament seen at dark-field illumination
- 7: Spores (s) and uninucleate schizonts (sc) in muscles
- 8: Spores in Malpighian tubules





J. J. Lipa

auctor phot.

Jerzy J. LIP A

On two microsporidians: *Nosema whitei* Weiser from *Tribolium confusum* and *Nosema weiseri* sp. n. from *Rhizopertha dominica*O dwóch mikrosporidiach: *Nosema whitei* Weiser z *Tribolium confusum* i *Nosema weiseri* sp. n. z *Rhizopertha dominica*

The lesser grain borer (*Rhizopertha dominica* F.) and the confused flour beetle (*Tribolium confusum* Duval) are well known serious stored product pests. Therefore the study of their parasites is greatly important. Recently, Lipa 1966 has given fairly complete list of protozoan parasites of insects belonging to the genus *Tribolium*.

In September 1962 a number of dead and diseased beetles of *T. confusum* and *R. dominica* was received from the Laboratory of Stored Product Pests of our Institute with the request for diagnosis.

The microscopic examination revealed that these insects were infected with microsporidian, coccidian and gregarine parasites. The results of studies on gregarine infection of *T. confusum* are published elsewhere (Lipa 1967) and a note on a coccidian infection is now prepared for publication. In the present paper results of our work on microsporidian infections are given¹.

Materials and methods

Dead and diseased specimens of *Tribolium confusum* Duval, *T. castaneum* Hbst., *T. destructor* Uytt., and *Rhizopertha dominica* F. were frequently received from the Laboratory of Stored Product Pests of our Institute. These insects were diagnosed and pathogens were determined. Besides, cultures of healthy and diseased populations of all insects were established in our laboratory and served as a source of material for detailed studies on the life cycle and pathogenicity of parasites.

Various tissues of insects were examined and checked for the presence of parasites. Smearred tissues as well as microtome slides were stained with 0.5 to 1.0% Giemsa's solutions for 12 to 24 hours.

¹ This study was supported in part by a research grant FG-Po-112 (1961—1965) from the United States Department of Agriculture.

Results

Nosema whitei Weiser, 1953

Synonyms: "Neosporidian" White, 1923; *Nosema buckleyi* Dissanaïke, 1955; *Nosema* sp. West, 1960.

Host insects: *Tribolium confusum* Duval, White 1923, Weiser 1953, Dissanaïke 1955 and Kramer 1960 recorded this species also in *T. castaneum* Hbst.

Habitat: fat body.

Locality record: Poznań 12.IX.1962 and in the following years (laboratory culture).

Schizogony and sporogony

The development of this microsporidian is typical for the genus *Nosema*. Schizonts are from 2 to 6 μ in diameter. Uni- and binucleate schizonts were observed. They divide by binary fission into two daughter cells.

Sporonts are binucleate, elongate and are up to 6 μ long. They stain weaker than schizonts.

The spore

Spores are elipsoidal. Fresh spores measured in water are 4.0 to 6.1 μ long and 2.7 to 3.7 μ wide (Pl. I 1). Fixed and stained spores are smaller and are 3.4 to 4.8 μ long and 2.4 to 3.3 μ wide (Pl. I 2) (Table 1).

Table 1

Frequency distribution of the length of one sample of 50 spores of *Nosema whitei* Weiser and *Nosema weiseri* sp. n.

Microsporidian	Dimensionable groups (microns)								
	2.0- -2.4	2.5- -2.9	3.0- -3.4	3.5- -3.9	4.0- -4.4	4.5- -4.9	5.0- -5.4	5.5- -5.9	6.0- -6.4
<i>Nosema whitei</i> Weiser fresh spores					5	20	23	1	1
stained spores			1	18	29	2			
<i>Nosema weiseri</i> sp. n. fresh spores			20	21	7	—	2		
stained spores	2	23	24	—	1				

The spores of *Nosema whitei* stain very well with Giemsa's solution (Pl. I 2). The polar filament up to 140 μ long is easily extruded by pressure applied to cover glass (Pl. I 3, II 4).

Pathogenicity

The main site of infection was the fat body which in dead insects was completely destroyed by the parasite. *Nosema whitei* is highly pathogenic and caused death of a great per cent of insects in infected cultures.

Taxonomic position

As one spore is produced from each sporont this species is placed among the genus *Nosema* and identified with *Nosema whitei* Weiser. It is generally

believed that White 1923 recorded for the first time this microsporidian as the parasite of *Tribolium confusum* and *T. castaneum* (= *T. ferrugineum* Fab.). However, there are no data to prove it. White mentioned only that fat cells were filled up with the so called "neosporidian" but he did not mention any morphological features of the parasite.

Weiser 1953 described *Nosema whitei* from one infected adult beetle of *T. castaneum*. The spores in Weiser's material were oval 4 to 5 μ long and 1.7 to 2.0 μ wide.

While studying schizogregarine infections of *T. castaneum*, Dissanaïke 1955 found one pupa infected with microsporidian she named *Nosema buckleyi*. The spores of *N. buckleyi* were 4.8 to 5.7 μ long and 2.8 to 3.2 μ wide (with an average value 5.4 by 3.0 μ). The length of polar filament was up to 195 μ .

West 1960 found in *T. confusum* a microsporidian he designated as *Nosema* sp. The living spores of *Nosema* sp. were 3.75 to 5.0 μ long (average 4.44) and 2.8 to 3.2 μ wide (average 3.0). Fixed and stained spores were 0.7 and 1.0 μ smaller in length and width respectively. The length of polar filament was up to 150 μ .

As seen in Table 2 the differences between data given by various authors are minor and therefore Weiser's proposition to consider *Nosema buckleyi* Dissanaïke as synonym of *Nosema whitei* Weiser is justified. Furthermore, I consider *Nosema* sp. studied by West 1960 as identical with *Nosema whitei*.

Nosema weiseri sp. n.

Host insect: *Rhizopertha dominica* F.

Habitat: fat body.

Locality record: Poznań 12.IX.1962 and in the following years (laboratory culture). Dr. William R. Kellen of the USDA, Fresno, California, recorded this species in Fresno, USA, in 1965.

Schizogony and sporogony

The development of this microsporidian is typical of the genus *Nosema*. Schizonts are 1.5 to 4.0 μ in diameter. Uninucleate and binucleate schizonts were frequently observed. Sporonts were elongate with two red nuclei.

The spore

Spores are elipsoidal (Pl. II 5, 6). Fresh spores, measured in water, are 3.0 to 4.1 μ long and 1.9 to 2.5 μ wide; two spores out of fifty were 5.0 μ long (Table 1). Stained spores were 2.2 to 3.2 μ long and 1.2 to 2.0 μ wide, a single stained spore was 4.0 by 2.0 μ . The length of the polar filament, easily extruded by pressure applied to cover glass, was on an average 60 μ .

Pathogenicity

The main site of infection is the fat body. At highly advanced disease or in dead insects the whole body is completely destroyed by *Nosema weiseri* sp. n. The microsporidian is highly pathogenic and in studied laboratory cultures up to 60% of insects were infected.

Systematic position

Inasmuch as one spore is produced from each sporont the species being

described belongs to the genus *Nosema*. There are no previous records of microsporidian infection of *Rhizopertha dominica*, this constituting the first record.

Spores of the newly found *Nosema* are almost only half as long as spores of *Nosema whitei* (Table 1). Without doubt such differences in size are of taxonomic importance.

For the reasons explained above I assume that the microsporidian found in *R. dominica* was not described previously. Accordingly, I propose the name *Nosema weiseri* sp. n. for it. The specific name is in honour of my distinguished friend Dr. Jaroslav Weiser, who greatly contributed to our knowledge on *Microsporidia*.

The holotype slide, stained with Giemsa's solution, from an adult taken at Poznań on September 23, 1963, is in the author's collection. The paratype slide is deposited in the collection of Dr. Jaroslav Weiser, Department of Insect Pathology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia.

Discussion

Weiser 1953 accepted that the so called "neosporidian" recorded by White 1923 from *Tribolium confusum* and *T. castaneum* is in fact a microsporidian he named *Nosema whitei*. In his later paper, Weiser 1961 considered that *Nosema buckleyi* Dissanaïke, 1955 from *T. confusum* is a synonym of *N. whitei*. The author of this paper considers *Nosema* sp. West 1960 from *T. confusum* to be identic with *N. whitei*, too.

It is interesting to notice that White 1923 observed an infection in both species of *T. castaneum* and *T. confusum*. Weiser 1953 observed *N. whitei* only in *T. castaneum* and mentioned that *T. confusum* and *T. destructor* are resistant. Dissanaïke 1955 reported this microsporidian from *T. castaneum* while West 1960 from *T. confusum*, but never from both *Tribolium*

Table 2
Characters of *Nosema whitei* Weiser reported by various authors under several names (synonyms) and from various hosts

<i>Tribolium</i> species	Tissues attacked	Original name	Size of spores in μ	References
<i>T. castaneum</i> <i>T. confusum</i>	fat body	„Neosporidian”	not given	White 1923
<i>T. castaneum</i>	fat body	<i>Nosema whitei</i>	4.5 × 1.7-2.0	Weiser 1953, 1961
<i>T. castaneum</i>	fat body	<i>Nosema buckleyi</i>	4.8-5.7 × 2.8-3.2	Dissanaïke 1955
<i>T. confusum</i>	fat body	<i>Nosema</i> sp.	3.75-5.0 × 2.8-3.2*	West 1960
<i>T. confusum</i>	fat body	<i>Nosema whitei</i>	4.0-6.1 × 2.7-3.5* 3.4-4.8 × 2.4-3.3**	Lipa, this paper

* fresh spores

** stained spores

species. In my studies, I have also observed *N. whitei* only in *T. confusum* while *T. castaneum* and *T. destructor* were not infected under natural conditions. As seen in Table 2 all morphological characters of microsporidians recorded in *Tribolium* spp. are very similar. Furthermore, in all cases the fat body was infected with the parasites. The only difference was host insects, therefore the existence of specific strains of *Nosema whitei* infecting various *Tribolium* species must be taken under consideration.

Although *Rhizopertha dominica* and *Tribolium* spp. live in the same environment we have not observed so far the cross-infections with their parasites.

So far *Nosema whitei* Weiser is known from United States, Czechoslovakia, France and Poland, while *Nosema weiseri* sp. n. from United States and Poland. Both species, however, seem to be cosmopolitan and with time they will probably be recorded in other countries too.

Summary

Microsporidian parasites infecting fat body of *Tribolium confusum* Duval and *Rhizopertha dominica* F. were studied. Synonyms of *Nosema whitei* Weiser from *T. confusum* are given. Fresh spores of *N. whitei* are 4.0–6.1 by 2.7–3.7 μ ; stained spores are 3.4–4.8 by 2.4–3.3 μ . *Nosema weiseri* sp. n. described from *R. dominica* has spores much smaller; fresh spores are 3.0–4.1 by 1.9–2.5 μ ; stained spores are 2.2–3.2 by 1.2–2.0 μ . Both microsporidians are highly pathogenic for their hosts.

STRESZCZENIE

Badano pasożytnicze pierwotniaki z rzędu *Microsporidia* zarażające ciało tłuszczowe *Tribolium confusum* Duval i *Rhizopertha dominica* F. Podano synonimy *Nosema whitei* Weiser z *T. confusum*. Świeże spory *N. whitei* mają wymiary 4.0–6.1 \times 2.7–3.5 μ ; barwione spory mierzą 3.4–4.8 \times 2.4–3.3 μ . *Nosema weiseri* sp. n. opisana z *R. dominica* ma spory mniejsze; świeże spory mierzą 3.0–4.1 \times 1.9–2.5 μ ; spory barwione mierzą 2.2–3.2 \times 1.2–2.0 μ . Oba mikrosporidia są bardzo zjadliwe dla swych żywicieli.

REFERENCES

- Dissanaïke A. A. 1955: A new schizogregarine *Triboliocystis garnhami* n.g., n. sp. and a new microsporidian *Nosema buckleyi* n. sp. from the fat body of the flour beetle *Tribolium castaneum*. J. Protozool., 2, 150–156.
- Kramer J. P. 1960: Observations on the emergence of the microsporidian sporoplasm. J. Insect Path., 2, 433–439.
- Lipa J. J. 1966: *Tribolium destructor* Uytt. as a new host for *Didymophyes minuta* (Ishii) Watson (Gregarinidae: Didymophyidae). Zool. Zh., 14, 1130–1133.
- Lipa J. J. 1967: Studies on gregarines (*Gregarinomorpha*) of arthropods in Poland. Acta Protozool., 5, 97–179.
- Weiser J. 1953: Schizogregariny z hmyzu, škodícího zasobám mouky. I. Věstn., čl. Spol. zool., 16, 199–211.
- Weiser J. 1961: Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten. Monogr. angew. Entomol., 17, Parey Verlag, 149 pp.

- West A. F. 1960: The biology of a species of *Nosema* (Sporozoa: *Microsporida*) parasitic in the flour beetle *Tribolium confusum*. *J. Parasit.*, 46, 747—754.
- White G. F. 1923: On a neosporidian infection in flour beetles. *Anat. Rec.*, 26, 358.

