

ACTA PROTOZOO- LOGICA

REDACTORUM CONSILIUM

S. DRYL (WARSZAWA), A. GRĘBECKI (WARSZAWA),
S. L. KAZUBSKI (WARSZAWA), L. KUŹNICKI (WARSZAWA),
G. I. POLJANSKY (LENINGRAD), K. M. SUKHANOVA (LENINGRAD)

VOLUMEN XII

Fasciculi: 15-21

W A R S Z A W A 1 9 7 3

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

ACTA PROTOZOLOGICA

Editor:
STANISŁAW DRYL

Associate Editor:
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: "Kinoshita 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.

D. V. OSSIPOV and I. I. SKOBLO

Morphogenetic activity of generative nucleus in the sexual cell reorganization of ciliates

Морфогенетическая активность генеративного ядра инфузорий
в период половой реорганизации клетки

The nuclear dualism, common in the majority of ciliates, makes them an especially favorable object for the study of the mechanisms of differential activity of the cell genetic apparatus. In these protozoa, any vegetative cell contains two types of nuclei (macronucleus and micronucleus) each of them being distinctly different in many most important biological properties, i.e., in morphology, structural and ultrastructural organization, functional activity (RNA synthesis), dynamic of DNA synthesis in the mitotic cycle, character of division, potentialities for changes of the character of nuclear differentiation, consequences after their casual loss and others (Dogiel et al. 1962, Sonneborn 1966, Raikov 1967, Skoblo 1968, Gorovsky and Woodard 1969, Gorovsky 1970, Borkhsenius 1971, Ammermann 1971, Prescott et al. 1971). Although macronucleus (somatic nucleus) and micronucleus (generative nucleus) of cell are identical genetically, all those differences between them remain stable in a number of consecutive agamic cellular generations, up to the moment of sexual reorganization of the nuclear apparatus.

Cytokaryological properties of ciliata conjugation reveal possibilities for the study of nucleo-cytoplasmic interaction in those animals at the period of sexual reorganization, using the method of hybridological analysis (Wichterman 1953, Raikov 1972). The study of peculiarities of interrelations of single cellular components may promote a more exact presentation of the comparative role of macro- and micronucleus, and of the corresponding nucleo-cytoplasmic interrelations in the regulation of morphogenetic processes in the sexual reorganization of cell in ciliates.

Let us analyse in general lines the principal stages of the nuclear reconstruction during the conjugation of ciliates (Fig. 1 A). Two vegetative cells unite temporarily into a conjugating pair. Micronucleus (Mi) undergoes three maturation divisions, the first two of them being meiotic. The third division in each conjugant is initiated only in one of the meiotic nucleus whereas the remaining derivatives of Mi degenerate. The nuclei arisen as result of the third maturation division of Mi differentiate. One of them becomes the stationary pronucleus, the second — the migrating

one. Owing to the third (additional) maturation division of *Mi*, the cross fertilization of conjugants in the pair becomes possible. The migrating pronucleus of each cell passes into the other conjugant of the pair where it fuses with the stationary nucleus producing the zygotic nucleus (synkaryon). Soon after the interchange of pronuclei and after karyogamy, the partners-cells separate. In each of them occurs the reconstruction of the new nuclear apparatus from the derivatives of mitotic divisions of synkaryon. The old macronucleus (*Ma*) desintegrates and soon degenerates.

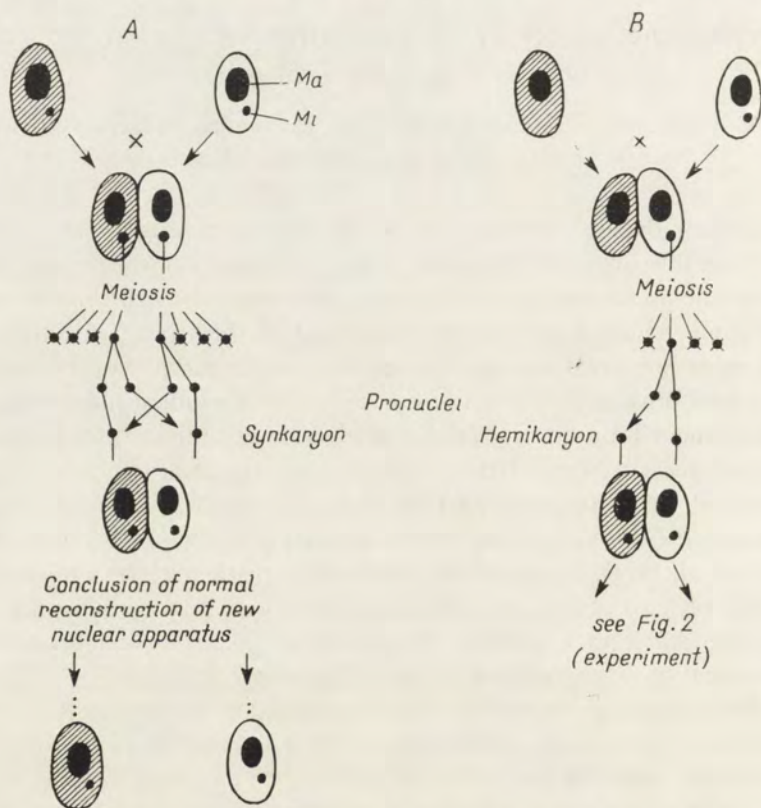


Fig. 1. Principal stages of nuclear reorganization *Paramecium caudatum* in conjugation normal (A) and used in experiment (B)

In this way, in the sexual process of ciliates, specialized gametes are absent. Instead of them gamont-cells are formed with a highly complicated organization, differing from the other vegetative cells only by a few changes (Dogiel et al. 1962, Raikov 1972). The whole sexual nuclear reorganization takes place in them only in the limits of one cell and the migrating (male) pronucleus really penetrates not into the egg-cell (macrogameta) like in *Metazoa* and in the majority of *Protozoa*, but into a highly differentiated cell-organism.

In the conjugation of ciliates, the temporarily fused partners interchange only the sexual nuclei—pronuclei, preserving—as a rule—the genetic system of cytoplasm unchanged. (Nanney 1963, Preer 1968, Ossipov 1971), except for certain cases when an exchange of cytoplasm between the partners is experimentally induced prior to the moment of their separation (Beale 1954, Sonneborn 1959, 1963). It should be, taken into account, however, that the intercellular interactions of most various forms occur between the partners. The interactions between the conjugants is based on the exchange of the components which do not possess a genetic continuity and this evidently is to be an indispensable condition for the normal course of sexual reorganization of cells (Ossipov 1971).

Owing to the above peculiarities of the nuclear reorganization in ciliates (Fig. 1 A), two synkaryons formed in one conjugating pair, should be fully identical genetically, independently of the initial genotype of parental cells. When the partner-cells manifest any differences concerning their cytoplasm prior to their sexual process, then genetically identical nuclei begin to develop in different cytoplasms as a result of completion of conjugation (Beale 1954, Preer 1968).

Numerous investigations proved that the ciliates of amiconuclear clones are able to conjugate between themselves (Woodruff 1921, Chen 1940, Kimball 1941, Schwartz 1946, Metz 1954, Miyake 1957, Diller 1965, Skoblo 1969). Of course, in different species of ciliates, the absence of *Mi* involves a different effect upon the character of "sexual" reorganization. This may be premature separation of partners, or in contrast, their prolonged union, full irreversible fusion of conjugants, abnormal desintegration of old *Ma* or its lack of capacity for fragmentation, impairment of stomatogenesis processes and others. Their common property is, however, the lack of viability of amiconuclear (*AMi*) conjugants. The results are, however, different in the case of conjugation between the normal and *AMi*-clones, when in the course of nuclear reorganization the pronucleus migrates into the partner which is deprived of generative nucleus (Fig. 1 B). In a number of cases, viable clones are formed from those before *AMi* conjugants (Kimball 1941, Levine 1953, Kimball and Gaither 1955, Wells 1961, Ammermann 1971).

One of the methods of investigating the function of nucleus of the unicellular organisms, and the comparative role of nucleus and cytoplasm in preservation of the viability of cell—is the transplantation of nuclei (Danielli 1959, Tartar 1961, Goldstein and Prescott 1967, Yudin and Sopina 1970, Mahlin 1971). The transplantation of nuclei may be performed between the cells which differ by genotypes. In those cases, the functional properties of cells into which the "foreign" nucleus has been transferred, often change to a certain degree. A study of the character of impairment or of restitution of single cellular systems may be utilized for an analysis of interaction or function of each of them. Therefore it becomes evident that the act of migration of pronuclei during the conjugation between *AMi*- and *Mi*-clones of ciliates may be looked upon as a *sui generis* transplantation of nucleus

from the normal conjugant into the cytoplasm of another partner (Fig. 1 B). It should be stressed that in this case we have a natural system occurring regularly in the normal course of sexual nuclear cell reorganization.

Besides, the conjugants of each pair represent themselves two reciprocal combinations: the nucleus (Mi) — cytoplasm, due to unilateral transit of the migrating pronucleus the genetically identical nuclei begin to develop in cells of different origin. However, this situation is complicated in some way by the fact that in the cytoplasm of exconjugants the old Ma is present besides the derivatives of pronucleus. The results of genetic, radioautographic and cytochemical studies indicate that DNA of the old Ma — as a rule — is not utilized in formation of the new definitive Ma (McDonald 1959, Berech and Wagtendonk 1962, Kimball and Perdue 1964, Jankowski 1966, Berger 1967, Preer 1968). In the exconjugants and even in the products of the several first metagamic divisions, the fragments of the old Ma keep for same time their activity (RNA synthesis) till the moment of the final conclusion of formation of the new definitive Ma of cell.

In the present study, the effect of interaction of the migrating pronucleus and the "amicronuclear" cytoplasm are investigated. It should be stressed that as one of controls served the behaviour of stationary pronucleus in its "own" cytoplasm.

Material and methods

The study was executed on three clones of *Paramecium caudatum*: M-17, KG-11a2, and KG-11a3. The clone M-17 was taken from a natural reservoir of the Leningrad district in 1965 (Skoblo and Ossipov 1968). The clones KG-11a2(Mi) and KG-11a3(AMi) present sister-karyonids of one exautogamont, arisen after crossing of clones M-13(AMi) and KT-20(Mi) (Ossipov and Skoblo 1968). All the three clones used belong to one unidentified syngen with two mating types (m.t.) m.t. I — clones KG-11a2 and KG-11a3 and m.t. II — clone M-17 (formerly these mating types were marked as m.t. M-13 and m.t. M-17). This gave a possibility to get at any moment a necessary number of pairs arisen synchronically corresponding to the variants of mating. In a number of cases (control II) pairs were gained artificially after evoking with chemical agents the conjugation among the reactive cells of one clone. Induction of intraclonal (selfing) conjugation was carried out by the method of Hiwatashi 1959, applying as agents EDTA (0.15–0.16 mM), (8–13 mM) or their combination: 0.075 mM EDTA+6.5 mM KCl.

Paramecia were cultivated by the commonly used method in 12 ml test tubes at 25° in the lettuce medium (Sonneborn 1950); *Aerobacter aerogenes* was used as food.

Since in the conjugation of two clones of complementary mating types a certain number of homotypic pairs arises with both members of the pair belonging to one clone (Hiwatashi 1961, Skoblo and Ossipov 1968), it was necessary to take into account such "illegitimate" pairs and to exclude them of the further analysis. In the case of crossing of normal clone with AMi-clones, the percent of formed homotypic pairs of both clones may be easily stated cytologically on preparations, without using any special methods of marking. In special experiments hundreds conjugating pairs were examined after crossing M-17 × KG-11a3. It was stated that the homotypic pairs M-17 × M-17 are never formed whereas the homotypic pairs KG-11a3 × KG-11a3 arise with a frequency of about 14%.

The peculiarities of the course of nuclear reorganization in the sexual process of paramecia had been examined on fixed preparations after the Feulgen staining modified by De Lamater (Sonnenborn 1950) and on provisional preparations stained with Dippell's 1955 method. Two hours after formation of conjugating pairs, paramecia were fixed with 1 h intervals till the moment of separation of partners (18 h stage). Usually the separation of conjugants takes place at the stage of I-II metagamic divisions of synkaryon (or hemikaryon). In those cases when the migration of pronucleus into AMi-partner occurs (stage of approx. 14 h), the origin of both conjugants of the pair may be reliably stated up to the moment of their separation, because in the cytoplasm of the normal partner the pycnotic bodies of degenerating derivatives of Mi are still preserved up to this time.

For the solution of problems of the present study it was necessary to elucidate the course of nuclear transformations and their differences between the conjugants of a pair and their next cellular offsprings. We used therefore the method of individual analysis of the exconjugant progeny, the essence of which consists in the following procedure. Beginning with the stage of the partners separation, the preparation method was adjusted so that it could be exactly stated from which conjugating pair, from which conjugant and after how many metagamic divisions arose the cells observed in preparation. For securing this, every conjugating pair was placed in separate microaquaria. After the moment of separation, exconjugants were placed in separate microaquaria and were allowed to divide several times. After elapse of time necessary for occurrence of a some metagamic divisions (1,2 or 3), the cells produced by each exconjugant were fixed, the stage and the peculiarities of the nuclear apparatus reconstruction were determined. The progeny of two exconjugants of one pair were placed separately on one slide. In this way we succeeded to follow the full picture of reorganization of the new nuclear apparatus, as well as the character of distribution of primordia and fragments of the old Ma between the cells in the first metagamic divisions of exconjugants. The peculiarities of nuclear reorganization were observed in each of two exconjugants arisen after crossing of normal (M-17) and AMi (KG-11a3) cells.

For every crossing, besides its cytological examination, an attempt was made to obtain viable progeny from exconjugants. In each variant of crossing, 200-800 single conjugating pairs were placed in separate microaquaria. However, not all the exconjugants produced viable clones. When the number of cells in a exconjugant clone reached several thousands, a fixed preparation was made and the structure of nuclear apparatus was analysed, namely the presence or absence of Mi. Besides, in all the exconjugant clones the mating type was determined. As test clones, the parental paramecia clones of a known mating types were always used in this case.

In some cases of crossing (Control II and III) the study of exconjugant cycle of the nuclear reorganization was carried out on selected exconjugants gained from pairs separated previously without planting out at single individuals. The exconjugants and the products of their divisions were fixed for 36, 48, 60 h and then 4, 5, 6, 10 days after the onset of conjugation.

Results

Figure 2 presents the main results of the research. In the experiment two clones KG-11a3 and M-17 were crossed, one of them being AMi. In this variant of crossing a normal pronucleus migration takes place in 89% of conjugating pairs. The results indicate that the pronucleus in a "foreign" cytoplasm manifests a definite morphogenetic activity since its presence in an exconjugant secures the possibility of normal completion of some processes in the conclusive period of sexual reorganization of the cell. On the other hand, this nucleus is under the action of the "foreign" cytoplasm. The present data fail to determine more exactly whether this action comes

	Experiment	Control I	Control II	Control III
Marking of clones and their mating types	KG-11a 3 x M-17 m.t. I. m.t. II	KG-11a 3 x M-17 m.t. I m.t. II	KG-11a 3 x KG-11a 3 (selfing - conjugation)	KG-11a 2 x M-17 m.t. I m.t. II
Onset of sexual nuclear reorganization				
Stage of pronucleus migration				
Onset of formation of new nuclear apparatus				
Normal fragmentation of old macronucleus occurs	+	-	-	+
Presence of normal primordia of macronucleus	-	+	-	+
New macronucleus develops as a result of Ma regeneration	+	-	-	-
Presence of micronucleus	-	+	-	+
Mating type of exconjugant clones	m.t. I only	-	-	**)
		m.t. I or m.t. II	-	**)

* All exconjugants perish.

** It was impossible to state definitely from which "cytoplasmic" parent the clones originate.

Fig. 2. Results of interaction of migrating pronucleus and "amicronuclear" cytoplasm in conjugation of *Paramecium caudatum*. Abbreviations: HK — hemikaryon, Ma — macronucleus, Mi — micronucleus, PN — pronucleus, SK — synkaryon, m.t. — mating type

from the old Ma or directly from the cytoplasm of exconjugant. It should be stressed that in the conjugation of KG-11a3 × M-17 as well as in the control variants at all the stages of reorganization some deviations from the normal behaviour of nuclei are observable. However, the major part of nuclear aberrations observed did not complicate the analysis of our results and therefore those anomalies are not to be considered.

Prior to analysis of the virtual results of crossing, the results of the control experiments should be studied. In the Control II (Fig. 2) the consequences of conjugation of AMi-cells of the clone KG-11a3 with each other were followed. Such pairs arise after crossing clones KG-11a3 and M-17 as a result of "illegitimate" fusion of infusoria which manifest one mating type. Besides they may be gained by means of chemical induction within the clone. Independently of the manner by which the pairs KG-11a3 × KG-11a3 have been gained, the normal fragmentation of the old Ma never occurs in exconjugants. It has been demonstrated previously that these exconjugants also lose their capacity for stomatogenesis i.e., for reproducing the complicated oral apparatus of the cell which is resorbed at early stages of conjugation (Ossipov and Tavrovskaja 1969). As result of this, exconjugants are not capable to take food and perish without division after 5–9 days. Since the cells initiating the nuclear reorganization are AMi, it is evident that the primordia of Ma and other derivatives of Mi are always absent in them. Similar lethal consequences of nuclear reorganization take place in any crossing combinations studied on AMi-clones of *P. caudatum* (Skoblo 1969).

Further consideration concerns the results of Control I (Fig. 2). It has been stated that in 11% of conjugating pairs KG-11a3 × M-17, for some presently unknown reasons, the migration of normally formed pronuclei failed to take place. In those cases, the new nuclear apparatus in Mi-partner (M-17) develops either from synkaryon or from hemikaryon. No essential differences concerning the subsequent fate of exconjugants have been stated. The old Ma becomes normally fragmented. The new Ma develops from the primordia — derivatives of Mi. The formed viable exconjugant clones prove to be of both types of conjugation and usually contain Mi. Quite different is the fate of AMi-partners (KG-11a3) in Control I. They behave in the same manner as the exconjugants in Control II (selfing — conjugation of cells KG-11a3). The old Ma loses in them the capacity for normal fragmentation. The cells perish after 5–9 days without division.

It has been stated by us previously that in the autogamonts of clone M-17 of *P. caudatum*, the pycnosis of Mi derivatives — at the stages till the moment of formation of pronuclei and karyogamy — leads invariably to the lack of fragmentation of the old Ma, to a full disturbance of stomatogenesis processes and to the inevitable death of the cell within a few days (Ossipov and Skoblo 1968, Skoblo and Ossipov 1968). In this way, the autogamonts M-17 with a similar nuclear aberration, behave in an analogical way as the exconjugants of AMi-clones in the

Controls I and II (Fig. 2). In contrast to this, the nuclear aberrations concerning the behaviour of synkaryon (or hemikaryon) derivatives in exautogamonts M-17 fail to induce the loss of capacity in the old Ma for the normal fragmentation and by a disturbance of stomatogenesis. Such exconjugants may also produce viable progeny, i.e., they behave with many respects like the Mi-partner in Control I and in the experiment (Fig. 1 and 2).

The above described characters of reorganization of the Mi-partner (M-17) in the Control I fully coincide with the results observed by us in Control III when in crossing two Mi-clones are applied: one of them being the same M-17, and another one — clone KG-11a2 which is a sister clone of the karyonid AMi-clone KG-11a3. Both clones had been gained in the following way. As a result of type of sexual process — unusual for *P. caudatum* — i.e., autogamy during conjugation (Ossipov and Skoblo 1968), two viable karyonids had been gained from one of the exautogamonts, one of them proved to be AMi. It is evident that the cytoplasm and Ma of those clones should be quite identical genetically. The viability of progeny in Control III has been analysed by us on 258 conjugating pairs: 287 (54.6%) of exconjugants concluded 3 metagamic divisions whereas only 113 (21%) of them produced viable exconjugant clones. Besides, 28 pairs gave progeny from both exconjugants and all the exconjugant clones contained Mi. In 57 pairs, only one of the two partners produced a viable exconjugant clone. Only two out of them proved to be AMi.

Consequently the results of Control III proved the absence of any defects in cytoplasm and in Ma of KG-11a3 cells concern the capacity for supporting the normal course of nuclear reorganization. In consideration of the problem whether the pronuclei of conjugants M-17 are not defective as well in their capacity for producing a new nuclear apparatus as for possibility of migration, the following circumstances should be kept in mind:

(1) The present study has been carried out without an analysis of segregation of the chromosomal markers in the progeny of conjugants.

(2) The main results have been obtained only on the base of cytological observation of the features of the nuclear reorganization course. For this reason, in the case of crossing of two Mi-clones (Control III) the method applied by us does not allow to consider the fact of migration (exchange) of pronuclei — as firmly established. The results gained in our experiments, provide, however, a reason to assert that the pronuclei of paramécia of clone M-17 are functionally normal.

As concerns the results of the main experiments (Fig. 2) it is evident that Ma of primarily AMi-partner acquires the ability for fragmentation, as usually in *P. caudatum*, after the transit of the migrating pronucleus into it. In the exconjugants of the partner KG-11a3, the process of stomatogenesis concludes normally, the cells are capable for metagamic divisions and can provide a viable progeny. However, the most important feature of reorganization consists in the fact that the new nuclear apparatus in such exconjugants is developing as result of regeneration

of Ma, not of the derivatives of hemikaryon originating from Mi of paramecia clone M-17. The derivatives of the first hemikaryon divisions degenerate always. The Ma regeneration process in such exconjugants proceeds in the following manner. A part of fragments of the old Ma gradually increases in size and becomes distributed evenly to the daughter cells in the first metagamic divisions of the exconjugants. As a result, whole definitive macronuclei arise from single fragments. In this way, the genotype of the cells of exconjugant clone should not be changed when compared with the genotype of their "cytoplasmic parent". This reflects — in our study that in all the viable exconjugant clones was inherited parental mating type (m.t. I).

The derivatives of hemikaryon normally reconstruct new nuclear apparatus in their "own" cytoplasm (partner M-17). The old Ma degenerates in a usual way the arising fragments become distributed among the products of the first exconjugant divisions and soon fully degenerate. Since in the course of the sexual nuclear reorganization a recombination occurs, the arising viable exconjugant clones certainly differ from their cytoplasmic parents with regard to their genetic properties. This is reflected in the character of heredity of mating types (m.t. I-clones appear as well as m.t. II ones).

The viability of progeny in the experiment has been analysed on 97 conjugating pairs: 80 (41.4%) of exconjugants accomplished 3 metagamic divisions, whereas only 67 (34.5%) out of them gave viable exconjugant clones. Besides, in all the 9 pairs — without exception — which gave viable progeny of both exconjugants, one clone was AMi, and the second one contained Mi. In the other 49 conjugating pairs, only one of two partners produced a viable clone. Out of them, 8 contained Mi i.e., descended of the conjugant clone M-17 and 41 proved to be AMi. The majority of the last clones originated surely from the conjugants KG-11a3.

Concluding the presentation of our results it should be especially stressed that in the Mi-partners up to the stage of pronuclei migration, the nuclear reorganization proceeds fully identically as well in the experiment, as in Control I and III. The deviations occurring in the subsequent stages of the nuclear apparatus reconstruction depend on the conditions under which the hemikaryon or synkaryon derivatives are developing.

Discussion

The data presented above permit to postulate that the migrating pronucleus (or the derivatives of its first divisions) yields into the cytoplasm of exconjugant a factor (substances) of a definite biological activity. The action of those substances being of nuclear — exactly of micronuclear — origin, determines the capacity of the old Ma to regeneration as well to a normal fragmentation and consequently to an active metabolism of Ma fragments till the moment of formation of the new defini-

tive nuclear apparatus. Besides, the pronucleus initiates the normal stomatogenesis i.e., restitution of the resorbed cortical structures of the buccal apparatus in exconjugants (Ossipov and Tavrovskaya 1969).

In the case of absence of the act of pronucleus migration in the pairs (Control I), the capacity of AMi-exconjugants (KG-11a3) for the above morphogenetic processes fails to appear even when the KG-11a3 cells remained in a close conjugation contact with the Mi-partners (M-17) for a period usual for these ciliates. The above results indicate that the hypothetic morphogenetic factor, when penetrated into cytoplasm, is evidently not able to pass across the cellular membranes from one conjugant of the pair (M-17) into another (KG-11a3).

The postulation put forward by us is the more striking when compared with the conjugation between the partner-cells of ciliates in normal conditions, in which an intense cytoplasmic exchange may take place especially at the period of the pronuclei migration (Ossipov 1971). So in *Tetrahymena pyriformis*, the migration of a considerable amount of RNA and protein between the conjugants has been revealed by autoradiographic methods (McDonald 1966). This author postulates that the principal biological function of this phenomenon consists in the protection of the migrating pronucleus against the "foreign" cytoplasm. On the basis of these data it is impossible to explain the results of genetic analysis obtained by Wells 1961 on the same object. She ascertained that as result of crossing between AMi and normal clones, viable Mi-clones from AMi-conjugants arise at low frequency. This means that the migrating pronucleus very rarely "acclimatizes" in the AMi-cytoplasm of *Tetrahymena* in spite even of the intense cytoplasmic exchange between the conjugants.

The morphogenetic activity of nuclei has already been demonstrated by the method of artificial transplantation of nuclei in algae, in protozoa and in multicellular animals. So, Haemmerling 1963 in the unicellular alga *Acetabularia*, ascertained the presence of a substances of a nuclear origin determined as "morphogenetic substances". It has been proved that those substances induce and regulate some definite morphogenetic processes. Tartar 1961 by means of transplantation of fragments of moniliform Ma from the vegetative cells of one species of *Stentor* into the cell of another one, gained "hybrids" which proved to be incapable to divide and finally perished. Evidently, analogical substances of nuclear origin have been detected in *Amoeba proteus* by the research workers in several laboratories. These were: cytonucleoproteins (Goldstein and Prescott 1967); the factor inducing the instability of heterokaryon in amoebae (Kalinina and Yudin 1964); and the lethal factor (Jeon and Lorch 1969, Mahlin and Yudin 1969, Mahlin 1971).

Although the definite morphogenetic role of Mi in the process of sexual nuclear reorganization in *P. caudatum* has been revealed, the data gained by us indicate that the cells of AMi-clone KG-11a3 are incapable to support in their cytoplasm Mi acquired anew in the process of conjugation. The migrated pronucleus in the cytoplasm of AMi-conjugant invariably degenerates after few hours, having completed 2-3 metagametic divisions within this time. However, its derivatives never initiate

and — the more so — never accomplish the processes of differentiation into definite Ma and Mi.

In contrast to a number of other ciliates — e.g., *Paramecium aurelia*, *P. multimicronucleatum*, *Stylonychia mytilus* (Sonneborn 1954, Diller 1965, Ammermann 1971), in *P. caudatum* the amiconuclear condition of cell appears evidently quite stable. The experimental deprivation of Mi in the vegetative cells of *P. caudatum* is endured with difficulty by the ciliate, the AMi-clones have then a lowered viability (Ossipov 1966). Simultaneously the micronucleus acquired by the AMi-cell in the process of conjugation KG-11a3 × M-17 cannot be kept normally. In such exconjugants, the new nuclear apparatus is formed not of the micronucleus derivatives but as result of regeneration of macronucleus, the former one giving the origin only to AMi-clones. In this respect, the fate of AMi-cells of *P. caudatum* after having enclosed the pronuclei in the course of conjugation with the normal ciliates is in harmony with the events marked above in *Tetrahymena pyriformis* (Wells 1961, Allen 1967).

It has been generally accepted that at the period of agamic multiplication of ciliates, Mi — in contrast to Ma — remains in the state of a full or nearly full repression (Sonneborn 1966, Rao and Prescott 1967, Preer 1968, Gorovsky and Woodard 1969, Gorovsky 1970, Murti and Prescott 1970), whereas at the period of sexual reorganization Mi becomes a functionally active nucleus (Raikov 1972). As the activeness of Mi in this case generally its capability is accepted to the nuclear reorganization (pro- and metagamic divisions) leading in result to formation of the new nuclear apparatus of the cell. However, the results gained by us in the present study as well as in the former ones (Ossipov and Skoblo 1968, Skoblo and Ossipov 1972), allow to postulate that the function of Mi — exactly of its derivatives — is not limited to this in *P. caudatum*. The Mi derivatives exhibit a definite morphogenetic activity participating in the regulation of some stages of the nuclear cell reorganization. It should, however, be kept in mind that considerable differences are observed even between related ciliates species, concerning the character of mechanisms which regulate the normal course of single processes of nuclear reorganization (Metz 1954, Skoblo and Ossipov 1968, Hiwatashi 1969, Ossipov 1971, 1972).

Summary

The analysis of the role of nucleo-cytoplasmic interactions in the regulation of morphogenetic processes in *Paramecium caudatum* has been ascertained as possible on basis of the study of cytokaryological features of sexual reorganization after crossing the normal and amiconuclear clones of *Paramecium*. The act of migration of pronucleus into the amiconuclear conjugant is essentially a natural transplantation of nucleus from one cell into the cytoplasm of another individual. The migrating

pronucleus secretes into the cytoplasm of exconjugant a factor of a definite morphogenetic activity. The action of this factor in the exconjugant cytoplasm determines the ability of the old macronucleus to fragmentation and induces stomatogenesis.

In this way, the function of the generative nucleus (inactive genetically in the agamic reproduction of ciliates at the period of sexual process is not limited to give only the origin for the new nuclear apparatus of the cell as a result of the series of divisions. Micronucleus takes also an active part in the regulation of the morphogenetic processes of sexual reorganization of the cell. In contrast to a number of the other ciliate species, in *P. caudatum* "the amiconuclear state of cytoplasm" appears evidently stable. Micronucleus acquired by the AMi-cell in the process of conjugation cannot be kept up normally in it. In such exconjugants, the new nuclear apparatus arises not from micronucleus derivatives but as a result of the macronuclear regeneration process. They give origin to amiconuclear clones only.

РЕЗЮМЕ

Используя цитокариологические особенности половой реорганизации при скрещивании нормального и амикронуклеарного клонов инфузории *Paramecium caudatum* оказалось возможным анализировать роль ядерно-цитоплазматических взаимоотношений в регулировании морфогенетических процессов у этих одноклеточных. Акт миграции пронуклеуса в амикронуклеарного конъюганта по сути является естественной трансплантацией ядра из одной клетки в цитоплазму другой инфузории. Мигрирующий пронуклеус выделяет в цитоплазму эксконъюганта фактор, проявляющий определенную морфогенетическую активность. Действие этого фактора в цитоплазме эксконъюганта определяет способность старого макронуклеуса к фрагментации и инициирует стоматогенез.

Таким образом, функция генетивного ядра (генетически неактивного при агамном размножении инфузорий) в период полового процесса не ограничивается только тем, что оно дает начало новому ядерному аппарату клетки в результате серии делений. Микронуклеус принимает активное участие также в регулировании морфогенетических процессов половой реорганизации клетки. В отличие от ряда других видов инфузорий, у *P. caudatum* "амикронуклеарное состояние цитоплазмы", по-видимому, является стабильным. Микронуклеус, приобретенный АМИ-клеткой в процессе конъюгации, не может в ней нормально поддерживаться. В таких эксконъюгантах новый ядерный аппарат возникает не из дериватов микронуклеуса, а в результате процесса регенерации макронуклеуса, и они дают начало только амикронуклеарным клонам.

REFERENCES

- Allen S. L. 1967: Cytogenetics of genomic exclusion in *Tetrahymena*. Genetics, Princeton, 55, 797-822.
- Ammermann D. 1971: Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*. Chromosoma, 33, 209-238.
- Beale G. H. 1954: The genetics of *Paramecium aurelia*. Cambridge Univ. Press, London and New York.
- Berech J. and Van Wagendonk W. 1962: An autoradiographic study of the macronuclear changes occurring in *Paramecium aurelia* during autogamy. Expl Cell Res., 26, 360-372.

- Berger J. 1967: Selective autolysis of nuclei as a source of DNA precursors for other nuclei within the same cell. *Science*, 158, 524.
- Borkhsenius O. N. 1971: Polimorfizm mikronukleusov *Paramecium caudatum*. V. Količestvo DNK v makronukleusah četyreh klonov s različnymi morfoložičeskimi tipami mikronukleusov. *Vestn. Leningr. Gos. Univ.* 21, 30-42.
- Chen T. T. 1940: Conjugation in *Paramecium bursaria* between animals with diverse nuclear constitutions. *Heredity*, 31, 185-196.
- Danielli J. F. 1959: The cell-to-cell transfer of nuclei in amoebae and comprehensive cell theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 78, 675-687.
- Diller W. F. 1965: The relation of amiconuclearity to stomatogenous activity during conjugation in several ciliates. *J. Morph.* 116, 51-64.
- Dippell R. V. 1955: A temporary stain for *Paramecium* and other ciliate *Protozoa*. *Stain tech.*, 30, 69-71
- Dogiel V. A., Poljansky G. I. and Cheissin E. M. 1962: Obščaja protozoologija. *Izd. AN SSSR, Moskva-Leningrad*, 591 pp.
- Goldstein L. and Prescott D. M. 1967: Protein interactions between nucleus and cytoplasm. In: *The Control of Nuclear Activity* (ed. L. Goldstein) Englewood Cliffs, New Jersey, 274-298.
- Gorovsky M. A. 1970: Studies on nuclear structure and function in *Tetrahymena pyriformis*. III. Comparison of the histones of macro- and micronuclei by quantitative polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Cell Biol.* 47, 631-636.
- Gorovsky M. A. and Woodard J. 1969: Studies on nuclear structure and function in *Tetrahymena pyriformis*. I. RNA synthesis in macro- and micronuclei. *J. Cell Biol.*, 42, 673-681.
- Haemmerling J. 1963: Nucleo-cytoplasmic interactions in *Acetabularia* and other cells. *A. Rev. Physiol.*, 14, 65-92.
- Hiwatashi K. 1951: Studies on the conjugation of *Paramecium caudatum*. IV. Conjugation behavior of individuals of two mating types marked by a vital staining method. *Sci. Rep. Tōhoku Univ., biol. ser.* 4, 19, 95-99.
- Hiwatashi K. 1959: Induction of conjugation by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) in *Paramecium caudatum*. *Sci. Rep. Tōhoku Univ., biol.*, ser 4, 25, 81-90.
- Hiwatashi K. 1969: *Paramecium*. In: *Fertilization. Comparative Morphology, Biochemistry and Immunology*. (eds. C.B. Metz and A. Monroy) Academic Press INC, New York, 2, 255-294.
- Jankowski A. W. 1966: Processy konjugacii *Paramecium putrinum* Clap. et Lachm. IX. O "nekrochromatine" i funkcionalnom značenii fragmentacii makronukleusa. *Citologija*, 8, 725-736.
- Jeon K. W. and Lorch I. J. 1969: Lethal effect of heterologous nuclei in *Amoeba heterokaryous*. *Expl Cell Res.* 56, 233-238.
- Kalinina L. V. and Yudin A. L. 1964: Genetičeskoe vzaimodejstvie jader v geterokarionah u ameb. *Citologija*, 6, 695-709.
- Kimball R. F. 1941: Double animals and amiconucleate animals in *Euplotes patella* with particular reference to their conjugation. *J. exp. Zool.*, 86, 1-32.
- Kimball R. F. and Gaither N. 1955: Behavior of nuclei at conjugation in *Paramecium aurelia*. I. Effect of incomplete chromosome sets and competition between complete and incomplete nuclei. *Genetics*, 40, 878-889.
- Kimball R. F. and Perdue S. W. 1964: Synthesis of RNA by fragments of the old macronucleus in *Paramecium aurelia* undergoing autogamy. *J. Protozool.*, 11 (Suppl), 33.
- Levine M. 1953: The interaction of nucleus and cytoplasm in the isolation and evolution of species of *Paramecium*. *Evolution*, 7, 366-385.
- Mahlin E. E. 1971: Javlenie nesovmestimosti pri transplantacii jader u ameb. III. Žiznesposobnost' geterokarionov, polučennyh pri transplantacii jader meždu različnymi štamami odnokletočnyh ameb. *Citologija*, 13, 1020-1027.
- Mahlin E. E. and Yudin A. L. 1969: Javlenie nesovmestimosti pri transplantacii jader u ameb. I. Nežiznesposobnost' geterokarionov, polučennyh pri transplantacii jadra *Amoeba proteus* v kletku *Chaos chaos*. *Citologija*, 11, 744-759.
- McDonald B. B. 1959: The fate on DNA in degenerating macronuclei of exconjugants of *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 6 (Suppl.), 17.
- McDonald B. B. 1966: The exchange of RNA and protein during conjugation in *Tetrahymena*. *J. Protozool.*, 13, 277-285.
- Metz C. B. 1954: Mating substances and the physiology of fertilization in ciliates. In: *Sex in Microorganisms*, (ed. D. H. Wenrich) Symp. Am. Assoc. Advan. Sci. Washington, 284-334.
- Miyake A. 1957: Aberrant conjugation induced by chemical agents in amiconucleate *Paramecium caudatum*. *J. Instn. polytech. Osaka City Univ.*, D8, 1-10.