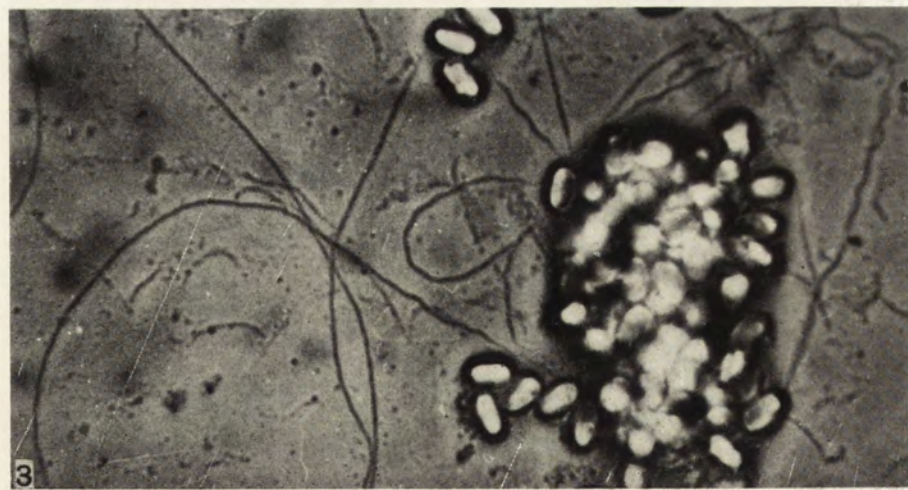
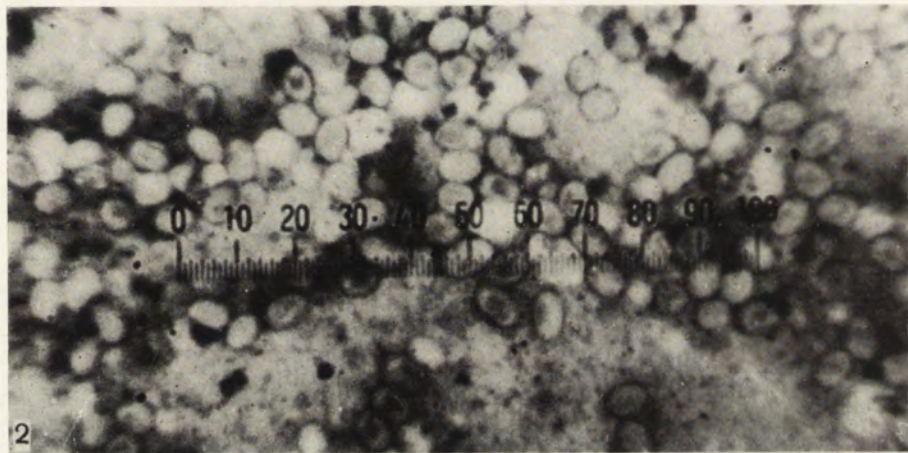
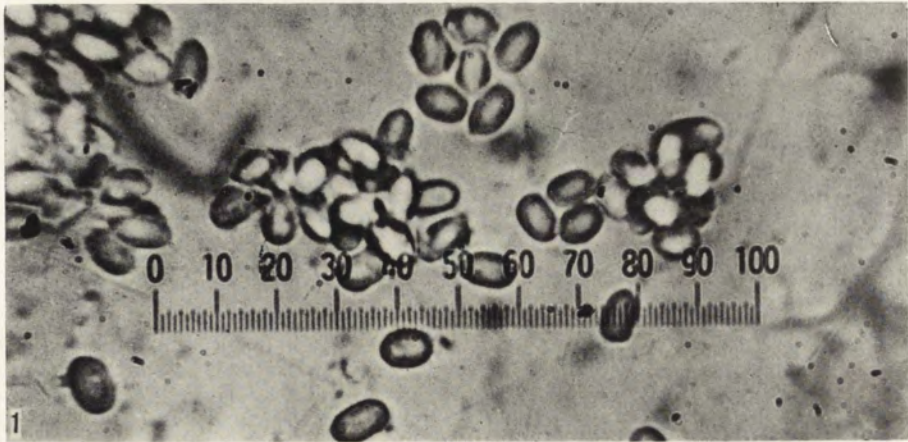
EXPLANATION OF PLATES I—II

Nosema whitei Weiser

- 1: Fresh spores as seen under phase contrast. 1440 ×
- 2: Spores stained with Giemsa's solution. 1600 ×
- 3: Fresh spores with extruded polar filaments as seen under phase contrast. 1440 ×
- 4: Stained spores with extruded polar filaments. 1600 ×

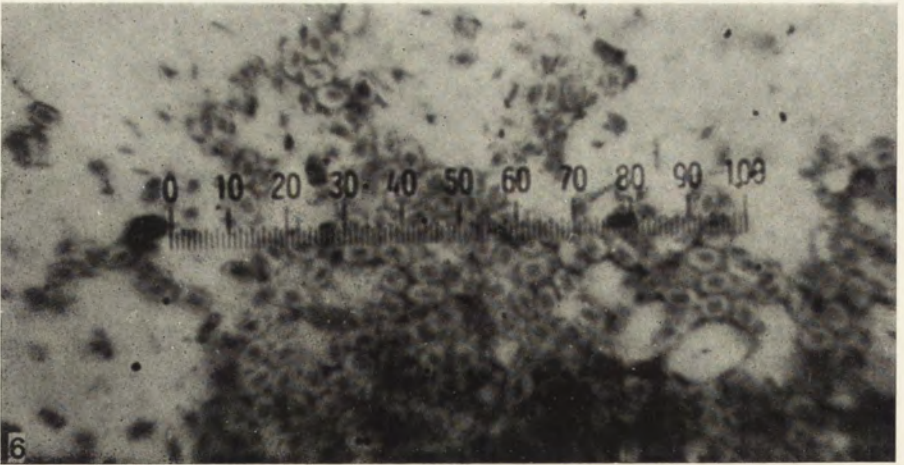
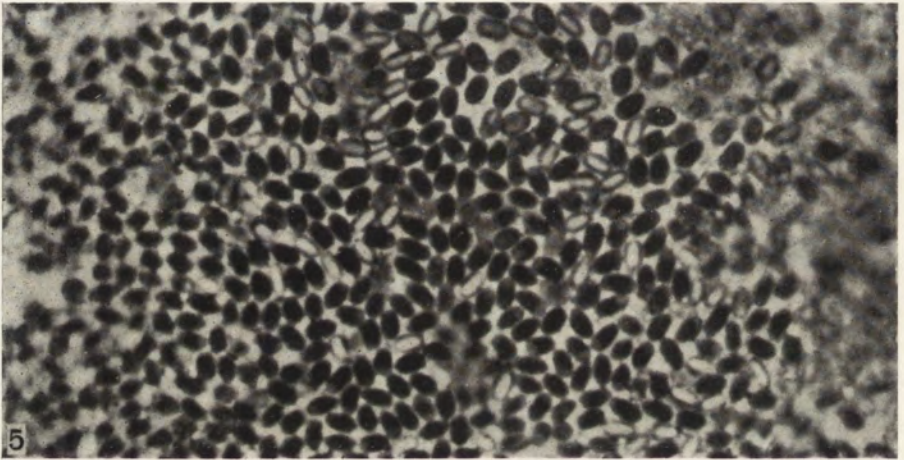
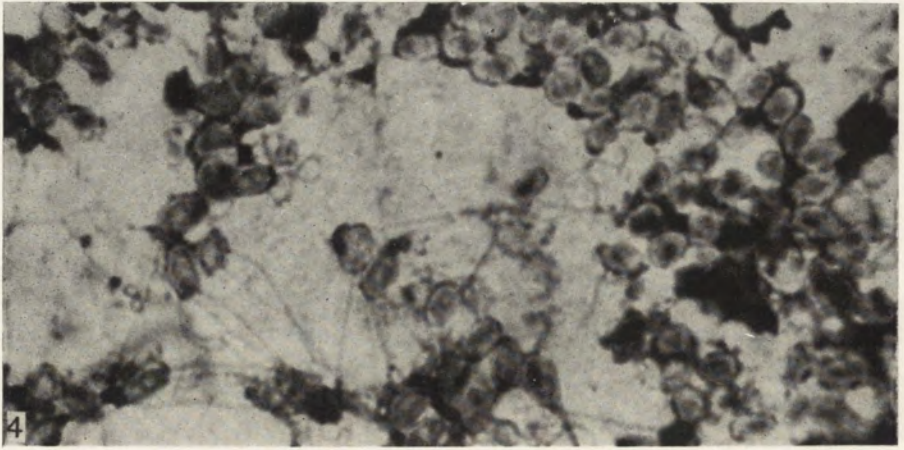
Nosema weiseri sp.n.

- 5: Fresh spores as seen under phase contrast. 1440 ×
- 6: Spores stained with Giemsa's solution. 1600 ×



J. J. Lipa

auctor phot.



J. J. Lipa

auctor phot.

E. S. SNIGIREVSKAYA

The occurrence of micropore in schizonts, microgametocytes
and macrogametes of *Eimeria intestinalis*О наличии микропоры у шизонтов, микрогаметоцитов и макрогамет
Eimeria intestinalis

The electron microscopic study of intracellular parasitic protozoa (*Eimeria*, *Lankesterella*, *Plasmodium*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*) revealed a number of common characters in their ultrastructure. The micropore is one of the structures characteristic for those protozoa. This structure has been described first by Garnham and al. 1961 as micropyle in the sporozoites of *Laverania falciparum* and in *Lankesterella garnhami* (Garnham and al. 1962 a). Subsequently the same structure was found in the trophozoites of toxoplasma (Garnham and al. 1962 b), of *Sarcocystis* (Ludvik 1963), *Selenidium* (Vivier et Schrevel 1964), *Coelotropha* (Vivier et Henneré 1965), *Eucoccidium* (Bardale 1966), in merozoites of *Eimeria* (Cheissin and Snigirevskaya 1965, Scholtzseck, Volkmann and Hammond 1966). Garnham and al. 1961 postulated that the protoplasmic content of the sporozoit, when penetrating into the host cell, passes out through micropyle and becomes spherical subsequently.

This view was denied by Cheissin and Snigirevskaya 1965, Scholtzseck and al. 1966 who suggest that the exchange process between the parasite and the host cell takes place through the micropore. This supposition is of an essential importance for the problem of nutrition of the intracellular parasite protozoa.

It has been usually accepted that in various sporozoa, toxoplasmas and leishmanias, an osmotic way of nutrition occurs. In the recent years, a number of electron microscope studies appeared which reported that in some intracellular parasites e.g. in malaria plasmodium, the process of pinocytosis was observed (Rudzińska and Trager 1959, Rudzińska, Trager and Bray 1965 and others). However the occurrence of those processes has not been associated with any special cellular structure. Cheissin and Snigirevskaya 1965 put forward the view that the micropore of merozoites of *Eimeria intestinalis* presents a ultracytostome corresponding to that of *Trypanosoma mega* (Steinert and Novikoff 1960). However direct evidences of functioning of micropyle as a cytostome were not provided.

Just in the recent study of Aikawa and al. 1966 it was ascertained that the micropore of the erythrocyte schizonts and gamonts of *Plasmodium* presents an actual cytostome through which occurs the nutrition of the parasite with the stroma of erythrocyte.

If in the merozoites of coccidia, the micropore really participates in swallowing of the nutritive substances, its presence could be anticipated at all the remaining stages of the intracellular development.

Therefore a special electron microscopic examination of various developmental stages of *Eimeria intestinalis* has been undertaken in order to determine whether the micropore occurs in schizonts and gametocytes as well.

Material and methods

Investigations were carried out on endogenous developmental stages of *Eimeria intestinalis*: merozoites, schizonts, microgametocytes, microgametes and macrogametes. Samples of small intestine tissue containing the parasites were fixed in 2% solution of OsO_4 (Sjöstrand 1956) and embedded in araldit. Ultrathin sections were prepared with ultramicrotome UMT-2, contrasted with lead hydroxide (Karnovsky 1961), or lead citrate (Reynolds 1963), or uranyl acetate (Watson 1958). Microphotograms were executed with the electron microscope JEM-5G at an accelerating intensity 80 kw. The electron optic magnification amounted 12000—18000 with the following light optic magnification.

Results

All the development stages of *Eimeria intestinalis* within the host cell, are coated with their own envelope and a membrane embracing the parasitophore vacuole which is produced by the host cell. In merozoites and in mature macrogametes, the envelope is constituted of two elementary membranes which lie at a distance of 350 Å from each other. In schizonts, microgametocytes and young macrogametes, only one membrane is present.

The micropore revealed in the membrane of various development stages of *E. intestinalis* presents a cylindric invagination at the surface of the parasite body, measuring 600 Å in diameter and 1500 Å in depth. The wall of micropore is produced by the two membranes which are at a distance of 300—400 Å from each other. The internal membrane of micropore presents the continuation of the outer cell membrane. The presence of micropore is characteristic for different stages of endogenous development of *Eimeria intestinalis*: for merozoites, schizonts, microgametocytes and macrogametes.

In the merozoites of different generations, which are mature but not yet detached from the residual body of schizont, one micropore was stated at the level of the nucleus (Pl. I 1, 2) It is constituted of both envelope membranes, its depth being usually 1500 Å. Only on one section a micropore was found which was penetrating into cytoplasm of the merozoit as deep as 3300 Å (Pl. II 3). The cross sections show that the micropore has the form of two concentric circles (Pl. II 4). The diameter of the inner circle is 600 Å and that of the outer one — 1500 Å. The distance between the two membranes of the micropore is 300—400 Å. The majority of sections shows that the micropore is separated from the cytoplasm by the inner membrane (Pl. I 2, II 3) sometimes however it is visible that micropore opens free into cytoplasm (Pl. I 1).

The micropore of schizonts and microgametocytes is produced by two membranes although their body is coated by one membrane only (Pl. III 5, 6, IV 7, 8, V 9, 10). The second membrane of micropore forms a sort of case around the first membrane which is lining the canal of the pore.

Numerous dense granules adhere to the external side of the micropore membrane (Pl. IV 7). It seems not improbable that the granules present the cross sections fibrils which run along the membrane embracing the micropore.

In the multinucleated schizonts and microgametocytes, several micropores were revealed on a single section. They are located at a considerable distance as well as closely one to another (Pl. IV 7). Being smaller than the nucleus, the micropore occur more rarely in the section plane. There was no possibility to evaluate the number of micropores in one schizont or microgametocyte because full section series with no gaps were not obtained. It might be supposed that in schizont the number of micropores is equal to that of nuclei because in segmentation of schizont into merozoit, the micropores are distributed by one into each merozoit. The microgamete proved to be the only stage out of all under study which fails to show micropores. It may be observed in formation of microgametes that micropores formed in the development of microgametocyte remains in the residual body (Pl. V 10).

In macrogametes, the micropores are of the same structure as in merozoits (Pl. VI 11, 12). The depth of micropore is 1500 Å, the diameter to its inner membrane — 700 Å, and to its outer one — 1000 Å. They are not only on the surface of the parasite but also in the depth of the invaginated cell membrane. Those invaginations are often observed in macrogametes (Pl. VII 13). Micropores lie at a certain distance from one another and their number in a macrogamete is evidently very high. On separate sections of a big macrogamete, several micropores on an insignificant area are observable (Pl. VI 12).

Discussion

The above results indicate that in *Eimeria intestinalis* — a parasite of the rabbit intestine — the micropore occurs at all the stages of the endogenous development except for the microgamet. Scholtysek, Volkman und Hammond 1966 and Scholtysek, Hammond and Ernst 1966, revealed also the micropore at various stages of development in coccidia. Those authors described the micropore e.g. in trophozoits, macrogamonts and macrogametes of *Klossia helicina*, in microgametocytes of *E. bovis*, in macrogametes of *E. bovis*, *E. stiedae*. At different stages of development of *Eucoccidium* (*Protococcidia*) the micropore has been described by Bardele 1966.

The structure of micropore is uniform at all the stages studied. It presents a short canal produced by the two membranes, the inner one passes directly into the outer membrane of the cell envelope. In the majority of sections, the micropore canal seems to be closed; sometimes however it is clear that it freely opens into cytoplasm. In this way it becomes evident that micropore is a peculiar organelle permitting the communication between the parasite cytoplasm and the parasitophore vacuole which surrounds it. The most frequent pictures in which the canal seems to be closed, are involved by the fact that the area of the ultrathin section only in some rare cases may coin-

cide exactly with the axis of the canal. A similar possibility concerning the pores of the nuclear membrane has been discussed in details in the article of Watson 1959.