- Murti K. G. and Prescott D. M. 1970: Micronuclear ribonucleic acid in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.*, 47, 460–467.
- Nanney D. L. 1963: Cytoplasmic inheritance in Protozoa. In: *Methodology in Basic Genetics*, (ed. W. J. Burdette) Holden-Day, San Francisco, 355–380.
- Ossipov D. V. 1966: Methody polučeniya gomozigotnyh klonov *Paramecium caudatum*. *Genetika*, 2, 41–48.
- Ossipov D. V. 1971: Osobennosti mežkletočnogo vzaimodejstvija pri konjugacii infuzorij. *Citologija*, 13, 411–424.
- Ossipov D. V. 1972: Mehanizmy regulacii polovogo processa u infuzorij. V sb.: *Mehanizmy reguljatornyh processov*. Leningrad, 158–175.
- Ossipov D. V. and Skoblo I. I. 1968: The autogamy during conjugation in *Paramecium caudatum* Ehrbg. II. The ex-autogamont stages of nuclear reorganization. *Acta Protozool.*, 6, 33–48.
- Ossipov D. V. and Tavrovskaya M. V. 1969: Micronucleus and morphogenesis of the cortex in *Paramecium caudatum*. In: *Progress in Protozoology*, Abstr. Third int. Congr. Protozool. Leningrad 1969. "Nauka", 102–103.
- Preer J. R. 1968: Genetics of Protozoa. In: *Research in Protozoology* (ed. T. T. Chen) Pergamon Press, Oxford-New York, 3, 129–278.
- Prescott D. M., Bostock C. J., Murti K. G., Laght M. R. and Gamow E. 1971: DNA of ciliated *Protozoa*. I. Electron microscopic and sedimentation analyses of macronuclear and micronuclear DNA of *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma*, 34, 355–366.
- Raikov I. B. 1967: Kariologija prostejših. Izd. "Nauka", Leningrad, 260 pp.
- Raikov I. B. 1972: Nuclear phenomena during conjugation and autogamy in ciliates. In: *Research in Protozoology* (ed. T. T. Chen) Pergamon Press, Oxford–New York, 4, 147–289.
- Rao M. V. N. and Prescott D. M. 1967: Micronuclear RNA synthesis in *Paramecium caudatum*. *J. Cell Biol.*, 33, 281–285.
- Schwartz V. 1946: Der Formwechsel des Makronucleus in der konjugation mikronucleusloser Paramecien. *Biol. Zbl.*, 65, 89–94.
- Skoblo I. I. 1968: Ėkskonjugantnye klony *Paramecium caudatum* so mnogimi mikronukleusami. *Citologija*, 10, 218–226.
- Skoblo I. I. 1969: The behaviour of amiconucleate *Paramecium caudatum* in sexual process. In: *Progress in Protozoology*, Abstr. Third int. Congr. Protozool., Leningrad 1969, "Nauka", 39–40.
- Skoblo I. I. and Ossipov D. V. 1968: The autogamy during conjugation in *Paramecium caudatum* Ehrbg. I. Study on the nuclear reorganization up to stage of the third synkaryon division. *Acta Protozool.*, 5, 273–290.
- Sonneborn T. M. 1950: Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. exp. Zool.*, 113, 87–143.
- Sonneborn T. M. 1954: Patterns of nucleocytoplasmic integration in *Paramecium*. *Caryologia*, 6 (Suppl.), 307–325.
- Sonneborn T. M. 1959: Kappa and related particles in *Paramecium*. *Adv. Virus Res.*, 6, 229–356.
- Sonneborn T. M. 1963: Does preformed cell structure play an essential role in cell heredity? In: *The Nature of Biological Diversity* (ed. J. M. Allen), McGraw-Hill Publ., New York, 165–221.
- Sonneborn T. M. 1966: Genetica prostejših i ee otnošenje k obščej genetike. *Genetika*, 11, 31–41.
- Tartar V. 1961: *The Biology of Stentor*. Pergamon Press, New York.
- Wells C. 1961: Evidence for micronuclear function during vegetative growth and reproduction of the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 8, 284–290.
- Wichterman R. 1953: *The Biology of Paramecium*. Blakiston Company, INC. New York-Toronto, 527 pp.
- Woodruff L. L. 1921: Micronucleate and amiconucleate races of *Infusoria*. *J. exp. Zool.*, 34, 329–337.
- Yudin A. L. and Sopina V. A. 1970: On the role of nucleus and cytoplasm in the inheritance of some characters in *Amoebae* (nuclear transfer experiments). *Acta Protozool.*, 8, 1–39.

Janina JANISZEWSKA and Maria KRZTOŃ

Raabeia furciligera sp. n. (*Cnidosporidia*, *Actinomyxidia*)
from the body cavity of

Limnodrilus hoffmeisteri Claparède, 1862

Raabeia furciligera sp. n. (*Cnidosporidia*, *Actinomyxidia*) z jamy ciała *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862

The new species *Raabeia furciligera* was detected on February 1972 in the body cavity of *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862, taken from the bottom slime of the river Odra in Brzeg (Lower Silesia) at the escape of town sewage. The slime was kept in laboratory under dropping water till the end of November 1971. The infected individual was the only one that could be procured.

Pansporocysts of the *Raabeia furciligera* sp. n. were found in some of the terminal segments of the body. The mature spherical pansporocyst has a diameter of 54.5 μm . The whole spore with its processes measures 125 μm . The spore shows 3 fairly long arched up processes of the epispor starting directly from the basis, which have the characteristic form of epispor cells found in the genus *Raabeia* Janiszewska, 1955, and whose length is 125 μm . These processes differ from those in other species of *Raabeia* in being branched at the end. The branches bifurcate right at the main stalk and are joined by some kind of fold resembling very primitive articular connection. These branches are very thin, growing narrow into a fine flagellum at the very tip (Fig. 1 a). Form and number of these ramifications are variable. Each of the three processes of the given spore has another shape. The most frequent ramification is that of 2.3 and 4 branches, less frequent are those of 5 branches. This diversity extends to the shape of spores itself, which may be similar though differently arranged (Fig. 1 b-d). The ramifications increase the surface of the spore, and make easier their floating on the surface of water, especially during summer. Primitive folds may also play some role in the locomotion of the spore. The nuclei of the epispor cells are located rather close to the lower than the upper part of the processes.

The containing sporozoites cavity of the epispor is cylindrical and measures $32.8 \times 10.2 \mu\text{m}$. In the individual under study there were approximately 24 nuclei of sporozoites, a number that corresponds to 5 divisions of mother cells for sporozoites. The fifth division seem to have remained interminated, and did not attain the expected number of 32 in our material. Polar capsules measure 4.4 μm . The length of the polar filament was little more than the half length of epispor cavity.

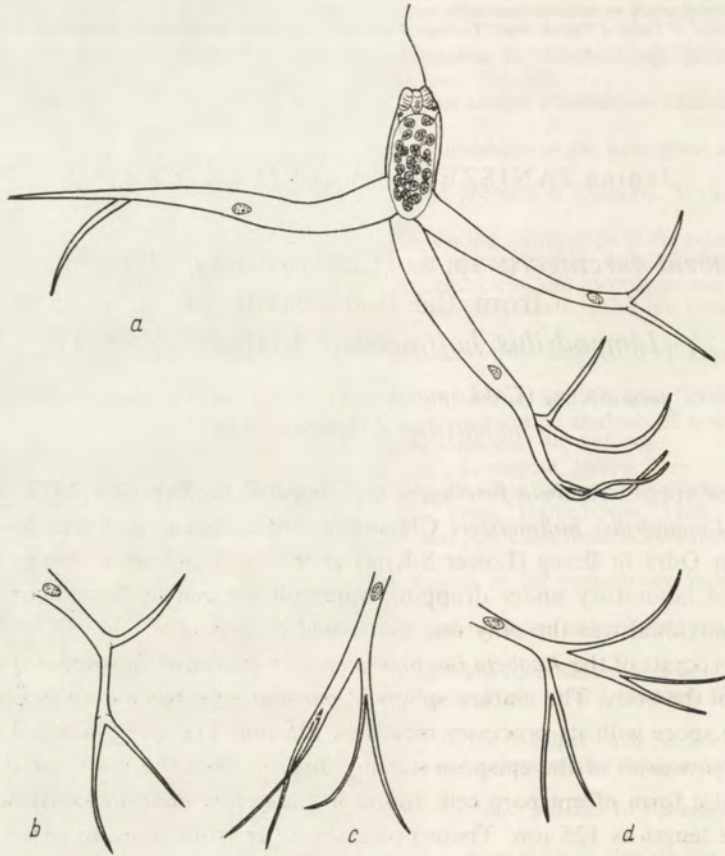


Fig. 1. *Raabeia furciligera* sp. n. a — spore, b-d — ramification of the episporic cell processes

Having at our disposal only one individual we cannot say much about the development of the species. This development presumably is like that of the other species in this genus or approaches that of other actinomyxidian parasites in *Tubificidae*.

By the size of the spore, its shape and the number of sporozoites the new species seems to stand close to *Raabeia gorlicensis* Janiszewska (Janiszewska 1955, 1957) differing principally by the ramifications of episporic cell processes.

Summary

Raabeia furciligera sp. n. was found in the body cavity of *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862 taken from the river Odra in Lower Silesia. The spores measure $32.8 \times 10.2 \mu\text{m}$, the processes of the episporic cell 125 μm . Morphologically the species approaches closely *Raabeia gorlicensis* Janiszewska, 1955 differing from it mainly by the ramifications of the episporic cell processes.

STRESZCZENIE

Raabeia furciligera sp. n. został znaleziony w jamie ciała *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862 w Odrze (Dolny Śląsk). Spory posiadają wymiary $32.8 \times 10.2 \mu\text{m}$, a z wyrostkami episporu $125 \mu\text{m}$. Gatunek pod względem morfologicznym jest najbardziej zbliżony do *Raabeia gorlicensis* Janiszewska, 1955; natomiast różni się od niego zasadniczo rozwidleniami na końcach wyrostków komórek episporu.

REFERENCES

- Janiszewska J. 1955: *Actinomyxidia*. Morphology, ecology, history of investigations, systematics, development. Acta parasit. pol., 11, 405–443.
- Janiszewska J. 1957: *Actinomyxidia* II. New systematics, sexual cycle, description of new genera and species. Zoologica Pol., 8, 3–34.

Stanisław L. KAZUBSKI

**Buccal apparatus of *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861)
Raabe, 1934 (*Thigmotricha*)**Aparat gębowy *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861)
Raabe, 1934 (*Thigmotricha*)

*Dedicated to the memory of
Prof. dr Zdzisław Raabe
the great investigator in Thigmotricha*

The ciliate *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861) Raabe, 1934 is known from more than a hundred of years, but in spite of the good knowledge of the general ciliature (Raabe 1934, 1971) its buccal apparatus has not yet been known. The buccal apparatus of this species is situated in a fairly deep peristomal infundibulum and usually not visible in silver impregnated preparations. Only some elements of this structure were seen in the photograph of dividing specimen of *M. steenstrupi* given by Penn (1958, Fig. 27).

Recently, by happy chance, one specimen of *M. steenstrupi* has revealed its peristome. This specimen was found in *Succinea putris* (L.) (*Gastropoda, Succineidae*) collected on 25th August 1972 at Czajcze Lake in the Wolin National Park (the Isle of Wolin in north-west part of Poland). The preparation was silver impregnated according to the dry method of Klein.

Results

The described specimen of *Myxophyllum steenstrupi* is oval, with broadly rounded anterior margin, 130 μm long and 117.5 μm wide. There are 50 rows of the general ciliature on the apparent right side. The peristome is situated in the posterior part of the ciliate body, in a funnel-shape depression into which enter the first kineties of the right and the last kineties of the left system of the ciliature. The final segments of the rows 2 and n deviate forming an elongated area in which the buccal apparatus is situated. The rows of the ciliary systems from both sides of the body converge behind the peristome forming the posterior suture which begins deeply in the infundibulum.

It is worth to note that the end of the row *n* is opposite to the ends of the rows 5 and 6 of the right side, and that the final parts of the rows of the right system are arranged more densely than those of the left system. Arrangement of the rows permits to set up a supposition that the buccal membranellae are situated at the anterior wall of the peristomal infundibulum.

In the buccal apparatus of *M. steenstrupi* two parts may be distinguished: the undulating membrane (UM), about 12 μm long; corresponding to the kinety 1 according to Chatton et Lwoff, and the adoral zone of membranellae, about 8 μm long, broadening posteriad. The arrangement of the kinetosomes in UM is the most probably the same as in the other *Thigmotricha*, among others in *Conchophthirus* (Antipa and Small 1971), in zig-zag. The arrangement of small kinetosomes in AZM seems to be irregular. In the preparation it was not possible to ascertain whether AZM is a homogenous structure or it is composed of some parts. Details of the buccal apparatus are visible in Fig. 1 and Pl. I.



Fig. 1. Buccal apparatus and environs of buccal area of *Myxophyllum steenstrupi* (Stein) Raabe, CVP — contractile vacuole pore, UM — undulating membrane, AZM — adoral zone of membranellae, PS — posterior suture. Kinetics 2 and *n* are designated

Single large pore of the contractile vacuole is situated in front of the anterior margin of the peristome in the slight dilatation between kineties 2 and 3.

Discussion

The genus *Myxophyllum* Raabe according to Raabe's system (1971) is ranged among the family *Thigmophryidae* in the nominal subfamily *Thigmophryinae* together with the genera *Thigmophrya* Ch. et Lw., 1923, *Conchophyllum* Raabe, 1936, *Cochliophilus* Kozloff, 1945 and *Cochliodomus* Raabe, 1971. Two other subfamilies belonging to *Thigmophryidae* are *Conchophthirinae* Kahl, 1931 and *Peniculistomatinae* Fenchel, 1965.

The buccal apparatus of *M. steenstrupi* is formed virtually according to the same pattern as in other *Thigmophryidae* (Raabe 1967, 1971) but is strongly reduced. It is composed of small undulating membrane (UM) and adoral zone of membranelles (AZM) in which, similarly as in trophic specimens of many other *Thigmatricha*, the components could not be distinguished. The arrangement of the kinetosomes in UM and AZM seems to be also similar to other *Thigmatricha*.

More interesting is the situation of the buccal area in relation to the whole argentophilic system. It lies at the very end of the ciliature and is surrounded with the final segments of the rows 2 and *n*. Just behind the peristome, still in the buccal infundibulum begins the posterior suture, gathering the kineties of the right and left systems. Similar situation occurs probably in the genera *Cochliophilus* (Kozloff 1945) and *Cochliodomus* (Raabe 1971). Unfortunately, the ciliature of the buccal cavity in these ciliates is not yet known in details. In this respect *Myxophyllum* differs from the representatives of the genus *Thigmophrya* in which the row 1 according to Fenchel (row 2 according to Ch. et Lw.) and the row *n* are parallel behind the buccal field and reach the posterior suture behind the infundibulum (Fenchel 1965). In this respect *Thigmophrya* are closer to the ciliates of the subfamily *Conchophthirinae* in which the rows surrounding the buccal field extend far to the back. To some extent similar situation occurs also in *Peniculistomatinae* which have the buccal field surrounded with rows beginning in the anterior part of the body and extending far to the body end.

Summary

The buccal apparatus of the ciliate *Myxophyllum steenstrupi* (Stein) Raabe is strongly reduced. It is composed of short UM and small AZM. Just behind the peristome the rows 2 and *n* join and initiate the posterior suture. Single contractile vacuole pore is situated between the rows 2 and 3 just before the peristome. The differences as well as similarities in structure of the buccal apparatus in *Myxophyllum* and other *Thigmophryidae* are discussed.

STRESZCZENIE

Aparat gębowy orzęska *Myxophyllum steenstrupi* (Stein) Raabe jest silnie zredukowany. Składa się on ze stosunkowo krótkiej UM i niewielkiej AZM. Tuż za gębą rozpoczyna się tylny szew, który rozpoczynają rzędy 2 i *n*. Odnotowano pojedynczą porę wodniczki tętniącej znajdującą się między rzędami 2 i 3, nieco powyżej gęby. Przedyskutowano różnice i podobieństwa w budowie aparatu gębowego u *Myxophyllum* i pozostałych orzęsków z rodziny *Thigmophryidae*.

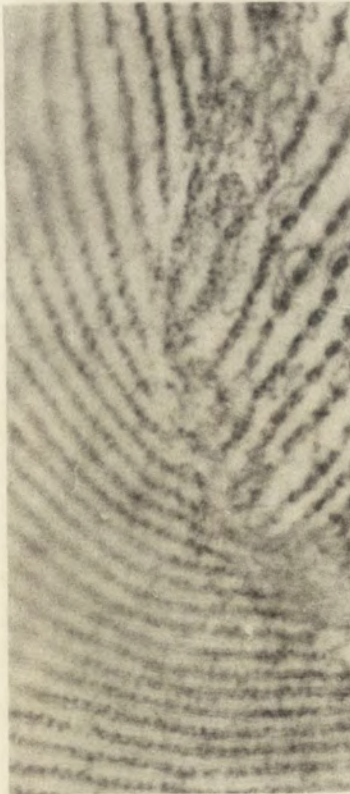
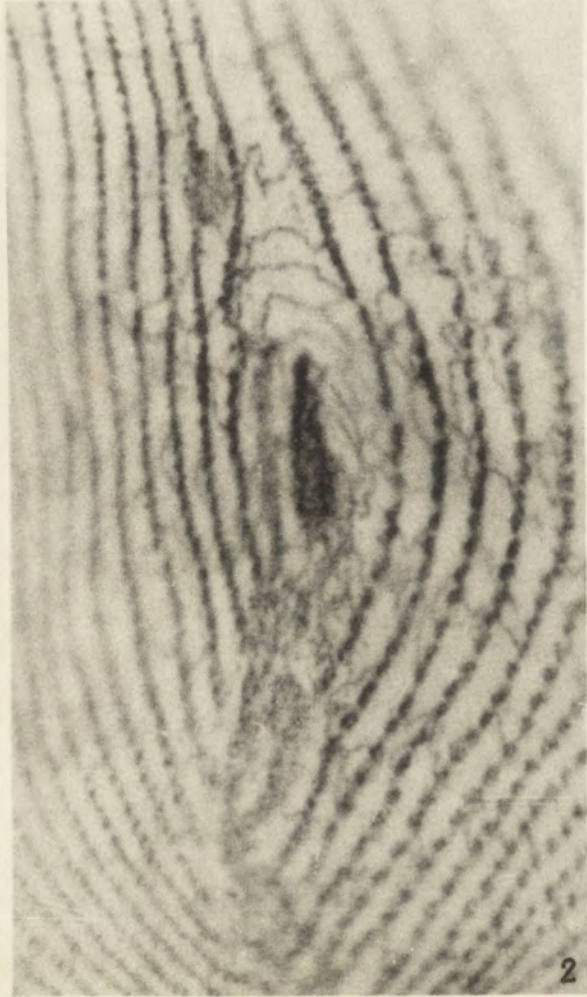
REFERENCES

- Antipa G. A. and Small E. B. 1971: A redescription of *Conchophthirus curtus* Engelmann, 1862, (*Protozoa, Ciliata*). J. Protozool. 18, 491–503.
- Fenchel T. 1964: On the morphology, morphogenesis and systematics of *Thigmophrya* Ch. Lw. (*Ciliata, Thigmotrichida*) with a description of *T. saxicavae* sp. n. Acta Protozool., 2, 113–121.
- Fenchel T. 1965: Ciliates from scandinavian Molluscs. Ophelia, 2, 71–174.
- Kozloff E. N. 1945: *Cochliophilus depressus* gen. nov., sp. nov. and *Cochliophilus minor* sp. nov., holotrichous ciliates from the mantle cavity of *Phytia setifer* (Cooper). Biol. Bull., 89, 95–102.
- Penn J. H. 1958: Studies on ciliates from mollusks of Iowa, Proc. Iowa Acad. Sci., 65, 517–534.
- Raabe Z. 1934: Weitere Untersuchungen an einigen Arten des Genus *Conchophthirus* Stein. Mém. Acad. pol. Sci. Lettr., Sér B. Sci. Nat., 1934, 221–235.
- Raabe Z. 1967: Ordo *Thigmotricha* (*Ciliata — Holotricha*), Acta Protozool., 5, 1–36.
- Raabe Z. 1971: Ordo *Thigmotricha* (*Ciliata — Holotricha*). IV. Familia *Thigmophryidae*. Acta Protozool., 9, 121–170.

EXPLANATION OF PLATE I

Buccal apparatus of *Myxophyllum steenstrupi* (Stein) Raabe

- 1: Buccal area, undulating membrane (UM) and adoral zone of membranelles (AZM), structure of UM is visible
- 2: Environs of buccal area UM, AZM and pore of contractile vacuole are visible, the posterior suture begins behind the buccal area
- 3: Postoral part of posterior suture of *Myxophyllum steenstrupi*



S. L. Kazubski

auctor phot.

Jolanta KINK

The organization of fibrillar structures in the trophic and encysted *Dileptus visscheri* (Ciliata, Rhabdophorina)

Organizacja struktur włóknistych w formach troficznych i incystowanych
Dileptus visscheri (Ciliata, Rhabdophorina)

In some life stages the cellular organization of ciliates undergoes considerable modifications, which cause different arrangement of cellular organelles in comparison to the trophic forms. Such situation occurs during encystment. From the study on the process of encystment and on resting cysts in ciliates it follows, that the formation of the resting stages is accompanied by strong dehydration, considerable diminution of volume and complete change of shape. Then it could be expected that in the encysted specimens deep transformations of cortical structures will occur.

The observations on the structure of resting cysts revealed, that in various ciliates the oral and somatic ciliatures disappear to different extent. The complete resorption of oral ciliature was stated in cysts of *Bursaria* (Lund 1917 and Beers 1948), in *Opisthonecta* (Rosenberg 1938) *Stentor* (Tartar 1961), *Oxytricha* (Hashimoto 1962) and *Blepharisma* (Repak 1968). The partial resorption of the oral ciliature and oral apparatus was described in *Frontonia* (Stout 1956, Roque 1961 and in *Dileptus* (Dragesco 1963). In *Euplotes* and *Nassula* no changes in the oral structures were observed (Faure-Fremiet et al. 1954, Beers 1966).

The total resorption of the somatic ciliature in encysted specimens of *Bursaria* was described by Lund 1917, in *Oxytricha* by Hashimoto 1962 and in *Blepharisma* by Repak 1968, while partial resorption of the somatic ciliature in *Nyctotherus* was described by Villeneuve-Brachon 1940 and in *Dileptus* by Dragesco 1963. However, no changes were stated in *Disematostoma* by Tuffrau and Sivoie 1961, in *Frontonia* by Stout 1956 and in *Nassula* by Beers 1966.

On the basis of mentioned studies, which were performed with the use of the light microscope, it was difficult to state, to what extent the pattern of infraciliature is simplified in the encysted ciliates, what kind of modifications may undergo the fibrillar system and whether kinetosomes are present in the cysts. The study on the ultrastructure of the encysted specimens may answer these questions.

So far, the limited studies with the use of the electron microscope yielded some informations concerning the origin and structure of the cyst walls in *Tetrahymena* (Zebrun et al. 1967) and in *Blepharisma* (Repak and Pfister 1967). There are some data dealing with the ultrastructural modifications of the infraciliature in the resting cysts with comparison to the trophic cells (Dippell and Grimes 1966, Tibbs 1969, Grimes 1972),

The study presented below supply some data concerning the organization of trophic and resting forms of ciliates.

Material and methods

The ciliates *Dileptus visscheri* Dragesco, 1963 were collected in the pond of Sadyba in Warsaw, Poland. They were cultivated in Petri dishes in the Pringsheim fluid. Once a week the cultures were transferred into clean Petri dishes and new Pringsheim solution was added. The food was supplied every day as a filtrated and condensed mass culture of *Colpidium*. The *Colpidium* was cultivated separately in the Pringsheim solution with the addition of egg yolk and oat grains or oat flakes.

The encystment in the culture was induced by supplying a large amount of a food during several days. This caused an increasing of the division rate and the density of the culture. The culture medium was not renewed. On the next day after stopping the extensive feeding — the mass encystment occurred in the cultures. In some encysted populations a spontaneous excystment was observed about 30 days after encystation.

The in vivo observations of the trophonts, encystment and the cysts were carried out under the phase-contrast microscope. The fixed and stained material was prepared using different methods. The silver impregnation with 0.5% protargol after fixation in the saturated mercuric chloride with 5% calcium bichromate was performed. Some ciliates were stained using 5% solution of nigrosine in saturated mercuric chloride, and then cleared in 5% aqueous calcium bichromate. Also the Feulgen reaction, the staining with the iron hematoxylin after Parduż 1952 and with the toluidine blue after Hashimoto 1964 were performed. The trophic cells and the cysts were impregnated with the osmic acid after Grain and Golińska 1969.

For the study with the electron microscope, cells from the standard cultures were collected. There were about several to twenty cells in each fixed sample. The samples of cysts were collected from the cultures at known time after the induction of encystment, so that the age of the cysts was known. Each sample contained about 20 to 50 cysts.

Both the trophic forms and the resting cysts were fixed in 2% OsO₄ in phosphate buffer at pH 7.2 for 30–60 min (the cysts were fixed longer). The material was later rinsed in the phosphate buffer and embedded in agar-agar. After dehydration in alcohols and acetone the material was finally embedded in Epon 812 and sectioned on the Reichert ultramicrotome. The sections were stained in uranyl acetate dissolved in alcohol and photographed under the electron microscope JEM 7A.

Results

Structure of the trophic individuals

Dileptus visscheri Dragesco, 1963 (*Rhabdophorina*, *Trachelidae*) measures from 200 to 350 µm. The animal's body possess an elongated, spindle-like shape. The anterior portion of the cell is extended into narrowing protrusion, called proboscis

(Fig. 1, Pl. I 1–3). The posterior part of the cell is tapered into small tail. The body is covered by cilia of equal length. They are arranged in longitudinally oriented kineties situated in small depressions. Usually there are about 14–16 kineties. The kineties run also on the dorsal side and on the right margin of the proboscis. On the left side of the proboscis, as a prolongation of the body kineties there are so-called “sensory cilia” (Gelei 1934). They are shorter and wider than the body cilia, and are heavier stained with the iron hematoxylin.

The interkinetal spaces are filled up with mucocysts, which were called by Dumont 1961 “ectoplasmic bodies”, and by Dragesco et al. 1965 “protrichocysts”.

On the basis of the proboscis on the ventral side the mouth opening — cytostome — is located. It is surrounded by the cytostomal lip, which form prominent, round protuberance on the surface.

The lip prolongs to the ventral side of the proboscis as a protuberant was, reaching the anterior end. This is called the ventral band (Fig. 1). Around the oral parts

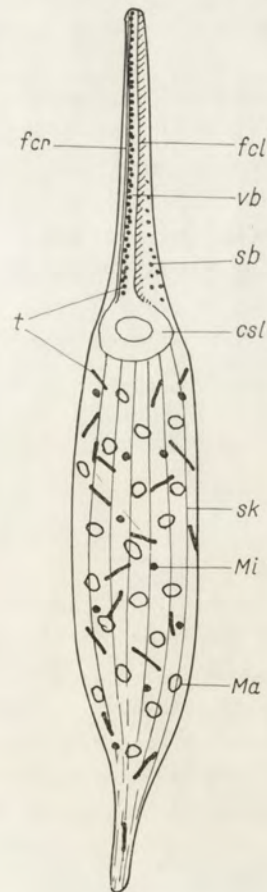


Fig. 1. The schematic representation of the general view of *Dileptus vissscheri*, seen from the ventral side. For the explanations of abbreviation see page 194

there is an oral ciliature which consists of the kinetosomes surrounding the cyto-stomal lip and ciliature on the left and right sides of the ventral band (which are called by many authors "feeding cilia").

The ciliature of the right side of the ventral band contains two meridional and parallel kineties, whereas the ciliature on the left side contains one meridional kinety and many short, diagonally oriented kineties (Fig. 1, Pl. I 2). The kineties which are situated closest to the ventral band in *D. anatinus* Golińska 1972 called subsequently: the paracytostomal kinety of the right side of the ventral band and the paracytostomal kinety of the left side of the ventral band.

Around the cytostome, towards the inside of the cell the oral fibers, so called nemadesmas are situated. They form double conoidal basket (Pl. I 1, 3) which is about 15–18 μm long.

Within the cytoplasm of the cell there are numerous stick-like structures called toxic trichocysts (toxicysts) arranged singularly or in bundles. After protargol staining similar structures can be seen on the right side of the ventral band, where they are very numerous and densely packed. The toxicysts localized on the ventral band can be extruded and serve to immobilize small ciliates which are used as a prey for *Dileptus*.

The nuclear apparatus of *D. visscheri* reveals a dispersed form (Fig. 1, Pl. I 1 and Pl. VII 19). It contains about 60 Ma and from 15 to 20 micronuclei, dispersed uniformly throughout the cell. The Feulgen staining revealed the presence of the nucleoli in the macronuclei. The micronuclei are stained uniformly, intensively red.

On the dorsal side of the ciliate there is the osmoregulatory system localized. It consists of about 8–12 contractile vacuoles.

From the performed observations it follows that the organization of somatic and oral ciliature of *D. visscheri* is very similar to that in *D. anatinus*, *D. cygnus* and *D. anser* described by Golińska 1971. In respect to the structure, arrangement and localization of cellular organelles *D. visscheri* also does not differ significantly from other species of *Dileptus*.

Ultrastructure of trophic cells

Ectoplasm. The cell is covered by continuous cell membrane (Pl. II 4). Under the membrane there is the ectoplasm which differs distinctly from the rest of the cytoplasm (Fig. 2, Pl. II 4, 5, 6). It shows uniform width in the whole cell, and is separated from the endoplasm by the microfibrillar layer. The ectoplasm contains membranous and fibrillar elements. To the membranous elements belong the vesicles with smooth and rough membranes and mucocysts. The fibrillar elements appear as microtubular structures such as kinetosomes and as transverse, postciliary and root fibers plus the microfibrillar structures such as the endo-ectoplasmic layer and the periodically stripped fiber — the kinetodesma.

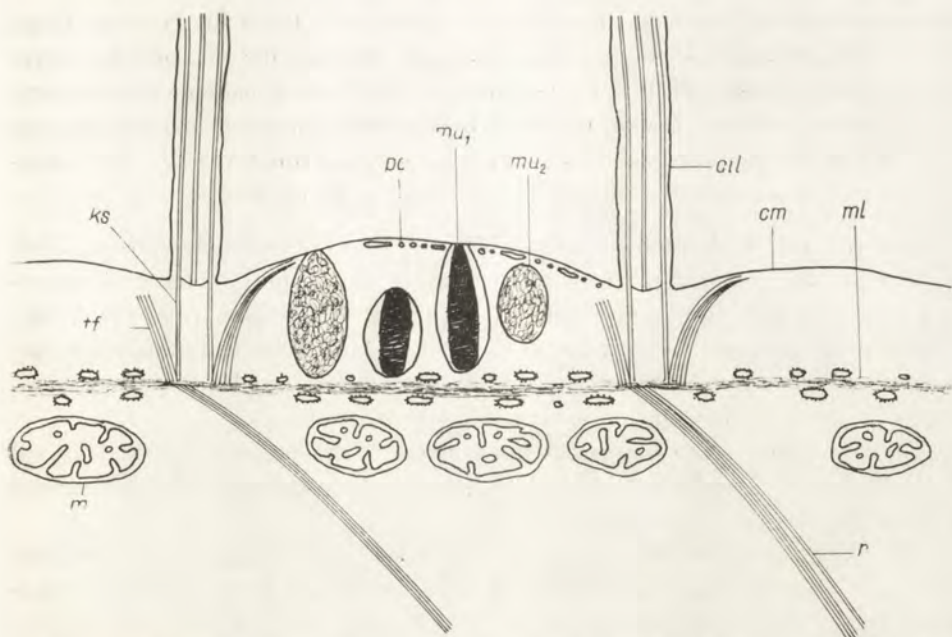


Fig. 2. The scheme of organization of the ectoplasm of *D. vissscheri*. For the explanation of abbreviations see page 194

Organization of membranous structures. Immediately under the cell membrane there is a layer of very small, smooth vesicles (Pl. II 4). The entire ectoplasm is filled with small smooth and rough vesicles, which are particularly numerous in the close vicinity to the microfibrillar layer. The interkinetal spaces are filled up with the mucocysts (Pl. II 4, 5, 6). These are organelles surrounded by a single membrane and are attached to the cell membrane of the ciliate. In the ectoplasm of *D. vissscheri* there are two kinds of mucocysts, the first ones — more elongated — contain the dense material which shows periodic character (Pl. II 4, mu_1), while the second ones — more bulged — contain uniformly dispersed material which shows mean electron density (mu_2). It remains unknown whether those two kinds of mucocysts represent two types of structures or two developmental stages of the same organelle.