Cheissin and Snigirevskaya 1965 have put forward the view that the micropore of coccidia performs the function of a ultracytostome through which some nutritive substances may be taken in. This supposition was suggested only by the morphological similitude of the merozoits micropore to the cytostome of *Trypanosoma mega* as described by Steinert and Novikoff 1960. We have till now no direct evidences speaking in favour of this presumed function of micropore in coccidia. The presence of a long canal and formation of small vacuoles around it in cytoplasm of some merozoits might suggest the transport of some substances through micropore into cytoplasm. Possibly the macromolecular compounds which cannot penetrate directly across the membrane, pass through the micropore.

Convincing evidences as to functioning of micropore as the cytostome, are provided by Aikawa and al. 1966. They observed the increase of the cytostome density and formation of food vacuoles at its outcome. Basing on the observation of various dimensions of cytostome, they expressed the supposition that the active nutrion is observable in the erythrocyte forms only (gametocytes and schizonts) of *Plasmodium fallax*, *P. lophure*, *P. cathemerium* whereas the cytostome of exerythrocytic forms (merozoit) seems not to participate in nutrition.

Scholtyseck, Volkmann und Hammond 1966, Scholtyseck, Hammond and Ernst 1966 believe that in some species of coccidia the union of the parasite with the host cell occurs through micropore. This view has been supported by Bardale 1966 who investigated *Eucoccidium*. He suggested the role of micropore in the transport of substances between the parasite and the host cell. He pointed out the dependence of the "pellicular pores" — as he calls the micropore — of the parasite size.

The data provided by the electron microscopical investigations permit to postulate that the micropore in *Eimeria intestinalis* is functioning at the same level at all the stages of development. This is supported by the fact that the shape and dimensions of micropore are the same at all the stages. The food vacuoles have not been found in the area around the cytostome; this indicates that the process of food intake is not continuous but occurs also at some moments which are not easy to be caught in the electron microscopic investigation.

The number of micropores is variable at different stages of development.

Merozoits have possibly only one micropore: they are of small dimensions and present a stage of the parasite propagation. The number of micropores augments in the intracellular stages during the process of growth. This is observable distinctly in schizonts and gametocytes. The most intense feeding occurs in macrogametes, in which besides the micropore, the invagination of the cell membrane occurs. Perhaps in macrogametes, besides the transport of substance through the micropore, pinocytosis takes place which involves a more full food supply at this stage of development.

It is remarkable that in microgametes — which are a short-lasting stage destined for fertilization of the macrogamete — the micropore has not been revealed.

In this way, it may be noted that the number of micropores in *Eimeria intestinalis* as well as in *Eucoccidium* depends on the size of the parasite and evidently on the degree of its metabolism as well.

In the merozoites of *Eimeria stidiae*, *E. perforans*, Scholtysek and Piekarski 1965 have described a posterior pore produced by the thickening of the membrane margin which is interrupted at its posterior end. They compared this pore to micropyle in *Lankesterella garnhami* and express a supposition that it plays a part in sliding of sporozoa. The authors fail to find the micropore located in the merozoite at the level of the nucleus and corresponding to the micropore of the merozoite in *Eimeria intestinalis*. In this species, the thickening of the membrane margin at the posterior body end has been found only in the merozoite prior to its detachment of the schizont body, its micropore is at the level of nucleus. We have therefore no reason to consider the structure of the merozoite posterior body end—as described by Scholtysek and Piekarski in *E. stidiae* and *E. perforans*—to be the micropore homologous to that in the other species.

The problem of the origin of micropores remains also not elucidated since no intermediate stages of its formation have been found.

Summary

Electron microscopic investigation of micropores were carried out on different stages of intracellular development of *Eimeria intestinalis*: in merozoites, schizonts, microgametocytes, microgametes and macrogametes. The data ascertained indicate that micropore exists at all the developmental stages excluding the microgamete. The structure of the micropore is consistent at all the development stages studied. It is a short canal produced by the two membranes. The interior one is directly continuous with the membrane of the cell envelope. As to the function of the micropore, its role in the food intake of the parasite is suggested. Possibly the macromolecular compounds penetrate through it being unable to pass directly through the membrane. The number of micropores augments with the growth of the parasite.

The origin of micropores has not been elucidated as yet.

РЕЗЮМЕ

Проведено электронномикроскопическое исследование микропор на различных стадиях внутриклеточного развития *Eimeria intestinalis*: мерозоитов, шизонтов, микрогаметоцитов, микрогамет и макрогамет. Полученные данные показывают, что микропоры имеются на всех стадиях развития, за исключением микрогаметы. Строение микропоры на всех исследованных стадиях развития весьма сходно. Это — короткий канал, образованный двумя мембранами, внутренняя из которых непосредственно переходит в мембрану клеточной оболочки. Относительно функции микропоры высказано предположение о том, что микропора участвует в питании паразита. Возможно, через нее проникают крупномолекулярные соединения, которые не могут проникнуть непосредственно через мембрану. Число микропор увеличивается по мере роста паразитов.

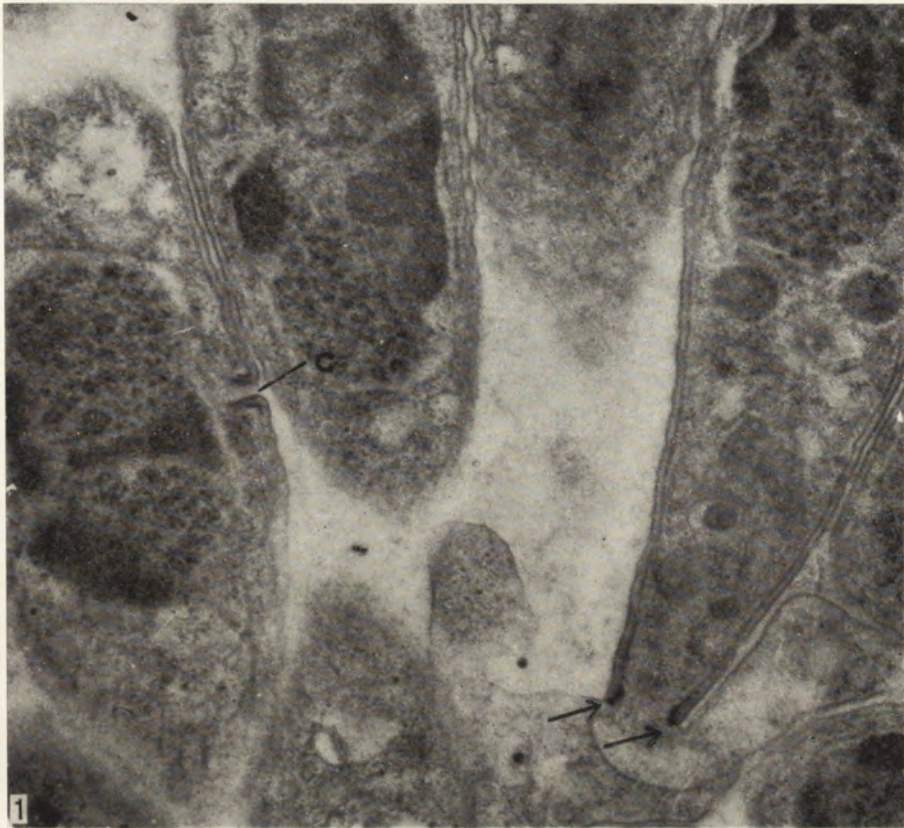
Вопрос о генезисе микропор пока не ясен.

REFERENCES

- Aikawa M., Hepler P. K., Huff C. G. and Sprinz H. 1966: The feeding mechanism of avian malarial parasites. *J. Cell Biol.*, 28, 2, 355—373.
- Bardale C. F. 1966: Elektronenmikroskopische Untersuchung an dem Sporozoen *Eucoccidium dinophili* Grell. *Z. Zellforsch.*, 74, 559—595.
- Cheissin E. M. and Snigirevskaya E. S. 1965: Some new data on the fine structure of merozoites of *Eimeria intestinalis* (Sporozoa, Eimeriidea). *Protistologica*, 1, 121—126.
- Garnham P. C. C., Baker J. R. and Bird R. G. 1962 a: The fine structure of *Lankesterella garnhami*. *J. Protozool.*, 9, 107—114.
- Garnham P. C. C., Baker J. R., Bird R. G. 1962 b: Fine structure of cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Br. med. J.*, 83—84.
- Garnham P. C. C., Bird R. G., Baker J. R. and Bray R. S. 1961: Electron microscope studies of motile stages of malarial parasites. II. The fine structure of the sporozoite of *Laverania* (*Plasmodium*) *falciparum*. *Trans. roy. Soc. of Trop. Med. Hyg.*, 55, 98—102.
- Karnovsky M. J. 1961: Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 11, 729.
- Ludvik J. 1963: Electron microscope study of some parasitic protozoa. *Progress in Protozoology*, Proc. First int. Congr. Protozool., Prague 1961, Publ. House Czechoslov. Acad. Sci., Prague 1963.
- Reynolds E. S. 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 729.
- Rudzińska M. A. and Trager W. 1959: Phagotrophy and two new structures in the malaria parasite. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6, 103—112.
- Rudzińska M. A., Trager W. and Bray R. S. 1965: Pinocytic uptake and the digestion of hemoglobin in malaria parasites. *J. Protozool.*, 12, 563.
- Scholtyssek E., Hammond D. M. and Ernst J. V. 1966: Fine structure of *Eimeria perforans*, *E. stiedae*, *E. bovis* and *E. auburnensis*. *J. Parasit.*, 52, 975—987.
- Scholtyssek E. und Piekarski G. 1965: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Merozoiten von Eimerien (*Eimeria perforans* and *E. stiedae*) und *Toxoplasma gondii*. Zur systematischen Stellung von *T. gondii*. *Z. Parasitenk.*, 26, 91—115.
- Scholtyssek E., Volkmann B. und Hammond D. M. 1966: Spezifische Feinstrukturen bei Parasit und Wirt als Ausdruck ihrer Wechselwirkungen am Beispiel von Coccidien. *Z. Parasitenk.*, 28, 78—94.
- Sjöstrand F. S. 1956: Electron microscopy of cells and tissues. In: Oster and Pollister, *Physical techniques in biological research.*, 3, Academic Press, New York, 241—298.
- Stehbens W. E. 1966: The ultrastructure of *Lankesterella hylae*, *J. Protozool.*, 13, 63—73.
- Steinert M. and Novikoff A. B. 1960: The existence of cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome, *Trypanosoma mega*. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 8, 2, 563—570.
- Viver E. et Henneré E. 1965: Ultrastructure des stades végétatifs de la Coccidie *Coelotropha durchoni*. *Protistologica*, 1, 89—104.
- Vivier E. et Schrevel J. 1964: Etude au microscope électronique d'une Gregarine du genre *Selenidium*, parasite de *Sabellaria alveolata*. *J. Microscopie*, 3, 651—670.
- Watson M. L. 1958: Staining of tissue sections for electron microscope with heavy metals. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4, 475—478.
- Watson M. L. 1959: Further observations on the nuclear envelope of the animal cell. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 4, 475—478.

EXPLANATION OF PLATES I—VII

- 1: Longitudinal section of micropore (c) of merozoit of *Eimeria intestinalis*. Micropore opens freely into cytoplasm. Right: merozoit not yet detached of the residual body of schizont. Arrow indicates the thickening of the membrane margin. $\times 31\ 500$
- 2: Merozoits with micropore (arrow) detached of the residual body of schizont. The connection of merozoit with the residual body is seen. $\times 2\ 2000$
- 3: Longitudinal section of the merozoit micropore with a long canal immersed into cytoplasm. $\times 46\ 000$
- 4: Cross section of the schizont micropore. $\times 31\ 500$
- 5: Micropore of a binucleated schizont. $\times 41\ 000$
- 6: Micropore of a multinucleated schizont. $\times 21\ 000$
- 7: Cross section of micropore of multinucleated schizont. $\times 41\ 500$
- 8: Cross section of micropore (c) of budding schizont. $\times 28\ 000$
- 9: Micropore of multinucleated microgametocyte. $\times 29\ 700$
- 10: Micropore (c) in the residual body of microgametocyte after transformation of microgametes. $\times 35\ 000$
- 11: Micropore of macrogamete. $\times 45\ 500$
- 12: Tangential section of macrogamete with 3 micropores cut transversally. $\times 23\ 500$
- 13: Micropores of macrogamete, two of them located in the invaginations of the cell membrane (arrow). $\times 34\ 500$

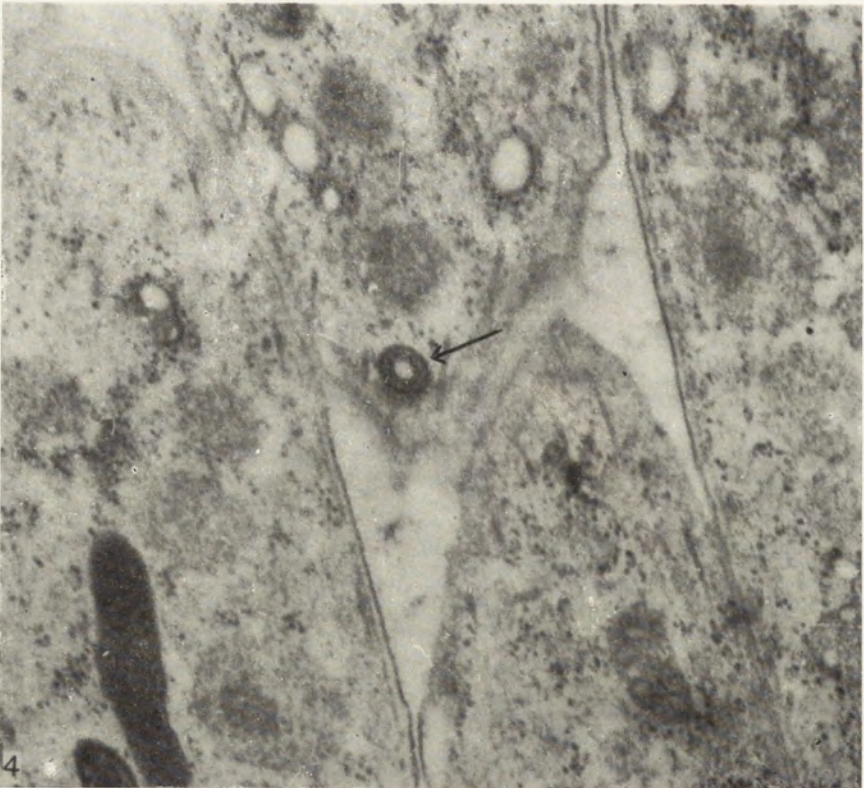


E. S. Snigirevskaya

J. V. V. auctor phot.



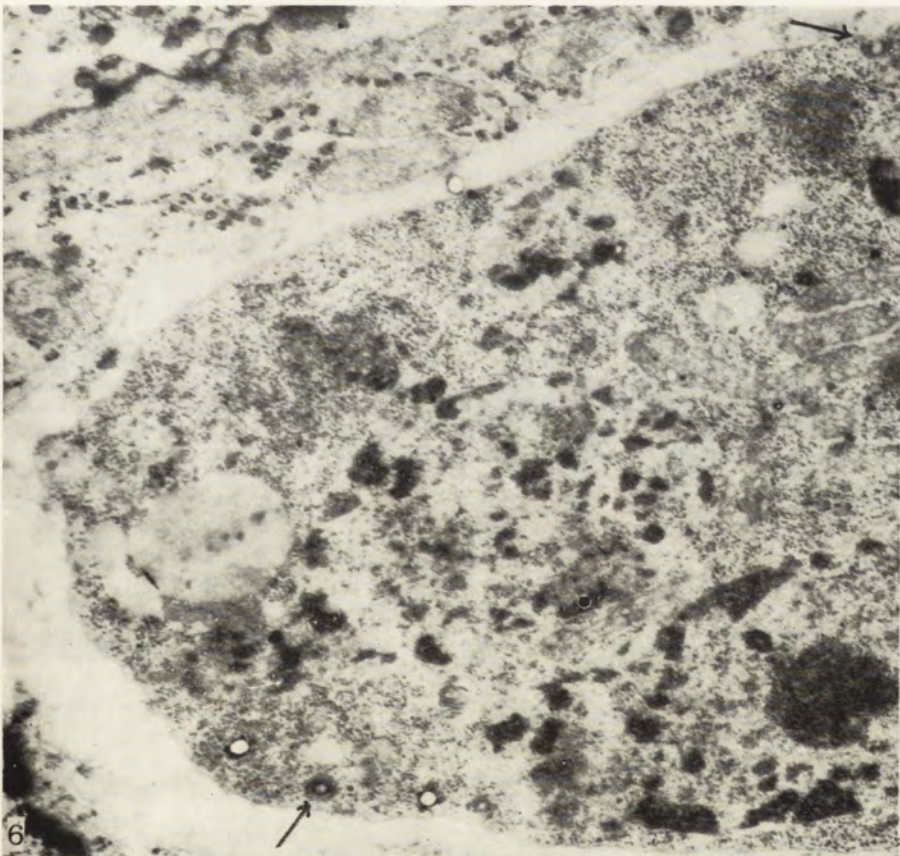
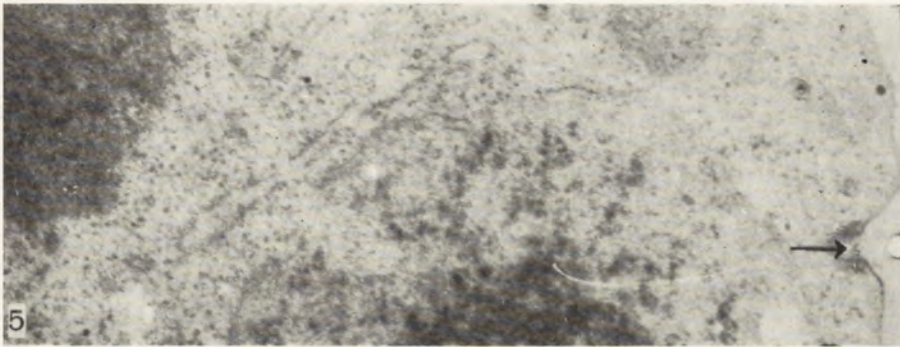
3



4

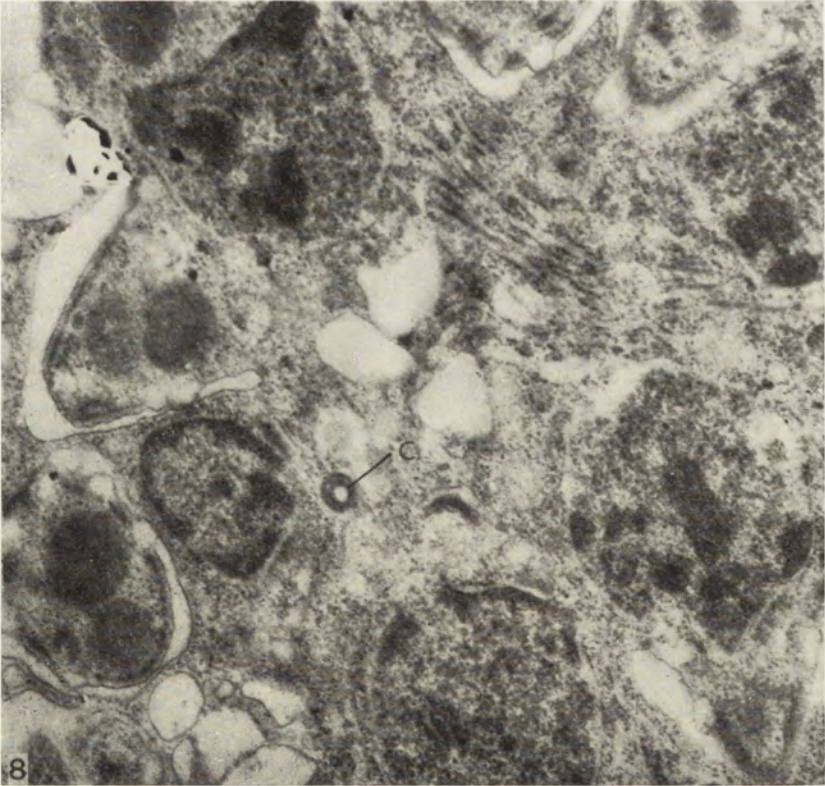
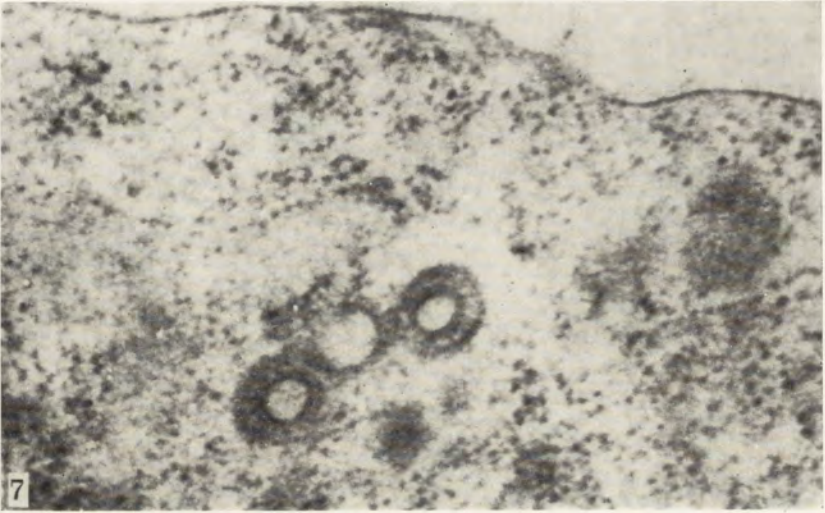
E. S. Snigirevskaya

auctor phot.



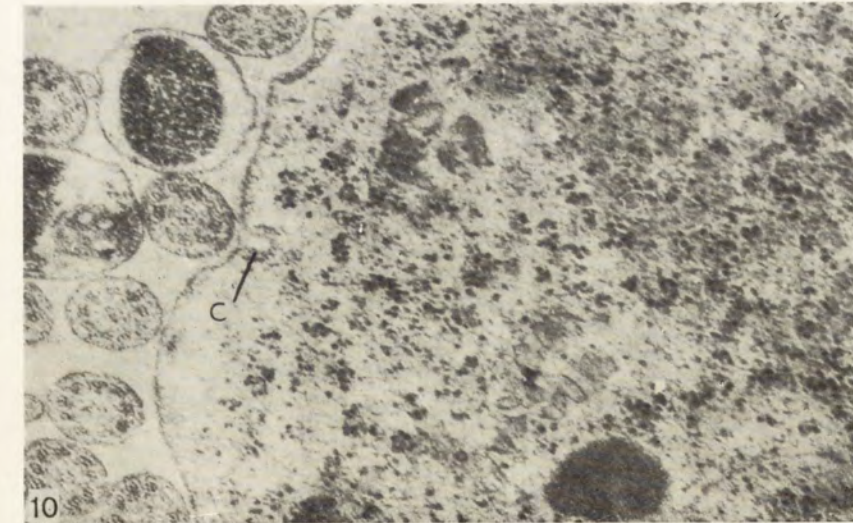
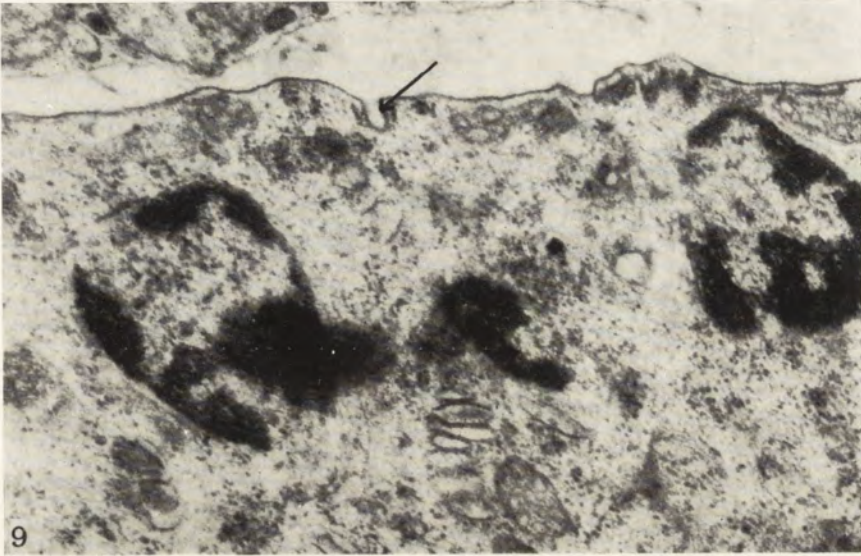
E. S. Snigirevskaya

auctor phot.



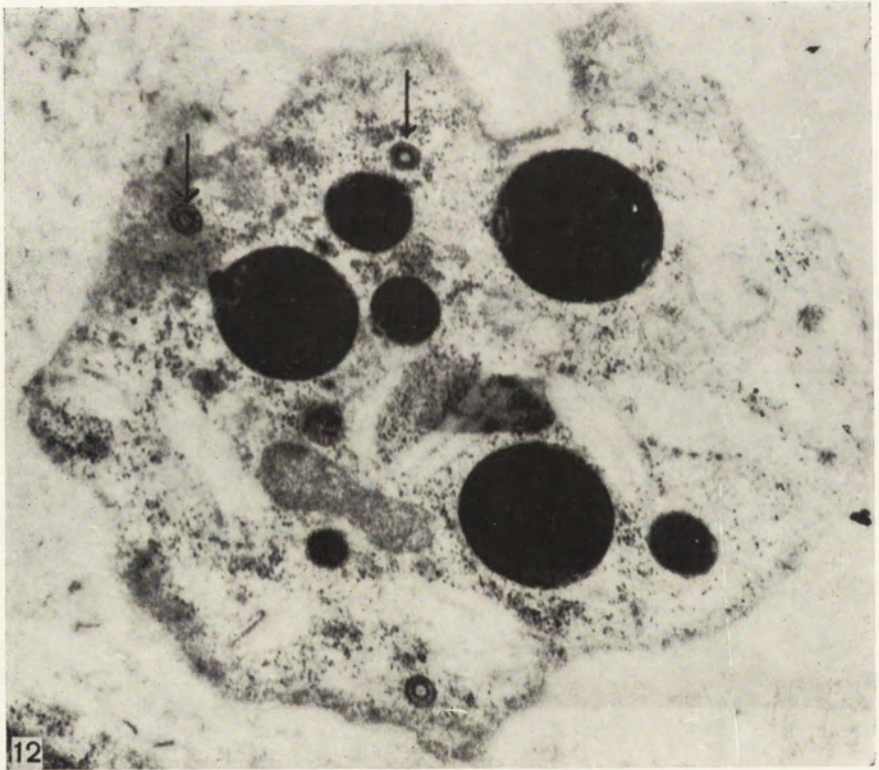
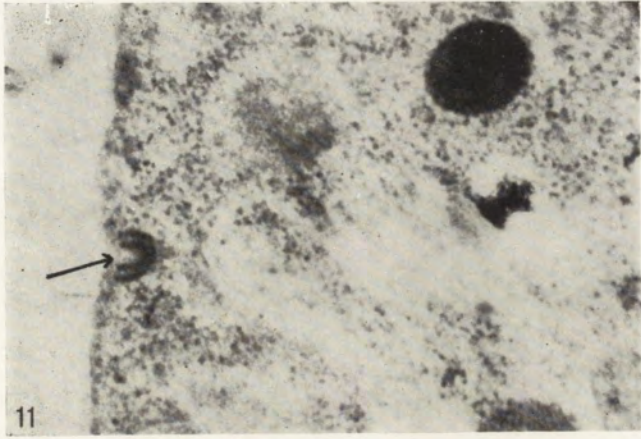
E. S. Snigirevskaya

auctor phot.



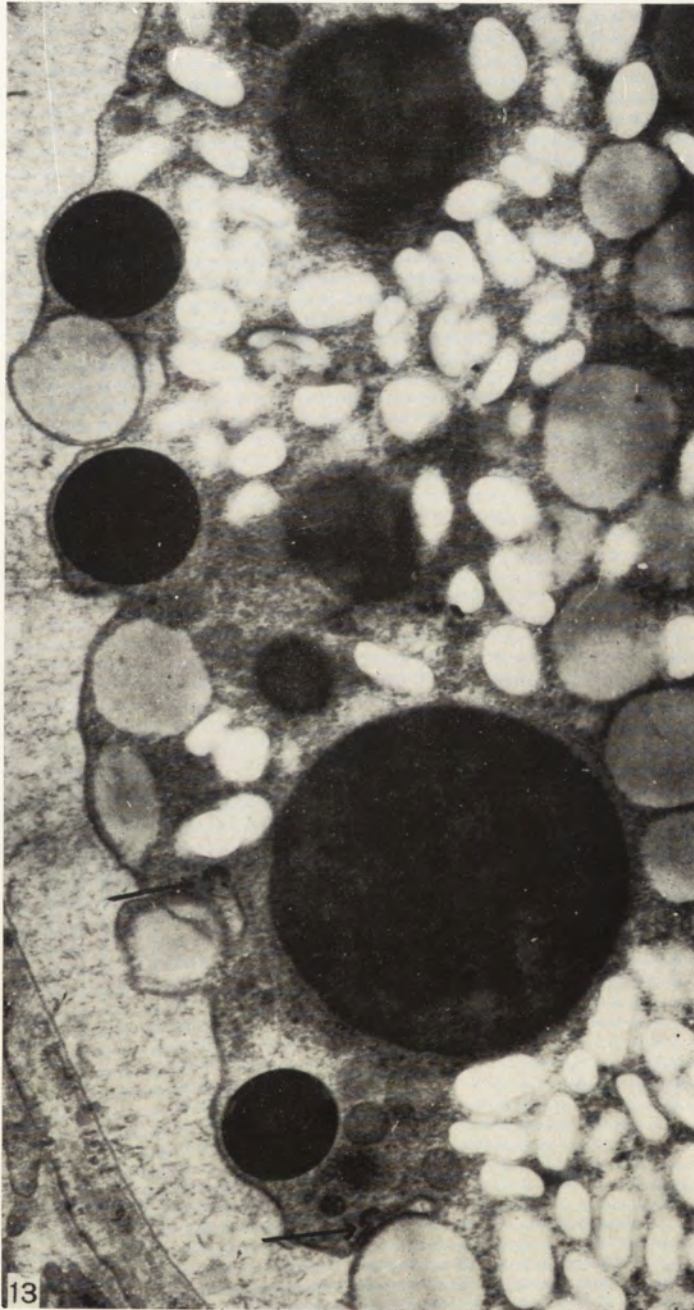
E. S. Snigirevskaya

auctor phot.