As concerns the organization of the fibrillar structures, the following fibers are attached to the proximal end of each kinetosome:

- (1) one strand of microtubules forming the transverse fiber (Pl. II 5, t),
- (2) a strand of microtubules forming the postciliary fiber (Pl. II 5, pc),
- (3) a strand of microtubules forming the root fiber (Pl. II 4, 6, r),
- (4) kinetodesma — a periodic fiber (Pl. II 5, kd).

The number and arrangement of the fibers connected with the somatic kinetosomes of *D. vissscheri* are the same as in other *Gymnostomatida* (Grain 1969). The proximal ends of the kinetosomes are settled down in the microfibrillar layer which

marks the boundary between the ecto- and endoplasm. (Pl. II 4). The root fibers leaving the proximal end of the kinetosome run through the microfibrillar layer toward the endoplasm (Pl. II 4, 6). The microfibrillar layer is made up from densely packed microfibrills (Pl. II 4, 6, Pl. V 13). Both, from ectoplasmic and endoplasmic sides, this layer is accompanied by numerous smooth and rough vesicles. The microfibrillar layer is continuous in the whole cell, except in the proboscis.

Endoplasm. Within the endoplasm there are territories of differentiated cytoplasm which are bound to particular structures. In the vicinity of the cytopharyngeal apparatus the endoplasm is very rich in vesicles and canalicules (Pl. V 14). Individual mitochondria are present in this region. Morphologically this cytoplasm is identical with the phagoplasm described by Fauré-Fremiet 1961 in oral apparatuses of different ciliates (in *Dileptus anser* among many others).

The cytoplasm close to the vesicles and canals of contractile vacuoles (Pl. III 8, sp) is similar to the spongioplasm which accompanies the osmoregulatory apparatuses in other ciliates (Kitching 1967).

The endoplasmic reticulum is made up from vesicles of different sizes with smooth and rough walls. They are arranged in semirandom pattern within the whole endoplasm.

Numerous mitochondria are present in the most peripheric part of the endoplasm (Pl. II 4, 6, m). Such agglomerations of mitochondria close to the surface of the cell is characteristic for many ciliates, independently from the presence of the microfibrillar layer. All mitochondria are ovate and possess numerous, thin and densely packed cristae called "microvilli" (Anderson 1967).

The macronucleus is covered by typical nuclear envelope (Pl. III 7, ne). The macronuclei contain the chromatin material which is uniformly arranged. Within the chromatin there are aggregations of darker material which correspond to the nucleoli containing RNA (after Raikov 1969). The micronuclei are filled with the chromatin only.

The toxicysts present in the cell of *D. visseri* are uniform in structure (Pl. IV 9, to). Each toxicyst possess two capsules: two external and internal ones. Each capsule is filled with structurally different materials.

Oral apparatus. The oral apparatus of *D. visseri* consists of the cytostome, the paracytostomal lip and the protrusion on the proboscis — the ventral band, the oral ciliature and cytopharyngeal apparatus. The last one is made up from two baskets of nemadesmas and filled with phagoplasm (Fig. 3 and 4).

The oral ciliature is composed of kinetosomes situated at the paracytostomal lip, paracytostomal kineties on the right and left sides of ventral band and additional kineties on the proboscis: longitudinal kinety on the right side of the band and short oblique kineties on the left side.

The ciliature of the lip and the paracytostomal kineties are made up from two rows of kinetosomes. The ciliary units in these kineties are formed by a pair of

kinetosomes composed of one ciliated and one non-ciliated kinetosome (Pl. IV 10,11, Pl. V 13). The pairs of kinetosomes are devoid of kinetodesma, and the rest of fibrils form a common set. The ciliated kinetosomes leave the postciliary fiber (pc), the non-ciliated leave the root fiber (r) and transverse fiber (tf) (Pl. IV 10, Pl. V 13) while last one form the skeleton of the cytostomal lip and the ventral band. The transverse fibers from the ventral band run posteriorly toward the cytostome forming a common central fiber (cf) (Pl. IV 12).

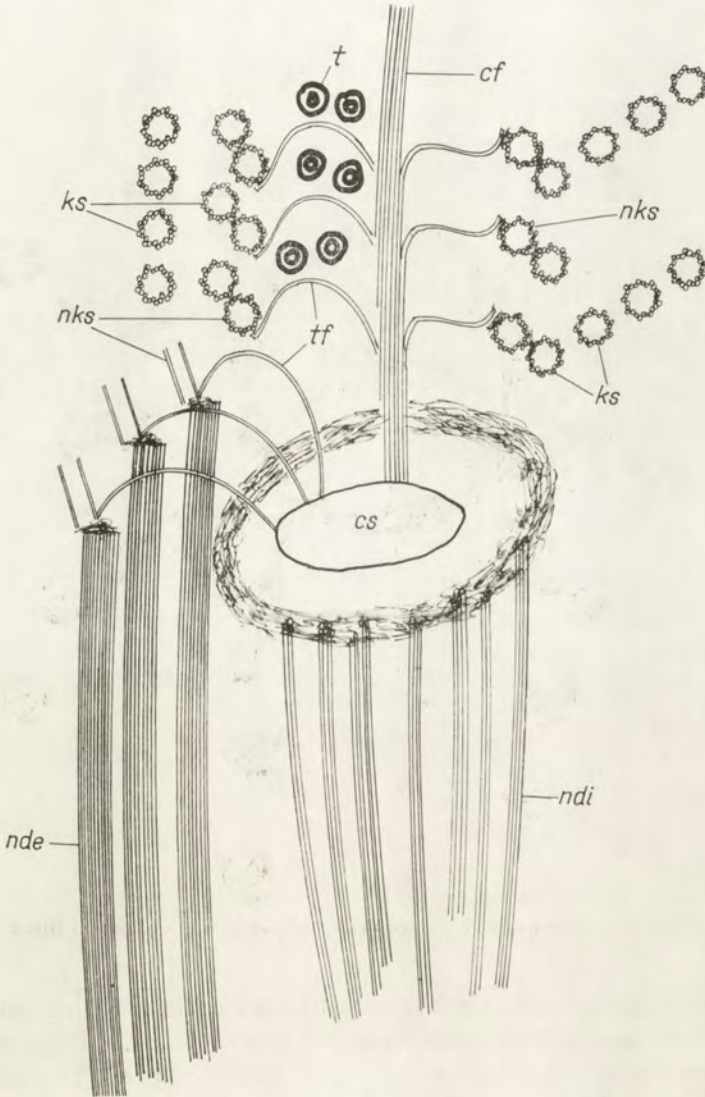


Fig. 3. The scheme of organization of the oral apparatus of *D. vischeri*. The abbreviations are explained on page 194

The additional kineties on the proboscis contain single kinetosomes which are equipped with the kinetodesma, transverse, postciliary and root fibers.

The nemadesmas of the external basket are attached to the non-ciliated kinetosomes localized on the edge of paracystostomal lip (Pl. V 13 nde). This nemadesmas round up the cytostome from the ventral side and both margins, whereas from the dorsal side the basket is uncomplete (Fig. 3 and 4). The number of nemadesmas within the basket is equal to the number of the non-ciliated kinetosomes (25–30). Each nemadesma consists of about 50 to 80 microtubules.

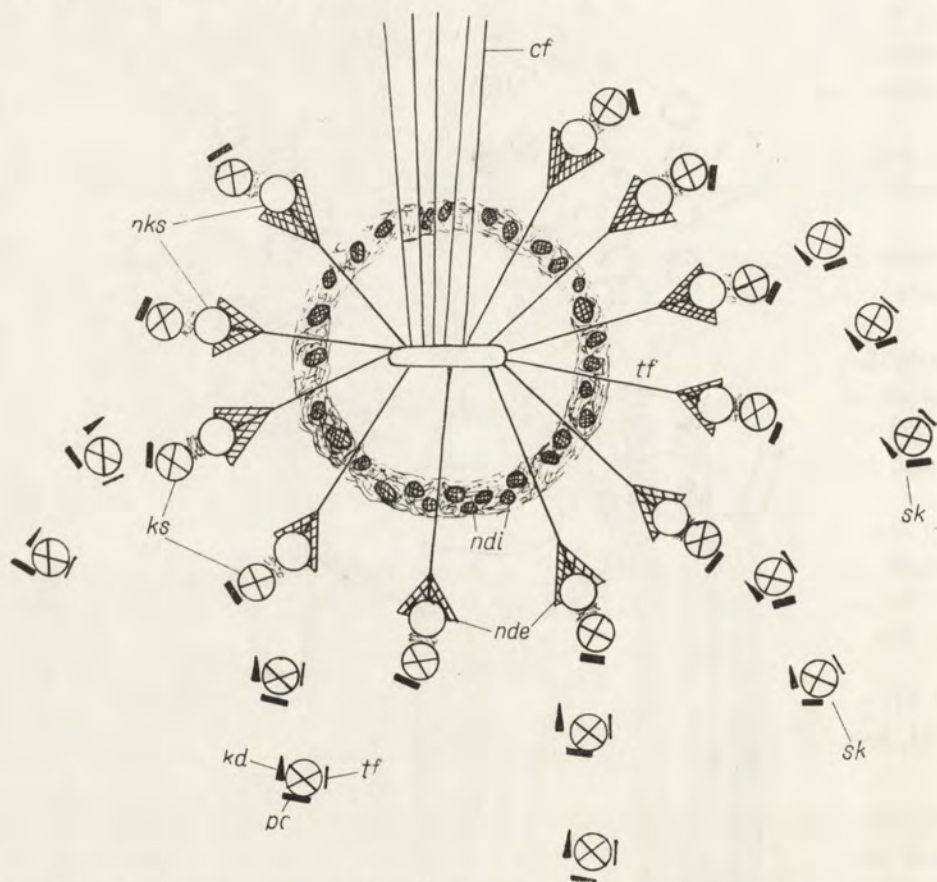


Fig. 4. The scheme of arrangement of the fibrillar structures in the oral region (the cross section)

Inside the external basket, which is made up from single and thick nemadesmas, there is a delicate internal basket built up from thin nemadesmas. A single nemadesma of the internal basket may consist of only 10 to 20 microtubules. The nemadesmas are collected in bundles with about dozen of nemadesmas in each bundle. They are mounted in a microfibrillar ring, which rounds up the cytostome (Pl. V 14). The

microtubules in both external and internal baskets are tightly packed: they are interconnected by transverse linkages (desmas) and possess an apical plate (Pl. V 13).

The oral apparatus of *D. visseri* is equipped with toxicysts (Pl. IV 10). They are situated on the right side of the ventral band. The toxicysts reveal the same structure as those present in the endoplasm.

Encystation of *D. visseri*

In vivo observations. The first sign of the beginning of encystation in the culture is the appearance of agglomerations of individuals in overcrowded culture. The animals entering the encystment show weak motility. There are changes in the shape of the encysting cells. They become more rounded and shortened, the proboscis gradually shortens. The final stages of the shortening of the proboscis gives the impression that its dorsal side heals to the dorsal side of the body. As a result the cell becomes oval and starts the rotary movements, gradually taking the spherical shape. After the external wall of the cyst is formed, the volume of the cytoplasm decreases and the internal cyst's wall begins to appear. The changes of the shape of the encysting cells are accompanied by the condensation of cytoplasm which becomes more opaque and compact.

Observations on stained preparations. During encystment the changes of the locomotory apparatus take place. On the preparations stained with the iron hematoxylin, it was observed that during the shortening of the proboscis the disturbances appear in the arrangement of the short diagonal kineties on the left side of the ventral band. In that time the ciliary arrangement on the right side of the band and of the somatic ciliature remain unchanged.

During subsequent stages of encystment naked, "bald", fields on the surface appear. At first the fields are small, taking place of a fragment of one or several somatic kineties (Pl. VII 18). They appear without any topographical regularity. Later on, the enlargement of the bald fields takes place (Pl. VI 17). On the preparations made in later stages of encystment remnants of the oral ciliature are seen only on the right side of the ventral band, and the remnants of the somatic ciliature appear as single cilia randomly disposed (Pl. VII 18).

On the basis of observations on the changes in the ciliature during encystment it can be thought, that the diminution of the motile activity of encystants is connected with the gradual loss of the ciliature. It remains unresolved, whether the disappearance of the ciliature during encystment is the result of resorption, or the result of detachment of cilia. This question will be discussed later.

The preceding observations concerned the disappearance of the ciliature which takes place before the formation of the external cyst wall. It seems, however, that the final and total loss of the ciliature occur after the external cyst walls have been completed. This stage of encystment was not studied because the opaque cytoplasm and thick walls made the observations very difficult.

During the encystment, changes in the shape of the nemadesmal baskets — the fibers of the oral apparatus — were observed. In trophic individuals of *D. visscheri* the oral basket possess a cone-like shape. In the encysting ciliates the nemadesmas form one “relaxed” bundle, attached to the surface of the cell.

The structure of the resting cysts

The resting cysts of *D. visscheri* are spherical with about 60 μm in diameter. They are gathered in groups of different number and attached to the bottom of the dish. The attachment of cysts to the substrate is probably caused by the viscosity of the cyst's walls.

Each encysted individual is covered by two cyst walls (envelopes) the external and internal ones. The envelopes do not contact each other. The cytoplasm of cysts is compact, nontransparent and reveals a granular structure.

The action of digitonine on cysts evoked an observable action of the contractile vacuoles. There are usually 2–3 vacuoles. The action of the vacuoles stimulated by digitonine in cysts is considerably slower than the action of normal vacuoles in the trophic cells. In encysted cells the discharge of the vacuole lasted of several second, whereas the filling required some minute. The resumption of the action of the contractile vacuoles under the influence of digitonine speaks in favour of the possibility that the detergent may penetrate inside the cysts walls, and that some of the contractile vacuoles remain in cysts. They also may perform their osmoregulatory functions.

The nuclear apparatus is dispersed, similarly as in trophonts, but the nuclei are tightly packed (Pl. VII 20). In the macronuclei of the cysts Feulgen-negative spaces were observed, however, it is not certain if they correspond to the nucleoli of the trophic form.

In the cysts of *D. visscheri* bundles of fibrous material loosely disposed in the cytoplasm were found (Pl. VIII 21, 22, 23). These bundles are of different width and about 10–20 micrometers long. In some cysts a single wide bundle was observed, whereas in others two or three thinner patches were seen. It is reasonably to presume that this fibrillar material represents a remnant of the fibers of the cytopharyngeal basket.

On the basis of protargol and osmic acid impregnated specimens it is difficult to state whether any kinetosomes are present in the resting cysts of *D. visscheri*. Both methods revealed on the surface and inside of the cytoplasm numerous small grains, which are very difficult to identify. Similar results were reported by Repak 1968 who studied the cysts of the ciliate *Blepharisma*.

Ultrastructure of the resting cysts of *D. visscheri*

The resting cysts of *D. visscheri* possess two envelopes: the external one (ectocyst), which originate earlier during the encystment, and an internal one (endocyst) which is formed later between the cell membrane and the external cyst wall.

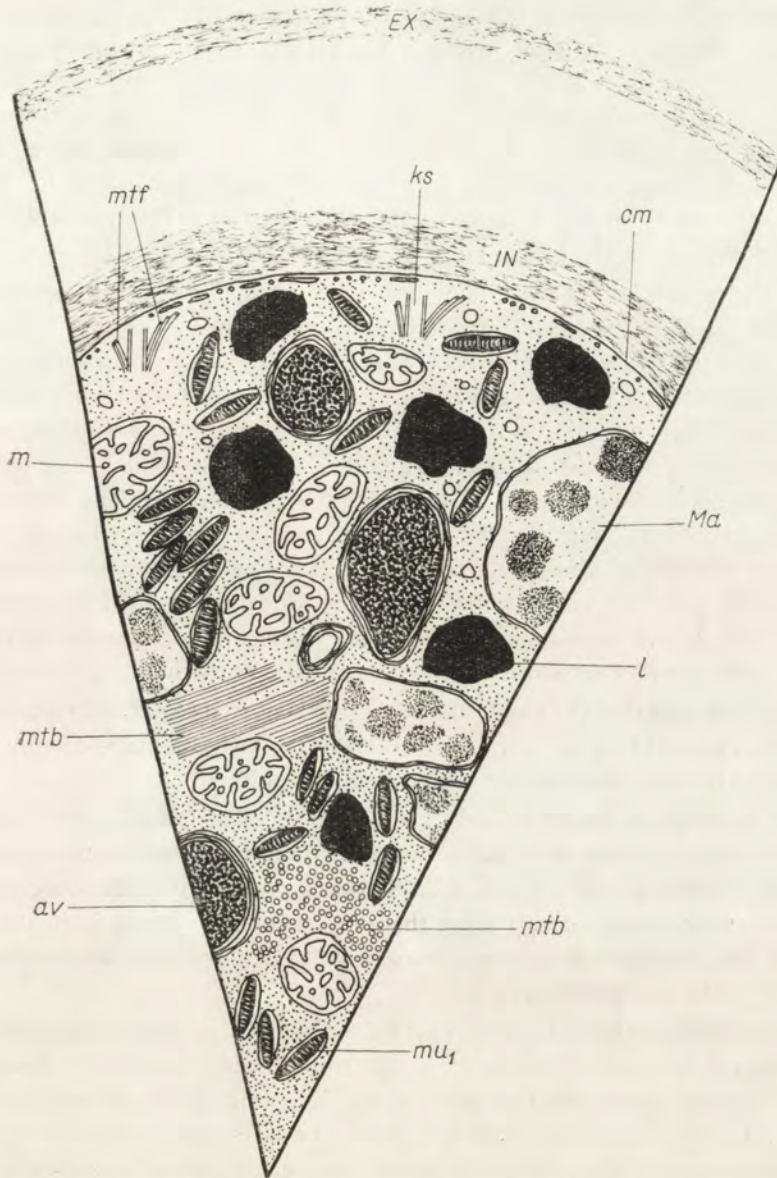


Fig. 5. The reconstruction of the structural organization of the cytoplasm in the resting cysts of *Dileptus*

The external cyst wall (Ex) of *D. visscheri* is built up from a fibrous material (Pl. IX 25), loosely packed in concentric strands. The inner cyst wall is also made from concentrically arranged fibrillar strands, but they are tightly packed (Pl. IX 24, 25). The width of the wall is unequal on the circumference of the same cyst.

During the aging of the cyst the cytoplasm of the encysted ciliates gradually condense and move out from the inner envelope (Pl. XII 33). Within the space an amorphous material appears (Pl. X 30).

The cytoplasm of encysted individuals of *D. vissscheri* is covered by cell membrane, which is regularly folded (cm. Pl. IX 24, 26, 27). Immediately under the cell membrane similarly as in trophonts there is a layer of very small vesicles (Pl. IX 24, arrow). Below, there are microtubular fibrils (Pl. IX 26, arrow). This probably represents the prolongation of the kinetosomal postciliary fibers.

In the superficial zone of the cytoplasm occasionally some kinetosomes can be observed (Pl. X 28, 29, 30, ks). They are rarely and irregularly arranged, what is in the striking contrast to the trophic cells where they are precisely arranged in kineties. The kinetosomes in the cysts are localized in different distances from the cell membrane, and they probably do not contact the membrane. The kinetosomes are accompanied by microtubular fibers (Pl. X 28, 29, 30, arrow) which leave the proximal ends of the kinetosomes and run toward the cell membrane. The direction of the course of the fibrils indicates that they correspond to the transverse and postciliary fibers in trophonts. On the obtained microphotographs the third microtubular fiber — the root fiber was not observed. Most probably this fiber disappears during encystment. It was impossible to resolve if the kinetodesma persists in the cyst or not. No fibrils with characteristic periodic structure were found.

From the fact that the kinetosomes in cysts bear transverse and postciliary fibers it can be deduced that they represent the remnants of the somatic ciliature or of the additional feeding cilia from the proboscis of trophic animal.

All kinetosomes found in cysts are devoid of cilia. On the cross sections no images of cilia were observed neither in the cytoplasm nor within the space between the cell membrane and the cyst wall. This may suggest that the disappearance of ciliature, which takes place during the encystment may result from the breaking off the cilia. Another possibility exists namely, that the cilia are resorbed before the cyst walls are produced.

In the resting cysts of *D. vissscheri* the microfibrillar layer, which form the boundary between the endo- and ectoplasm in the trophic cells, completely disappears. In young cysts strands of a fibrillar material of different size can occasionally be observed (Pl. XI 31, arrows). The character of these fibrillar strands suggests that these are the remnants of the microfibrillar layer. They are arranged in different distances from the membrane. In the old cysts no fibrillar strands were found.

The disappearance of the microfibrillar layer is accompanied by structural mixing up of the ecto- and endoplasmic components. The mucocysts, which represent the typical ectoplasmic organellae in trophonts, in the encysted individuals are found in whole cytoplasm. They can be observed under the cyst surface, where they are frequent in young cysts (Pl. X 28, 30), as well as inside the cytoplasm, which in turn is typical for older cysts (Pl. XI 32). Only one kind of mucocysts were found

in the encysted ciliates. All mucocysts were filled with electron-dense material. Occasionally a stripping of the inside of mucocysts was seen (Pl. XIV 37, mu₁)

The arrangement of mitochondria in the cytoplasm of the cysts also evidences the mixing up of ecto- and endoplasmic components. These organelles are characteristic for the endoplasm of trophic *Dileptus*. The mitochondria in cysts were found close to the cell membrane as well (Pl. XIII 35, Pl. IX 24, 27, Pl. X 28) as inside the cytoplasm (Pl. XIII 35). On the basis of obtained images it is difficult to state, if there are structural changes in the mitochondria of the encysted individuals.

In young and old cysts there are bundles of microtubular fibers arranged randomly in the cytoplasm (Pl. XII 33, mt.b, 34 arrows). These bundles occurred in the periphery of the cysts or deeply inside. They probably correspond to the fibrillar bundles observed under the light microscope (see previous section). The bundles seen in EM are of different diameter and contain about 2000 microtubules in each bundle. The obtained pictures suggested the possibility of splitting off one large bundle into thinner branches. The microtubules in each bundle show similar, parallel arrangement. The packets of microtubular material are situated directly in the cytoplasm, and no autophagic vacuoles were observed around them. Any interconnection between microtubules were not stated, also no contact between the patches and the kinetosomes in cysts were observed.

The length of the bundles, the number of microtubules and their arrangement suggest that they probably represent the remnants of the cytopharyngeal basket of the oral apparatus of trophic cells. If so, then this fact additionally supports the conclusion that the kinetosomes of the oral ciliature are completely resorbed. This question will be discussed later.

The material filling the macro- and micronuclei in encysted forms of *D. visseri* is morphologically different from the contents of the trophic nuclei. In the macro-nuclei of the cysts large agglomeration of a granular material (Pl. XIV 36) of different osmophilicity was found. The chromatin material of micronuclei is more condensed in comparison with the trophic form. The nuclei in the cysts are covered by double membrane.

In the young cysts of *D. visseri* very often vesicles filled with electron-dense material are seen (Pl. IX 26, av). These vesicles represent the autophagic vacuoles. They contain the mucocysts, toxicysts and other membranous structures. The vacuoles are dispersed randomly through the cytoplasm of the encysted specimen. In the older cysts the autophagic vacuoles contain material of low density (Pl. XIV 37, av).

In the resting cysts of *D. visseri* — in the light microscopic study, the presence of contractile vacuoles was stated. In the ultrastructural studies of young cysts a picture of vesicles were found. They show some resemblance to the contractile vacuoles of the trophic cells (Pl. XI 32). The vacuole in the cyst is rounded by single membrane, the cytoplasm surrounding the vacuole is rich in flattened vesicles — which would correspond to the spongoplasm accompanying the contractile vacuo-

les in trophonts. The site of the contact between the vacuole and the cell membrane (porus) was not found.

The cytoplasm of the encysted animals shows a considerable condensing of the cellular structures. The density of the cytoplasm is greater in older cysts than in the younger ones (Pl. XII 33, 34). It contains numerous, membrane-free ribosomes. In the cytoplasm of cysts irregular agglomerations of electron-dense material exist. They probably represent the lipids (Pl. X 30, Pl. XII 33, 1). In old cysts there are more such agglomerations than in young cysts and they are situated closer to the surface. The cytoplasm of the cysts does not contain toxicysts, which are so characteristic for the endoplasm and oral regions of trophonts. On the sections through the young cysts, the toxicyst are present, but only in the autophagic vacuoles. That indicates, that these organelles are completely digested and disappear in the resting forms of the ciliate *Dileptus visscheri*.

Discussion

The changes of the cell shape in the encysted individuals and the transformations in structure and ultrastructure

During a process of encystment the shape of a ciliate changes completely, also the volume of the cell decreases. The formation of rounded and diminished resting form of *D. visscheri* reflects some transformations in the structure.

The microfibrillar layer, which in the trophic cells of the studied species separates the ecto- and endoplasm, and which disappears completely in encysted cells, probably plays some role in the maintenance of the shape of the cell. The ultrastructural organization of *D. visscheri* — the mounting of the kinetosomes in this layer — already suggests the participation of the microfibrillar layer in maintaining the shape. From the study of Golińska and Grain 1969 and Golińska 1972, it follows, that the microfibrillar layer is engaged in the process of modeling of a primordium of the new mouth and tail parts during regeneration, and also that it participates in the formation of the division furrow in *Dileptus*. Golińska studied the action of puromycine on the development of the oral apparatus during regeneration in *D. cygnus*. She stated, that this agent caused blockage of proboscis and tail formation, the deformation of the microfibrillar layer, disappearance of the toxicysts and the failure of development of the new ones. It is well known, that puromycine blocks the protein synthesis and decreases the metabolic activity of the cell. The appearance of the deformations in the ultrastructure of the microfibrillar layer and the resorption of toxicysts suggest, that this are the very labile structures and that they can exist only in cells with optimal metabolic activity. Since in the cysts of *D. visscheri* the lack of the microfibrillar layer was stated, it suggests that this may be correlated to the change in the metabolic activity of the cysts. Pięgoń and Edstrom 1959 stated that in starved and encysted ciliates *Urostyla*, the amount of DNA

maintains on the same level, whereas the amount of the RNA decreases, which means that protein synthesis decreases respectively.

The disappearance of the microfibrillar layer is accompanied by the mixing up of the components of cytoplasm in *Dileptus visscheri* and *Pseudoprorodon niveus* (Kink, unpubl). The displacement of the cellular organelles proceeds together with the condensation of cytoplasm and the increasing mechanical mixing up of the cellular structures.

Since the achieved data indicate some role played by the microfibrillar layer in the morphogenetic processes, it will be interesting to study the reconstitution of the layer during the excystment and its role in reformation of the cellular shape.

The microtubular elements are also involved in the maintenance of the shape. Besides such functions as the transmission of stimuli, intercellular transport of coordination of movement, the supporting function is recently ascribed to the microtubular fibers of the ciliates (Allen 1967, Pitelka 1969, Grain 1969, Kennedy and Zimmerman 1970). The microtubules present in other protozoa, as for instance in *Actinosphaerium*, perform some supporting role (Tilney, et al. 1966). A similar role is ascribed also to the microtubular fibers which exists permanently in some tissue cells, as well as in cells in which they appear during differentiation in embryogenesis (Kennedy 1969).

The study on resting cysts of *Oxytricha fallax* (Grimes 1972 in press) suggest also some supporting role of the microtubules. The author observed the complete resorption of the microtubular elements, such as the cilia and kinetosomes with all accompanying microtubules. In the cysts of other ciliates it was observed, that some microtubular structures may persist in the encysted forms, like for instance the kinetosomes in *Didinium* (Dippell and Grimes 1966) and *Pseudoprorodon* (Kink, unpubl.), the whole kineties in *Colpoda* (Tibbs 1969) and cilia and the cytopharyngeal apparatus in *Dileptus anser* (Dragesco 1963).

Although in the resting cysts of *D. visscheri* the complete resorption of the microtubular elements does not occur, yet the considerable simplifications within the system of microtubules may be connected with the change of shape of the encysted cells. In the cysts only single kinetosomes, devoid of cilia, bearing the uncomplete set of microtubules remain. The remnants of the microtubular basket of nemadesmas persist in the form of bundles of tightly packed microtubules. The supposition that the bundles correspond to the cytopharyngeal basket of trophic cell is supported by such data as the length of the bundles, the number of microtubules, the arrangement of fibers and the fact that they are situated straight in the cytoplasm and are not surrounded by any vacuolar membranes. In the trophic form of *D. visscheri* the internal basket is mounted into the microfibrillar ring, which is built up from similar material as the microfibrillar layer separating the ecto- and endoplasm. Probably, the desintegration of the basket proceeds simultaneously with the resorption of the microfibrillar layer. The nemadesmas released from the ring may form one or several bundles, which stay in the cytoplasm. The dedifferentiation of the inner basket in the

encysted individuals of *Dileptus* seems to be analogical to the process of the exchange of the cytopharyngeal apparatus occurring in division of such *Gymnostomata* as *Chilodonella*, *Brooklynella* or *Nassula*.

Tucker 1970 studied the process of exchange of the cytopharyngeal apparatus in the proter of *Nassula*. He observed, that during division the oral basket for the proter is pulled down inside the cytoplasm to the region of the future fission line, where it stays for some time. Subsequently, its nontubular elements are digested in the vacuoles, whereas the microtubules are gradually resorbed straight in the cytoplasm. It can be expected that the external basket on the resting cysts of *Dileptus* may undergo similar desintegration where the dedifferentiation of the "trophic" form proceeds together with the resorption of the kinetosomes surrounding the mouth. This supposition is supported by the observation that in resting cysts of *D. visscheri* no traces of the non-ciliated oral kinetosomes were found. It is not known, whether the nemadesmas of both baskets form a common or separate bundles and whether any microtubules are resorbed before encystation.

In the resting cysts of *D. visscheri* the existence of single kinetosomes and the lack of the microfibrillar layer separating ecto- and endoplasm were stated. The kinetosomes in cysts were found also in *Didinium* (Dippell and Grimes 1966) and *Pseudoprorodon* (Kink, unpubl.), in the last species the disappearance of the microfibrillar layer was also stated. It can be concluded then, that the simplification of the structure of the encysted ciliates does not depend on the level of diversification in trophic forms, but rather reflects the different sensitivity of a particular structure to the changed conditions of the internal environment.

The type of structure which represents the resting cysts of *Dileptus* could be characteristic for the resting forms of *Gymnostomata*.

The reduction of the locomotory apparatus

From the study on the encystation in different ciliates it is known, that together with the change of the cell shape there are changes in the locomotory apparatus. The ciliature may disappear completely, as it is in *Blepharisma*, *Oxytricha* or *Bursaria*, partially as in *Dileptus* and *Nyctotherus* or it may persist unchanged in *Nassula* or *Frontonia*. The authors describing the disappearance of the ciliature use such terms as: reduction, dedifferentiation or resorption.

During encystment of *Dileptus visscheri*, the enlargement of "bald" spots occurred. It is not known whether the loss of ciliature is caused by detachment of cilia, or by their resorption. Kennedy and Brittingham 1968 studied the action of chloral hydrate on the *Paramecium* cells. This agent has the highly dehydrating properties and causes an reversible desintegration of the microtubular structures. These authors have found in the EM study that the chloral hydrate evoked the detachment of cilia in their proximal ends and their subsequent falling away. It is well known, that the formation of a cyst is connected with a strong dehydration of a cell and that this

process has some influence on the membraneous and tubular structures. It is probable then, that the desintegration of the ciliature during encystment is caused by detachment of cilia. Also the fact that in the cytoplasm of cyst no resorbed cilia were found supports this conclusion. Resorbed cilia with the arrangement of tubules 9+2 without the cell membrane were seen in the cytoplasm of regenerating cells of *Dileptus cygnus* (Golińska and Grain 1969) and of *Lacrymaria* (Kink 1972): similar pictures were reported by Roth and Shigenaka 1964 in *Diplodinium*. However, still, it is difficult to exclude the possibility, that the cilia in *D. visscheri* can be resorbed in the earlier stages of encystment.

To what extent is the infraciliature simplified? In the trophic cells the infraciliature is made up from numerous kinetosomes arranged in kineties, from each kinetosome run some fibers (transverse, postciliary and root fibers plus kinetodesma). In the encysted forms only single, cilia-less kinetosomes occur, which are accompanied by the transverse and postciliary fibers. The kinetodesma and root fibers are lacking.

From up to date studies on the developmental processes in ciliates it is known, that the reconstruction of the cortical pattern is connected with the proliferation of new kinetosomes, differentiation of these kinetosomes into oral and somatic ciliatures, equipped with cilia and fibrils.

From the performed studies it follows that the kinetosomes present in the resting cysts of *D. visscheri* are maintained till the beginning of excystment. They could probably play some role as organization centres for developing new kinetosomes. From the study of Dippell 1968 on proliferation of kinetosomes in *Paramecium* it follows that the kinetodesma orients the position of the kinetosome. From the newest study of Grimes 1972 ab on the origin and development of basal bodies in *Oxytricha* it follows, that new kinetosomes may originate outside the region of action of the old kinetosome, and if arising close to the old one, the new basal body may form at any orientation with respect to the old one. In the resting cysts of *Oxytricha* no kinetosomes were observed (Grimes 1972 a). That indicates that for the initiation of the differentiation during excystment in this ciliate, the preexisting kinetosomes are not necessary. From the study on flagellates (Outka and Kluss 1967, Schuster 1963) it is known that new kinetosomes may arise "de novo". Therefore the kinetosomes in the resting cysts of *Dileptus* may, but do not have to, be actively engaged in the formation of new structures during excystment.

The cortical development in ciliates is connected with the determination of polarity and with the establishment of the anterior-posterior axis in the new arising unit. In the trophic individuals of *D. visscheri*, such organelles as the oral apparatus, locomotory apparatus or the osmoregulatory apparatus, take the precise position with respect to the anterior-posterior axis of a ciliate. And so the mouth is located in the anterior part of the body, the ciliature is arranged in meridional kineties joining anterior and posterior ends of the body, whereas the contractile vacuoles are localized on the dorsal side.