E. S. Snigirevskaya

auctor phot.



E. S. Snigirevskaya

auctor phot.

E. M. CHEISSIN, J. M. ROZANOV, B. N. KUDRIAVTSEV

Fluorescence microscopic study on the content of nucleic acids in merozoites and microgametes of *Eimeria intestinalis* from the intestine of rabbit

Исследование содержания нуклеиновых кислот у мерозоитов и микрогамет *Eimeria intestinalis* из кишечника кролика методом флуоресцентной микроскопии

In the development cycle of sporozoa, the chromosome reduction takes place in the first metagametic division of the zygote nucleus (Dobell 1925, Belař 1926, Naville 1927, Wedekind 1927, Hauschka 1943 and others). Therefore all the developmental stages — except the zygote — have a haploid number of chromosomes. The corresponding nuclei of schizonts and of merozoites as well as those of microgametocytes or micro- and macrogametes should have also an equal number of chromosomes.

In the representatives of the suborder of *Eimeriidae*, the zygotic reduction has been ascertained by means of direct microscopic observation only in *Aggregata eberthi* (Dobell 1925) and in *Barrouxia schneideri* (Wedekind 1927). In the numerous representatives of the genus *Eimeria*, meiosis of the first nucleus division of zygote has not been observed as yet although theoretically it should take place. Therefore the haploidy of all the development stages in the representatives of this genus has been usually accepted by analogy with the other representatives of sporozoa.

Indirect evidences for the zygotic meiosis might be provided by juxtaposition of DNA quantity in the nuclei of schizonts or merozoites on one — and of gametes on the other side. An equal number of chromosomes or quantity of DNA in gametes and in agamonts would prove the zygotic reduction. In the case of existence of the gametic meiosis, agamonts should have the double number of chromosomes and a double quantity of DNA respectively when compared with those values in the gametes.

For solvation of this problem it was necessary either to establish the number of chromosomes or to determine the quantity of DNA in the merozoite (or schizont) nuclei, and in those of microgametes. We failed to succeed in a sufficiently exact determination of the chromosome number in the nuclei of merozoites (or schizonts) and of microgametes. We therefore decided to determine the quantity of DNA in the nuclei of merozoites and microgametes by application of a new cytophotometric technique.

Material and methods

Merozoites and microgametes of *Eimeria intestinalis* were used for the study. The infected rabbits, 16—24 days of age were sectioned on the 7th—8th, or 9th—10th day. The mucose of the intestine was scarificized, smears were prepared of mucus containing parasites which were fixed with methanol. One series of smears was stained with iron haematoxylin for control. Another series was stained with the fluorescent dye auramine OO—SO₂ for the quantitative determination of DNA. It was first shown in the study of Kasten 1959, 1960, 1961 that the fluorescent stain auramine O—SO₂ binds specifically DNA. Later on, Ruch und Bosshard 1963 and Bosshard 1964 applied this dye for the quantitative determination of DNA. For the same purpose, Rozanov i Kudriavtsev 1966 applied the dye auramine OO—SO₂.

In the present study, the material was treated according to the method of Rozanov i Kudriavtsev 1967. Preparations fixed with methanol were placed in 6 N solution of hydrochloric acid for 8 min. at temp. 20°C, then rinsed in distilled water and stained with a fresh prepared stain solution. The reactive stain solution was 0.5% aqueous solution of auramine OO filtered and saturated subsequently with SO₂. Saturation was performed by addition of thionyl chloride (SOCl₂) in the ratio 0.1 ml:45 ml of auramine OO solution. Staining lasted 1 hr. in a container with a tightly adhering lid. Preparations were rinsed with distilled water, with 3 portions (3 min. each) of sulphurous solution, rinsed in tap water for 20 min. Then followed the ethanol sequence (70°, 96°, 100°) and inclusion into glycerol. The control of specificity of staining was performed by DNA-se RNA-ase action followed by the just described method of staining.

If not exposed to intense light, the preparations stained after the above method could be preserved for several hours without any discernable fall of the intensity of fluorescence.

The stained preparations were studied visually with a luminescence microscope ML-2 as well as in the fluorescence light, as in the phase contrast. As exciter fluorescence filter FS-1 and as barrier filter—ZS-18 were used.

All the quantitative studies were carried out on luminiscence set (on the base MLD-1) constructed especially for this study in our laboratory, permitting to measure the intensity of fluorescence of the nuclei in arbitrary units.

In our investigations we choose the cytophotometric method taking advantage of the fluorescence stain. The cytophotometric fluorescence method possesses two essential advantages over the absorption methods: 1. it is much more sensitive, 2. involves no necessity of calculating the irregularity of distribution of the substance in the object. Those advantages get a special value in the investigations of such objects as *E. intestinalis*. The small nuclei of merozoites measuring 1—2 μ in diameter, when stained after Feulgen have a very low optical density. Besides, the irregular distribution of DNA is characteristic for them. In such an object, a sufficiently precise evaluation of DNA quantity by the absorption cytophotometric methods proved to be impossible.

However the application of the fluorescence stain auramine OO—SO₂ and of a comparatively simple fluorescence technique, permit to measure

this insignificant quantity of DNA which is present in the nuclei of various stages of coccidia.

Measurements and photographing was performed with the lens $90\times$ and eye piece $3\times$.

Results

After the treatment with the fluorescence stain auramine OO—SO₂, the nuclei of schizonts, merozoites, microgametocytes and microgametes show a bright green fluorescence whereas the cytoplasm remains quite dark (Pl. I, II). It is clear that in the nuclei of merozoites and schizonts only the peripheral part is fluorescent and the nucleus assumes therefore the shape of a ring or a horse shoe (Pl. I 1). This picture of the DNA distribution fully corresponds to that which was gained by Cheissin 1958 a, b after the Feulgen reaction. In this case the microgametes are comma-shaped. They have the same shape after staining with auramine OO—SO₂ (Pl. I 6, II 7—10). After the action of RNA-se, the nucleus keeps its fluorescence similar to that in the nuclei non-treated with RNA-se. DNA-se fully abolishes the fluorescence of the nuclei of gametes, schizonts and merozoites. These results support the conclusion that the auramine OO—SO₂ staining, similarly as the Feulgen reaction may serve for a specific detection of DNA.

The nuclei of microgametocytes like those of schizonts have a ring-shaped disposition of DNA and for that reason these development stages can scarcely be distinguished in preparations (Pl. I 2—4). In the course of microgamete formation, the gradual elongation of nucleus is seen well. Initially the nucleus has a shape of a short obtuse comma, then when elongating, it bends assuming the shape of the letter U (Pl. I 5—6, II 7). Analogous changes of nucleus have been observed by Scholtyssek 1965 in microgametocytes of *E. perforans* investigated by the electronmicroscopic method. In the subsequent development, the nucleus extends in length assuming the form of an elongated comma (Pl. II 8—10). In some smears, a multitude of mature microgametes are seen well, dispersed beyond the membrane of the microgametocyte. The nuclei of many of them are strongly bent on one end which indicates bending of the microgametocyte body itself during the motion.

The following data were obtained by the quantitative study of the DNA content in the nuclei of merozoites and microgametes. For the merozoite nuclei, the relative coefficients of DNA content in the limits from 0.06 to 0.12 are characteristic. In average the DNA content in the merozoite nuclei amounted 0.099. The same result was obtained for microgametes. The minimal coefficient was 0.06 and the maximal one — 0.13. In average the DNA content in the microgamete nuclei has been determined by the value 0.098.

It should be remarked that the two-fold dispersion of the DNA coefficient occurring in measurements is involved by the errors of the methodics of the direct measurements of DNA content in very small objects. This dispersion is the same as well in the measurements of the merozoite nuclei as of that of microgametes.

In this way, the merozoite nuclei and also those of microgametes have the same quantity of DNA.

After the staining with auramine OO—SO₂, besides the merozoits and microgametes, growing macrogametes with faintly fluorescent nuclei were found (Pl. II 11, 12). Their vesicular nucleus shows an even, regular fluorescence. Sometimes however a more intense fluorescence was observed near the karyosome, which remains usually dark.

Discussion

The quantitative evaluation of the fluorescence intensity in the material stained with auramine OO—SO₂ permitted to establish the coincidence of the DNA content in the nuclei of merozoits and of microgametes. Microgametes should always have the haploid quantity of DNA independently of the fact whether the zygotic or gametic reduction has taken place. The coefficients of DNA quantity obtained for the nuclei of merozoits, prove the haploidy of those nuclei. Since they are haploid, it may be stated with certainty that the reduction in *E. intestinalis* occurs in the division of synkaryon — i.e. that it is zygotic — and not in formation of the gametes.

The application of the fluorescence cytophotometry proved that this method is sufficiently specific and more sensitive than the photometric absorption method applied to preparations after the Feulgen reaction. The fluorescence cytophotometric method permitted to perform the determination of an insignificant quantity of DNA in the nuclei of extremely small dimensions (1—3 μ). Really, in the nuclei of merozoits and microgametes the total DNA content is approximately by two degrees lower (84 times) than e.g. in the spermatocytes of rat which were examined by us with the same methods for comparison.

The Feulgen reaction reveals no DNA in the nuclei of macrogametes. Those nuclei are always Feulgen-negative although they slightly stain with methylen green after the Unna reaction (Cheissin 1958). Nevertheless staining with auramine OO—SO₂ reveals DNA in the nuclei of macrogametes.

It may be therefore postulated that the negative result of the Feulgen reaction in the macrogamete nuclei is determined most possibly by the low DNA concentration in the nucleus and not directly by its absence.

Summary

The method of staining with auramine OO—SO₂ followed by photometry of the intensity of fluorescence was applied for determination of the DNA content in the nuclei of merozoits and microgametes of *Eimeria intestinalis*. The data obtained prove that the stain may be used for the specific determination of DNA.

The nuclei of merozoits and microgametes contain equal haploid quantities of DNA which may be accounted for only by the occurrence of a zygotic reduction in the development cycle of *Coccidia*. Fluorescence of the macrogamete nuclei after staining with auramine OO—SO₂ proves the presence of DNA in it.

The method of fluorescence cytophotometry presents advantages over the absorption method owing to its high sensibility.

РЕЗЮМЕ

Для определения количества ДНК в ядрах мерозоитов и микрогамет *Eimeria intestinalis* был применен метод окраски аураминоом $OO-SO_2$ с последующим фотометрированием интенсивности флуоресценции. Полученные данные свидетельствуют о том, что эта окраска может быть использована для специфического выявления ДНК.

Ядра мерозоитов и микрогамет содержат одинаковое гаплоидное количество ДНК, что можно объяснить только наличием в цикле развития кокцидий зиготической редукции. Ядро макрогамет флуоресцирует при окраске аураминоом $OO-SO_2$, что свидетельствует о наличии в ядре ДНК.

Метод флуоресцентной цитофотометрии имеет преимущество перед абсорбционным методом благодаря его большей чувствительности.

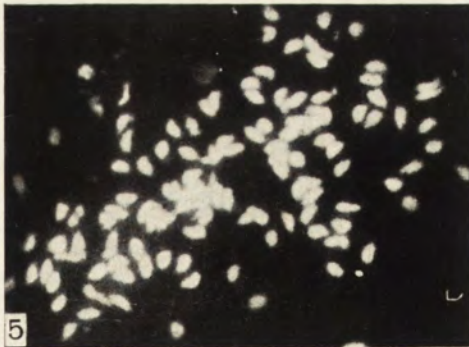
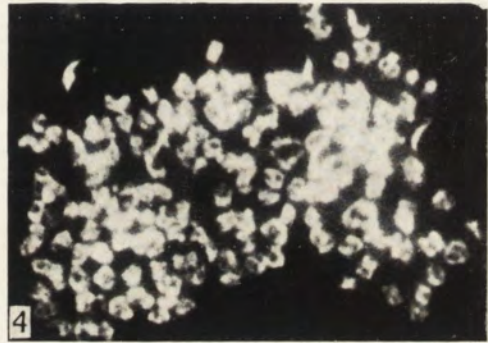
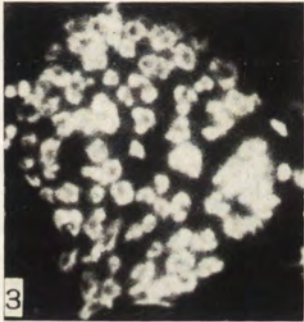
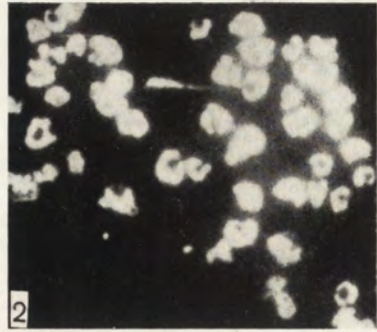
REFERENCES

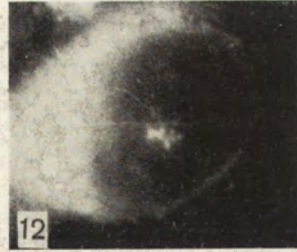
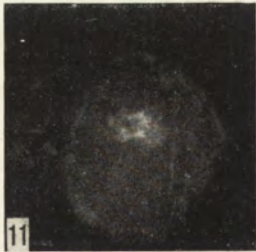
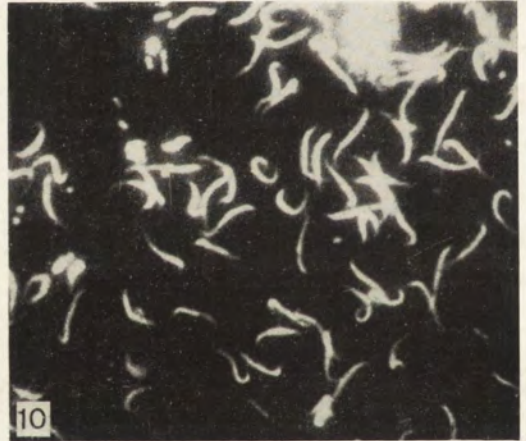
- Belař K. 1926: Zur Cytologie von *Aggregata eberthi*. Arch. Protistenk., 53, 312—325.
- Bosshard U. 1964: Fluoreszenzmikroskopische Messung des DNS-Gehaltes von Zellkernen. Z. wiss. Mikroskop., 65, 391—408.
- Cheissin E. M. 1958 a: Cytologische Untersuchungen verschiedener Stadien des Lebenszyklus der Kaninchencoccidien. I. *Eimeria intestinalis*. Arch. Protistenk., 102, 265—290.
- Cheissin E. M. 1958 b: Citologičeskoje issledovanie žiznennogo cikla kokcidij krolika. II. *Eimeria magna*. Voprosy citologii i protistologii, Izd-vo AN SSSR, M-L, 258—276.
- Dobell C. 1925: The life history and chromosome cycle of *Aggregata eberthi*. Parasitology, 17, 1—136.
- Hauschka T. S. 1943: Life history and chromosome cycle of the coccidian *Adelina deronis*. J. Morphol., 73, 529—573.
- Kasten F. H. 1959: Schiff-type reagents in cytochemistry. Histochemie, 1, 466—500.
- Kasten F. H. 1960: The chemistry of Schiff's reagent. Int. Rev. Cytol., 10, 1—100.
- Kasten F. H. 1961: Auramine O— SO_2 , a highly fluorescent Schiff-type reagent for DNA in the Feulgen reaction. J. Histochem. Cytochem., 9, 599.
- Naville A. 1927: Recherches sur le cycle évolutif et chromosomique de *Klossia helicina*. Arch. Protistenk., 57, 427—474.
- Rozanov Ju. M. i Kudrjavtsev B. N. 1966: Primenenie fluorescentnogo krasitela auramina OO dlja količestvennogo opredelenija DNK. Materialy I-ej naučnoj konferencii molodyh specialistov In-ta citologii AN SSSR, M-L, 35.
- Rozanov Ju. M. i Kudrjavtsev B. N. 1967: Metod fluorescentnoj citofotometrii dlja količestvennogo opredelenija DNK. Citologija, 9, 361—368.
- Ruch F. und Bosshard U. 1963: Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenzmikroskop. Z. wiss. Mikroskop., 65, 335—341.
- Scholtzseck E. 1965: Die Mikrogametenentwicklung von *Eimeria perforans*. Z. Zellforsch. 66, 625—642.
- Wedekind G. 1927: Zytologische Untersuchungen an *Barrouxia schneideri*. Z. Zellforsch., 5, 505—650.

EXPLANATION OF PLATES I—II

Different stages of development of *Eimeria intestinalis* and *Eimeria magna*. Fluorescence microscope, lens 90 X, eye piece 3 X. Auramine staining. Only the fluorescent nuclei containing DNA are seen.

- 1: Nuclei of merozoites from a desintegrated mature schizont of the second agamic generation of *E. intestinalis*
- 2: Nuclei of microgametocyte of *E. magna*
- 3 and 4: Multinuclear microgametocytes of various size of *E. intestinalis*
- 5: Initial stage of microgametes formation. *E. intestinalis*
- 6: A more advanced stage of microgamete formation *E. intestinalis*
- 7: Nearly mature microgametes of *Eimeria intestinalis* bent U-like
- 8: Multicentered microgametocyte of *E. magna* with a high number of microgametes
- 9: Onecentered microgametocyte of *E. intestinalis*
- 10: Free microgametocytes of *E. intestinalis*
- 11: Macrogamete of *E. intestinalis* with a fluorescent nucleus
- 12: Fluorescent nucleus of a zygote, to the left a highly fluorescent nucleus of an epithelial cell





V. D. KALLINIKOVA

Cytochemical study of enzymes of the respiratory chain in the life cycle of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. I. Enzymes of the respiratory chain at all stages of the life cycle, in vivo and in culture

Цитохимическое исследование ферментов дыхательной цепи в жизненном цикле *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. I. Ферменты дыхательной цепи на всех стадиях цикла, in vivo и в культуре

In the metabolism of *Trypanosomidae*, the respiratory enzymes have been studied most extensively. The findings accumulated in this field are nearly exclusively due to the biochemical investigations.

It has been ascertained that the cytochrome system was lost in the blood forms of the trypanosomes of the brucei group similarly as in some other parasites. This deficiency however should be looked upon as a secondary one i.e. as a result of specialization during the transformation of parasites in evolution, since the corresponding forms from culture (insect stages) of those species still possess this system (Brand and Johnson 1947, Brand and Tobie 1947, Hunter and Lwoff 1951, Brand 1956, 1959 a, Fulton and Spooner 1959, Ryley 1962). Despite the loss of cytochromes, the blood forms of trypanosomes of the brucei group are characterized by an intense metabolism and possess an effective oxidative system. The elucidation of this system is just being begun (Fulton and Spooner 1959, Grant and al. 1961).

Trypanosomes containing cytochromes show a certain variability in their set of cytochromes. They mostly contain cytochrome "a" and "b", more rarely "c" (Bernstein and Tobie 1951, Agosin and Brand 1956, Seaman 1956, Fulton and Spooner 1959, Brand 1959, 1960). The oxidative activity of the cytochrome-containing trypanosomes is insignificant. This involves a question as to the existence of cytochrome oxidase of those flagellates. Some authors suspect its absence (Harvey 1949), others make the errors of the biochemical methods responsible for its spurious presence (Seaman 1956, Brand 1960).

Very little is known about the flavine enzymes in trypanosomes. Their presence is suspected by a number of authors (Seaman 1953, Agosin and Brand 1955, Baernstein 1953, 1953 a, 1963), who based their supposition on indirect evidences.

In connection with the loss of the cytochrome system in some trypanosomes, a problem arises concerning peroxidase and catalase which are asso-

ciated with the non-cytochromic path of oxidation. Striking is a nearly complete absence of either catalase or peroxidase activity and also of hydrogen peroxide as the final product in no-cytochromic forms (Fulton and Spooner 1959, Baernstein 1963).

In this way, the biochemical data concern mostly the cytochrome system of trypanosomes. However such links of the respiratory chain as cytochrome oxidase, diaphorases and peroxidase remain not sufficiently elucidated.

The considerable scope of the biochemical literature remains in a sharp contrast with the very scarce cytochemical and cytological studies. Special studies of the respiratory enzymes are nearly absent.

A long time before the biochemical investigations, G. I. Roskin and L. B. Levinson failed to detect cytochrome oxidase in the blood forms of *T. brucei* and *T. equiperdum* with cytochemical methods. As presently known, those forms do not possess the cytochrome system. Simultaneously in the same forms as well as in the cultivated ones of *Leishmania tropica* a slight peroxidase activity was stated (Roskin and Levinson 1926, 1927). Recently in the blood forms of *T. gambiense* Michel 1964 revealed by means of cytochemical methods a slight activity of the following enzymes: cytochrome oxidase, succinic dehydrogenase, NADH and NADPH diaphorases and peroxidase.

The problem of respiratory enzymes cannot be discussed without the cytological facts concerning mitochondria. This holds true especially when trypanosomes are concerned. It was ascertained in a number of cytological studies, that mitochondria accumulate around the kinetoplast in trypanosomes and exhibit the activity of respiratory enzymes. It is extremely important that the kinetoplast itself stains with the mitochondrial dye Janus green and contains mitochondrial elements as proved by the ultramicroscopical studies.

It should be mentioned that the biochemical and cytochemical research has been carried out without a sufficient attention to the biology of *Trypanosomidae*. In the first place their important biological property is the multiplicity of stages in their complex life cycle. Besides, namely the study of the respiratory enzymes proves that their metabolism may considerably differ at various stages of the cycle.

In this respect a special place among *Trypanosomidae* occupies *T. cruzi* which undergoes in its life cycle the most full number of stages which correspond to nearly all the genera embracing the family *Trypanosomidae*. The biochemical investigations concern mostly the cultivated forms and less so the blood forms, whereas the remaining stages of this species life cycle are not investigated at all. The cytochemical investigations of the enzymes of the respiratory chain in *T. cruzi* have not been sygnalized.

The present study embraces the cytochemical examination of enzymes of the respiratory chain: cytochrome oxidase, NADH and NADPH diaphorases and also peroxidase in the entire life cycle of *T. cruzi* as well in cultures as in the vertebrate organism.

Material and methods

For the investigation of the enzymes of the respiratory chain in *T. cruzi*, the modern cytochemical methods have been applied, with special attention to the peculiarities of the studied object. All the stages of the life cycle were

examined: leptomonade, crithidial and metacyclic forms from cultures and the trypanosomal and leishmanial forms from the infected mouse organism.

Cytochrome oxidase was revealed with the Moog's method based on the deposition of indophenol blue granules in the places of localization of the enzyme. Equal proportion of 0.01 M solutions: 1. para-phenylen-diamine, 2. α -naphthol and 3. phosphate buffer pH 7.8 was added to the protozoa culture in a ratio 1 : 1, or to the extract of the gastrocnemius muscle or to blood of the infected mice. The mixture was incubated for 20—30 min. at 37°C in an open container. Then a drop of the mixture was examined on a slide covered with a slip. In the blood forms, the enzyme appears more distinctly on smears which had been slightly dried.

NADH and NADPH diaphorases were revealed by means of the tetrazolium salts method with corresponding substrates. The presence and localization of diaphorases was evaluated by the deposit of formazan grains. The smears of the *T. cruzi* culture and blood or prints of organs of the infected mice were slightly dried, fixed in formol-calcium at +4°C for 10—20 min., rinsed with tap water and incubated for 30—60 min. (in the case of NADPH diaphorase 2—3 hrs.) at 37°C in the following solution: NADH or NADPH — 4 mg. distilled water — 1.2 ml, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4—0.8 ml, nitro BT 1 mg/ml — 1.0 ml. After incubation slides were rinsed with water, slightly stained with light green, dried and covered with balsam.

Peroxidase was revealed with benzidine which is oxidized by the enzyme to oxibenzidine in the presence of hydrogen peroxide. Brown grains of oxibenzidine appear in the site of peroxidase localization. 10 mg of benzidine was solved in 2 ml. of distilled water, filtered, 1 drop of 2—3% hydrogen peroxide was added. To this solution an equal volume of protozoa culture or of extract of gastrocnemius muscle of infected mice was added and incubated on the air for 5—20 min. A blood smear was previously fixed in ethanol and formalin (9 : 1) and rinsed with water. Fresh preparations were examined covered with slips.

Photographs were executed from the microscope MBI-6 with the camera "Kiev". Author expresses her thanks to T. A. Ogloblina for her help in the photographic procedure.

Results

Cytochrome oxidase

The Moog's reaction clearly shows a high activity of cytochrome oxidase in all the stages of the life cycle of the flagellate (Pl. I 1—6). The cycle stages differ only slightly in the degree of the enzyme activity i.e. in the compactness of the indophenol blue grains in the cell. Grains of variable size appear, as a rule, in all the individuals. The most dense proved to be the grains of trypanosomal and crithidial forms.

The intracellular topography of the cytochrome oxidase activity shows no distinct regularity. However in crithidia the enzyme is often localized in the area of kinetoplast — at the base of flagellum (Pl. I 2). In the metacyclic and trypanosomal forms in which the kinetoplast and the free part of flagellum are spacially separated and located at opposite parts of the cell, cytochrome oxidase is revealed at both cell ends. In the metacyclic forms,

the enzyme activity is more conspicuous at the end which is opposite to kinetoplast where it sometimes reveals up to 7 grains distinctly arranged in a row directed towards the free flagellum. In trypanosomes, the disposition is inverse, the enzyme is most active at the posterior cell end between the nucleus and kinetoplast, embracing the latter (Pl. I 5).

NADH and NADPH diaphorases

Revealing the activity of both enzymes presents some difficulties. However all the cycle stages show the diaphorase activity (Pl. I 7—17) although far not all the cells of the same stage manifest it. Besides, both enzymes display many common features. The activity of diaphorases appears in the form of distinct granules of a not quite equal size and — in the case of NADPH diaphorase — of a very irregular shape. In leptomonads, the granules are characteristic by their big dimensions and irregular shape (Pl. I 7). They distinctly accumulate in the kinetoplast area. In this area and at the base of flagellum, appears a distinct activity of diaphorases also in crithidia (Pl. I 8, 14, 15). Its topography is especially distinct during the first 10 days after inoculation of the culture when the activeness of the enzyme is rather low. Subsequently the number of grains and their size augment, their topography becomes less definite. Sometimes the kinetoplast itself shows the activity of diaphorases (more frequently of NADPH diaphorase Pl. I 8). In highly deformed crithidia, the diaphorase activity appears sometimes in the kinetoplast only.

As the crithidia transforms to the metacyclic form, a part of the diaphorase activity seems to shift to the posterior cell end together with the kinetoplast. However at the anterior cell end, at the base of the free flagellum, the activity of the enzymes is manifested as well. As result of the above observations, it may be ascertained that in the metacyclic forms, diaphorases have a very distinct localization (Pl. I 10, 16) which appears in the form of a chain constituted of several grains at the anterior end of the base of the free flagellum, and as 1—3 grains around the kinetoplast which sometimes exhibits itself a diaphorase activity (more often of NADPH diaphorase). NADH diaphorase is more frequently revealed at one of the poles of the metacyclic forms and rarely at both their poles.

The grade of the diaphorase activity in the metacyclic forms is distinctly lower than that of leptomonads and crithidia. However in this respect the metacyclic forms show superiority over the trypanosome forms (Pl. I 11). NADPH diaphorase appears as 1—11 (most often 4—5) grains in a cell. Their topography coincides with that in the metacyclic forms. NADH diaphorase appears in the trypanosome forms only in exceptional cases as 1—3 grains around the kinetoplast. In the prevailing number of cases this diaphorase fails to appear although on the same slide the activity of this enzyme was revealed in some leucocytes of mouse and in the leishmanial forms which occasionally occurred in blood.

Leishmanial forms show a distinct activity of diaphorases (Pl. I 12, 17). In a cell 3—15 grains of formazan are revealed, their topography is more determined in the case of NADH diaphorase. In those forms the activity of diaphorases is connected with the area of kinetoplast and is sometimes manifested in this structure itself.

Peroxidase

With the benzidine method, the activity of peroxidase was revealed

effectively only in the crithidial stage of the life cycle. It appears only in leptomonades which are ready to be transformed into crithidia (Pl. I 18) and disappears in the course of transition of crithidia into the metacyclic forms. Leishmanial and trypanosomal forms fail to show the peroxidase activity neither, whereas the mouse neutrophils give a sharp reaction simultaneously.

Peroxidase is manifested as big spherical granules located behind the nucleus i.e. at the cell end opposite to the kinetoplast. (Pl. I 18—20).

Discussion

Trypanosoma cruzi belongs to the cytochrome-containing representatives of this genus. The biochemical data however concerning this species embrace only the cultivated (evidently crithidial) and blood trypanosomal stages of their cycle (Brand and al. 1946, Brand and Johnson 1947, Fulton and Spooner 1959). By means of the cytochemical method of Moog, we succeeded to reveal the activity of cytochrome oxidase at all the stages of the life cycle of *T. cruzi*. It is considered that the positive result of the Moog's reaction reliably indicate the presence of the system: cytochrome oxidase — cytochrome. Evidently the cytochrome system occurs not only in the crithidial and trypanosomal but also in leptomonade, metacyclic, as well as in the intracellular leishmanial forms of *T. cruzi*.