From the study on development of the primordia of a new mouth during division and regeneration in different ciliates *Rhabdophorina* it is known that the organization of the new mouth for the opisthe takes place in the equatorial region of the cell, in the plane perpendicular or slightly oblique with respect to the anterior-posterior axis of the cell. It is also known for regeneration and division that in the process of differentiation of the new mouth the fragments of several or all somatic kineties participate (Golińska 1972). In the resting cysts of the studied species the oral apparatus undergoes a considerable desintegration, and the remnants, in form of microtubular bundles, do not contact the surface of the cyst. This means that the element connected with the anterior pole of the cell desintegrates.

Also the kinetal system arranged accordingly to the anterior-posterior axis in trophonts, in the encysted specimens may undergo considerable changes. From this system only single kinetosomes remain, which can keep their "previous" position. However, it is not ruled out that these uncomplete ciliary units may change their primary position, under the influence of the transpositions and condensation of the surrounding cytoplasmic structures.

It has been stated, that in the resting cyst of *D. visseri* some, not numerous (in comparison to the trophonts) contractile vacuoles remain. In the trophic cells the contractile vacuoles are structurally bound to the cell surface by the porus. It has not been resolved if in the cysts the poruses remain. If they could, then they would constitute the only one organelle connected with the "preexisting" polarity of the ciliate. Many workers believe that the appearing in early excystation stages of the acting contractile vacuole, can be considered as a sign of determination of the polarity of the excysting ciliate (Beers 1945, Jeffries 1956, Stout 1956, Repak and Pfister 1967). Hashimoto 1964 studying in the light microscope the resting cysts of *Oxytricha fallax* stated bundles of fibrillar material situated at two opposite poles of the cyst. He observed that close to this bundles a primordium of new mouth appeared. Grimes 1972 a, however, failed to confirm the presence of such bundles in the EM studies. It is possible then, that the determination of polarity is connected with the organization of the cytoplasm itself with the non-random disposition of organelles in a particular part of the cyst. However, no such non-random arrangement of organelles was observed in the resting cysts of *D. visseri*. Only kinetosomes are situated close to the surface. The remaining cellular organelles such as microtubular bundles, autophagic vacuoles, mucocysts, mitochondria, nuclei and the endoplasmic reticulum are disposed randomly all over the cytoplasm. The autophagic vacuoles are characteristic for many resting forms of ciliates (Bowers and Korn 1969, McArdle et al. 1972, Grimes 1972 ab). The most characteristic for ectoplasm — mucocysts, and for endoplasm — mitochondria, are dispersed all over the cyst. It does not seem probable, that the polarity of the excysted individual could be determined by the position of cysts — similarly as in some egg's cell (Child

1941). The determination of the polarity of eggs is acquired by their position in the ovariole and the different rate of respiration of both poles: the attached and free — one. The encysted ciliate is isolated from the environment by the cyst walls and only during the early excystment together with the loosening of the envelopes the environment begins to influence the cytoplasm.

When is the polarity of the excysted cell determined and what are the structural markers of the polarity — these are the question which can be answered only after the reconstitution study of the trophic cell.

Acknowledgements

I wish to express my grateful thanks to dr. K. Golińska and to dr M. Jerka-Dziadosz for helpful criticism and advice during this work and for critical reading of the manuscript.

Summary

During encystment of a ciliate *Dileptus visscheri* the change of shape of the vegetative cell and considerable reduction of structures occur. The cilia of oral and somatic region disappear completely. In the resting cysts of *Dileptus* a small number of kinetosomes, equipped with microtubular fibers, can be found. These kinetosomes represent probably the remnants of the somatic infraciliature. The cytopharyngeal fibers (nemadesmas) in cysts are present as a bundles of microtubular fibers. The microfibrillar material disappear completely in resting cysts. The disappearance of microfibrillar layer between ecto- and endoplasm, was studied in detail. As a result of the absence of microfibrillar layer the mixing of ecto- and endoplasmic organelles takes place. Toxic trichocysts are digested in autophagic vacuoles during encystment. In the resting cysts of *Dileptus* a small number (2–3) of contractile vacuoles was stated.

STRESZCZENIE

W trakcie encystacji orzęska *Dileptus visscheri* następuje całkowita zmiana kształtu komórki vegetatywnej i znaczne uproszczenie jej budowy. Orzęski zanikają kompletnie zarówno w somatycznych jak i gębowych częściach komórki. W cystach spoczynkowych *Dileptus* można znaleźć nieliczne kinetosomy wyposażone we włókna mikrotubularne. Przypuszcza się, że te kinetosomy stanowią pozostałość orzęsienia somatycznego. Włókna cytopharyngealne (nemadesmy) są w cystach obecne w postaci pęków włókien mikrotubularnych. Materiał mikrofibryllarny zanika całkowicie w cystach spoczynkowych. Badano szczegółowo zanikanie warstwy mikrofibryllarnej rozdzielającej ekto- i endoplazmę. W wyniku zanikania tej warstwy obserwowano wymieszanie organelli ekto- i endoplazmatycznych z endoplazmatycznymi. Trichocysty toksyczne ulegają strawieniu w wakuolach autofagicznych. Stwierdzono obecność nielicznych (2–3) wodniczek tętniących w cystach spoczynkowych *Dileptus*.

REFERENCES

- Allen R. D. 1967: Fine structure, reconstruction and possible function of the cortex *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 14, 553-565.
- Anderson E. 1967: Cytoplasmic organelles and inclusions of *Protozoa*. In: Research in Protozoology. (ed. T. T. Chen), Pergamon Press, Oxford-New York, 1, 1-41.
- Beers C. D. 1945: The encystment process in the ciliate *Didinium nasutum*. J. Elisha Mitchell Scient. Soc., 61, 264-275.
- Beers C. D. 1948: Encystment in the ciliate *Bursaria truncatella*. Biol. Bull., 94, 86-98.
- Beers C. D. 1966: The excystment process in the ciliate *Nassula ornata* Ehrbg. J. Protozool., 13, 73-83.
- Bowers B. and Korn E. D. 1969: The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neffstrain). 2. Encystment. J. Cell Biol., 41, 786-806.
- Dipell R. V. 1968: The development of basal bodies in *Paramecium*. Proc. natr. Acad. Sci. USA. 61, 461-468.
- Dippell R. V. and Grimes G. W. 1966: The occurrence of basal bodies in the cortex of active and encysted *Didinium nasutum*. J. Protozool., 13, (Suppl.) 9.
- Child C. M. 1941: Patterns and problems of development. University of Chicago Press.
- Dragesco J. 1963: Revision du genre *Dileptus*, Dujardin, 1871 (*Ciliata*, *Holotricha*). Bull. biol. Fr. Belg., 97, 103-148.
- Dragesco J., Auderset G. et Baumann H. 1965: Observations sur la structure et la genes des trichocystes toxiques et des protrichocystes de *Dileptus* (cilies Holotriches). Protistologica, 1, 81-90.
- Dumont J. N. 1961: Observations on the fine structure of the Ciliate *Dileptus anser*. J. Protozool., 8, 392-402.
- Faure-Fremiet E. 1961: Le cytoplasme stomopharyngien des Cilies Cyrtophores. C. R. Acad. Sci., 255, 357-362.
- Faure-Fremiet E., Gauchery M. et Tuffrau M. 1954: Les processeus de le enkystement chez *Euplotes muscicola* Kahl. Bull. biol. Fr. Belg., 88, 154-167.
- Gelei J. 1934: Die sensorischen organellen der Ciliaten. Allatt. Kozl., 31, 115-138.
- Golińska K. 1971: Comparative studies on the morphology of *Dileptus anatinus* sp. n. (*Holotricha*, *Gymnostomata*). Acta Protozool., 8, 367-377.
- Golińska K. 1972: Studies on stomatogenesis in *Dileptus* (*Ciliata*, *Holotricha*) in the course of division process. Acta Protozool., 9, 283-297.
- Golińska K. et Grain J. 1969: Observations sur les modifications ultrastructurales lors de la regeneration chez *Dileptus cygnus* Clap. et Lach. 1859, Cilie *Holotricha*, *Gymnostome*. Protistologica, 5, 447-463.
- Grain J. 1969: De cinetosomes et ses derives chez les Cilies. Année biol., 8, 54-97.
- Grain J. et Golińska K. 1969: Structure et ultrastructure de *Dileptus cygnus* Clap. et Lach. 1859, Cilie *Holotricha*, *Gymnostome*. Protistologica, 5, 269-291.
- Grimes G. W. 1972a: Differentiation during cystment in *Oxytricha fallax*. J. Protozool., (in press).
- Grimes G. W. 1972b: Origin and development of kinetosome in *Oxytricha fallax*. J. Cell. Sci., (in press).
- Hashimoto K. 1962: Relationships between feeding organelles and encystment in *Oxytricha fallax* Stein. J. Protozool., 9, 161-162.
- Hashimoto K. 1964: Localization of ciliary primordia in induced abnormal cysts of *Oxytricha fallax*. J. Protozool., 11, 75-84.
- Jeffries W. B. 1956: Studies on excystment in the *Pleurotricha lanceolata*. J. Protozool., 3, 136-144.
- Kennedy J. R. 1969: The role of microtubules in the cell cycle. In: The Cell Cycle. (eds. Padilla G. M., Whitson, G. L., and Cameron I. L.) 227-248.
- Kennedy J. R. and Brittingham E. 1968: Fine structure changes during chloral hydrate deciliation of *Paramecium caudatum*. J. Ultrastruct. Res., 22, 530-545.
- Kennedy J. R. and Zimmermann A. M. 1970: The effects of high hydrostatic pressure of the microtubules of *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell. Biol., 47, 508-577.
- Kitching J. A. 1967: Contractile vacuoles, ionic regulation and excretion. In: Research in Protozoology (ed. T. T. Chen), Pergamon Press, Oxford-New York, 1, 307-337.
- Kink J. 1972: Observations on morphology and oral morphogenesis during regeneration of ciliate *Lacrymaria olor* (O. F. M. 1786), *Holotricha*, *Gymnostomatida*. Acta Protozool., 10, 205-213.
- Lund E. J. 1917: Reversibility of morphogenetic processes in *Bursaria*. J. exp. Zool., 24, 1-17.
- McArdle E. W., Berquist B. L. and Ehret C. F. 1972: Cellular autophagy and new mucocyst formation in encysting *Tetrahymena rostrata*. J. Protozool., (abstract, in press).

- Outka D. E. and Kluss B. C. 1967: The amoeba-to-flagellate transformation in *Tetramitus rostratus*. 2 — Microtubular morphogenesis. *J. Cell. Biol.*, 35, 323–347.
- Parducz B. 1952: Uj gyorsogzito eljaras a veglenykutatas es oktats szolgotataban. *Annls hist.-nat. Mus. natn. hung.*, 2, 5–12.
- Pigoñ A. and Edstrom J. E. 1959: Nucleic acid changes during starvation and encystment in the ciliate (*Urostyla*). *Expl Cell Res.*, 16, 648–656.
- Pitelka D. R. 1969: Fibrillar systems in *Protozoa*. In: *Research in Protozoology*. (ed. T. T. Chen), Pergamon Press, Oxford-New York, 3, 279–389.
- Raikov I. B. 1969: Mycronucleus of ciliates. In: *Research in Protozoology*. (ed. T. T. Chen), Pergamon Press, Oxford-New York 3, 1–129.
- Repak A. J. 1968: Encystment and encystment of the heterotrichous ciliate *Blepharisma stoltei* Isquith. *J. Protozool.*, 15, 407–412.
- Repak A. J. and Pfister R. M. 1967: Electron microscopical observation on the extracellular structures of the resting cysts of *Blepharisma stoltei*. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 86, 417–421.
- Roque M. 1961: *Frontonia microstoma* Kahl. *J. Protozool.*, 8, 334–341.
- Rosenberg L. E. 1938: Cyst stages *Opisthonia hemeguyi*. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 57, 147–152.
- Roth L. E. and Shigenaka Y. 1964: The respiration of cilia. *Z. Zellforsch.*, 64 19–24.
- Stout J. D. 1956: Excystment of *Frontonia depressa* (Stokes) Penard; peniculous hymenostome. *J. Protozool.*, 3, 31–32
- Schuster F. 1963: An electron microscope study of the amoeba-flagellate *Naegleria gruberi* (Scharfing). *J. Protozool.* 10, 297–313.
- Tartar V. 1961: *The Biology of Stentor*. Pergamon Press, London, 413.
- Tibbs J. 1969: Fine structure of *Colpoda steinii* during encystment and excystment. *J. Protozool.*, 15, 725–732.
- Tilney R. C., Hiramoto Y. and Marsland D. 1966: Studies on the microtubules in *Heliozoa*. A pressure analysis of the role of the structures in the formation and maintenance of the axopodia of *Actinosphaerium nucleofilum* (Barret). *J. Cell Biol.*, 29, 77–95.
- Tucker J. B. 1970: Morphogenesis of a large microtubular organelle and its association with basal bodies in the ciliate *Nassula*. *J. Cell. Sci.*, 6, 385–400.
- Tuffrau M. et Savoie A. 1961: Etude morphologique du cilie hymenostome *Disematostoma colpidioides* von Gelei, 1954. *J. Protozool.*, 8, 64–68.
- Villeneuve-Brachon S. 1940: Recherches sur les cilies heterotriches. *Archs Zool. exp. gén.*, 82, 1–180.
- Zebrun W., Corliss J. O. and Lom J. 1967: Electron microscopical observations on the mucocysts of the ciliate *Tetrahymena rostrata*. *Trans. Am. microsc. Soc.*, 86, 28–36.

EXPLANATION OF PLATES I–XIV

The structures of the trophic specimens of *Dileptus visseri* (the animals were fixed in mercuric chloride with calcium bichromate and stained with protargol)

1: The general appearance of the cell, a side view. (objective magn. 40×)

2: The fragment of the ventral band on the proboscis photographed from the dorsal side (objective magnification 100×)

3: The fragment of the anterior part of the cell, a side view (objective magnification 100×)

The ultrastructure of the trophic specimens *D. visseri*

4: The fragment of longitudinal section through ectoplasm. Three arrows indicate the ecto-endoplasmic microfibrillar layer. The proximal end of the kinetosome is mounted in the layer. Mitochondrion in the endoplasm. The single arrow points to the layer of vesicles under the cell membrane (22 500×)

5: The fragment of the tangential section through ectoplasm in the region of proximal ends of kinetosomes. The arrangement of the fibers leaving the kinetosomes from somatic kineties are seen. Numerous sections through the mucocysts are seen 23 400×)

6: A fragment of the tangential section through the ectoplasm. Three arrows indicate the microfibrillar layer separating the ecto- and endoplasm. The root fiber (r) leaving the kinetosome run through the fibrillar layer and enter the endoplasm (26 100×)

7: A section through the macronucleus (18 000×)

8: A section through the contractile vacuole (11 700×)

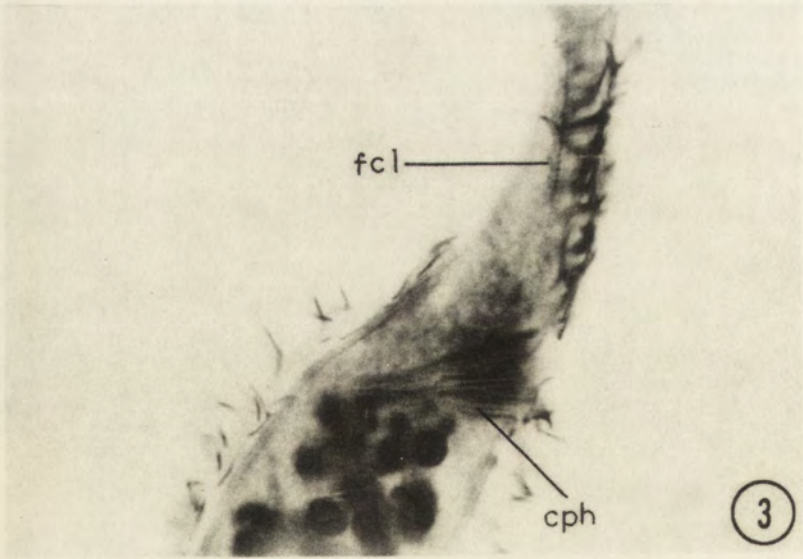
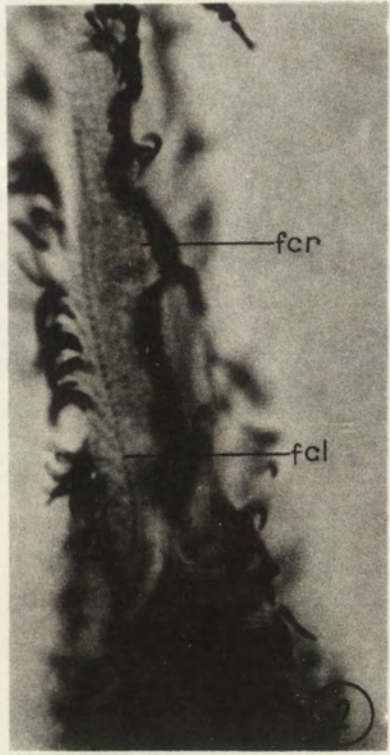
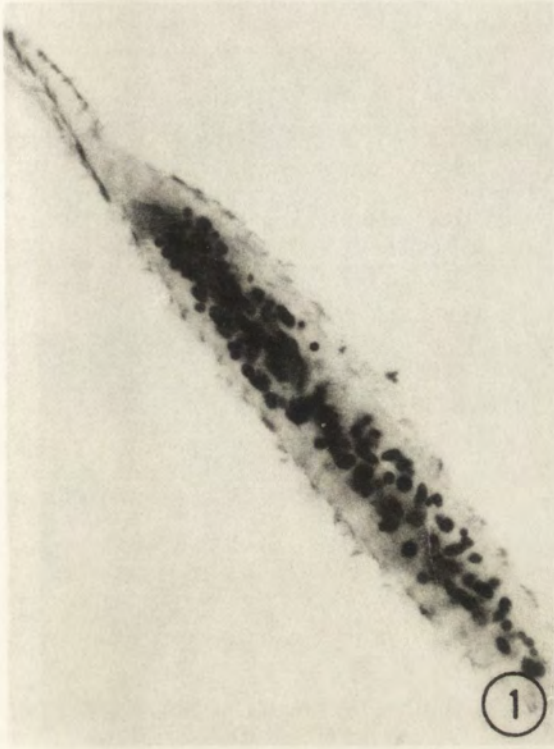
9: The longitudinal section through the toxicysts 1 — the internal capsule, 2 — the external capsule. In the upper part of the photograph the microfibrillar layer separating the ecto- and endoplasm is indicated by arrows (17 000×)

10: A fragment of the cross section through the kinetosomes of oral ciliature from the right side of the ventral band. The ventral band is on the upper part of the photograph (28 800×)

- 11: A fragment of the longitudinal section through the kinetosomes of the oral ciliaure from the right side of the ventral band (17 100×)
- 12: A fragment of the longitudinal section through the central fiber on the ventral band. The distal part of the proboscis is in the upper part of the photograph (17 100×)
- 13: A fragment of the longitudinal section through the external basket. In the upper right part of the photograph a fragment of the cytostomal lip. The arrows indicate the microfibrillar layer (26 200×)
- 14: A longitudinal section through the fragment of the cytopharyngeal apparatus. In the upper right part of the photograph a cytostomal lip is indicated by single thick arrow. The arrows indicate the microfibrillar ring in which the internal nemadesms are mounted (18 000×)
- The structure of the encysting individuals of *D. visscheri*
- 15: The early stage of encystment. The cell posses the rounding shape. No disturbances in the ciliaure are seen. Staining after Parducz (Objective magnification 100×)
- 16 and 17: Later stages of the encystment. The enlarging fields lacking the ciliaure are seen. Parducz staining (Objective magnification 100×)
- 18: Late stage of encystment. Few cilia of somatic ciliaure and feeding cilia are seen. Parducz staining (Objective magnification 100×)
- 19: The nuclear apparatus of the trophic cell. A fragment of a cell with several macronuclei. Feulgen staining (Objective magnification 100×)
- 20: The nuclear apparatus of encysted individual. Feulgen staining (Objective magnification 100×)
- 21, 22 and 23: The resting cysts of *D. visscheri*. The fibrillar bundles appearing in the encysted specimens are indicated by arrows. Fixed in mercuric chloride with the nigrosine, cleared in the calcium bichromate (Objective magnification 100×)
- The ultrastructure of the resting cysts *D. visscheri*
- 24: The cross section through the superficial part of the cytoplasm of the cyst. The arrow point to the vesicle under the cell membrane (26 100×)
- 25: A longitudinal section through the cyst walls (11 700×)
- 26: A section through the superficial fragment of the cytoplasm. The arrows indicate the microtubular fibers (23 400×)
- 27: A fragment of the superficial cytoplasm of the cyst (28 800×)
- 28: A longitudinal section through the kinetosome. The arrow indicate the microtubular fibers running from the proximal end of the kinetosome (45 900×)
- 29: A cross section through the kinetosome near the proximal end. The arrows indicate the microtubular fibers running from the kinetosome (50 400×)
- 30: Oblique section through the kinetosome. The arrows point to the microtubular fibrils leaving the kinetosome (25 100×)
- 31: A fragment of the cytoplasm of the cyst. The arrows indicate the cross section through the microfibrillar strand being the remnant of the microfibrillar layer (34 200×)
- 32: A fragment of the superficial cytoplasm of the cyst. The cross section through the contractile vacuole. In the upper part of the photograph the internal cyst wall is seen. The arrow point to the cell membrane (31 500×)
- 33: A fragment of the section of the cytoplasm of the cyst. The black arrows indicate the mitochondria, the white — the mucocysts (18 000×)
- 34: A fragment of the section of the cytoplasm of the cyst. The tangential section through the bundle of the microtubules (arrows) (20 700×)
- 35: The fragment of the cross section through the bundle of microtubules. The arrows indicate the single microtubule (32 400×)
- 36: A section through the macronucleus of the encysted specimen (21 600×)
- 37: A section through the autophagic vacuole (32 400×)

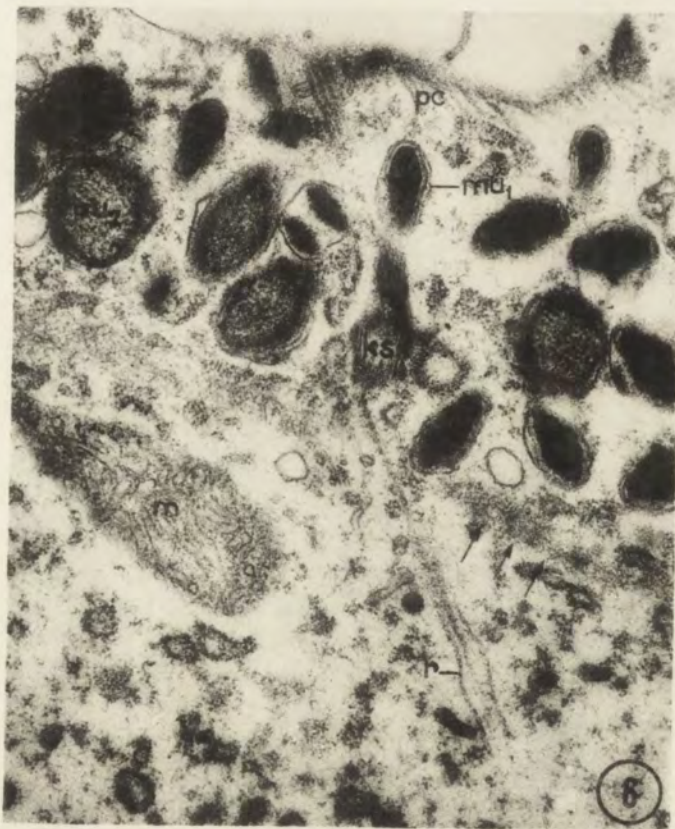
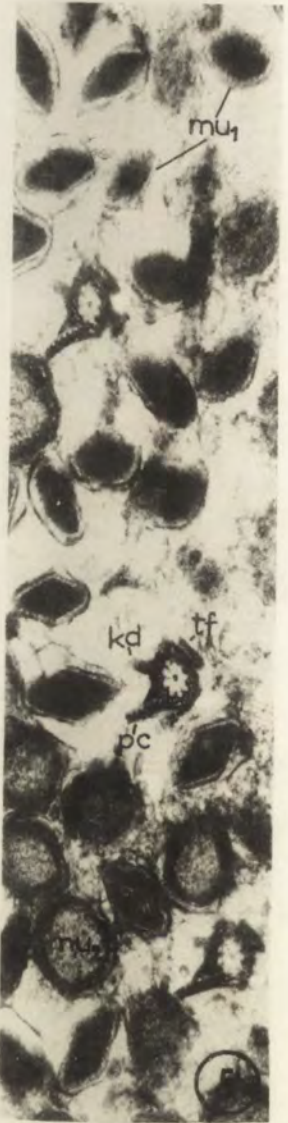
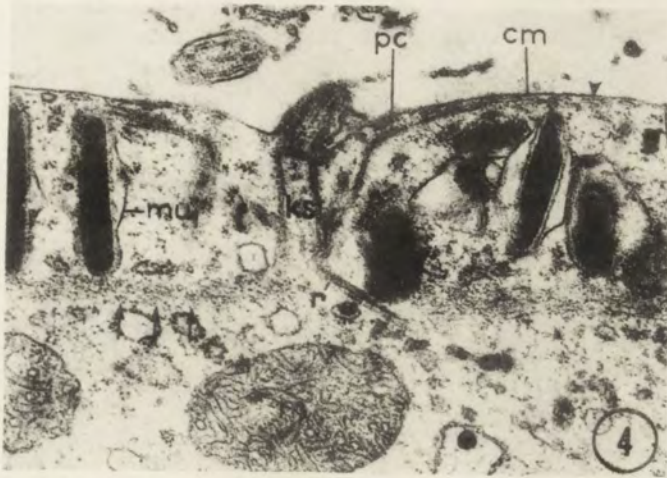
Explanations of the abbreviations

av — autophagic vacuole, cf — central fiber, cil — cilium, cm — cell membrane, cph — cytopharyngeal apparatus, cs — cytostome, csl — cytostome lip, cv — contractile vacuole, er — endoplasmic reticulum, EX — external cover of cyst, fc — feeding cilia, fcl — feeding cilia on the left side of proboscis, fcr — feeding cilia on the right side of proboscis, IN — internal cover of cyst, kd — kinetodesmal fibril, ks — kinetosome, l — lipid, Ma — macronucleus, Mi — micronucleus, m — mitochondria, ml — microfibrillar layer, mr — microfibrillar ring, mtb — microtubular bundle, mtf — microtubular fibrils, mu₁ — mucocyst filled with electron dense material, mu₂ — mucocyst, n — nucleole, ndi — nemadesmos of internal basket, nde — nemadesmos of external basket, nks — nonciliated kinetosome, ne — nuclear envelope, pc — postciliary fibrils, ph — phagoplasm, r — root fibrils, sb — sensory bodies, sk — somatic kinety, sp — spongiopasm, t — toxicyst, tf — transverse fibrils, vb — ventral band.



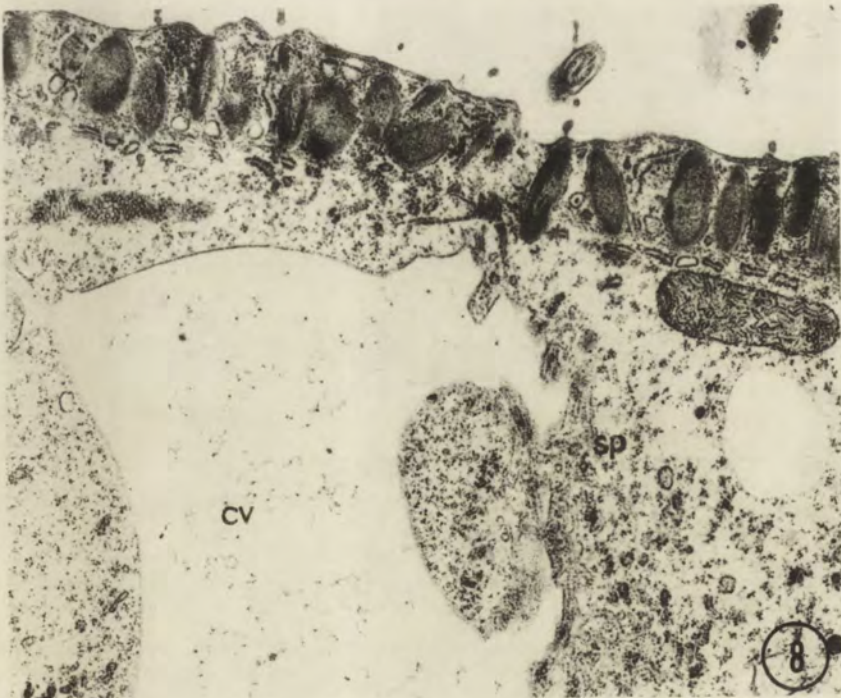
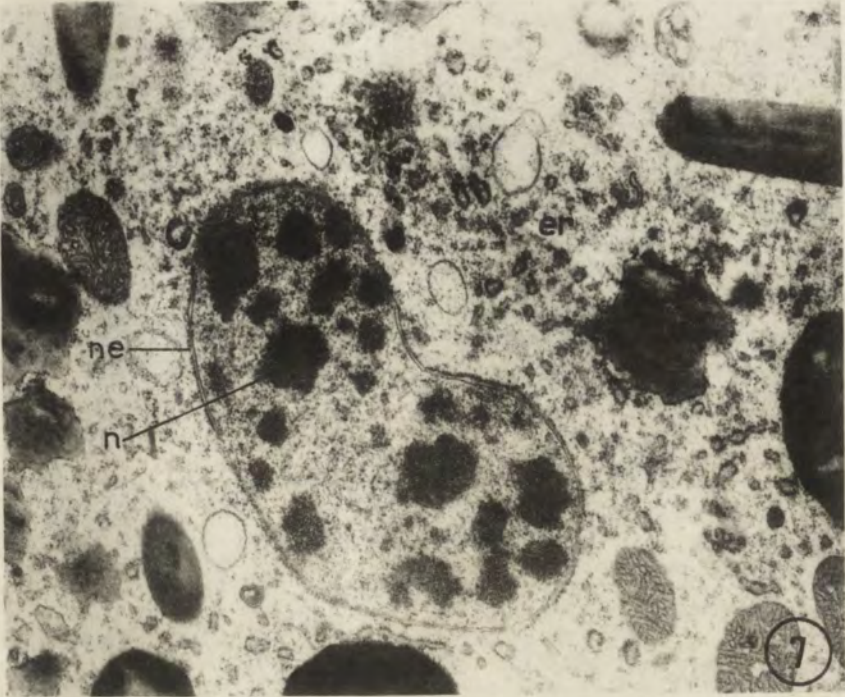
J. Kink

auctor phot.



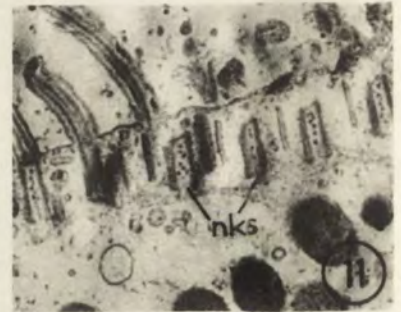
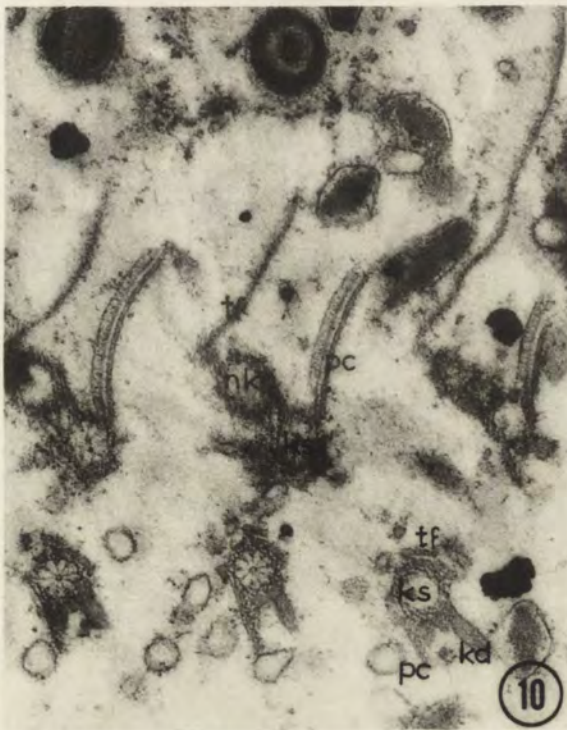
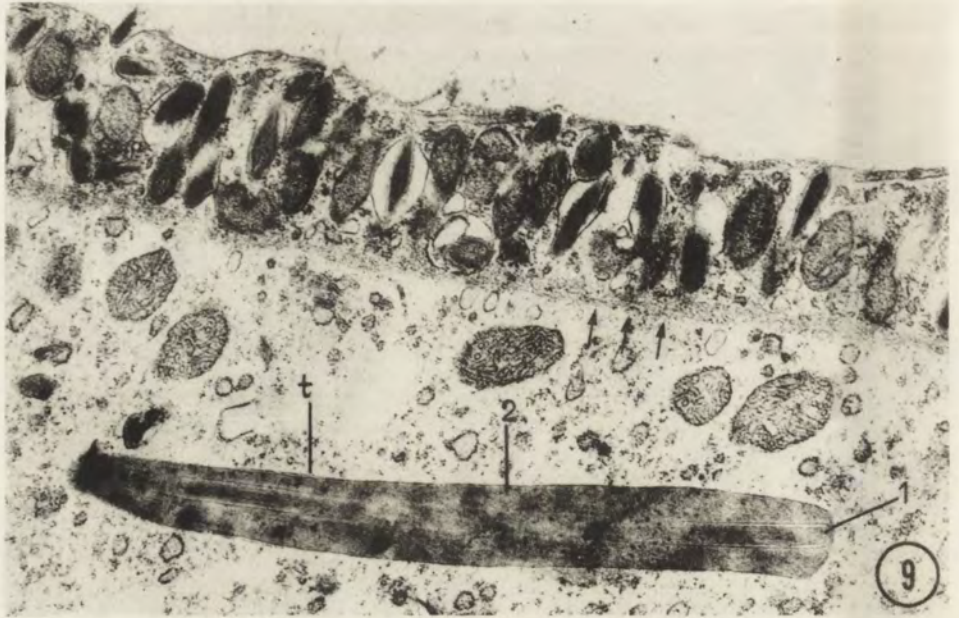
J. Kink

auctor phot.