As to the assembly of cytochromes, the presence of cytochrome "b" was found with no doubt in the cultivated forms of *T. cruzi*. The results concerning the activity of cytochrome "c" are contradictory (Baernstein and Tobie 1951, Seaman 1953, Agosin and Brand 1955, Fulton and Spooner 1959, Brand 1960). Presumably cytochemistry cannot solve this problem although the results of the reaction of Moog indicate the action of cytochrome "c".

As far as proved by the cytochemical methods, the degree of cytochrome oxidase activity differs very little at various stages of the *T. cruzi* cycle, being rather high. It proved to be much higher in the trypanosomal forms than in the non-cytochromal ones of *T. gambiense* (Michel 1964) and in *T. equiperdum* in which the reaction is much weaker (our complementary observations). This result contradicts the biochemical information of a weak activity of cytochrome oxidase in the cultivated and in blood forms of *T. cruzi* (Brand and al. 1946, Brand and Johnson 1947, Seaman 1956, Fulton and Spooner 1959, Brand 1960). The results of the present cytochemical investigation agree with the view of some authors that the impression of a faint cytochrome oxidase activity in *T. cruzi* may be due to the limited possibility of revealing this enzyme by corresponding biochemical methods (Seaman 1956, Brand 1960). This is the more probable since if in *T. cruzi*, cytochrome "c" is absent indeed i.e. its cytochrome oxidase would be somewhat peculiar (Baernstein 1953 a).

Similarly as cytochrome oxidase, the activity of flavoproteids of the diaphorases type is manifested at all the stages of the life cycle as revealed by cytochemical methods. Their activity in the cultivated forms of *T. cruzi* has been just suspected (Seaman 1953, Baernstein 1953, Agosin and Brand 1955, Grant and al. 1961). Almost all the stages of the cycle manifest the activity of NADH and NADPH diaphorases. However both

enzymes are less active in the metacyclic and especially in trypanosomal forms. In these latter ones, the activity of NADH diaphorase is either extremely low or is absent (being conspicuous in leucocytes). This permits to postulate that at different stages of *T. cruzi* cycle not only the degree of flavoproteids activity may be different but also their composition. Complementary observations allowed to reveal the activity of diaphorases in cultural forms of *Leishmania* and in *Strigomonas oncopelti*. As mentioned above, Michel succeeded in demonstrating diaphorases in the blood forms of *T. gambiense*. Evidently those flavoproteins function not only in the cytochrome — containing but also in the non-cytochromic forms of trypanosomes.

As to the peroxidase activity of trypanosomides, a controversy exists between the biochemical and cytochemical results. Biochemists stress its absence in non-cytochromic trypanosomes whereas all the cytochemical investigations — presently not numerous — succeeded in revealing the peroxidase activity in the cytochrome-containing species (*L. tropica*) as well as in the non-cytochromic forms — *T. brucei*, *T. equiperdum*, *T. gambiense* (Roskin and Levinson 1926, 1927, Michel 1964).

In the present investigations, the peroxidase activity has been ascertained in *T. cruzi*. However the potential "reserve" path of oxidation is active only at one stage of the cycle — in the crithidial one. It appears in leptomonades which are ready to pass into the crithidial stage and perish at the metacyclic stage.

Evidently the view of the presence of enzymes of the non-cytochromic path of oxidation in the most primitive representatives of the family (Wertlieb and Guttman 1963), holds true for the cytochrome-containing trypanosomides.

In the crithidial forms of *T. cruzi*, the activity of peroxidase is manifested in granules which contain also polysaccharides (Kallinikova 1964) and thiol groups (Roskin i Kožuhova 1964). Consequently glutanion peroxidase may be in question.

In this way, the cytochemical results indicate that the total enzyme system of the respiratory chain is not quite the same at various stages of the life cycle of *T. cruzi* (Table 1). At all the stages of the cycle, the rather active cytochrome oxidase is the final link of the chain while the degree of diaphorases activity — and possibly their assembly — differ considerably at various stages. Only the crithidial stages show the peroxidase activity associated with the non-cytochromic path of oxidation.

The advantage of the cytochemical study is the possibility of determining the intracellular localization of the chemical components. This problem is nearly uninvestigated in the case of the respiratory enzymes of trypanosomides.

We succeeded to reveal that the activity of diaphorases appears in *T. cruzi* in the area of kinetoplast in the majority of cases, and sometimes this structure itself shows the diaphorase activity. This topographical association of those enzymes with the kinetoplast remains at all the stages of the life cycle, at all the possible spacial interrelations of this organoid to the free part of flagellum. So it is also in the leishmanial forms in which the free flagellum is lost. The topographical association of cytochrome oxidase with the kinetoplast and with flagellum is rather clearly marked in the crithidial and trypanosomal stages of the cycle. The same localization of cytochrome oxidase and

Table 1
Enzymes of the respiratory chain in the life cycle of *Trypanosoma cruzi*

Enzymes	Life cycle stages					Remarks
	in vitro			in vivo		
	lepto- monadial	crithi- dial	meta- cyclic	trypano- somal	lei- shmanial	
Cytochrome oxidase	+	+	+	+	+	Degree of activity approx. uniform
NADH diaphorase	+	+	+	?	+	In metac. stage rather low, in trypanosomal possibly absent
NADPH diaphorase	+	+	+	+	+	Low activity at metac. and trypanosomal stages
Peroxidase	±	+	-	-	-	In leptomonades only prior to their transformation into crithidia

of diaphorases was observed by us in the leishmanial forms from the culture and in *Strigomonas oncopelti*.

The topographical connection of the kinetoplast with the respiratory enzymes — as revealed cytochemically — together with the information from the literature concerning an analogical topography of mitochondria in trypanosomides and also the mitochondrial elements of kinetoplast — involve a suggestion of a functional link of this organoid with the respiratory enzymes of the cytochromal path of oxidation.

The author of the present study confronted the data found in the literature concerning the ability of various species and groups trypanosomides for a spontaneous loss of kinetoplast, with the biochemical findings about the loss of the cytochrome system and of Krebs cycle in those protozoa. This confrontation has revealed a definite positive correlation between the ability of trypanosomides for a painless loss of kinetoplast with their loss of cytochrome system and of the Krebs cycle enzymes. This supports the functional association of kinetoplast with the activity of those enzymes (Kallinikova 1967).

It deserves attention that in contrast to diaphorases and to cytochrome oxidase, peroxidase — which performs the non-cytochromic oxidation — is not connected topographically with kinetoplast. On the contrary, it appears at the cell pole opposite to kinetoplast. This was observed for *T. gambiense* as well (Michel 1964). It may be supposed that the loss of kinetoplast should not influence the course of this path of oxidation and its functional connection with the activity of this enzyme might not exist.

Michel described the topography of diaphorases of the non-cytochromic

form of *T. gambiense*. This topography differs from that in *T. cruzi*. Both enzymes together with peroxidase appear only at the cell end opposite to the kinetoplast. Perhaps in non-cytochromic forms, the respiratory enzymes are less—or not at all—bound with the kinetoplast which may be lost without impairing their metabolism. This deserves a special attention.

The cytochemical study method may introduce a contribution to our knowledge of the functional role of kinetoplast.

Summary

The enzyme system of the respiratory chain seems to be not quite identical at different stages of the life cycle of *T. cruzi*. At all the stages of the life cycle, the activity of cytochrome oxydase and flavine enzymes of the diaphorase type have been revealed. The degree of activity and may be the composition of diaphorases are different at various stages. The crithidial stage shows the peroxidase activity which disappears at other stages.

Cytochrome oxidase and diaphorases are topographically associated with the kinetoplast in *T. cruzi*. This indicates their functional association. This view is supported by the comparison of findings of other authors on the ability of other trypanosomes to lose their kinetoplast as well as their cytochrome system.

РЕЗЮМЕ

Ферментная система дыхательной цепи на разных этапах жизненного цикла *T. cruzi* представляется не совсем одинаковой.

На всех стадиях цикла обнаруживается активность цитохромоксидазы и флавиновых ферментов типа диафораз. Степень активности диафораз, а возможно, и их состав несколько различаются от стадии к стадии.

Критидиальная стадия проявляет пероксидазную активность, которая утрачивается на остальных этапах цикла.

Цитохромоксидаза и диафоразы топографически связаны с кинетопластом *T. cruzi*, что свидетельствует об их функциональной связи. Последнее подтверждается при сопоставлении литературных данных о способности различных трипанозом к утрате кинетопласта и потере ими цитохромной системы.

REFERENCES

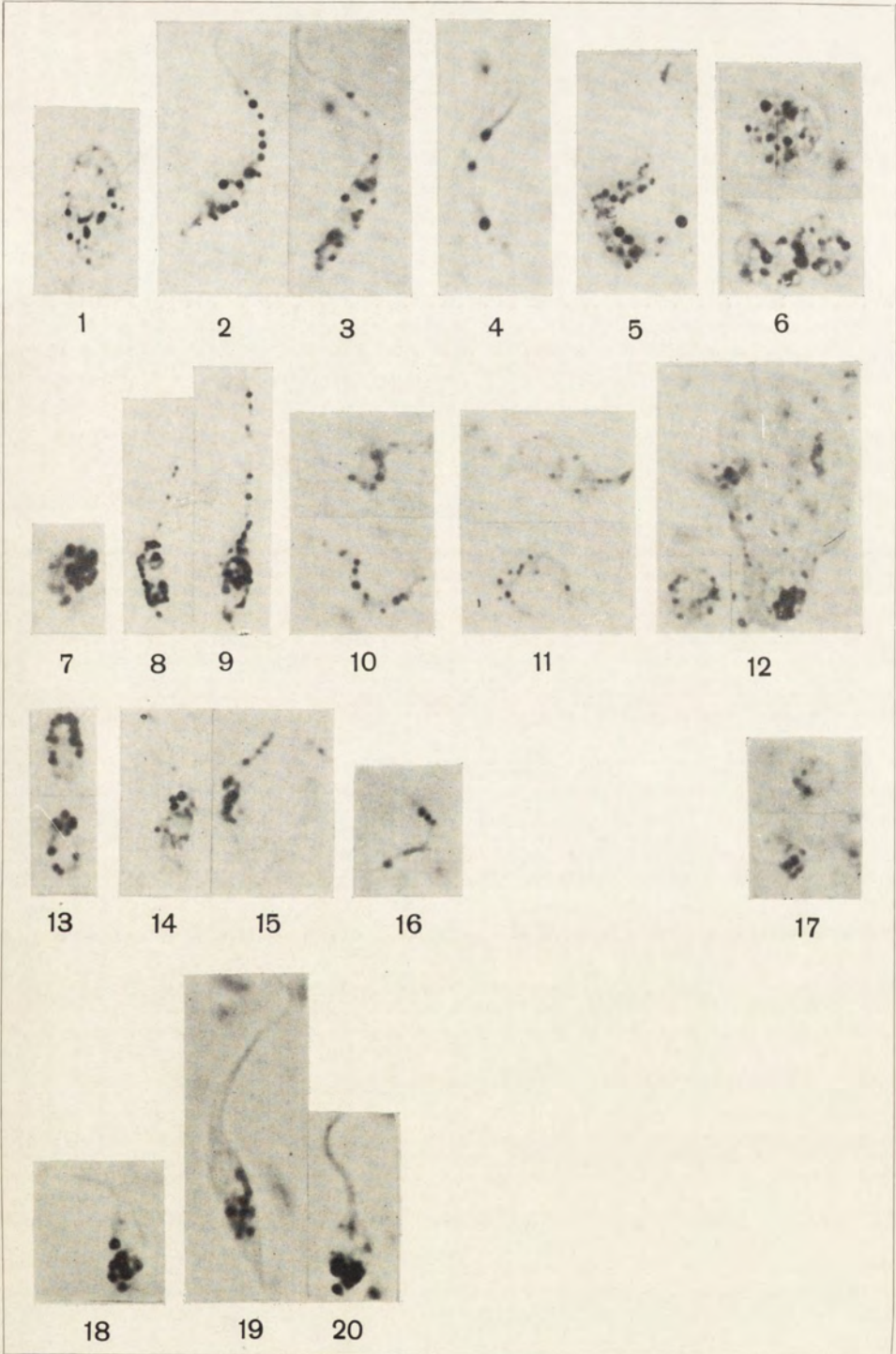
- Agosin M. and Brand T. von 1956: Characterisation and intracellular distribution of the succinic dehydrogenase of *Trypanosoma cruzi*. *Expl Parasit.*, 4, 624.
- Baernstein H. D. 1953: Malicdehydrogenase and related enzymes in the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Expl Parasit.* 2, 380—396.
- Baernstein H. D. 1953a: The enzyme system of the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. N. J. Acad. Sci.*, 56, 983—994.
- Baernstein H. D. 1963: A review of electron transport mechanism in parasitic protozoa. *J. Parasit.*, 49, 12—21.
- Baernstein H. D. and E. J. Tobie 1951: Cytochrome system of *Trypanosoma cruzi*. *Federation Proc.*, 10, 159.

- Brand T. von 1956: Beziehungen zwischen Stoffwechsel und taxonomischer Einleitung der Säugetiertrypanosomen. Zool. Anz., 157, 119—123.
- Brand T. von 1959: Neuere Untersuchungen aus dem Gebiet der Parasitenphysiologie. Z. Tropenmed. Parasit., 10, 123—134.
- Brand T. von 1959 a: Neuere Untersuchungen aus dem Gebiet der pathologischen Physiologie parasitischer Infektionen. Z. Tropenmed. Parasit., 10, 135—146.
- Brand T. von 1960: Der Stoffwechsel der Trypanosomen. Ergebn. Biol., 22, 30—46.
- Brand T. von and Johnson E. 1947: A comparative study of the effect of cyanide on the respiration of some *Trypanosomidae*. J. cell. comp. Physiol., 29, 33—46.
- Brand T. von, Johnson E. M. and Rees Ch. 1946: Observation on the respiration of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. gen. Physiol., 30, 163—175.
- Brand T. von and Tobie E. J. 1948: Further observations on the influence of cyanide on some trypanosomes. J. cell. comp. Physiol., 31, 49—68.
- Fulton J. D. and Spooner D. F. 1959: Terminal respiration in certain mammalian Trypanosomes. Expl. Parasit., 8, 137—162.
- Grant P. T., Sargent J. R. and Ryley J. F. 1961: Respiratory systems in the *Trypanosomidae*. Biochem. J., 81, 200—206.
- Harvey S. C. 1949: The carbohydrate metabolism of *Trypanosoma hippicum*. J. biol. Chem., 179, 435—453.
- Hutner S. H. and Lwoff A. 1951: Biochemistry and Physiology of Protozoa. N. J. Academic Press
- Kallinikova V. D. 1964: Citohimičeskoe izučenie polisaharidov v žiznennom cikle *Shizotrypanum cruzi*. Citologija, 6, 43—52.
- Kallinikova V. D. 1967: Kinetoplast i dyhatel'nye fermenty v kletke tripanozomid. DAN SSSR, 173, 215—218.
- Michel R. 1964: Reflexmikroskopische und enzymatische Untersuchungen der cytoplasmatischen Granula von *Trypanosoma gambiense*. Z. Tropenmed. Parasit., 15, 400—426.
- Roskin G. I. i Kožuhova S. B. 1964: Citohimija tiolovyh grupp u *Schizotrypanum cruzi* i ih izmenenija v cikle žizni protoznojnoj kletki. Citologija, 6, 35—43.
- Roskin G. und Levinson L. 1926: Die Oxydasen und Peroxydasen bei Protozoa. Arch. Protistenk., 56, 145—166.
- Roskin G. I. i Levinson L. B. 1927: Oksidazy i peroksidazy prostejših. Trudy Mikrob. Inst. NKProsa.
- Ryley J. F. 1962: Studies on the metabolism of the Protozoa. 9. Comparative metabolism of blood-stream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiense*. Biochem. J., 85, 211—223.
- Seaman G. R. 1953: The succinic dehydrogenase of *Trypanosoma cruzi*. Expl. Parasit., 2, 236—241.
- Seaman G. R. 1956: Succinate metabolism of haemoflagellates. Expl. Parasit., 5, 138—148.
- Wertlieb D. M. and Guttman H. N. 1963: Catalase in insect Trypanosomatids. J. Protozool., 10, 109—112.

EXPLANATION OF PLATE I

The activity of enzymes of the respiratory chain at different stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*

- 1—6: Cytochromoxydase activity
- 7—12: NADPH-diaphorase activity
- 13—17: NADH-diaphorase activity
- 18—20: Peroxydase activity
- 1, 7, 13: Leptomonade stage of the life cycle
- 18: Transformation of leptomonade form into crithidial form
- 2, 3, 8, 9, 14, 15, 19, 20: Crithidial stage
- 20: Deformation of crithidia in old culture
- 4: Transformation of crithidial form into metacyclic form
- 10, 16: Metacyclic stage
- 5, 11: Trypanosome stage
- 6, 12, 17: Leishmanial stage



V. D. Kallnikova

auctor phot.

PROTISTOLOGICA

Tom III

Fascicule 1

Mignot J. P. — Structure et ultrastructure de quelques Chloromonadines	5
Mignot J. P. — Affinités des Euglénomonadines et des Chloromonadines — Remarques sur la systématique des Euglenida	25
Dragesco J. — Armature fibrillaire interne chez <i>Hartmannula acrobates</i> Entz (Cilié, Holotriche Gymnostome)	61
Gaumont R. et Remy M. F. — Essai de culture in vitro de quelques Ciliés du rectum de la grenouille	67
Charret R. — Caractères cytologiques du Thécamoebien <i>Arcella polypora</i>	73
Roque M., de Puytorac P. et Lom J. — L'architecture buccale et la stomatogénèse d' <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> Fouquet, 1876	79
Tuffrau M. — Perfectionnements et pratique de la technique d'imprégnation au Protargol des Infusoires Ciliés	91

Fascicule 2

Batisse A. et Dragesco J. — <i>Ophryodendron roscoffensis</i> nov. sp.	103
Bonhomme-Florentin A. — Les méthodes d'isolement du genre <i>Ento-</i> <i>dinium</i> (Cilié Oligotriche). L'action de ce Cilié dans la digestion de la cellulose	113
Andre J. et Feure-Fremiet E. — Lésions cytoplasmiques provoquées chez un Cilié par un Tentaculifère parasite	121
Clément-Iftode F. — Sur une Sphaerophrya ectoparasite de <i>Nassula</i> <i>elegans</i>	127
Dragesco J. et Tuffrau M. — <i>Neobursaridium gigas</i> Balech, 1941, Cilié Holotriche Hyménostome pantropical	133
Théodoridès J. et Desportes I. — Quatre nouvelles Grégarines pa- rasites de Coléoptères Ténébrionides du Laos	147
Hollande A., Cachon J. et M. et Valentin J. — Infrastructure des axopodes et organisation générale de <i>Sticholonche zanolea</i> (Radiolaire Sticholonchidea)	155
Sénaud J. — Contribution à l'étude des Sarcosporidies et des Toxoplasmes	167

Fascicule 3

Compte-rendu de la 6 ^{ème} réunion du Groupement des Protistologues de Langue Française	237
Hovasse R. — Hommage rendu au Professeur P.-P. Grassé	239
Hovasse R., Mignot J. P., Joyon L. — Nouvelles observations sur les Trichocystes des Cryptomonadines et les "R bodies" des particules kappa de <i>Paramecium aurelia</i>	241
Hollande A., Valentin J. — Morphologie et infrastructure du genre <i>Barbulanympha</i> , Hypermastigine, symbiotique de <i>Cryptocercus punc-</i> <i>tulatus</i> Scudder	257
De Puytorac P. — Aspects de l'ultrastructure du Cilié <i>Lembadion lucens</i> (Maskell)	269
Wery M. — Etude du cycle sporogonique de <i>Plasmodium chabaudi</i> en vue de la production massive de sporozoïtes viables et de formes exo-erythro- cytaires	275
Deflandre G. — Critique de travaux français récents concernant les Coccolithophoridés actuels	287
Pyne C. — Etudes préliminaires sur l'organisation de la chromatine pendant l'interphase chez <i>Euglena gracilis</i>	291

Ormières R. — <i>Leidyana peregrinata</i> n. sp., Eugrégarine parasite de Lépidoptères Pyralidae: cycle normal et cycle coelomique	295
Noirot-Timotheé C. — Etude au microscope électronique des inclusions cytoplasmiques de <i>Cepedea dimidiata</i> (Protozoa Opalinina) et plus spécialement des mitochondries ou corps de Zeller	301
Cachon J. et M. — <i>Cymbodinium elegans</i> nov. gen., nov. sp., Péridinien <i>Noctilucidae</i> Saville-Kent	313
Kolle-Kralik U. und Ruff P. W. — Vibrotaxis von <i>Amoeba proteus</i> (Pallas) in Vergleich mit der Zilienschlagfrequenz der Beutetiere	319
Vivier F., Petitprez A. et Chivé A. P. — Observations ultrastructurales sur les chlorelles symbiotes de <i>Paramecium bursaria</i>	325
Greuet C. — Organisation ultrastructurale du tentacule d' <i>Erythrospis pavillardi</i> Kofoid et Swezy Peridinien Warnowiidae Lindemann	335
Mugard H. et Renaud L. — Etude de l'effet des ultra-sons sur <i>Amoeba proteus</i> (<i>Chaos diffluens</i>)	347
Codreanu R. — Sur une Microsporidie nouvelle hyperparasite d'une Grégarine du genre <i>Enterocysts</i> et le statut systématique de la famille des <i>Enterocystidae</i> Margareta Codreanu, 1940, propres aux Ephémères	351
Fascicule 4	
Lamy L. — Cycle biologique complet de <i>Leishmania</i> in vitro et étude de divers comportements	359
Corbel J. C. — <i>Metchnikovella martojai</i> , n. sp. (Microsporidie, <i>Metchnikovellidae</i>), parasite d'une Grégarine de Gryllide	365
Tuffrau M. — Les structures fibrillaires somatiques et buccales chez les Ciliés Hétérotriches	369
Batisse A. — Ultrastructures de la coque et du disque chez le genre <i>Metacineta</i> Bütschli	395
Tuzet O. et Manier J. F. — <i>Enterobryus oxidi</i> Lichtwardt, Trichomycète eccrinale parasite du Myriapode Diplopode <i>Oxydus gracilis</i> (Koch) (cycle, ultrastructure)	413
Deflandre G. — <i>Stenopyxinium</i> n. g. <i>grassei</i> , n. sp., nouveau type de kyste de Dinoflagellé fossile d'un silex crétacé	423
Cachon J. et M. — Contribution à l'étude des <i>Noctilucidae</i> Saville. Kent I. Les <i>Kofoidininae</i> Cachon J. et M. Evolution morphologique et systématique	427
Maurand J. et Manier J. F. — Une microsporidie nouvelle pour les larves de Simulies	445
Porchet-Henneré E. — Corrélations entre le cycle du développement de la Coccidie <i>Myriosporides amphiglenae</i> et celui de son hôte <i>Amphiglena mediterranea</i> (Annélide polychète). Mode de contamination	451
Clément-Iftode F. et Versavel G. — <i>Teutophrys trisuloa</i> (Chatton, de Beauchamp), Cilié planctonique rare	457
Roque M. et de Puytorac P. — Infraciliature d'un nouvel <i>Ophryoglenidae</i> : <i>Ichthyophthirioides browni</i> , n. g., n. sp.	465
Mugard H. et Rouyer M. — Influence de la température sur <i>Ophryoglena mucifera</i> en culture axénique et non axénique	475

Fasciculi praeparati:

C. G. Gillies and E. D. Hanson: Morphogenesis of *Paramecium trichium* [Morphogénese de *Paramecium trichium*] — D. B. Ossipov and I. I. Skoblo: The autogamy during conjugation in *Paramecium caudatum* Ehrbg. II. The ex-autogamont stages of the nuclear reorganization [Автогамия при конъюгации *Paramecium caudatum* Ehrbg. II. Экс-автогамонтный цикл ядерной реорганизации] — B. R. Seshachar and A. R. Kasturi: Conjugation in *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. [Konjugation von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg.] — A. Czapiak: Remarques sur *Deltopylum rhabdoides* Fauré-Fremiet et Mugard (*Ciliata, Hymenostomata*) [Uwagi o *Deltopylum rhabdoides* Fauré-Fremiet et Mugard (*Ciliata, Hymenostomata*)] — E. M. Cheissin: On the distinctnes of the species *Eimeria neoleporis* Carvalho, 1942 from the cottontail rabbit *Sylvilagus floridanus mearnsii* and *Eimeria coecicola* Cheissin, 1947 from the tame rabbit *Oryctolagus cuniculus* [О самостоятельности видов *Eimeria neoleporis* Carvalho, 1942 из белохвостого кролика *Sylvilagus floridanus mearnsii* и *Eimeria coecicola* Cheissin, 1947 из домашнего кролика *Oryctolagus cuniculus*] — J. J. Lipa: Some observations on flagellate parasites of hemipterans *Corimelaena*, *Euschistus*, *Gerris*, *Leptocoris* and *Oncopeltus* in the United States [Обсервacje nad wiciowcami pasożytującymi w pluskwiakach *Corimelaena*, *Euschistus*, *Gerris*, *Leptocoris* i *Oncopeltus* w Stanach Zjednoczonych] J. J. Lipa: *Stempellia scolyti* (Weiser) comb. nov. and *Nosema scolyti* sp. n. microsporidian parasites of four species of *Scolytus* (*Coleoptera*) [Mikrosporidia *Stempellia scolyti* (Weiser) comb. nov. i *Nosema scolyti* sp. n. pasożytujące w czterech gatunkach *Scolytus* (*Coleoptera*)] — T. V. Beyer: Cytochemical studies on the haemogregarines of Armenian reptiles. I. DNA in the nuclei of some *Karyolysus* species from the rock-lizards *Lacerta armenica* and *L. saxicola* [Цитохимическое исследование гемогрегаринов из рептилий Армении. 1. ДНК в ядрах некоторых видов *Karyolysus* из скальных ящериц — *Lacerta armenica* и *L. saxicola*] — V. D. Kallinikova: Cytochemical study of enzymes of the respiratory chain in the life cycle of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. 2. Respiratory enzymes of crithidial forms in the course of cultivation and some observations on the growth of the culture [Цитохимическое исследование ферментов дыхательной цепи в жизненном цикле *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. 2. Дыхательные ферменты критидиальных форм в процессе культивирования *Trypanosoma cruzi*, наряду с другими показателями роста культуры] — Л. Н. Серавин: Роль механических и химических раздражителей в индуцировании фагоцитарной реакции у *Amoeba proteus* и *A. dubia* [The role of mechanical and chemical stimulators on the induction of phagocytic reactions in *Amoeba proteus* and *A. dubia*] — L. Kuźnicki: Behavior of *Paramecium* in gravity fields. I. Sinking of immobilized specimens [Zachowanie się *Paramecium* w polach grawitacyjnych. I. Opadanie immobilizowanych orzęsków]

SUBSCRIPTION

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

Place your order with your bookseller or directly with:

Exporte and Import Enterprise „RUCH”

Warszawa, Wronia 23, Poland

Cable: Exprimruch, Warszawa

Bank Account: Bank Handlowy S.A. Warszawa

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

Fasciculi:

21. A. Czapik: La famille *Tetrahymenidae* et son importance dans la systématique et l'évolution des ciliés [Rodzina *Tetrahymenidae* i jej znaczenie w systematyce i ewolucji orzęsków] 315
22. M. Jerka-Dziadosz: Study on resorption of ciliature in *Urostyla* (*Hypotricha*) [Badania nad resorpcją orzęsienia u *Urostyla* (*Hypotricha*)] 359
23. J. J. Lipa: *Nosema coccinellae* sp. n., a new microsporidian parasite of *Coccinella septempunctata*, *Hippodamia tredecimpunctata* and *Myrrha octodecimguttata* [*Nosema coccinellae* sp. n., nowy gatunek pierwotniaka z rzędu *Microsporidia* pasożytujący w *Coccinella septempunctata*, *Hippodamia tredecimpunctata* i *Myrrha octodecimguttata*] 369
24. J. J. Lipa: On two microsporidians *Nosema whitei* Weiser from *Tribolium confusum* and *Nosema weiseri* sp. n. from *Rhizopertha dominica* [O dwóch mikrosporidiach *Nosema whitei* Weiser z *Tribolium confusum* i *Nosema weiseri* sp. n. z *Rhizopertha dominica*] 375
25. E. S. Snigirevskaya: The occurrence of micropore in schizonts, microgametocytes and macrogametes of *Eimeria intestinalis* [О наличии микропоры у шизонтов, микрогаметоцитов и макрогамет *Eimeria intestinalis*] 381
26. E. M. Cheïssin, J. M. Rozanov, B. N. Kudriavtsev: Fluorescence microscopic study on the content of nucleic acids in merozoites and microgametes of *Eimeria intestinalis* from the intestine of rabbit [Исследование содержания нуклеиновых кислот у мерозоитов и микрогамет *Eimeria intestinalis* из кишечника кролика методом флуоресцентной микроскопии] 389
27. V. D. Kallinikova: Cytochemical study of enzymes of the respiratory chain in the life of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. I. Enzymes of the respiratory chain at all stages of the life cycle, in vivo and in culture [Цитохимическое исследование ферментов дыхательной цепи в жизненном цикле *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. I. Ферменты дыхательной цепи на всех стадиях цикла, in vivo и в культуре] 395

With this issue the Volume V is complete