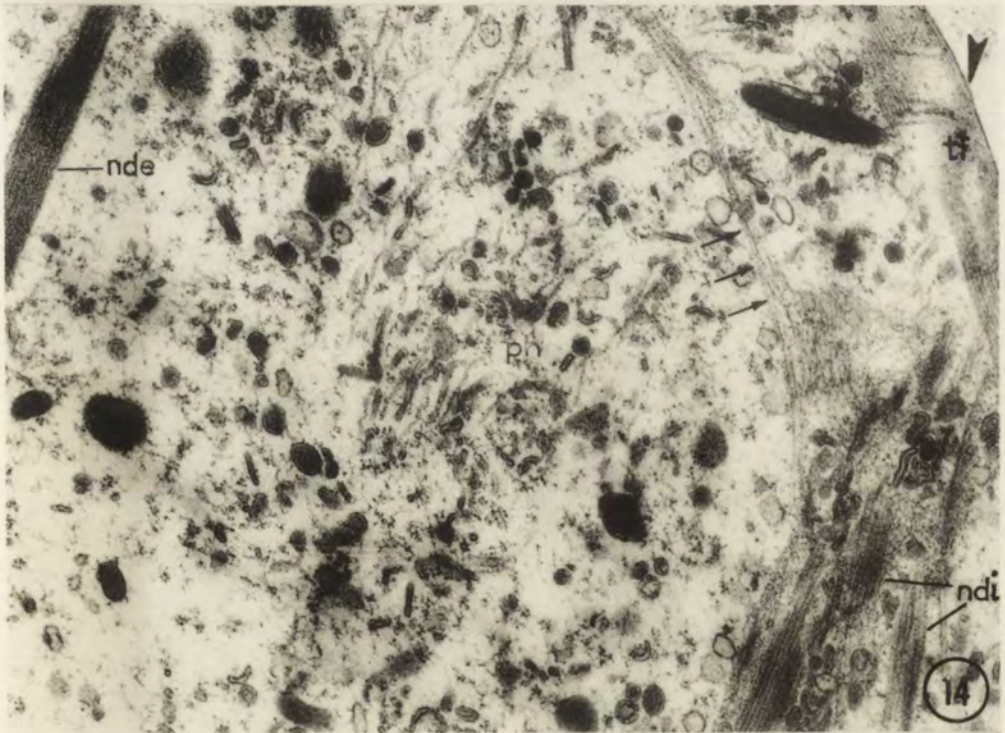
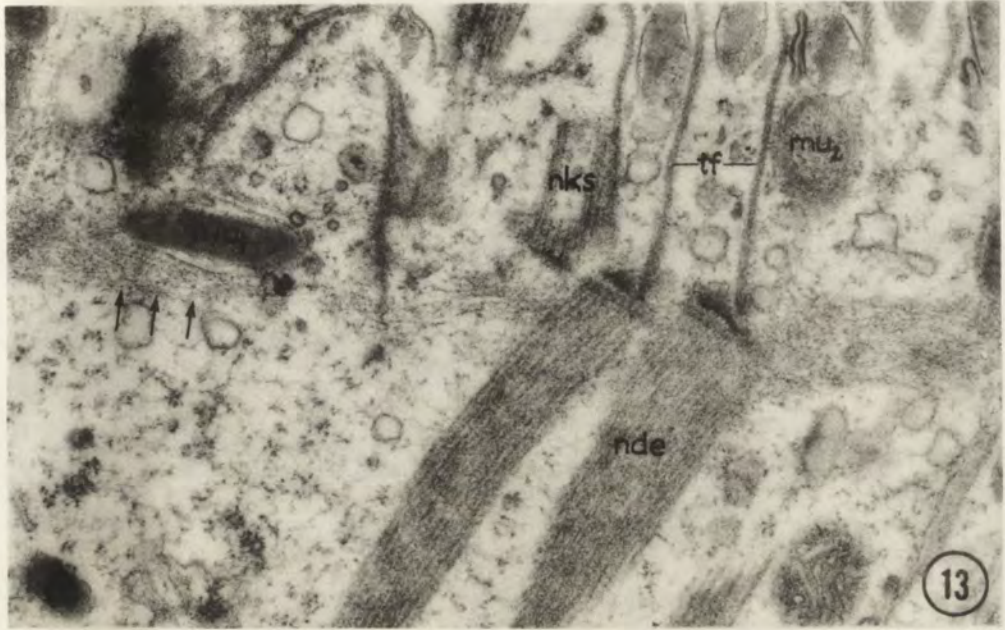
J. Kink

auctor phot.



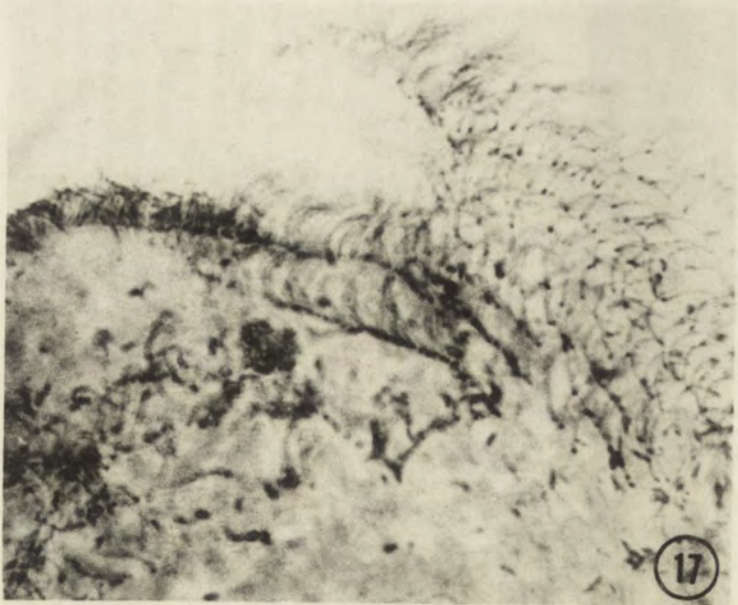
J. Kink

auctor phot.



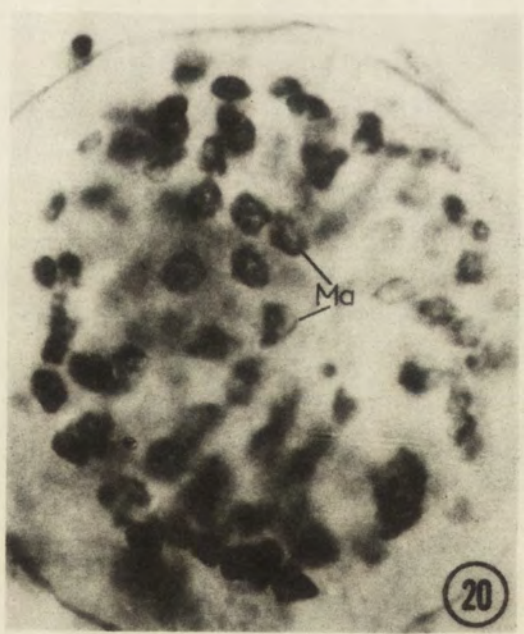
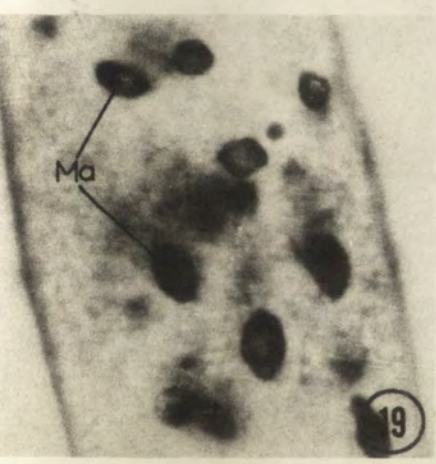
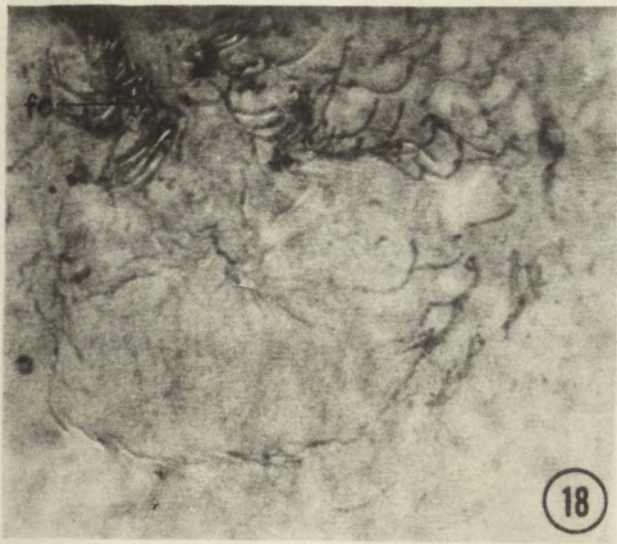
J. Kink

auctor phot.



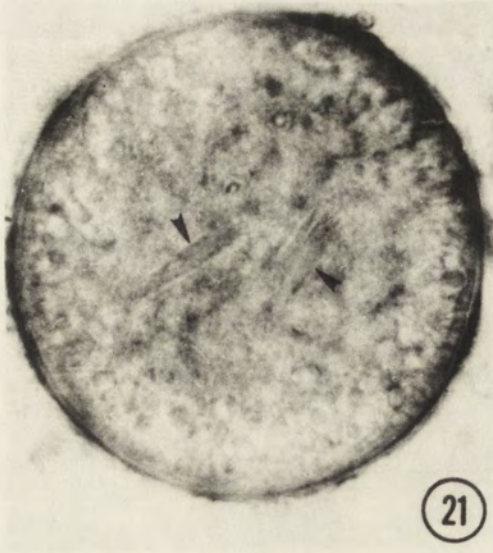
J. Kink

auctor phot.



. Kink

auctor phot.



21



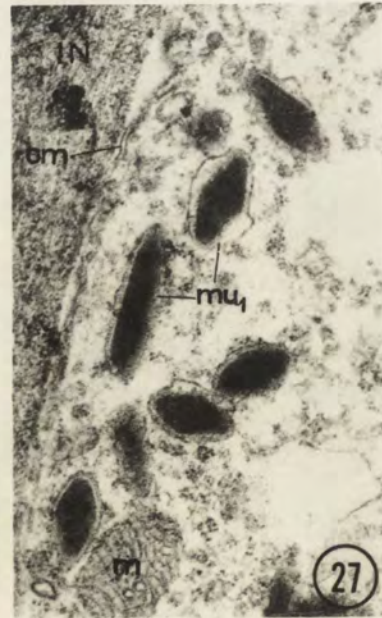
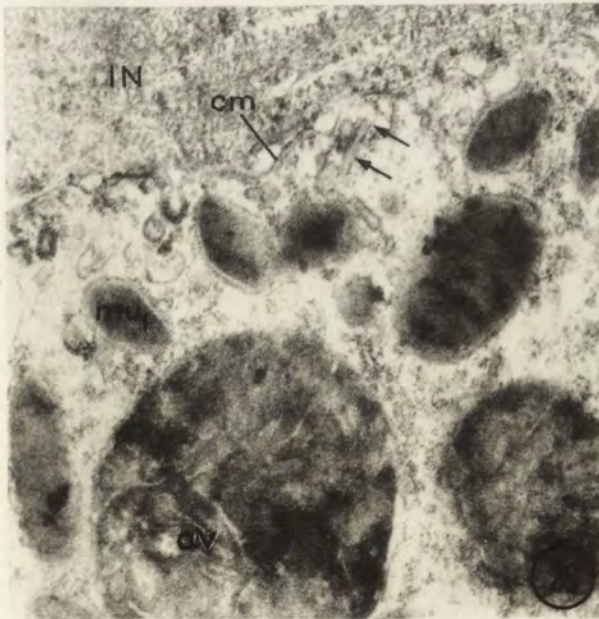
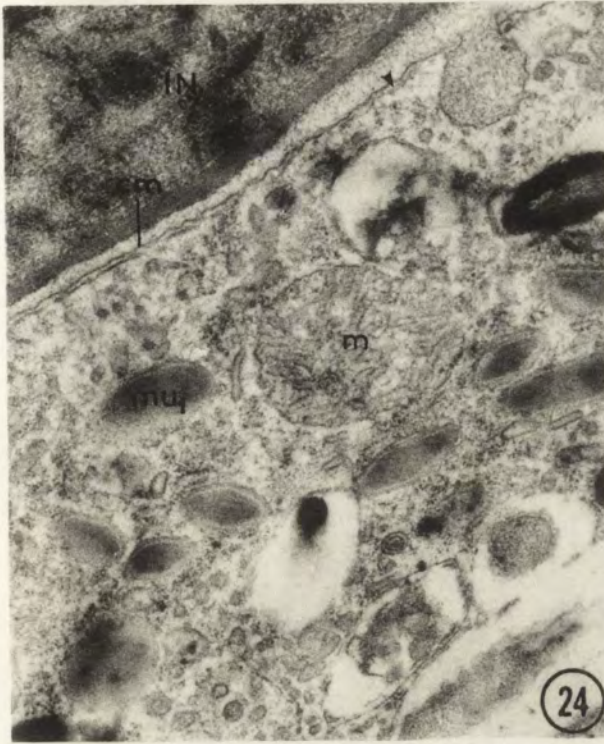
22



23

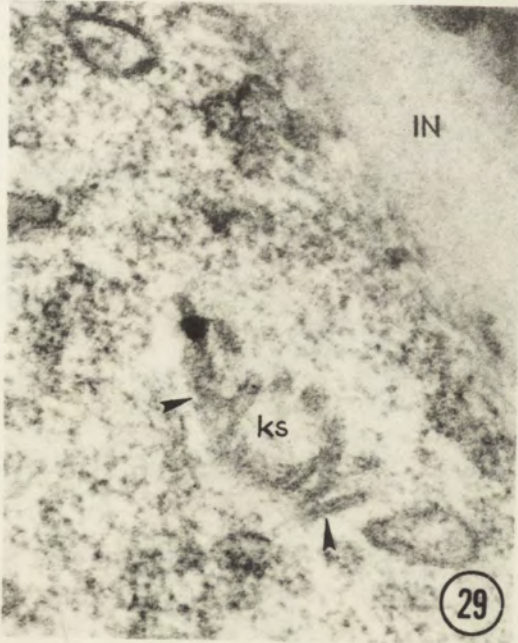
J. Kink

auctor phot.

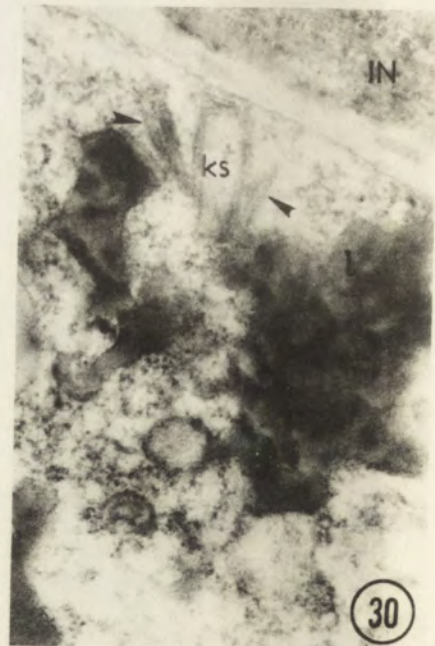


J. Kink

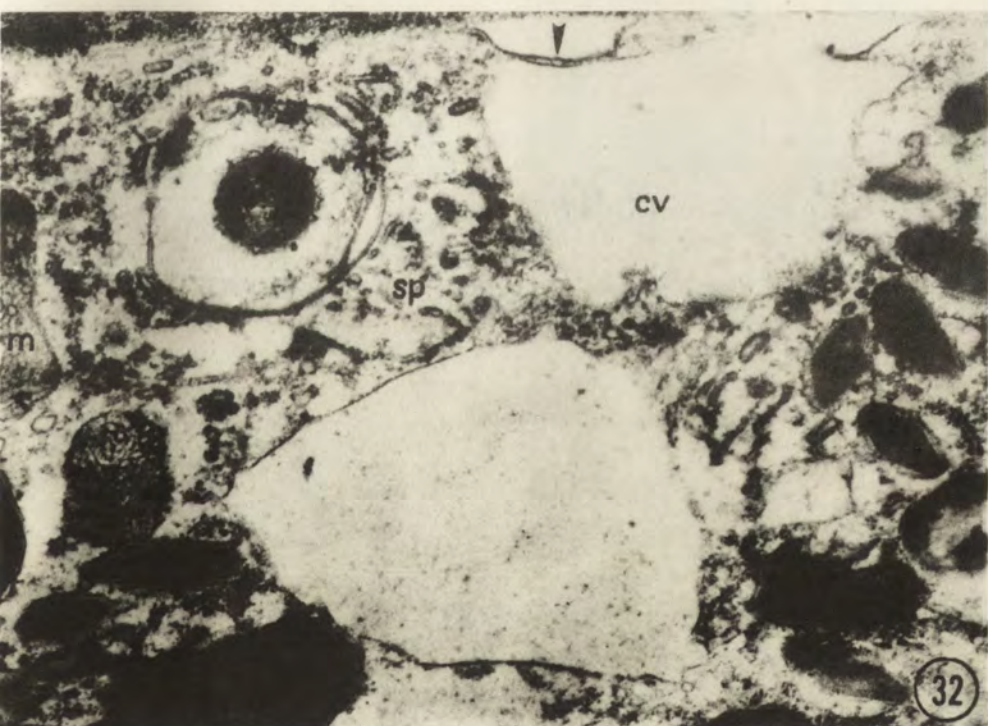
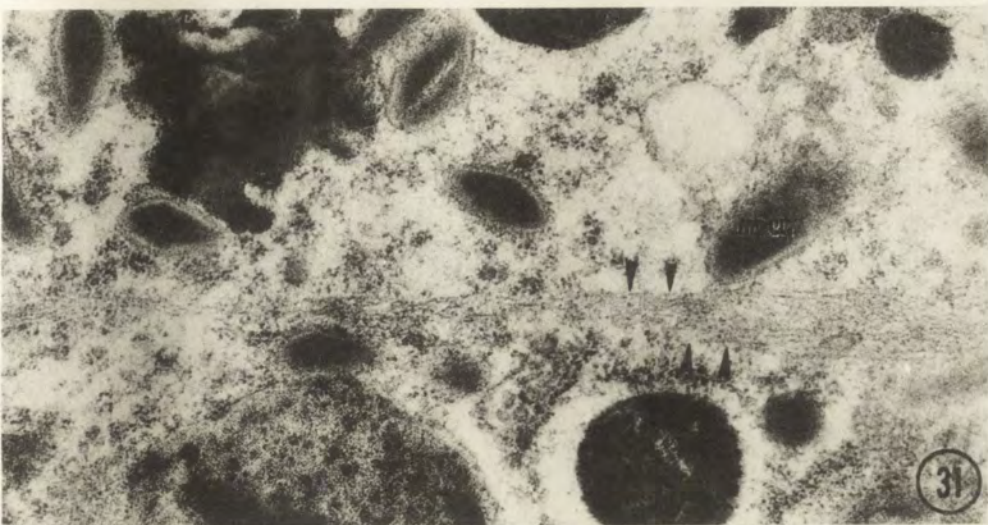
auctor phot.



J. Kink

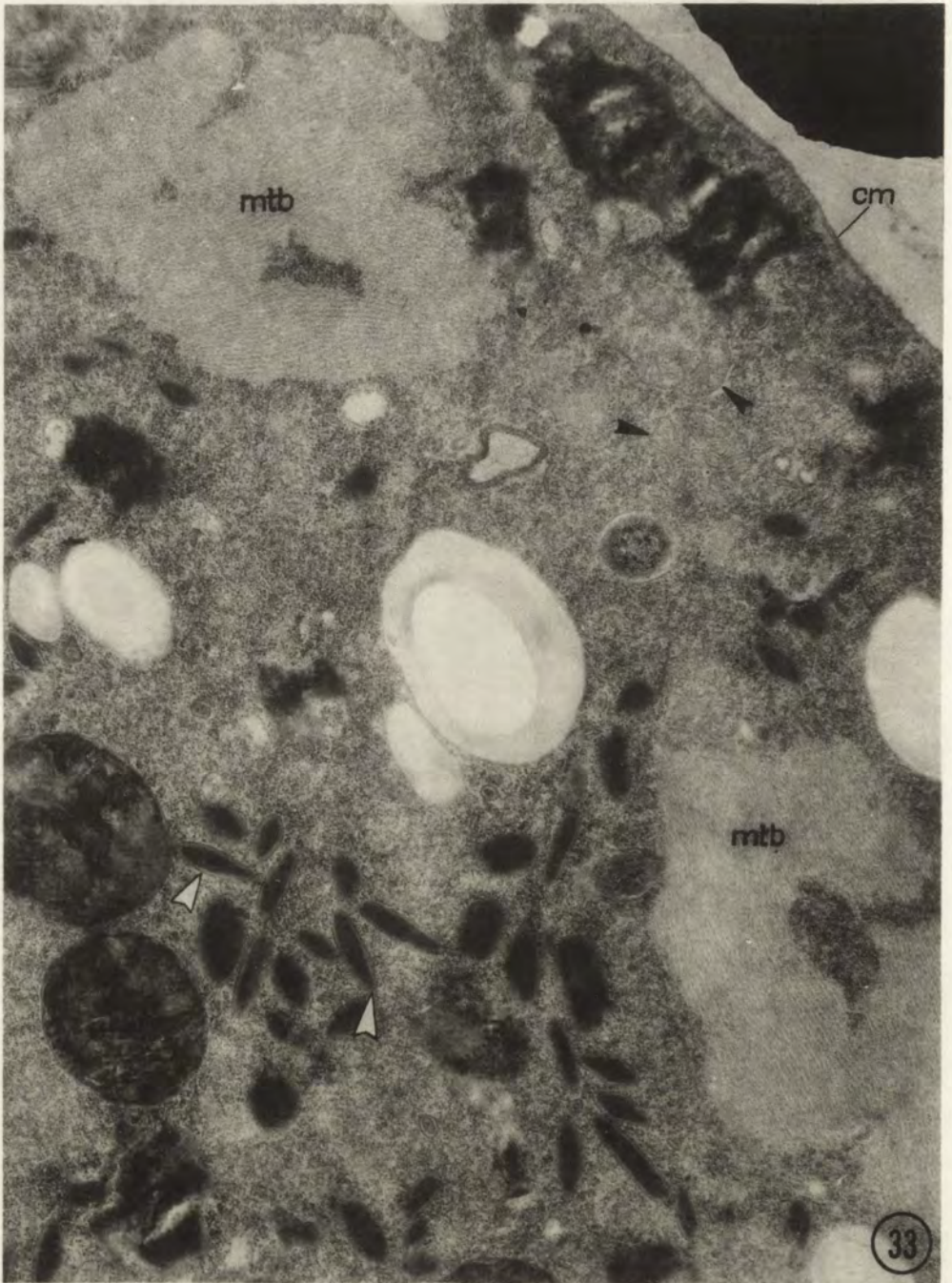


auctor phot.



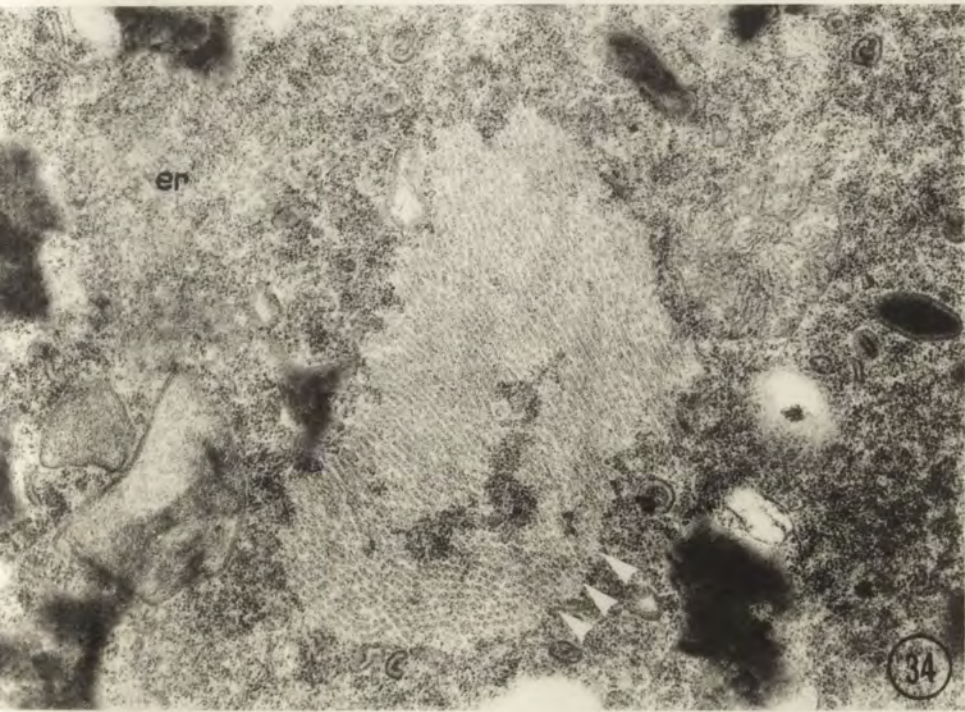
J. Kink

auctor pho



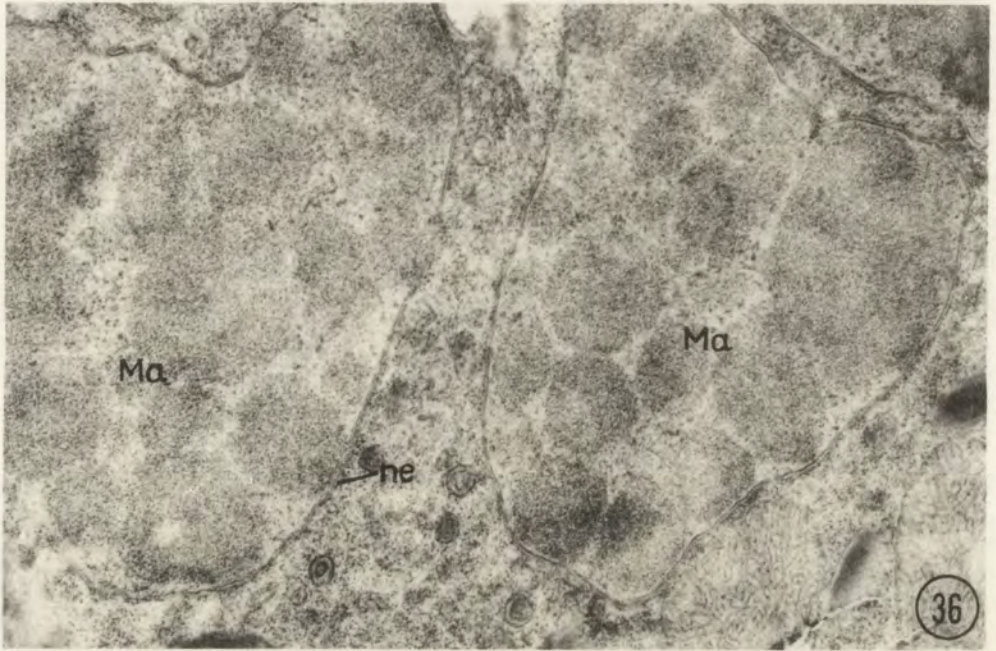
J. Kink

auctor phot.



Kink

auctor phot.



J. Kink

auctor phot.

Magdalena MARINČEK

Développement d'*Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia) —
parasite de la carpeRazviće *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia) — parazita šarana

Le cycle évolutif d'*Eimeria subepithelialis* Moroff et Fiebiger, 1905 n'a pas été jusqu'à présent suffisamment étudié quoique cette Coccidie parasite une espèce de poisson très importante du point de vue économique.

Les premières données sur l'évolution d'*E. subepithelialis* ont été présentées par Moroff et Fiebiger (1905). Ils ont décrit cette espèce en se basant sur un cas d'infection de la carpe dans un étang en Allemagne. Ces auteurs n'ont pu constater que les stades très rares de la phase asexuée du développement; ils ont donné quelques remarques sur le développement des microgamétocytes ainsi que sur la structure des macrogamètes. Zschische (1914) a également trouvé *E. subepithelialis* chez les carpes d'étang en Allemagne et a fourni quelques renseignements sur l'évolution de cette espèce. Il a constaté de très rares schizontes et a décrit la phase moyenne de la microgamétogenèse ainsi que la structure des macrogamètes. Schäperclaus (1943) a étudié plusieurs cas d'infection par *E. subepithelialis* chez la carpe qu'il a désigné comme "coccidiose nodulaire". Il considère que cette coccidiose est contrairement à celle que provoque *E. carpelli*, très rare estimant que cette rareté est due à la position sous-épithéliale du parasite et par conséquent à l'impossibilité dans laquelle se trouve cette Coccidie de parvenir dans le milieu environnant. Schäperclaus considère que le développement complet du parasite se déroule dans la couche sous-épithéliale de la muqueuse intestinale. Il a signalé que sur son matériel il n'a trouvé que peu de stades qu'il considèrerait être des mérozoïtes, cependant il n'a pas constaté de schizontes.

Bespalič 1959 a observé l'infection de la carpe par *E. subepithelialis* en Russie, mais il n'a pas étudié le développement de cette Coccidie. Pellérdy et Molnár (1968) ont constaté en Hongrie, un grand pourcentage d'infection par *E. subepithelialis* des alevins de la carpe.

Matériel et méthodes

Afin d'étudier les stades évolutifs de ce parasite nous avons utilisé diverses méthodes histologiques. Les parties d'intestin infecté de la grandeur de 4 à 10 mm, ainsi que les frottis ont été fixés et traités par une suite de procédés histologiques. Pour la fixation nous avons utilisé différents fixateurs: les mélanges de Bouin, de Schaudinn, de Zenker, de Carnoy, de Flemming, de Helly, de Dubosq-Brasil et le formol neutre à 4%. Nous avons fixé les frottis avec du Schaudinn chaud ou du Bouin. C'est avec Bouin, Schaudinn et Carnoy que les meilleurs résultats ont été obtenus.

Le matériel a été incluí dans la paraffine. Les blocs étaient coupés en tranches d'épaisseur de 4-10 μm . Nous avons coloré les coupes par des procédés différents: à l'hématoxyline d'après Heidenhain avec coloration supplémentaire à l'éosine ou au mélange de vert lumière et d'acide picrique, ensuite à l'hématoxyline d'après Delafield avec coloration supplémentaire à l'éosine; on a utilisé aussi l'hématoxyline d'après Weigert, hémalum et l'azur-éosine d'après Maksimov. Les frottis sont colorés seulement à l'hématoxyline d'après Heidenhain. C'est avec l'hématoxyline d'Heidenhain que nous avons obtenu les meilleurs résultats, tandis que l'azur-éosine d'après Maksimov s'est montré impropre, quoiqu'il donne de bons résultats lors de la coloration de Coccidies de lapin.

Dans le but d'étudier les phases asexuées du développement nous avons procédé à une infection artificielle. Nous avons tout d'abord assuré un matériel impeccable pour lequel nous étions sûr qu'il n'était pas infecté, en élevant de jeunes carpes dans des conditions stériles. Au début nous transportions de l'étang les oeufs fécondés que nous continuions à élever au laboratoire. Cependant, cette technique s'est avérée inefficace ce qui nous a obligé à modifier notre procédé: nous prenions les alevins qui venaient à peine d'éclore, âgés à peu près de deux jours et nous les élevions au laboratoire. Malgré la grande attention portée à la nutrition, à la purification et à l'aération de l'eau, les pertes étaient très grandes, surtout au cours du premier mois. Nous parvenions à conserver seulement 20% du nombre initial des jeunes poissons.

Les carpes ainsi élevées ont été infectées au printemps. A cette époque elles avaient presque un an; elles atteignaient alors 5-7 cm de longueur et pesaient 4-13 g.

Le matériel infestant a été récolté sur le terrain à l'époque de l'émission des stades mûrs des parasites. L'infection artificielle a été réalisée de deux façons différentes: le matériel infestant avait été mélangé avec un peu de solution physiologique et introduit à l'aide d'une sonde dans la partie antérieure de l'intestin où il a été inoculé à la nourriture. D'habitude nous pratiquions les deux méthodes ensemble. La première nous offre la possibilité d'introduire d'un seul coup une quantité importante de matériel infestant (quelque 0.5 cm^3). Comme nous opérions avec de très petits poissons, cette méthode présentait des inconvénients car il arrivait souvent que la muqueuse intestinale soit irritée, inflammée, lésée et même que la paroi intestinale soit perforée. Au cas où la sonde n'aurait pas suffisamment pénétré, la partie majeure du matériel infestant ressortait par les branchies. Le deuxième procédé est plus favorable pour les poissons, mais la quantité du matériel infestant que nous arrivions à introduire était beaucoup plus petite. Cette méthode consiste à faire de très petites capsules de jaune d'oeuf cuit durci ou de pâte, de la grandeur de 3-4 mm, dans l'intérieur desquelles on met une goutte de liquide contenant des oocystes et des spores, et qui sont ensuite bouchées par de minuscules opercules. Ensuite nous jetions les capsules, ainsi préparées, aux poissons affamés dans l'aquarium. Il arrivait souvent que les poissons rejettent les capsules avalées ou qu'ils les broyaient, ce qui dispersait dans l'eau le matériel infestant, qui, ainsi, était perdu.

La température de l'eau au cours de l'expérience était maintenue entre 15°C et 25°C. La nourriture que nous donnions aux petits poissons était riche en hydrates carboniques. On sait qu'une telle nourriture est favorable au développement de nombreux parasites intestinaux ce qui est en rapport avec la nature de leur métabolisme (Hegner and Eskridge 1937, Mowri and Becker 1930 et autres, d'après von Brandt 1952).

Durant toute l'expérience nous avons procédé à l'examen des excréments des poissons. Ils ont été sacrifiés à des intervalles de temps différents à partir du moment de l'inoculation; leur tube digestif a été traité par les méthodes histologiques mentionnées.

Résultats

Les études sur l'évolution d'*E. subepithelialis* Moroff et Fiebiger, 1905 ont montré que cette espèce est caractérisée par une suite de particularités intéressantes par rapport aux autres espèces de Coccidies.

L'infection ne se manifeste que pendant le printemps et elle est la plus répandue chez les jeunes carpes n'ayant pas encore un an.

Au début du printemps, lorsque la température de l'eau atteint 7–10°C et lorsque chez les poissons infectés apparaissent les premiers signes d'infection à peine perceptibles sous forme de très pâles points blanchâtres, généralement localisés sur le tiers postérieur de l'intestin, on a découvert des stades de multiplication agame, en même temps que des stades précoces de la génération sexuelle.

Les schizontes sont logés dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, dans leur cytoplasme, entre le noyau et la surface apicale, parfois tout à fait superficiellement. Ils sont d'aspect oval et de très petites dimensions; les schizontes mûrs mesurent le plus souvent 8.5–9.5 μm sur 7.8 μm . Les stades tout jeunes, uninucléés, ne peuvent pas se distinguer des jeunes stades sexuels mais, cependant, le schizonte plurinucléé diffère du stade similaire de la phase sexuée, du microgamétocyte plurinucléé, par son cytoplasme qui est moins basophil et par ses noyaux qui sont quelque peu plus petits par rapport aux microgamétocytes. En outre, on peut y constater certains granules de grosse taille qui se colorent intensément par l'hématoxyline d'après Heidenhain (Fig.5) comme le matériel du noyau. Aussi quelques autres auteurs ont trouvé des structures semblables chez certaines Coccidies (Hammond et al. 1946 chez *E. bovis*; Rutheford 1943 chez *E. irresidua*, *E. media*, *E. perforans*, *E. magna*). Nos recherches cytochimiques ultérieures montreront la nature de ce granules.

Ces schizontes forment 5 à 17, le plus souvent 10 à 12 mérozoïtes qui sont disposés sans aucun ordre à l'intérieur des schizontes (Fig. 5). Les mérozoïtes sont légèrement courbés avec une extrémité un peu plus arrondie et l'autre pointue. Ils mesurent de 3.3 à 6.1 μm . Sur les coupes d'intestin infecté ces schizontes peuvent être très difficilement détectés et identifiés à cause de leurs petites dimensions; de plus, il semble que la plupart des mérozoïtes soit situés parallèlement à la surface de l'intestin de sorte qu'il est très difficile de constater, sur une coupe transversale, leur coupe longitudinale.

Ces schizontes, découverts tôt au printemps, représentent la dernière génération de la reproduction asexuée, dont les mérozoïtes se différencient en gamontes. Sur les stades plus âgés de gamogonie on ne peut plus trouver des individus de la multi-

plication agame. Cependant, en tenant compte de la grande capacité d'agglomération et de la grande production d'une part et du nombre relativement petit de mérozoïtes chez les schizontes trouvés d'autre part, nous avons supposé que cette génération n'était pas unique et qu'elle était précédée par quelques générations encore. L'étude des toutes premières phases d'apparition des nodules, alors qu'ils se manifestent encore très indistinctement, vers la fin de l'hiver, n'a pas démontré la présence de stades antérieures de reproduction asexuée. Nous en avons conclu qu'ils se déroulent encore plus tôt, pendant l'hiver et peut être au cours de l'automne précédent, ou même de l'été. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude des poissons alors que l'infection ne s'était pas encore du tout manifestée, pendant l'hiver. Ces recherches n'ont pas donné de résultats positifs probablement à cause de petit pourcentage d'infection.

Le problème de savoir à quel moment a lieu l'infestation des carpes a attiré de même notre attention. Vu que l'infection est répandue surtout parmi les jeunes poissons âgés d'un an, au printemps, après leur premier hivernage, l'infestation a pu se produire soit pendant l'hivernage, dans les abris hivernaux où leur peuplement est très dense, ou au cours de l'été et de l'automne.

Les résultats de nos recherches précédentes nous ont amené à croire que la deuxième supposition était plus vraisemblable. En effet, pendant l'hiver les poissons sont peu actifs. En outre, les abris hivernaux se vident pendant l'été, ils se dessèchent, s'exposent à l'effet du soleil et on les couvre de chaux, ce qui représente des mesures tout à fait propices pour la libération du sol des oocystes et des spores de *Coccidies*. De plus, dans les abris hivernaux les poissons sont groupés par catégories suivant l'âge ce qui rend impossible le contact entre les jeunes et les vieux poissons, porteurs éventuels de parasites. Pendant l'été, au contraire, au cours de leur développement, les jeunes poissons sont très rarement complètement isolés des plus vieux poissons âgés de deux ans qui sont les transporteurs de l'infection les plus importants. A cette époque ils se nourrissent très intensément et il est fort possible que dans ce cas avec la nourriture et l'eau ils introduisent des stades infestants d'*E. subepithelialis*. C'est justement l'époque de l'émission intense d'oocystes et de spores dans le milieu extérieur et c'est certainement alors qu'elles sont les plus virulentes. Un long séjour dans le milieu environnant diminue les réserves nutritives du parasite et, par conséquent, sa capacité vitale.

Dans le but d'expliquer le problème cité plus haut on a procédé à une expérience d'infection artificielle de jeunes carpes dans les conditions de la température estivale.

En examinant les matières fécales des poissons en expérience on a constaté, chez la plupart des poissons, au cours des premières 24 heures après l'inoculation, l'apparition d'un certain nombre d'oocystes et de spores dans les excréments. Ces formes provenaient du matériel infestant introduit. Pendant tout le temps de la durée de l'expérience nous n'avons constaté aucun stade évolutif du parasite dans les excréments des poissons infectés. Cependant, à l'examen des coupes histologiques d'intestin des carpes infectées nous avons découvert divers stades de reproduction agame

d'*E. subepithelialis* suivant le temps qui s'était écoulé depuis le jour de l'infestation. L'examen de l'intestin à l'extérieur ne présentait aucun signe d'infection.

Après 3 à 5 jours à partir du jour de l'inoculation, nous avons constaté, dans les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale du tiers postérieur de l'intestin, les stades initiaux de la 1^{ère} génération agame ayant l'aspect de très petites formes uninucléées ou binucléées; en outre, nous avons trouvé aussi de rares stades avec 4 noyaux. Les stades les plus jeunes sont tout à fait sphériques (Fig. 1) avec un noyau à peine visible. On a pu trouver des stades uninucléés allant de 1.6 à 3.7 μm . Le stade binucléé est également sphérique et sa grandeur est de 3.1 à 3.9 μm . Au cours de la croissance, le parasite devient quelque peu allongé et prend une forme ovale. Le stade de 4 noyaux avait les dimensions suivantes 3.7-4.6 $\mu\text{m} \times 2.1-3.1 \mu\text{m}$. Les noyaux des schizontes ont un karyosome très distinct, intensément colorable par l'hématoxyline tandis que le nucléoplasme a un ton clair. La membrane nucléaire est indistincte.

Ces schizontes sont localisés au dessus des noyaux des cellules épithéliales, dans la partie apicale du cytoplasme. Il y en a qui sont isolés, mais dans la plupart des cas ils ont disposés en petits groupes de 2, 3 ou 4 individus ensemble. On les observe sur un ou plusieurs plis de la muqueuse intestinale, le plus souvent voisins, particulièrement sur leurs sommets. Ces petits groupes de schizontes proviennent certainement des sporozoïtes d'une spore ou d'un oocyste et représentent le début des futures agglomérations qui se manifestent dans l'apparition de nodules blanchâtres très caractéristiques.

Après 14 jours à partir du moment de l'inoculation nous avons encore constaté des schizontes de la même génération au stade de 4 noyaux. Ils avaient l'aspect oval et mesuraient 4.5-5 $\mu\text{m} \times 3.2-3.7 \mu\text{m}$.

Le développement de cette première génération schizogonique dure 28 à 33 jours lorsque commence l'évolution de la deuxième génération agame. En effet, sur des coupes d'intestin des carpes infestées de 28 à 33 jours, nous avons trouvé des schizontes segmentés qui, à en juger par leurs caractéristiques morphologiques et par leur localisation, représentaient des stades mûrs de la première génération asexuée. Ils sont d'aspect oval, presque sphérique, mesurant à peu près 8 μm et ils produisent 10 à 17 mérozoïtes disposés sans ordre précis (Fig. 2): La longueur des mérozoïtes était environ de 3 μm ; leur noyau était situé au milieu du corps vermiforme.

En outre, sur ces coupes nous avons constaté dans la couche épithéliale des mérozoïtes libres, déjà dispersés, ainsi qu'une multitude de jeunes schizontes de la suivante, deuxième génération agame. Ils sont disposés soit au niveau des noyaux des cellules épithéliales soit, le plus souvent, au dessus d'eux, parfois presque à la limite de la couche épithéliale et du tissu sous-épithélial. Ces schizontes se distinguent de ceux de la première génération non seulement par leur localisation mais aussi par leur grandeur. La plupart des schizontes se trouvaient au stade contenant un, rarement deux ou quatre noyaux. Les stades uninucléés mesurent 5 μm et la division des noyaux commence quand les schizontes atteignent cette dimension. Le plus sou-

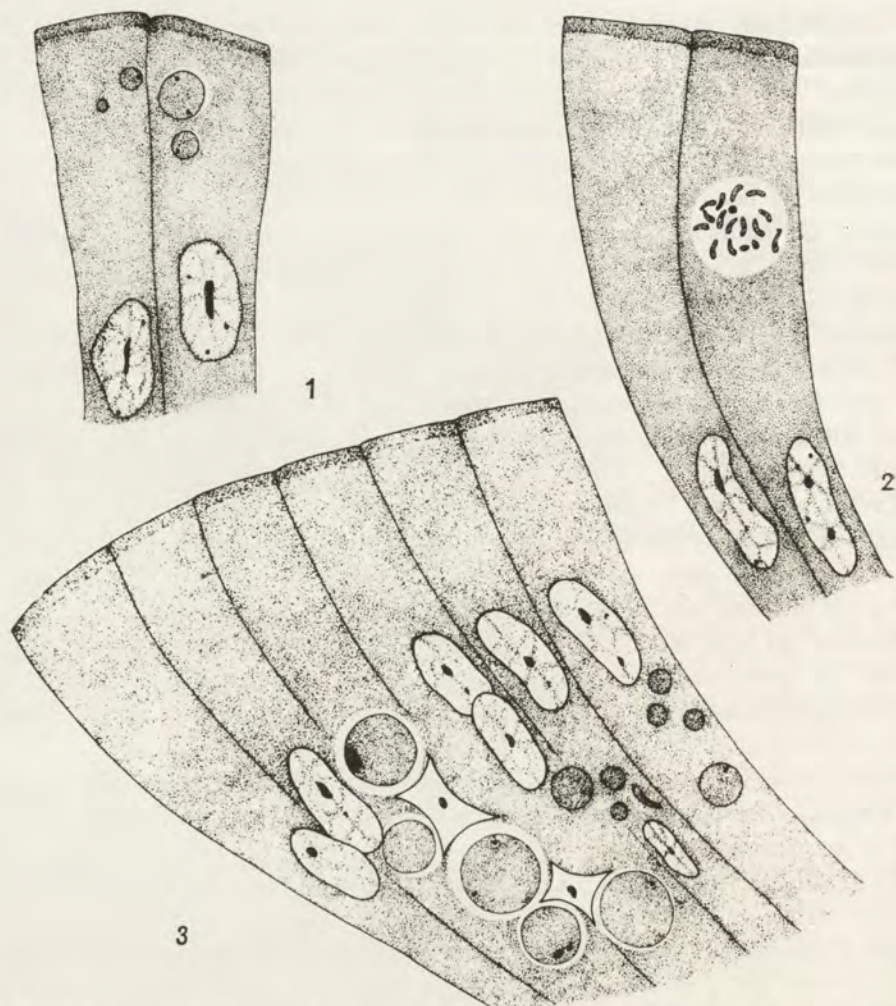


Fig. 1-3. *Eimeria subepithelialis*. 1 — Jeunes schizontes uninucléés et binucléés de la première génération. 2 — Schizonte segmentée de la première génération. 3 — Jeunes schizontes uninucléés et binucléés de la deuxième génération; dans quelqu'un d'eux noter la présence de gros granules fortement colorés, un mérozoïte de la première génération est visible.

Tous les dessins (Fig. 1-25) sont effectués à l'aide du prisme à dessiner avec l'agrandissement de 15×100

vent ils sont sphériques, surtout les tout petits; les schizontes un peu plus âgés peuvent avoir l'aspect oval. Chez bien des schizontes on peut voir dans le cytoplasme un gros granule fortement coloré (Fig. 3). Les schizontes de cette génération forment des amas déjà assez grands par rapport à la première génération; ils sont souvent disposés en groupes jusqu'à dix individus. Ceci prouve que les mérozoïtes de la première génération n'émigrent pas loin du lieu de leur origine mais ils pénètrent dans les cellules voisines.

Après 45 à 51 jours à partir de l'infection nous avons pu observer, sur des coupes d'intestin des carpes infectées, des schizontes adultes multinucléés avec un grand nombre de noyaux, de 20 à 50. D'après l'endroit où ils étaient localisés, d'après leur grandeur et l'aspect général on a pu conclure qu'ils représentent les stades adultes de la deuxième génération. Ils sont situés généralement dans la partie basale des cellules épithéliales, rarement au niveau de leurs noyaux. Les stades avec 22 noyaux mesurent environ $6.2 \times 5.3 \mu\text{m}$, avec 30 noyaux — $6.2-7.8 \times 6.2 \mu\text{m}$, avec 30-40 noyaux — $9.3 \times 6.2 \mu\text{m}$ et avec 50 noyaux — $10.9-11.5 \times 8.1-9.5 \mu\text{m}$. La division

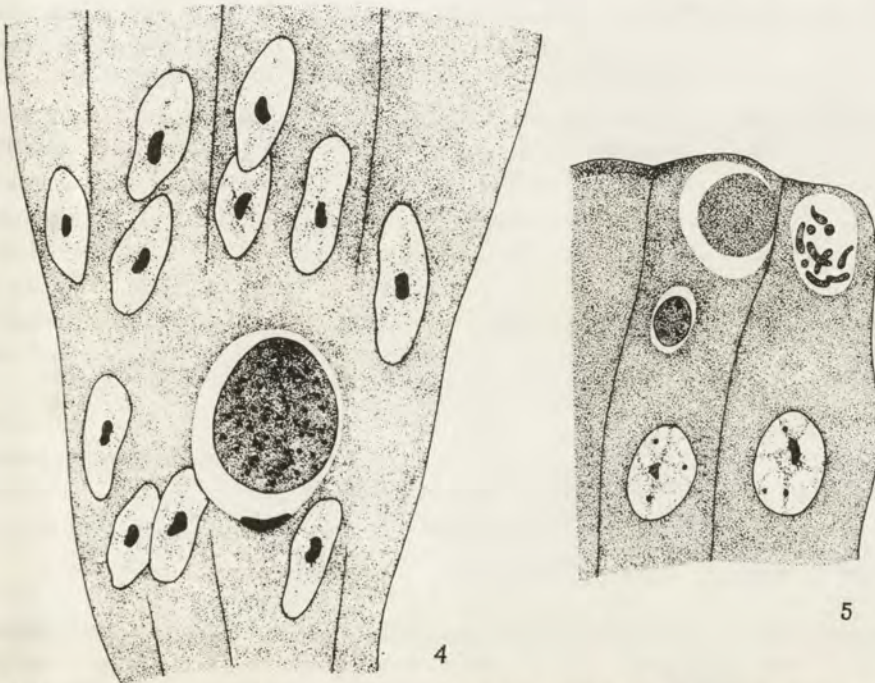


Fig. 4-5. *Eimeria subepithelialis* 4 — Schizonte plurinucléé adulte de la deuxième génération peu de temps avant la segmentation. 5 — Dernière génération de schizontes; noter un schizonte segmenté, un schizonte jeune plurinucléé et un jeune macrogamète

des noyaux progresse très rapidement, plus rapidement que la croissance de schizonte et c'est pourquoi leur répartition dans le cytoplasme est très dense. Dans la structure du noyau le karyosome est nettement visible et autour de lui on voit un très petit champ de nucléoplasme plus claire; la membrane nucléaire n'est pas distincte. Les schizontes de ce stade sont d'aspect oval. Chez un certain nombre on a observé dans le cytoplasme un globule qui montre une très forte coloration.

Sur les coupes histologiques d'intestin des carpes chez lesquelles l'infection a duré 60 jours, nous avons constaté dans l'épithélium des schizontes mûrs, multinucléés, avec à peu près 50 noyaux. Chez certains schizontes on a observé un début de seg-

mentation du cytoplasme. La plupart étaient placés dans la partie proximale des cellules épithéliales, ce n'est que rarement qu'on peut les constater dans la couche sous-épithéliale, dans la région tout à fait supérieure de la tunica propria. D'après leurs caractéristiques on a pu conclure que ces formes représentaient les stades terminaux du développement de la 2^{ème} génération schizogonique (Fig. 4). Par conséquent, leur évolution dure un peu plus de 32 jours. Les schizontes de cette génération engendrent un beaucoup plus grand nombre de mérozoïtes par rapport à la génération précédente, environ 50, et ainsi ils contribuent fort à l'autoinvasion de l'hôte et à une multiplication intense des parasites.

Nos recherches futures montreront bien si les mérozoïtes de cette génération se développent dans la dernière génération schizogonique dont l'existence a été constatée au printemps, ou s'il existe encore un stade intermédiaire.

En se basant sur les résultats obtenus dans ces expériences on peut conclure que la reproduction agame chez cette espèce englobe au moins trois générations des schizontes qui se distinguent par leur morphologie, leur localisation et le nombre de mérozoïtes. La position épithéliale des schizontes est, sans doute, la plus favorable à la dispersion des mérozoïtes; leurs dimensions sont très petites et leurs réserves énergétiques ne sont probablement pas grandes. Il est possible que de ce fait les mérozoïtes migrent à de très faibles distances de l'endroit de leur origine, ce qui est sûrement la cause de l'apparition des nœuds nodulaires caractéristiques pour cette espèce de Coccidies.

Les expériences ont démontré que l'infestation des jeunes carpes a vraisemblablement eu lieu déjà en été; le développement des parasites commence déjà pendant les mois d'été pour, probablement, ralentir son cours en hiver ou s'arrêter complètement aux stades de la schizogonie tardive et de la gamogonie précoce que l'on constate au début du printemps.

Les gamontes tout à fait jeunes peuvent être constatés en même temps que les phases finales de la schizogonie, au commencement du printemps, au début du mois de mars, quand la température de l'eau atteint environ 7°C. Avec l'apparition et le développement des formes sexuelles les agglomérations endogènes des parasites atteignent le maximum de sorte que seulement l'évolution de la génération sexuelle a pour conséquence la manifestation externe de l'infection sous forme de nodules blanchâtres (Pl. I 1). Les générations asexuées ne montrent aucun signe extérieur sur la paroi de l'intestin de la carpe.

Les jeunes formes sexuelles se développent dans le cytoplasme des cellules épithéliales, dans sa couche apicale. Ils attaquent les cellules voisines en forment de cette manière une série presque ininterrompue qui peut englober un ou plusieurs plis de la muqueuse intestinale (Pl. I 2, 3). Parfois, en cas d'infection aiguë, de telles séries sont réparties sur plusieurs places, en occupant des régions proches ou voisines et en englobant une partie importante de la surface intestinale; en cas d'infection très grave elles la couvrent entièrement. Les gamontes sont répartis surtout sur les sommets des plis mais ils descendent aussi le long de leurs côtes jusqu'au fond des

cryptes. Dans les cellules épithéliales ils peuvent être répartis seulement dans une série, mais en cas de plus grandes agglomération même en deux et trois couches l'une au-dessous de l'autre (Pl. II 4,5) de sorte qu'on peut trouver dans une cellule épithéliale même jusqu'à trois individus de génération sexuelle. Il n'est pas bien rare que les gamontes se placent aussi dans les cellules glandulaires.

La microgamétogenèse se déroule complètement dans la couche épithéliale de la muqueuse intestinale. Les toutes jeunes microgamétocytes sont de forme sphérique, uninucléées et il est difficile de les distinguer des jeunes macrogamètes. La division du noyau commence lorsque le gamonte mâle atteint le diamètre d'environ 4.6 μm . Au début le cytoplasme est homogène et se colore un peu plus intensément que le cytoplasme du gamonte femelle. Au cours de la croissance la division des noyaux continue intensément, la taille du karyosome diminue et le cytoplasme perd sa homogénéité et prend un aspect réticulaire (Fig. 6 à 9). Aux stades ultérieurs sa partie centrale est un peu plus colorée et la région périphérique est plus claire.



Fig. 6-15. La microgamétogenèse de *Eimeria subepithelialis* 6 — Jeune microgamétocyte binucléé. 7 — Jeune microgamétocyte plurinucléé. 8-9 — Microgamétocytes plurinucléés dans les phases ultérieures du développement. 10 — Microgamétocyte plurinucléé à l'époque de la migration des noyaux sur la périphérie. 11 — Microgamétocyte plurinucléé à l'époque du commencement de la formation des microgamètes. 12 — Microgamétocyte plurinucléé dans la phase ultérieure de la formation des microgamètes; matériel chromatique sous forme de filaments. 13 — Microgamétocyte plurinucléé dans la phase tardive de la formation des microgamètes; matériel chromatique sous forme de cercle ou de fer à cheval. 14 — Microgamétocyte adulte dans la dernière phase de la formation des microgamètes. 15 — Microgamétocyte mûr avec des microgamètes formés

Pendant la croissance les noyaux se retirent et se repartissent à la surface du microgamécyte (Fig. 10). A cette période les contours des karyosomes disparaissent et le matériel nucléaire est représenté par de petits groupes de fins filaments à la surface du gamonte (Fig. 11 et 12). Plus tard, ces petits groupes deviennent plus compacts et prennent une position caractéristique. La masse nucléaire prend bientôt l'aspect de cercle ou de fer à cheval (Fig. 13); généralement il y a une certaine protubérance sur une partie du bord du cercle ou du fer à cheval. Au cours de la formation ultérieure des microgamètes les noyaux prennent l'apparence de courtes et grosses virgules (Fig. 14); plus tard, ils s'allongent et s'amincissent de sorte que le microgamète formé a l'aspect d'une fine et longue virgule (Fig. 15). Il est composé surtout par le matériel nucléaire et nous n'avons pas pu constater sa partie cytoplasmique. Les microgamètes mûrs mesurent 3.7 μm de long et ont deux flagelles, une plus longue et une plus courte. Pendant la maturation du microgamécyte le cytoplasme montre une coloration plus claire et prend une structure réticulaire. Très souvent le cytoplasme forme des replis le long desquels se forment les microgamètes ou il se fragmente en quelques îlots dont chacun devient le centre de formation des microgamètes.

Les résultats des recherches morphologiques de la gamétogenèse mâle sont confirmés par les analyses cytochimiques (Marinček 1967). L'aspect de la disposition du matériel nucléaire au cours de la microgamétogenèse est en accord complet avec l'aspect qu'on obtient par les recherches cytochimiques. Ces analyses ont montré également que les microgamètes étaient composés en majeure partie de matériel nucléaire riche en DNA et que le cytoplasme des microgamécytes, au cours de leur maturation, présente une diminution d'intensité de la réaction sur les protéines.

Les microgamécytes adultes sont généralement d'aspect oval et varient quant à leur taille. Nous avons trouvé des microgamécytes mûrs mesurant $12.5\text{--}46.8 \times 6.2\text{--}23.4 \mu\text{m}$. Ils sont placés séparément entre les macrogamètes dans l'épithélium, mais ils peuvent parfois former de gros amas dans les cellules voisines. Ils sont moins nombreux que les macrogamètes. Le rapport entre les microgamécytes et les macrogamètes est de 1:7.

Le développement des macrogamètes se déroule aussi en majeure partie dans l'épithélium de la muqueuse intestinale. Les jeunes stades sont sphériques avec un cytoplasme homogène et un grand noyau clair. La grandeur du karyosome est remarquable déjà chez les toutes jeunes formes (Fig. 16). Pendant la croissance, le noyau prend l'aspect étoilé avec un certain nombre d'excroissances et son contenu devient plus dense et prend une teinte plus foncée. Le karyosome grandit au cours de la croissance du gamète tandis que plus tard, à la période de la fécondation il disparaît. Il est remarquablement plus grand chez les macrogamètes que chez les microgamécytes. Il paraît que la grandeur du karyosome est en rapport avec l'intensité du métabolisme que prouve la dynamique des changements de ses proportions au cours de la croissance et du développement des macrogamètes. Saute aux

yeux la présence d'un grand karyosome aux stades qui sont en période de croissance intense et sa disparition quand la croissance est terminée. Ce fait est constaté aussi chez les autres espèces de Coccidies telles que chez *E. tenella* (Scholtyseck 1953), *E. intestinalis* (Cheissin 1958), *E. acervulina* et *E. brunetti* (Pattillo and Becker 1955) et cela s'explique par sa participation probable dans les processus synthétiques. L'intensité du métabolisme au cours de la croissance des macrogamètes est plus grande que chez les microgamétocytes d'où s'ensuit que les différences dans la grandeur des karyosomes sont compréhensibles. L'analyse cytochimique de notre matériel ainsi que les études analogues des autres espèces de Coccidies (*E. intestinalis*, *E. magna*, *E. coecicola*, *E. acervulina*, *E. brunetti*) ont prouvé que le karyosome contient des matières qui sont liées à la synthèse des protéines, en premier lieu l'acide ribonucléique (Cheissin 1958, 1960, Pattillo and Becker 1955, Beyer 1963, Beyer and Ovchinnikova 1966, Marinček 1967), ensuite des nucléotides libres de purines, des groupes SH de protéines, du glutathion, de la cysteine libre (Beyer 1963), de la phosphatase acide et alcaline (Beyer 1963, Marinček et Miljkovič 1972).

On peut remarquer pendant la période de croissance d'importants changements aussi dans le cytoplasme des macrogamètes. Tout d'abord apparaissent plusieurs petits granules qui se colorent par l'hématoxyline dans la nuance foncée; plus tard ils s'agrandissent et leur nombre augmente. Chez les macrogamètes mûrs ces granules sont de proportions différentes, ils atteignent souvent la grandeur de karyosome. Leur nombre est différent et il peut s'élever jusqu'à 15 (Fig. 16-19). Nous avons établi par l'examen cytochimique que ces granules sont de nature protéique et qu'ils participent dans la formation des enveloppes des spores. Moroff et Fiebiger (1905) considéraient que ces granules ont pris naissance à l'occasion de la réduction du matériel chromatique.

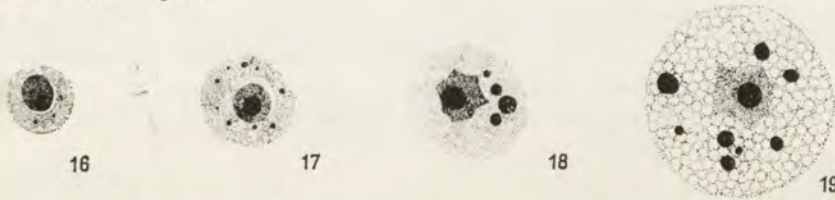


Fig. 16-19. La macrogamétogenèse de *Eimeria subepithelialis*. 16 — Jeune macrogamète. 17 — Macrogamète un peu plus âgé; noter dans le cytoplasme des granules protéiques qui montrent une très forte coloration et des grains clairs de glycogène. 18 — Macrogamète dans une phase un peu plus reculée de son développement. 19 — Macrogamète mûr; noter dans le cytoplasme de gros granules protéiques et une importante agglomération de grains de glycogène

En outre, au cours du développement des macrogamètes, certains autres granules apparaissent dans le cytoplasme qui sont découverts par l'analyse cytochimique (Marinček 1967). Nous avons constaté qu'ils sont de caractère des hydrates carboniques, peut être de caractère des mucopolysaccharides et que plus tard ils forment les membranes des oocystes et des spores. Quand la croissance des macrogamètes touche à sa fin, de grandes quantités de glycogène se chargent sous forme de granules

qui apparaissent en premier lieu dans la zone autour des noyaux et plus tard ils remplissent le cytoplasme tout entier (Fig. 17-19).

Quoique la macrogamétogenèse se déroule dans la couche épithéliale les macrogamètes mûrs quittent l'épithélium et d'une certaine manière ils émigrent dans la couche sous-épithéliale (Pl. III 6, 7). Dans les phases précoces de la gamogonie nous n'avons jamais découvert les gamontes femelles dans la couche sous-épithéliale mais seulement dans l'épithélium. Cependant, dans les stades tardifs de l'évolution, dans le domaine des nodules, on a pu constater d'importantes agglomérations d'oocystes dans le tissu sous-épithélial conjonctif (Pl. III 8). Ils sont répartis en cet endroit avec densité, souvent sur toute la profondeur de la paroi intestinale jusqu'à la couche musculaire, en détruisant dans une large mesure le tissu dans lequel ils se trouvent.

On a pu constater un phénomène analogue de migration aussi chez certaines autres Coccidies dans les différents stades de l'évolution. Nous ne pouvons pas préciser de quelle manière les macrogamètes *E. subepithelialis* émigrent dans le tissu sous-épithélial. Dans beaucoup de cas on voit autour de l'oocyste le reste de la cellule épithéliale sous forme d'une mince ceinture avec le noyau qui est repoussé à un bout. Il est possible que les cellules avec les parasites sont tout simplement repoussées de la couche de l'épithélium. D'autre part, nous avons pu constater les oocystes mêmes qui découlaient des cellules épithéliales fortement détruites, sur la voie vers la couche sous-épithéliale, ce qui indiquerait un mode actif éventuel de la migration.

Il est intéressant que le passage des macrogamètes dans la couche sous-épithéliale s'effectue alors que leurs réserves glycogéniques sont déjà formés. La position épithéliale est incontestablement dans ce sens plus favorable que le placement sous-épithélial.

Etant donné que les microgamétocytes sont localisés dans l'épithélium et qu'en cet endroit s'effectue aussi le développement et la maturation des macrogamètes, leur fécondation se réalise, certainement, dans l'épithélium ou dans sa proximité; les macrogamètes qui viennent seulement d'être fécondés sont toujours situés plus près des couches superficielles du tissu sous-épithélial.

Le processus de croissance et d'évolution des individus sexuels, à partir de toutes petites formes qui peuvent être constatées dès la première manifestation de l'infection, au début du printemps, jusqu'à l'apparition des macrogamètes fécondés, dans les conditions naturelles, découle à la température de l'eau dans l'étang de 7°C à 14°C et dure de 8 à 12 jours.

En s'enveloppant les macrogamètes fécondés forment une membrane mince à deux contours qui n'a pas de micropyle. Cette membrane est fragile, très délicate et elle se détruit facilement. Chez la plupart des Coccidies des poissons la paroi oocystique est plus ou moins mince. Une exception présentent seulement *E. intestinalis* (syn. *E. cheni*) et *E. mylopharyngodoni* de l'amour noir (*Mylopharyngodon piceus* — Chine), ensuite *E. sinensis* de *Hypophthalmichthys molitrix* — Chine, ainsi que *E. syngnathi* de *Syngnathus nigrolineatus* du bassin du Don (Bychowsky 1962).

L'apparition des membranes minces chez les oocystes des Coccidies des poissons est incontestablement en rapport avec le fait que ceux-ci arrivent dans l'eau de telle sorte qu'ils n'ont pas besoin de mesures protectrices contre l'assèchement, comme c'est le cas des oocystes des Coccidies parasitant les Vertébrés terrestres qui ont, généralement, des membranes plus épaisses, plus solides et très résistantes. Cependant, à en juger d'après les données de la littérature, la membrane des oocystes d'*E. subepithelialis* est plus délicate et moins résistante en comparaison avec les Coccidies des autres poissons. Les recherches cytochimiques ont prouvé qu'elle consiste seulement en une couche de nature des hydrates carboniques, peut être de nature des mucopolysaccharides. La participation des protéines dont la présence est liée à l'hémi-perméabilité de la membrane est presque complètement absente. Chez les Coccidies des lapins (*E. intestinalis*, *E. magna*, *E. coecicola*) Cheissin (1958) et Beyer (1963) ont constaté que la membrane des oocystes consiste en deux couches, dont la couche externe est mucoprotéique et la couche interne protéique. La constitution chimique spécifique de la membrane des oocystes d'*E. subepithelialis* entraîne probablement comme conséquence la faible résistance contre l'action des facteurs physiques et chimiques. Les membranes des spores ont la principale fonction protectrice chez cette espèce. Elles ne sont pas plus épaisses que la membrane des oocystes, mais elles diffèrent d'elle par leur composition chimique: elles consistent en deux couches dont l'une est de nature protéique et l'autre de nature des hydrates carboniques. La plus grande partie du matériel protéique des macrogamètes destiné à la formation des membranes, est employée à l'édification des membranes des spores qui assument la fonction de la membrane des oocystes.

Peu de temps après la fécondation du macrogamète commence la première division du synkarion. Dans la copule pendant la première division apparaît un fort allongement du noyau diploïde (Fig. 20). À cette époque on ne peut plus constater le karyosome. Immédiatement après la première commence la deuxième division du noyau; à ce moment — là le cytoplasme se rétracte et les premiers signes de plasmotomie apparaissent (Fig. 21). Ensuite, tout le cytoplasme se partage de sorte que le reliquat cytoplasmique n'existe pas. L'espace entre la membrane des oocystes et des sporoblastes est rempli de liquide qui est d'une couleur rosée pale. Sur les coupes histologiques colorés, sur la périphérie des sporoblastes (Fig. 22) on voit le matériel des granules protéiques qui ne sont plus ronds mais représentent des corpuscules allongés, qui ont plus tard la tendance de se joindre à la surface des sporocystes (Fig. 23). C'est de ces granules protéiques et des granules de nature des hydrates carboniques qui sont restés dans le cytoplasme des sporoblastes après la formation de l'enveloppe de l'oocyste que se forment les membranes des spores.

Les oocystes sont le plus souvent arrondies (Fig. 24), dans la plupart des cas d'une grandeur de 15.6 à 18.7 μm , mais il y en avait dont la grandeur atteignait 20–21 μm et même 25 μm . Les spores sont longues de 9.3–12.5 μm et larges de 4.6–6.2 μm .

Les sporozoïtes sont allongés avec une extrémité obtuse et l'autre qui est plus pointue. Le noyau est généralement un peu poussé vers l'extrémité obtuse. Ils se distinguent par la présence d'un ou deux gross globules, dont l'un est généralement sur l'extrémité antérieure et l'autre sur l'extrémité postérieure des sporozoïtes (Fig. 25).

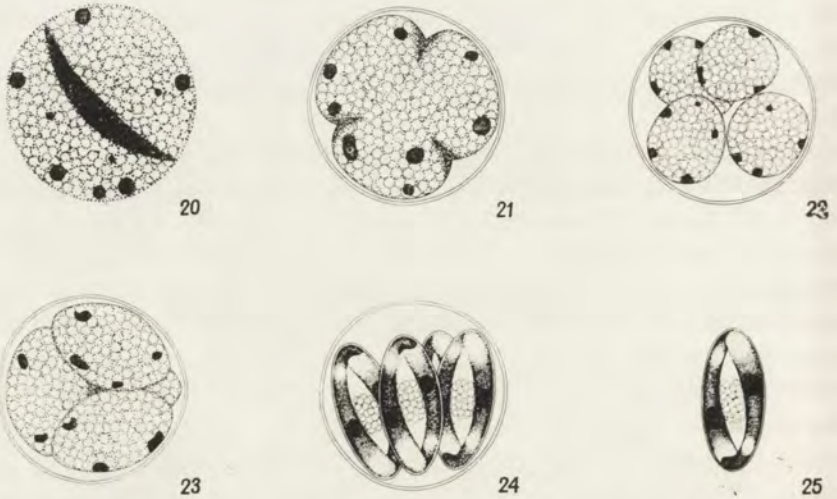


Fig. 20–25. *Eimeria subepithelialis*. 20 — Première division du noyau après la fécondation. 21 — Plasmotomie au cours de la formation des sporoblastes. 22 — Oocyste avec sporoblastes; noter sur la périphérie des sporoblastes le matériel des granules protéiques. 23 — Oocyste en période de formation des sporocystes 24 — Oocyste mûr, 25 — Spore

Ces globules réfractent fortement la lumière. Nous avons établi par l'analyse cytochimique qu'ils sont de nature protéique, mais leur fonction n'est pas encore connue. A l'occasion de la division du cytoplasme, dans le processus de formation des sporozoïtes, une partie reste inutilisée sous forme de reliquat dans lequel se maintient une importante quantité de réserves glycogéniques nécessaires à l'entretien de l'activité vitale des sporozoïtes.

La sporulation chez *E. subepithelialis* se déroule généralement dans le tissu de l'hôte, ce qui est caractéristique pour les Coccidies des Vertébrés poïkilothermes et de certains Invertébrés. Tel est le cas des Coccidies des poissons qui, par conséquent, diffèrent par le caractère de leur métabolisme des Coccidies des homéothermes; elles se servent pour ce processus de l'oxygène du tissu environnant. Il y a, cependant, certaines Coccidies des poissons qui mûrissent entièrement dans le milieu extérieur, telles que *E. pigra* chez *Scardinius erythrophthalmus* (Bychovsky 1962) et *E. raiarum* chez la raie (Grassé 1953). Quoique chez les homéothermes la sporulation est exogène, il y a certaines espèces chez lesquelles elle s'écoule dans l'organisme de l'hôte: *Isospora bigemina* chez les chiens et les chats effectue la sporulation dans le tissu

sous-épithélial de l'intestin (Davis et al. 1963) et *Cryptosporidium parvum* qui parasite le souris peut mûrir de même en passant par l'intestin de l'hôte (Tyzzer 1912).

A l'occasion de l'examen du cycle évolutif d'*E. subepithelialis* dans les conditions naturelles nous avons constaté la possibilité de l'émission des oocystes non-segmentés dans le milieu environnant. Ce fait intéressant est incontestablement la conséquence de la forte destruction de la paroi intestinale que cette espèce peut provoquer. Cette circonstance nous a incitée à examiner expérimentalement si la sporulation est possible aussi dans le milieu extérieur chez cette espèce caractéristique d'après sa localisation sous-épithéliale profonde et la sporulation endogène dans les conditions mi-anaérobies. Les oocystes non-segmentés sont laissés dans l'eau à la température du laboratoire et le matériel est périodiquement contrôlé à l'état frais. Les expériences ont fait ressortir que le processus de sporulation peut être effectué avec succès dans le milieu extérieur. Ce fait indique la haute spécificité du métabolisme d'*E. subepithelialis* par rapport aux autres espèces de Coccidies des poissons qui s'est développée en conséquence des conditions spéciales de la vie.

La sporulation dans les conditions naturelles commence quand la température de l'eau dans l'étang atteint 14°C. Lorsque la température de l'eau est entre 10°C et 14°C 98% de formes se trouvent encore dans la phase des macrogamètes et des oocystes non-segmentés et seulement 2% des oocystes sporulent. Dans un délai de cinq jours à la température de l'eau entre 14°C et 17°C le pourcentage des oocystes sporulés atteint déjà 79.4% et au total 20.6% reste non-sporulés. Quand la température s'élève à 17°C et au-dessus, 97.2% des oocystes sporulent et mûrissent entièrement. Dans les conditions expérimentales, à la température du laboratoire (de 18°C à 25°C) la durée de la sporulation est de 22 à 40 heures. Par conséquent, le processus de sporulation dépend de la température du milieu environnant, il s'écoule plus vite à une température élevée, tandis qu'à une température déterminée il est d'une durée déterminée. Dans les conditions naturelles, à la température de l'eau de 14°C à 17°C sa durée est de cinq jours et à une température plus élevée (18-25°C), en dehors du corps de l'hôte, sa durée n'est que de 22 à 40 heures.

Il est intéressant de comparer la durée de la sporulation exogène d'*E. subepithelialis* qui parasite l'hôte poïkilotherme et d'*Isoospora bigemina* qui parasite les chiens et les chats et qui représente une exception parmi les Coccidies des homéothermes, car vu qu'elle termine complètement sa évolution dans l'organisme de l'hôte, elle peut de même, en cas d'infection aiguë, arriver dans le milieu environnant non-segmentée. Tandis que *E. subepithelialis* achève sa maturation dans un délai de 22 à 40 heures à la température de 18-25°C, pour la sporulation d'*I. bigemina* il est nécessaire que 96 heures s'écoulent à la température de 30°C (Davis et al. 1963). Peut être que cette différence s'ensuit de l'adaptation des parasites aux différentes conditions de température de la sporulation habituelle.

E. subepithelialis se distingue encore par une autre caractéristique très marquante qui consiste en ce que dans le tissu de l'hôte s'accomplit déjà la destruction des enveloppes chez un grand nombre d'oocystes par suite de quoi les spores se libèrent.

Sur les coupes histologiques de l'intestin infecté, ainsi qu'à l'examen des excréments des poissons infectés à l'époque de la sporulation des oocystes, on peut constater un grand nombre de spores libres (Pl. III 9); leur nombre est plus élevé que celui des oocystes. La possibilité de la libération des spores est en rapport avec la faible solidité de l'enveloppe des oocystes, ce qui est certainement la conséquence de sa constitution chimique spécifique. La fonction principale de la protection chez cette espèce est assumée par les membranes des spores. Chez toutes les Coccidies des poissons et des autres animaux, connus jusqu'à présent, la destruction des oocystes s'effectue seulement lorsqu'ils arrivent dans le nouvel hôte. Le phénomène de l'arrivée des spores libres dans le milieu extérieur a été jusqu'à présent remarqué seulement chez *I. bigemina* (Davis et al. 1963).

L'évacuation des spores et des oocystes mûrs dans le milieu extérieur est réalisable par la forte destruction de l'épithélium et du tissu sous-épithélial de la muqueuse et de la sous-muqueuse qui est la conséquence du développement de cette espèce de Coccidies. La durée de l'émission des stades infestants chez cette forme est d'un mois et demi à trois mois, quoiqu'elle puisse être aussi d'une plus longue durée. Nous avons pu constater parfois, vers la fin de la période patente, au mois de juin, quelques taches blanchâtres minuscules sur la paroi intestinale qui représentaient le reste des nodules, c'est à dire l'ensemble d'un petit nombre d'oocystes et de spores qui se sont maintenus en cet endroit. Ils étaient entourés d'une membrane conjonctive; ainsi enfermés dans une sorte de capsule conjonctive ils doivent, incontestablement, dégénérer au bout d'un certain temps.

Nos recherches expérimentales ainsi que les examens effectués dans les conditions naturelles ont prouvé la grande dépendance du cycle évolutif de la température du milieu environnant. L'influence de la température sur l'évolution des Coccidies est étudiée surtout chez les hôtes terrestres homéothermes et, en général, sur le processus de sporulation qui, chez les Coccidies de ces organismes, s'écoule dans le milieu extérieur. L'influence de la température sur le développement des Coccidies des poissons n'a presque pas été l'objet de recherches jusqu'à présent. Il n'y a que les données que Zmerzlaja a exposé (1969) sur l'influence de la température sur *E. carpelli* qui, de même, parasite la carpe.

Nous avons étudié par voie expérimentale l'action des températures différentes sur une phase déterminée de l'évolution, notamment sur celle de gamogonie et celle de sporogonie chez *E. subepithelialis*.

Au début du printemps, dans la phase initiale de la gamogonie, nous avons transporté 170 jeunes carpes dans le laboratoire. A cette époque la température de l'eau dans l'étang était d'environ 7°C. Nous avons divisé les poissons en trois groupes et nous les avons exposés à des températures différentes. Le premier groupe a été maintenu dans les conditions de basse température qui variait de 3°C à 5°C; le deuxième groupe se trouvait à une température de 13°C à 14°C et le troisième groupe à 17°C. Neuf jours après le commencement de l'expérience les poissons ont été sacrifiés.

fiés, le tractus intestinal a été examiné et on a constaté le stade de développement de ce parasite.

Dans le premier groupe de poissons le développement a été très inhibé: 92.6% des individus étaient au stade de très jeunes gamètes et seulement 7.4% étaient au stade de macrogamètes adultes et fécondés et des oocystes avec des signes à peine perceptibles du commencement de la sporulation. Dans le groupe des poissons qui ont été exposés à la température de 13–14°C l'évolution a progressé beaucoup plus vite: la gamétogenèse a été complètement achevée, la fécondation a été effectuée, les oocystes étaient déjà formés et la majeure partie de ceux-ci a été sporulée. Nous avons constaté que 71.5% d'oocystes ont complètement mûri en terminant le processus de formation des spores et des sporozoïtes, tandis que seulement 28.5% étaient encore dans les phases antérieures de l'évolution, au stade de macrogamètes mûrs et fécondés. Dans le groupe des poissons qui étaient exposés à la température de 17°C les processus de gamogonie et de sporogonie étaient définitivement achevés: 96.6% des individus étaient au stade des oocystes sporulés et on pouvait constater qu'un grand nombre de spores étaient déjà libérées. Par conséquent, on peut conclure que la température de 3°C à 5°C agit défavorablement sur le développement de la génération sexuelle, en provoquant l'inhibition de l'évolution des gamètes; la température de 13–14°C favorise la gamogonie et la sporogonie, tandis que la température de 17°C peut être considérée comme étant optimale pour le développement de la génération sexuelle.

Donc, nos expériences confirment tout à fait les résultats de nos recherches effectuées sur le terrain. Sur la base de nos investigations on peut conclure que la gamogonie découle à la température de l'eau inférieure à 13–14°C. Elle commence à la température de 7°C et elle prend fin à la température d'environ 14°C, et précisément c'est à cette température que la sporogonie commence en masse. Le développement s'achève complètement à l'époque où l'eau dans l'étang atteint environ 17°C et alors commence la phase de la dispersion. Cette température c'est justement la plus basse température du frai des carpes. Par conséquent, les stades infestants arrivent dans l'eau de l'étang à l'époque de l'apparition de nombreux alevins de carpe qui sont les plus susceptibles à l'infection.

Discussion

Les données exposées jusqu'à présent dans la bibliographie sur l'évolution d'*E. subepithelialis* sont fragmentaires, car elles ne comprennent que certains aspects du cycle évolutif. Les données qui se rapportent surtout à la schizogonie sont incomplètes et elles se rapportent seulement à la dernière phase de ce processus. Nos données au sujet du développement de la dernière génération agame diffèrent partiellement des données dans la bibliographie. Ainsi Moroff et Fiebiger (1905) signalent que les schizontes qu'ils ont découverts en même temps que les formes se-

xuelles, au printemps, et qui correspondraient certainement à la génération des schizontes que nous avons constatés à cette époque, contiennent 8 à 11 mérozoïtes souples, dont la longueur est de 8 μm et largeur de 0.5 à 1 μm , et qui sont répartis longitudinalement autour du reliquat cytoplasmique. Les mérozoïtes interfèrent de telle sorte que jusqu'à chaque pôle de schizonte s'étendent les bouts de chaque autre mérozoïte. Nous n'avons pas constaté cette disposition des mérozoïtes; dans nos schizontes ils sont répartis sans ordre. Le nombre des mérozoïtes chez nos schizontes peut être plus élevé (jusqu'à 17) et leur longueur est bien plus petite (3.3 à 6.1 μm), par rapport aux mérozoïtes qui ont été décrits par Moroff et Fiebiger. Ces auteurs n'ont pas précisé la position des schizontes, de même ils n'ont pas indiqué leur grandeur, de sorte que dans ce sens nous ne pouvons pas effectuer des comparaisons. Ils ont signalé, cependant, qu'ils ont trouvé des stades très rares de la reproduction schizogonique.

Nos constatation en ce qui concerne le développement de cette espèce ne concordent pas avec les interprétations de Schäperclaus (1943). Cet auteur a signalé que les stades évolutifs, autant de la phase asexuée que de la phase sexuée, sont placés seulement dans la couche sous-épithéliale de la paroi intestinale. Il a signalé qu'il a trouvé seulement peu de stades qu'il considérait comme mérozoïtes; il n'a pas indiqué leur nombre mais il affirme qu'il les a constatés dans un plus grand nombre que Zschische (1914) et que leur longueur est de 10 à 12 μm . D'après la figure qu'il a présentée, il est possible que cet auteur avait observé, en réalité, au lieu des mérozoïtes — des sporozoïtes qui, parfois, en l'absence de la membrane des oocystes et la faible visibilité des enveloppes des spores ou leur destruction à l'occasion de la coupe du sujet, peuvent rappeler les mérozoïtes. La longueur qu'il a indiquée pour les mérozoïtes correspond justement à la longueur qu'il a donnée pour les sporocystes. En outre, la disposition des mérozoïtes sur la figure qu'il a présentée rappelle nettement la position qui est typique pour les sporozoïtes. Cet auteur n'a fourni aucune donnée sur les schizontes. Contrairement à Schäperclaus nous n'avons pas constaté les schizontes et les mérozoïtes dans la couche sous-épithéliale de l'intestin. La longueur de nos mérozoïtes est sensiblement plus petite que celle qui a été mentionnée par cet auteur.

Les résultats que nous avons obtenus dans les recherches des phases tardives de la schizogonie coïncident, cependant, avec les résultats obtenus par Zschische (1914) en ce qui concerne la localisation des schizontes. Il y a une analogie aussi dans la longueur des mérozoïtes. Zschische a trouvé des mérozoïtes d'une longueur de 4 à 6 μm , tandis que nous avons constaté que leur longueur est de 3.3 à 6.1 μm . Cependant, chez nos schizontes le nombre des mérozoïtes est généralement beaucoup plus grand (10 à 12) par rapport à leur nombre chez les schizontes que cet auteur a observés (5 à 6). Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de comparer la forme et la grandeur des schizontes, car Zschische n'a pas indiqué les caractéristiques morphologiques des schizontes examinés.

En se qui concerne le développement de la génération sexuelle il faut souligner que

nous avons trouvé une bien plus grande variabilité de grandeur des oocystes et des spores que les auteurs précédents. Les examens morphologiques qui sont complétés par les analyses cytochimiques ont permis d'élucider la nature et l'importance fonctionnelle de certains éléments structuraux et de découvrir certaines particularités physiologiques d'*E. subepithelialis*.

Les résultats de nos examens permettent de bien saisir le cycle évolutif d'*E. subepithelialis*.

L'infection des jeunes carpes a lieu probablement pendant les premiers mois de leur vie, au cours de l'été. Le fait que les premières phases de l'évolution s'écoulent à la température relativement élevée, ce qui est confirmé par nos expériences, plaide en faveur de l'affirmation plus haut mentionnée. Cependant, les stades évolutifs mûrs des parasites n'apparaissent qu'au printemps, chez les carpes qui n'ont pas encore atteint l'âge d'un an et chez celles qui sont âgées de moins de deux ans. Chez les carpes qui n'ont que quelques mois, nous n'avons jamais découvert, au cours de l'automne, des oocystes mûrs d'*E. subepithelialis*, ils n'apparaissent qu'au printemps prochain; nous avons pu observer les phases tardives de la schizogonie et le développement sexuel complet au printemps seulement. A cette époque on aperçoit le synchronisme frappant du processus d'évolution. Nous n'avons jamais pu constater en même temps chez certaines carpes des stades sexuels tout à fait initiaux et chez d'autres — des stades complètement mûrs, mais le processus d'évolution se déroulait plus ou moins parallèlement, dans ce concours de circonstances les stades déterminés apparaissent toujours à la température déterminée du milieu extérieur.

Par conséquent, le processus d'évolution commence, probablement, au cours de l'été et de l'automne quand les meilleures conditions existent pour la rencontre efficace du parasite et de l'hôte. A cette époque-là apparaît un grand nombre de jeunes poissons, en même temps que les stades virulents et infectifs des parasites, émis par les poissons infectés. Au cours de l'hiver l'évolution s'arrête au stade de la schizogonie tardive ou de la phase initiale de la gamogonie pour se poursuivre et se terminer complètement au printemps. La période prépatente est donc, chez *E. subepithelialis*, très longue et dure environ neuf mois.

Cependant, *E. subepithelialis* dans nos populations se distingue des populations vivantes dans les régions situées plus au nord de notre pays par son cycle évolutif de même que par son dynamisme saisonnier et celui des catégories d'un âge différent. En effet, Zschische (1914) et Bepalij (1959) déclarent d'avoir trouvé des oocystes mûrs chez les toutes jeunes carpes, âgées de 14 jours à 5 mois, c'est à dire au cours de l'été et de l'automne. Nous, au contraire, nous n'avons pas trouvé les oocystes mûrs chez les alevins du premier âge mais seulement chez les carpes d'une année, c'est à dire au printemps. On peut en conclure que le développement dans les conditions régnant dans notre pays dure plus longtemps parce qu'il inclut probablement un stade latent. Les examens des auteurs cités plus haut se rapportent, cependant, aux étangs qui se trouvent tout à fait au nord de l'Allemagne et au nord de l'Ukraine.

Les vérifications expérimentales et celles effectuées sur le terrain, concernant les rapports entre ce parasite et les facteurs du milieu environnant, surtout la température, nous ont permis d'expliquer ces différences en tant qu'adaptation du développement aux conditions spéciales du climat. Puisque la gamogonie s'écoule à la température de 7–14°C et la sporogonie à la température de 17°C, il est probable qu'en été la température élevée dans les étangs de notre pays, atteignant et dépassant même 30°C, provoque l'inhibition du processus de la gamogonie. Les conditions diverses de température se sont probablement reflétées sur la constitution génétique des populations locales. Par conséquent, ces variations du cycle évolutif peuvent être comprises en tant que l'expression de l'adaptation provenant de la sélection, grâce à la plasticité génétique de l'espèce.

Resumé

Les recherches ont montré que *Eimeria subepithelialis* Moroff et Fiebiger se distingue par une série de particularités écologiques et physiologiques par rapport aux autres Coccidies des poissons et des hôtes homéothermes.

L'infection des jeunes carpes s'effectue pendant les premiers mois de leur existence, au cours de l'été. La période prépatente dure à partir de l'été jusqu'au printemps prochain. La période patente est d'une durée d'un mois et demi à trois mois.

Au sujet de son cycle évolutif, ainsi que de la dynamique saisonnière et de la dynamique des différents âges, *E. subepithelialis*, dans nos populations, présente des particularités par rapport aux populations des régions septentrionales de l'Europe. Cela est, certainement, le reflet de l'adaptation des parasites aux conditions climatiques particulières. Les conditions de température différentes se sont reflétées, vraisemblablement, sur la constitution génétique des populations locales.

REZIME

Ispitivanja su pokazala da se *Eimeria subepithelialis* Moroff et Fiebiger odlikuje nizom ekoloških i fizioloških osobnosti u odnosu na druge kokcidije kako riba tako i homeotermnih domaćina.

Zaražavanje mladih šarana vrši se u toku prvih meseci njihovog života, i još u toku leta. Prepatentni period je vrlo dug i traje od leta do sledećeg proleća. Patentni period iznosi od jedan i po do tri meseca. Razviće pokazuje veliku zavisnost od temperature okolne sredine: svaki odredjeni stadium odvija se u odredjenim temperaturnim uslovima.

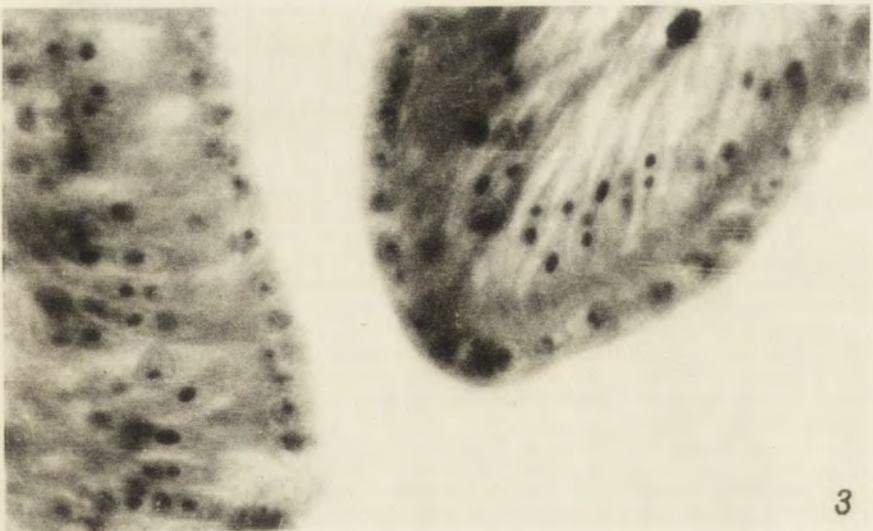
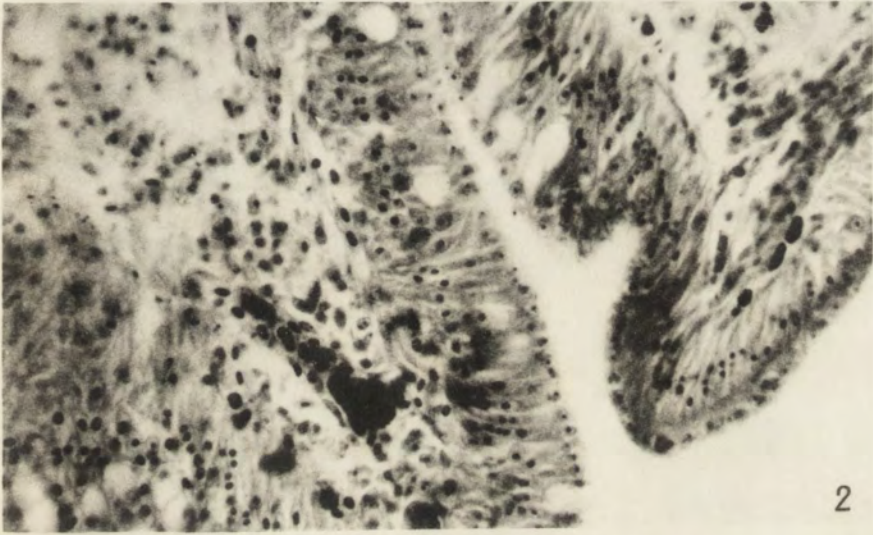
U pogledu svog razvojnog ciklusa kao i uzrasne i sezonske dinamike *E. subepithelialis*, u našim populacijama, pokazuje specifične osobnosti u odnosu na populacije iz severnijih oblasti Evrope. U uslovima koji vladaju u našoj zemlji, razviće ove vrste traje duže, jer uključuje izvestan latentni period. Ovo je, svakako, odraz adaptacije parazita na posebne klimatske uslove. Različiti temperaturni uslovi verovatno su se reflektovali na genetičku konstituciju lokalnih populacija. Ove promene životnog ciklusa mogu se shvatiti kao izraz adaptacije koja je nastala putem selekcije zahvaljujući genetičkoj plastičnosti vrste.

BIBLIOGRAPHIE

- Bespaliĭ I. I. 1959: Kokcidioz karpov v prudovyh hozjajstvah USSR. Trud. sovešč. bolezni. ryb, 49–52.
- Beyer T. V. 1963: Citohimičeskoe issledovanie kišečnyh kokcidii krolika pri raznyh uslovijah ih suščestvovanja v hozjaine. Avtoreferat kand. diss., Leningrad.
- Beyer T. V. and Ovchinikova L. P. 1966: A cytophotometrical investigation of the cytoplasmic RNA content in the course of oocyst formation in the intestinal rabbit coccidia *Eimeria intestinalis* Cheissin, 1948. Acta Protozool., 4, 75–80.
- Bychowsky B. E. (ed.) 1962: Opredelitel parazitov presnovodnyh ryb SSR. Izd. AN SSSR Moskva-Leningrad, pp. 776.
- Brandt T. von 1952: Chemical Physiology of Endoparasitic Animals. New York.
- Cheissin E. M. 1958: Cytologische Untersuchungen verschiedener Stadien des Lebenszyklus der Kaninchen-coccidien. I. *Eimeria intestinalis* E. Cheissin, 1948. Arch. Protistenk., 102, 265–290.
- Cheissin E. M. 1960: Citoģičeskoe issledovanie Źivnennogo cikla kokcidij krolika. II. *Eimeria magna* Pérard, 1924. Voprosy citologii i protistologii, 258–276.
- Cheissin E. M. 1967: Źivnenye cikly kokcidij domašnih Źivotnyh. Izd. "Nauka", Leningrad.
- Davis S. F. M., Joyner L. P. and Kendall S. B. 1963: Coccidiosis. London.
- Grassé P. 1953: Sous-embanchement des Sporozoaires. Classe des Coccidiomorphes. In: Traité de Zoologie, 1, 2, p. 691–797.
- Hammond M. D., Bowman G. W., Davis L. R., Simms B. T. 1946: The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*. J. Parasit., 32, 409–427.
- Marinček M. 1967: Citoheмиjska istraživanja pojedinih stadijuma Źivotnog ciklusa *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Eimeriidea). Archiv. bioloških nauka, 19, 23–36.
- Marinček M. 1973: Les changements dans le tube digestif chez *Cyprinus carpio* á la suite de l'infection par *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia). Acta Protozool., 12, 217–224.
- Marinček M. i Miljković G. 1972: Citoheмиjsko ispitivanje alkalne fosfataze u pojedinim stupnjevima razvića *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Eimeriidae). Acta parasitol. iugoslav., 3, 2 (sous press)
- Moroff T. and Fiebiger J. 1905: Über *Eimeria subepithelialis* n. sp. Arch. Protistenk., 6, 166–178.
- Pattillo W. H. and Becker E. R. 1955: Cytochemistry of *Eimeria brunetti* and *E. acervulina* of the chicken. J. Morph., 96, 61–97.
- Pellérdy L. and Molnár K. 1968: Known and unknown eimerian parasites of fishes in Hungary. Folia parasit., 15, 97–105.
- Rutheford R. L. 1943: The life cycle of four intestinal coccidia of the domestic rabbit. J. Parasit., 29, 10–32.
- Schäperclaus W. 1943: Die Darmcoccidiosen, insbesondere die Knötchencoccidiose des Karpfens. Z. Fisch., 41, 283–295.
- Tyzzar E. E. 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. n) a Coccidium found in the small intestine of the common mouse. Arch. Protistenk., 26, 394–412.
- Zmerzlaja E. I. 1969: Life cycle of *Eimeria carpelli* Léger et Stankovitsch. Progress in Protozoology, Abstr. Third int. Congr. Protozool., Leningrad, 1969, Nauka.
- Zschische A. 1914: Bemerkungen zur Entwicklung von *Eimeria subepithelialis*. Zool. Anz., 44, 67–75.

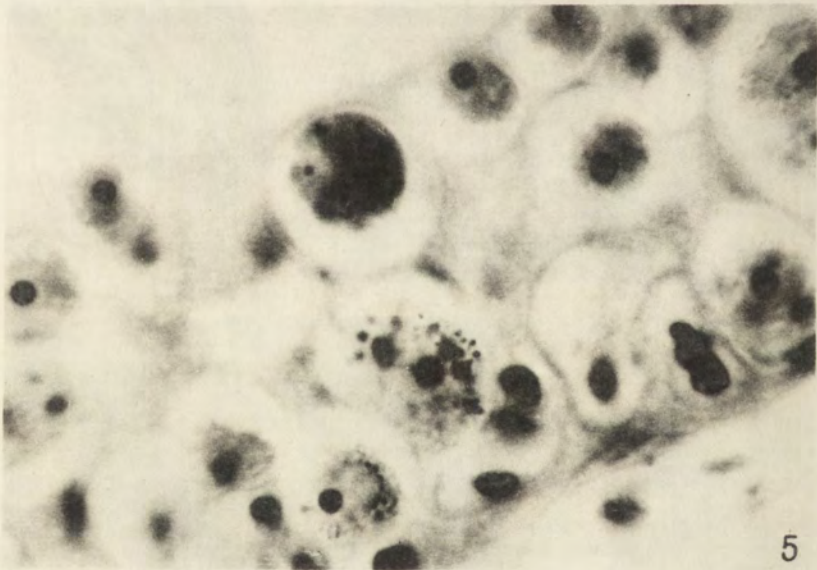
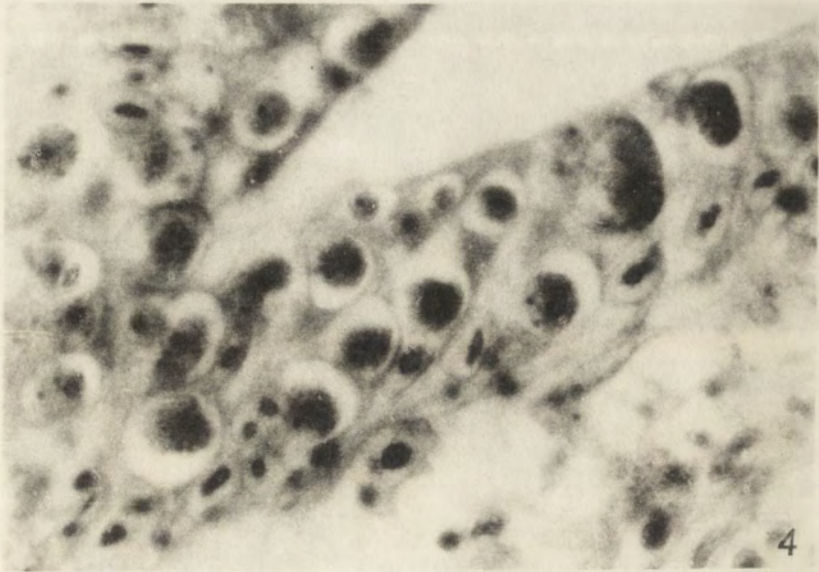
EXPLICATION DES PLANCHES I-III

- 1: Intestine d'une carpe âgée à peine d'un an qui est infectée par *Eimeria subepithelialis* montrant plusieurs nodules blanchâtres sur la partie arrière
- 2: Coupe de l'intestin de la carpe infectée par *E. subepithelialis*, montrant deux plis de la muqueuse intestinale; de très jeunes gamétocytes sont visibles dans la couche apicale des cellules épithéliales
- 3: Détail augmenté de la photographie 2
- 4: Épithélium de la crypte intestinale avec des macrogamétocytes et des microgamétocytes
- 5: Même que a la photographie 4, détail plus augmenté
- 6: Coupe de l'intestin de la carpe infectée par *E. subepithelialis* montrant la présence des macrogamètes mûrs dans la couche sous-épithéliale
- 7: Fragment de coupe de l'intestin de la carpe infectée montrant plusieurs plis de la muqueuse intestinale; noter dans l'épithélium de jeunes macrogamètes et microgamétocytes, et des macrogamètes fécondés et oocystes dans la couche sous-épithéliale
- 8: Fragment de coupe de l'intestin de la carpe infectée, au niveau de la couche sous-épithéliale de la muqueuse et de la sous-muqueuse; noter une multitude de macrogamètes fécondés et d'oocystes avec les spores
- 9: Fragment de la paroi de l'intestin avec les oocystes mûrs et les spores libres; l'épithélium détruit



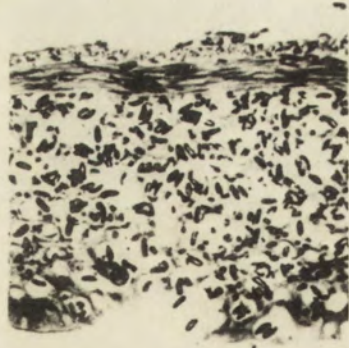
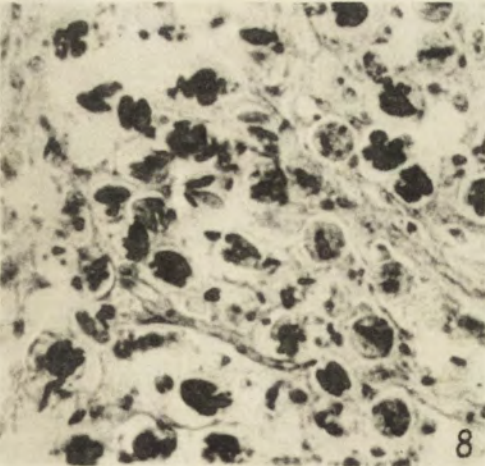
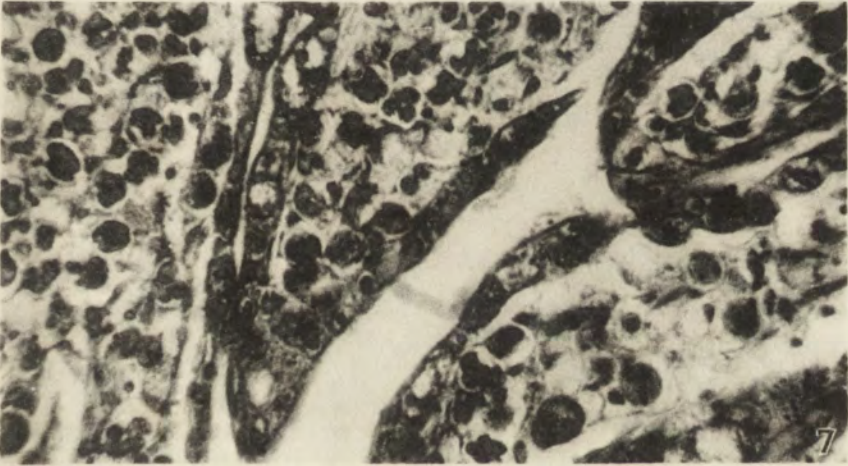
M. Marinček

auctor phot.



M. Marinček

auctor phot.



M. Marinček

auctor phot.

Magdalena MARINČEK

Les changements dans le tube digestif chez *Cyprinus carpio*
à la suite de l'infection par *Eimeria subepithelialis*
(Sporozoa, Coccidia)

Promene u crevnom traktusu *Cyprinus carpio* usled infekcije vrstom
Eimeria subepithelialis (Sporozoa, Coccidia)

L'effet pathogène d'*Eimeria subepithelialis* Moroff et Fiebiger 1905 sur l'organisme de l'hôte était peu connu jusqu'à présent. De plus les avis des auteurs précédents, en ce qui concerne l'effet pathogène de ce parasite, étaient contradictoires.

Moroff et Fiebiger (1905) ont publié le travail dont les données sur l'action pathologique de cette espèce de Coccidies étaient très insuffisantes. Ils disent que "la structure normale de la muqueuse est changée" et que "la couche épithéliale orientée vers la cavité intestinale s'est très bien conservée, seules les cryptes avaient disparues".

Zschische 1914 suppose que "la maladie comme telle ne se manifeste que lorsque les couches plus profondes du tissu conjonctif de l'intestin se trouvent atteintes à la suite du développement des stades sexuelles ce qui a pour conséquence la destruction des cellules". L'auteur cite que ses recherches ont été entreprises à la suite d'une mort massive des alevins dans un étang de Saxe causée par une infection par *Eimeria subepithelialis*.

Schäperclaus 1943 cite encore que les poissons atteints étaient maigres et que cela justement était le symptôme caractéristique par lequel se manifestait cette coccidiose. Il n'a constaté aucun changement et aucune destruction dans l'épithélium mais seulement dans la couche sous-épithéliale. C'est pourquoi l'auteur considère que chez cette espèce, vu sa localisation sous-épithéliale, l'émission d'oocystes mûrs et de spores dans le milieu environnant, n'a pas lieu. C'est justement dans la difficulté qu'ont ces stades de paraître dans le milieu extérieur que l'auteur voit la raison de la rareté de cette espèce de Coccidies en Allemagne. Schäperclaus considère que *E. subepithelialis* n'endommage pas l'épithélium de l'intestin et qu'elle n'a pas de grand effet pathogène. Puisqu'au cours de ses vingt années de recherches il n'a constaté qu'une fois *E. subepithelialis* il doute que ce soit bien cette espèce là qui ait

causé le peril des alevins de la carpe dans le cas décrit par Zschische, mais suppose qu'il s'agit là d'une hydropisie abdominale infectieuse ou d'un effet cause par d'autres protozoaires parasites.

Matériel et méthodes

Ces études ont été réalisées sur des coupes histologiques d'intestin effectuées dans la région de l'agglomération des parasites.

Des portions d'intestin infecté de la grandeur de 4 mm à 10 mm sont fixées dans différents fixateurs. Nous avons le plus souvent employé les mélanges de Bouin, de Schaudinn, de Zenker, de Carnoy, de Helly ainsi que le formol à 4%.

Le matériel est inclu dans la paraffine; les blocs sont coupés en coupes de l'épaisseur de 4 à 10 μm .

Pour la coloration des coupes nous avons employé plusieurs procédés; nous avons utilisé l'hématoxyline d'après Heidenhain avec la coloration supplémentaire à l'éosine ou au mélange de vert lumière et d'acide picrique ainsi que l'hématoxyline d'après Delafield avec coloration supplémentaire à l'éosine, puis l'hématoxyline d'après Weigert et l'hémalum-éosine.

Résultats

Au cours de nos recherches nous avons étudié les changements histopathologiques du tube digestif provoqués par *E. subepithelialis* Moroff et Fiebiger. Le cycle évolutif de cette espèce se déroule dans la paroi de l'intestin de la carpe en provoquant toute une série de changements (Marinček 1973).

Le processus de la reproduction agame qui englobe au moins trois générations de schizontes a lieu généralement dans l'épithélium; seulement quelques rares schizontes de la seconde génération peuvent être remarqués aussi dans la couche supérieure du tissu conjonctif de tunica propria. La première et la dernière génération agame est de très petite dimension (de 8 à 9.5 μm); la première se développe dans le cytoplasme des cellules épithéliales, au-dessus de leur noyaux. La dernière génération est également localisée dans la partie apicale des cellules de l'épithélium, quelquefois tout à fait superficiellement. Par conséquent, elles ne provoquent pas de changements trop évidents dans l'épithélium, bien que, naturellement, la présence des parasites soit la cause du déséquilibre du métabolisme des cellules infectées, tandis que la libération des mérozoïtes provoque une certaine lésion mécanique. La seconde génération des schizontes est située dans la partie basale des cellules épithéliales; par ses dimensions qui atteignent 11.5 \times 9.5 μm , elle cause des changements plus évidents des cellules attaquées. A la suite de la croissance des parasites, les cellules infectées s'élargissent, leur cytoplasme se retire vers la périphérie tout en formant une ceinture étroite qui enveloppe le parasite. Les noyaux de ces cellules sont alors repoussés de côté, aplatis et souvent dégénérés (Fig. 1).

La reproduction sexuelle provoque dans la paroi de l'intestin les changements beaucoup plus marquants et plus forts par rapport à la schizogonie. Ces changements

apparaissent déjà dans les phases initiales de l'évolution des formes sexuées et sont remarquables surtout dans les stades postérieurs de la gamogonie. Compte tenu du fait que les gamétocytes sont de loin plus nombreux que les schizontes et qu'ils forment de très grandes agglomérations, l'effet pathogène le plus accentué des parasites est lié justement à ce degré du cycle évolutif.

Les gamontes mâles se développent complètement dans la couche épithéliale; les macrogamètes commencent leur développement dans l'épithélium, mais plus tard, à l'époque de maturation et de fécondation, ils se déplacent vers le tissu sous-épithélial de la muqueuse et vers la sous-musqueuse où a lieu la sporogonie et où se forment les agglomérations des oocystes sporulés sous la forme de "nodules".

Les toutes jeunes formes sexuées se localisent superficiellement dans les parties apicales des cellules épithéliales. On peut souvent trouver dans une seule cellule deux ou même trois parasites. Parfois, les gamontes peuvent être remarqués dans les cellules glandulaires.

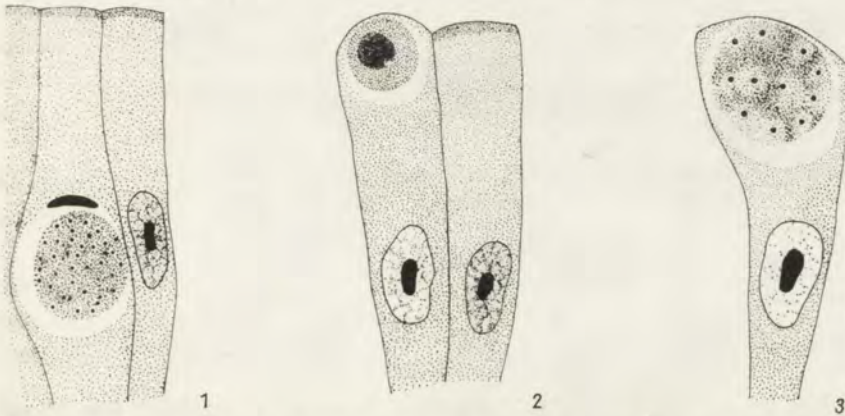


Fig. 1-3. Les changements dans le tube digestif chez *Cyprinus carpio* à la suite de l'infection par *Eimeria subepithelialis*. 1 — Déformation de la cellule épithéliale par suite de croissance du schizonte de la deuxième génération. 2 — Altérations dégénératives du noyau de la cellule-hôte par suite du développement du gamonte. 3 — Déformation de la cellule infestée et altérations dégénératives du noyau, conséquences qui suivent le développement du microgamétocyte

On remarque les premiers changements, provoqués par le développement des gamontes, sur les noyaux des cellules attaquées; leur chromatine est dégénérée, les nucléoles sont plus grands et le nucléoplasme plus clair par rapport aux noyaux des cellules épithéliales normales (Fig. 2). Les cellules infestées ont souvent la superficie apicale bombée et saillante au-dessus de la superficie de l'épithélium à cause de la présence des parasites et de leur localisation superficielle. Dans certains cas, on peut constater sur la superficie des cellules attaquées des parties sous forme des doigts tournés vers la cavité intestinale. On constate en plus une certaine tendance de libération des parasites; ils sont complètement repoussés dans la couche super-

ficielle, tandis que les cellules infestées sont souvent rejetées avec les parasites dans la lumière du tube digestif.

Au cours de la croissance des gamétoctes, les cellules épithéliales perdent leur forme cylindrique, elles s'élargissent et se déforment (Fig. 3); parfois dans la partie distante, où loge le parasite, elles sont élargies mais dans la partie proche elles sont rétrécies si bien qu'elles ressemblent à une coupe (Pl. I 1). A la suite de l'augmentation du volume des parasites le cytoplasme de la cellule attaquée se retire et, en même temps, ont lieu les altérations dégénératives des noyaux.

On peut constater, dans certains cas, chez les cellules épithéliales infestées, une hypertrophie remarquable (Fig. 4). La cause de ces phénomènes se trouve, sans aucun doute, dans les changements du métabolisme des cellules envahies, qui ont lieu à la suite de l'action mécanique et chimique du parasite intracellulaire et qui provoquent l'activation du métabolisme cellulaire et le gigantisme des cellules infectées. Il faut attirer l'attention sur le fait que la croissance démesurée de la taille n'apparaît que dans certains cas et qu'elle ne représente pas une réaction générale à la présence des parasites.

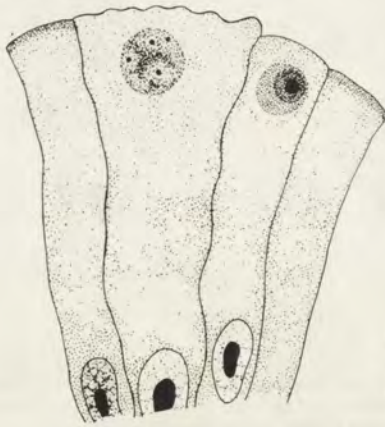


Fig. 4. Les changements dans le tube digestif chez *Cyprinus carpio* à la suite de l'infection par *Eimeria subepithelialis*. Hypertrophie d'une cellule épithéliale infestée

L'hypertrophie parasitaire est un phénomène présent dans la nature. On l'observe aussi chez quelques autres coccidioses; une forte hypertrophie est provoquée par *Caryotropha mesnili*, ainsi que par *Aggregata octopiana*, *Globidium novillei* etc. (Grasse 1953).

A la fin de la croissance des formes sexuées, les cellules épithéliales envahies sont plus ou moins détruites, tandis que leurs noyaux sont totalement dégénérés (Pl. I 2). Les changements des cellules et leur mort sont certainement causés non seulement par l'action mécanique des parasites mais aussi par des changements physiologiques, c'est à dire par un dérèglement de leur métabolisme normal. La dégénérescence totale des cellules épithéliales infestées provoque la chute des parties de l'épithélium ou bien, dans les cas d'une coccidiose aiguë, la desquamation de toute

la couche épithéliale aux endroits de l'agglomération des parasites. De cette façon lamina propria est tout à fait découverte (Pl. I 3-4, II 5-7).

La migration des gamètes féminins et leur agglomération dans le tissu conjonctif de la muqueuse et de la sous-muqueuse provoquent des changements et des lésions dans les couches citées (Pl. III 8). Les parasites se trouvent entre les éléments du tissu conjonctif. Compte tenu de leur grandeur remarquable (les oocystes atteignent au maximum 21-25 μm , tandis que les microgamétocytes atteignent au maximum $46.8 \times 23.4 \mu\text{m}$ et de leur grand nombre ils forment de vastes cavités tellement serrées que le tissu ressemble aux rayons de miel. A la suite de la forte destruction, les grandes parties du tissu des couches plus profondes de l'intestin se détachent dans la cavité ce qui provoque, à ces endroits, une sérieuse lésion de la paroi allant quelquefois jusqu'à la musculature (Pl. III 9, 10).

L'infection est accompagnée de processus inflammatoire; on remarque l'infiltration des lymphocytes aussi bien dans l'épithélium que dans le tissu sous-épithélial. Aux endroits de très profonde destruction, on a constaté l'agglomération des éosinophiles. En outre, dans les régions de la muqueuse intestinale, autour de l'agglomération des parasites, on a noté l'accroissement du nombre des cellules sécrétoires qui sont pleines de sécrétion, ce qui nous fait remarquer que le processus de sécrétion est très actif.

Dans la cavité de l'intestin on trouve d'habitude de nombreuses bactéries, ce qui est la conséquence de la décomposition des parties détachées de l'épithélium et du tissu conjonctif.

L'effet pathogène des parasites dépend de la grandeur de leur agglomération. Les parasites sont souvent entassés dans un grand nombre à partir de l'épithélium jusqu'à la couche de la musculature, en provoquant de cette sorte des lésions très profondes de la paroi intestinale. La destruction peut envahir une partie plus ou moins grande de l'intestin, ce qui dépend de la superficie de l'agglomération. L'examen microscopique de coupes d'intestins infectés montre que cette lésion peut être localisée tantôt dans une partie de la coupe intestinale tantôt sur toute la surface de la coupe en cas d'une infection grave. Au cours de nos recherches, nous avons pu, par rapport au stade de l'évolution des parasites et au degré de l'infection, constater tous les degrés de l'effet pathogène à partir de la dégénération partielle du tissu jusqu'à la perte totale de la muqueuse et même des éléments de la sous-muqueuse dans la zone de l'agglomération des parasites.

Nos recherches ont démontré qu'*E. subepithelialis* en plus de l'influence nocive qui se rattache à la lésion mécanique de l'intestin et des troubles qui découlent, amène le dérèglement du système enzymatique de l'hôte. Nous avons constaté la disparition de l'activité de la phosphatase alcaline au niveau de la microvillosité et dans les noyaux des cellules épithéliales, ensuite dans les noyaux des cellules du tissu conjonctif de la muqueuse et de la sous-muqueuse ainsi que dans les cellules de la musculature de l'intestin dans la région de l'agglomération des parasites (Marinček et Miljković 1972).

Discussion

Les changements de la muqueuse intestinale qui apparaissent comme la conséquence du parasitisme d'*Eimeria subepithelialis* provoquent, sans aucun doute, l'exclusion de la partie infestée de l'intestin des fonctions de la digestion et de l'absorption. Ce fait a une très grande importance dans les cas où l'infection envahit une grande partie du tube digestif.

En outre, la destruction de l'épithélium permet que les produits nocifs du métabolisme, ainsi que les produits de la décomposition, s'infiltrent dans le sang. La destruction de la paroi intestinale peut permettre la pénétration des bactéries pathogènes dans l'hôte. Il est possible que les lésions de la muqueuse provoquées par la coccidiose contribuent à l'apparition de l'hydropisie abdominale infectieuse chez la carpe, qui représente un grand danger pour les étangs car elle peut être la cause d'épidémie de grande envergure et anéantir plus de la moitié de la totalité des poissons. La coccidiose se combine très souvent avec la hydropisie abdominale et elle aggrave encore l'état du poisson malade.

La destruction de la paroi du tractus digestif de l'hôte permet l'émission des stades mûrs des parasites dans le milieu environnant. Cependant, à la suite du pouvoir de régénération de l'épithélium celui-ci se reconstitue. Dans certains cas, la régénération peut avoir lieu avant qu'une partie importante des parasites n'ait quitté l'hôte. C'est à cause de cela que l'on peut remarquer parfois, sur la coupe de l'intestin, que les parasites sont enfermés dans la couche sous-épithéliale où ils provoquent sa destruction, tandis que l'épithélium est normal. C'est ce fait, sans doute, qui a amené les auteurs antérieurs à considérer qu'*E. subepithelialis* se développe et provoque des changements uniquement dans la couche sous-épithéliale de l'intestin, tandis que l'épithélium reste intacte. Cependant, lors d'un examen systématique d'une série de coupes d'intestin effectuée au niveau de l'agglomération des parasites, on peut constater dans l'épithélium des régions plus ou moins dégénérées où se trouvent des oocystes, ceux qui se sont vraisemblablement développés les derniers. C'est dans ces régions que les destructions sont les plus faciles et où, par conséquent, la libération des parasites devient possible.

Ainsi, nos recherches mettent en questions les affirmations de Schäperclaus d'après qui *E. subepithelialis*, à cause de sa localisation sous-épithéliale ne parvient presque pas dans le milieu environnant et qu'elle n'a pas une grande influence pathologique sur l'hôte.

Resumant les faits exposés nous pouvons conclure qu'*E. subepithelialis*, en provoquant des changements pathologiques dans la paroi intestinale, peut amener à des altérations considérables du fonctionnement de l'intestin qui se reflètent sur la constitution de l'hôte. Les poissons attaqués sont d'habitude très maigres, les yeux enfoncés, les nageoires effrangées. Le résultat final de l'infection dépendra, de toute façon, de l'intensité de l'infection ainsi que de l'état générale du poisson infecté. Quand même, dans la plupart des cas un rétablissement spontané a lieu.

Résumé

L'effet pathologique d'*Eimeria subepithelialis* Moroff et Fiebiger dépend du stade du cycle évolutif et du degré de l'infection.

La schizogonie ne cause pas de changements trop évidents du tractus digestif. Elle est suivie d'une certaine lésion mécanique des cellules épithéliales attaquées, ainsi que d'une déformation et ces altérations dégénératives de leur noyaux.

La reproduction sexuelle provoque des changements beaucoup plus pathogènes. Ils se manifestent dans la dégénération totale, la destruction et la desquamation de l'épithélium et de la couche sous-épithéliale de la muqueuse et même des éléments de la sous-muqueuse dans la région de l'agglomération des parasites, ce qui provoque des lésions profondes et sérieuses, allant quelquefois jusqu'à la musculature. L'infection est suivie du processus inflammatoire.

On peut constater la perte de l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules de la paroi intestinale dans la zone de l'agglomération des parasites.

REZIME

Infekcija šarana vrstom *Eimeria subepithelialis* Moroff et Fiebiger izaziva niz značajnih promena u zidu crevnog traktusa domaćina.

Patogeni efekat parazita zavisi od stupnja njegovog razvojnog ciklusa kao i od stepena inficiranosti.

Šizogonija ne prouzrokuje značajnije promene u zidu creva; razviće bespolnih generacija je praćeno izvesnim mehaničkim oštećenjem napadnutih epitelijskih ćelija kao i deformacijom i degenerativnim promenama njihovih jedara.

Razviće polne generacije prouzrokuje mnogo jače i drastičnije patološke promene u odnosu na agamnu generaciju. Najveći patogeni efekat parazita vezan je upravo za ovaj stupanj razvojnog ciklusa. Ove promene se manifestuju u degeneraciji, razaranju i deskvamaciji epitelijskog i subepitelijskog sloja mukoze pa čak i elemenata submukoze na mestima aglomeracije parazita usled čega dolazi do stvaranja dubokih i ozbiljnih povreda koje ponekad dopiru skoro do sloja musculature.

Infekcija je praćena zapaljivim procesom. Osim toga, ona dovodi i do poremećaja enzimatskog sistema domaćina; može se konstatovati gubitak aktivnosti bazne fosfataze u ćelijama crevnog zida u oblasti nagomilavanja parazita.

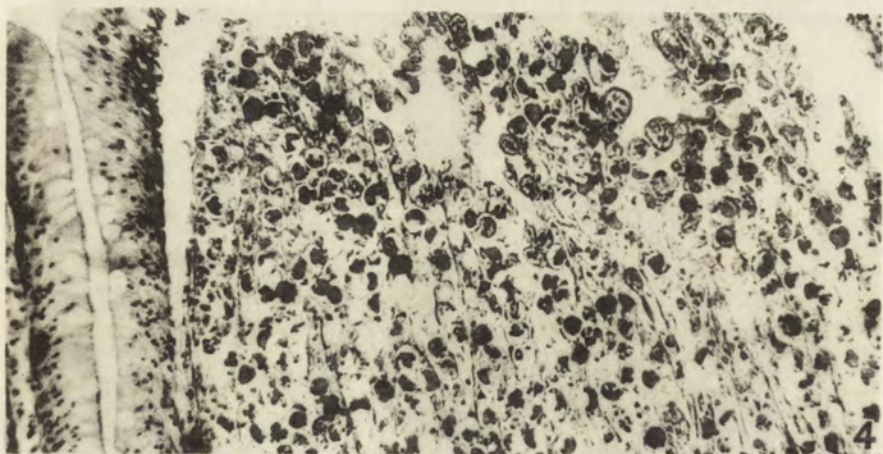
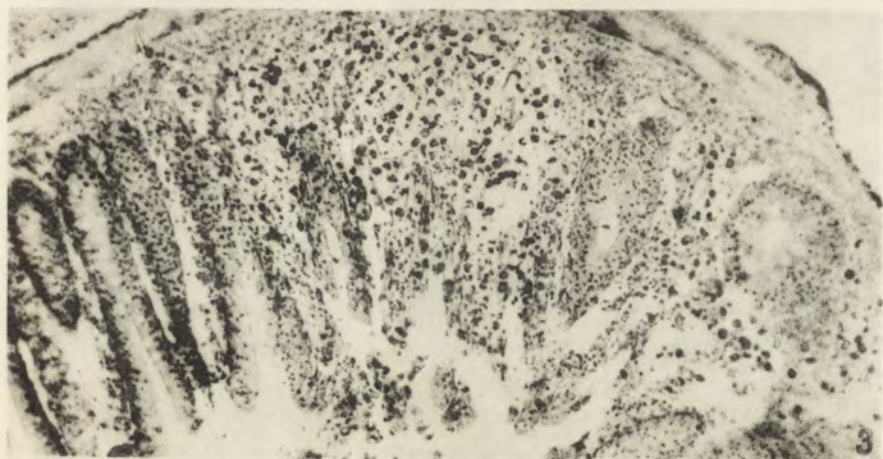
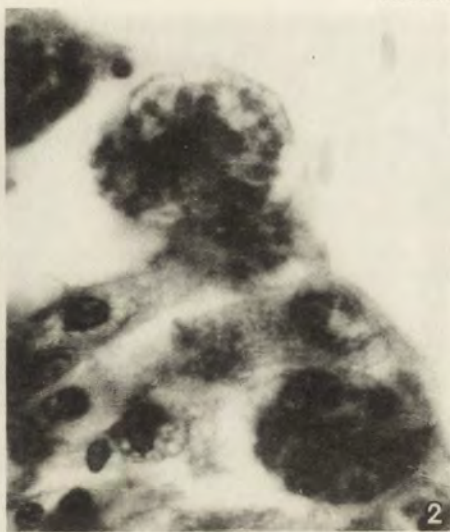
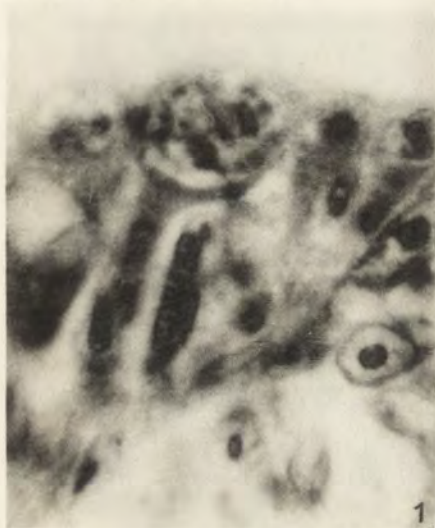
BIBLIOGRAPHIE

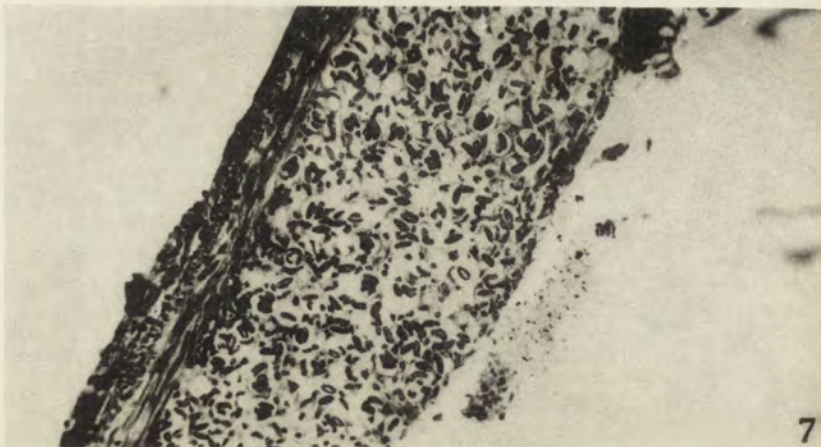
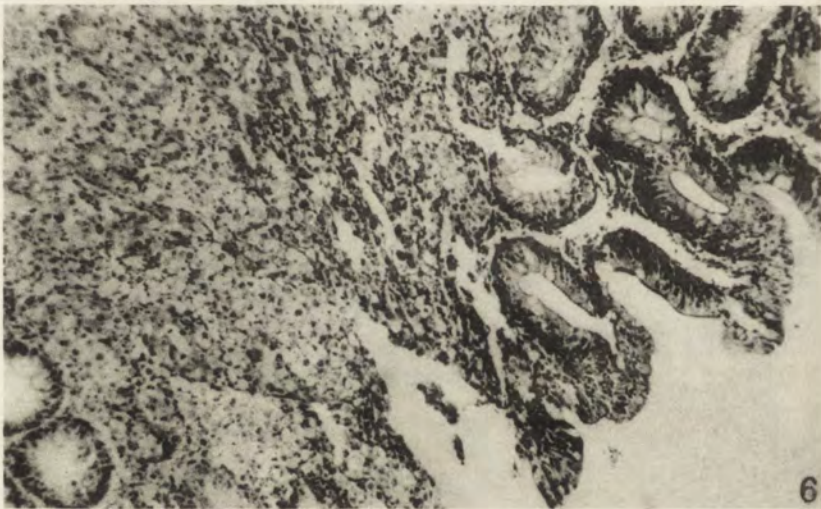
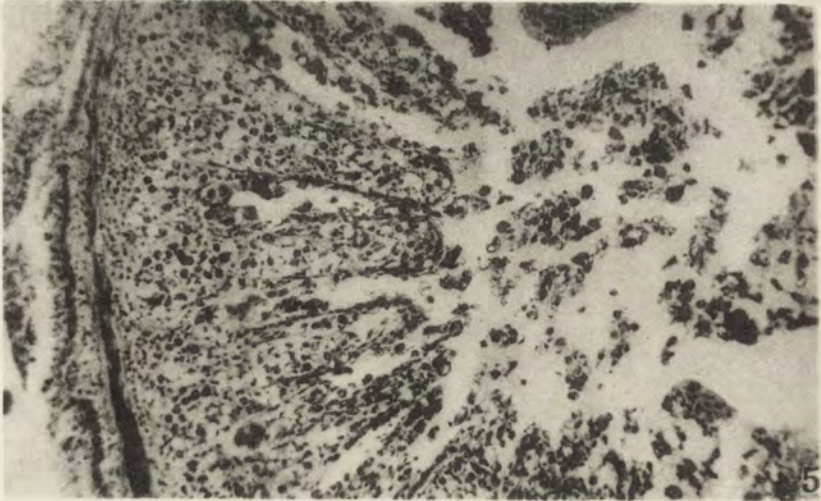
- Beyer T. V. 1960: Citologičeskoe issledovanie različnyh stadij žiznennogo cikla kokcidii krolika. Voprosy citologii i protistologii, 277-284.
- Cheissin E. M. 1967: Žiznjenje cikly kokcidii domašnih životnyh. Izd. "Nauka". Leningrad.
- Curry E. 1939: The histology of the digestive tube of the carp (*Cyprinus carpio communis*). J. Morph., 65, 53-78.
- Grassé P. 1953: Sous-embanchement des Sporozoaires. Classe des Coccidiomorphes. Traité de Zoologie, 1, 2, Paris.

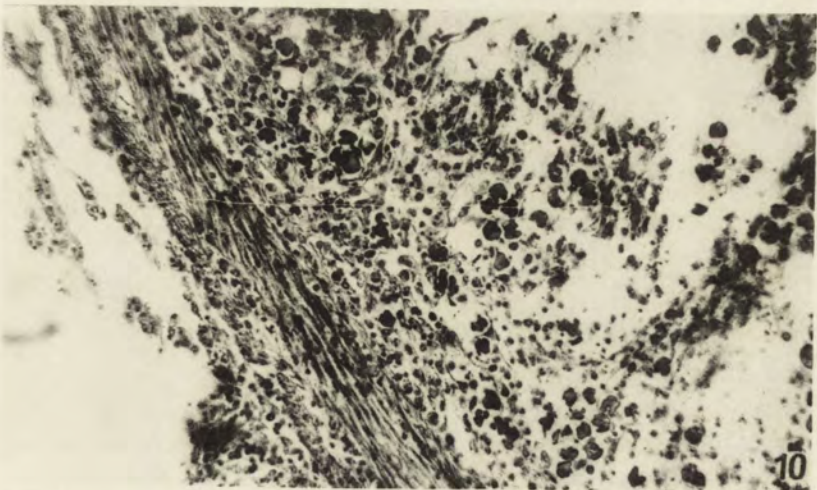
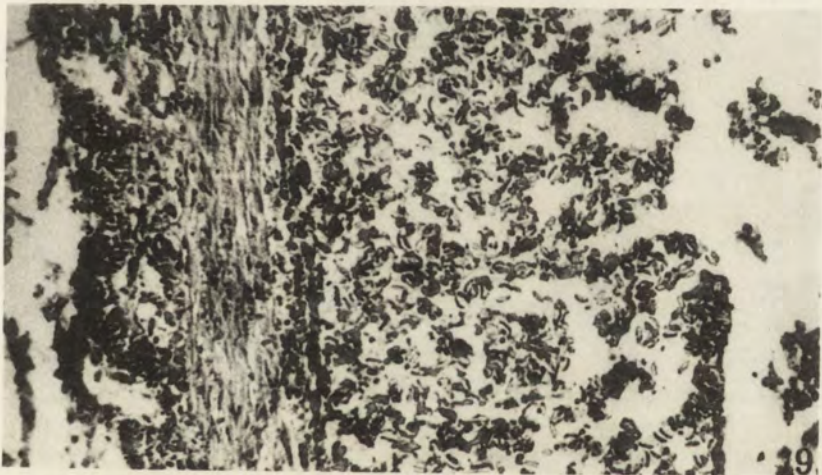
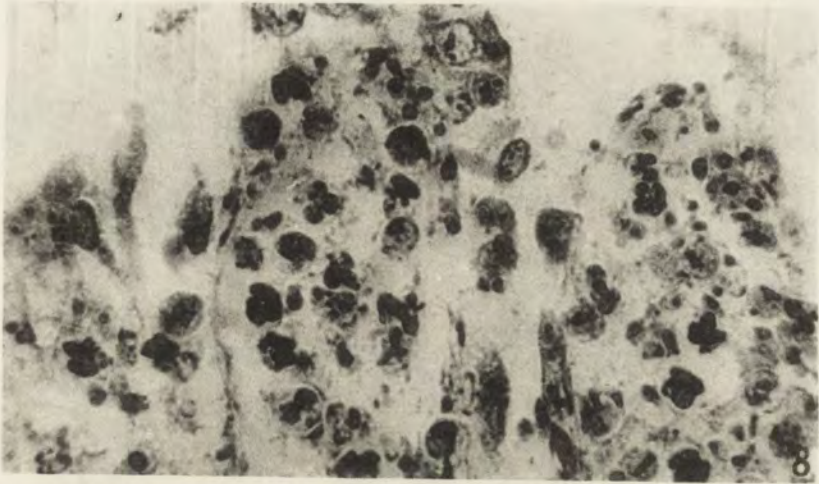
- Léger L. et Stankovitch S. 1921: L'entérite coccidienne des alevins de carpe. Trav. Lab. Piscicult. Univ., Grenoble, 13, 191-194.
- Marinček M. 1973: Développement d'*Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia) — parasite de la carpe. Acta Protozool., 12, 195-216.
- Marinček M. i Miljković G. 1972: Citoheмиjsko ispitivanje alkalne fosfataze u pojedinim stupnjevima razvicia *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Eimeridae). Acta parasitol. iugoslav. 3, 2 (sous press).
- Moroff T. und Fiebiger J. 1905: Über *Eimeria subepithelialis* n. sp. Arch. Protistenk., 6, 166-178.
- Schäperclaus W. 1943: Die Darmcoccidiosen, insbesondere die Knötchen-coccidiose des Karpfens. Z. Fisch., 41, 283-295.
- Stankovitch S. 1921: Systématique et répartition des Coccidies des poissons d'eau douce. Thèse, Fac. Sci. de Grenoble.
- Zmerzlaja E. I. 1964: Rolj sornyh ryb v rasprostranении kokcidioznogo enterita karpov. Zool. Zh., 1408-1410.
- Zschische A. 1914: Bemerkungen zur Entwicklung von *Eimeria subepithelialis*. Zool. Anz., 44, 67-75.

EXPLICATION DES PLANCHES I-III

- 1: Déformation de la cellule épithéliale par suite de croissance de gamétocyte d'*Eimeria subepithelialis*
- 2: Destruction des cellules épithéliales infectées à la suite du développement des gamontes d'*Eimeria subepithelialis*
- 3: Destruction de la paroi intestinale à l'endroit de l'agglomération des parasites
- 4: Une partie de la coupe de l'intestin au niveau de l'agglomération des parasites; on voit la destruction de l'épithélium et en partie de la couche sous-épithéliale
- 5: Desquamation complète de l'épithélium; dans la cavité intestinale on voit des fragments de la muqueuse
- 6: Destruction de l'épithélium et du tissu conjonctif
- 7: Une partie de la paroi de l'intestin avec oocystes mûrs et spores libres; l'épithélium est détruit
- 8: Dégénération et destruction de l'épithélium et du tissu sous-épithéliale
- 9: Forte destruction de la paroi de l'intestin contenant une masse de spores mûres; dans la lumière intestinale fragments de tissu détaché
- 10: Très profonde lésion de la paroi intestinale atteignant presque la couche musculaire







Лаборатория Клеточных Адаптаций и Экзобиологии, Институт Цитологии АН СССР,
Ленинград 190121, проспект Маклина 32, СССР

В. Н. БЫЧЕНКОВА и Л. К. ЛОЗИНА-ЛОЗИНСКИЙ
V. N. BYCHENKOVA and L. K. LOZINA-LOZINSKY

Устойчивость инфузорий *Colpoda maupasii* к действию двуокиси углерода

Resistance of *Colpoda maupasii* to the action of carbon dioxide

В литературе имеются довольно многочисленные данные о высокой устойчивости к двуокиси углерода различных микроорганизмов, низших грибов и многоклеточных животных. В работе Броуна (Brown 1922) приводятся данные ряда авторов о том, что *Botrytis cinerea* и другие грибы растут и размножаются при концентрации CO_2 от 10 до 30%. Аммонифицирующие бактерии нечувствительны к CO_2 в 60% концентрации. Пивные дрожжи могут расти в атмосфере чистого CO_2 .

На некоторые организмы двуокись углерода в определенных концентрациях оказывает стимулирующее действие. По данным Лебедева (1919) сухой вес *Aspergillus niger* увеличивается в атмосфере, содержащей от 0.5 до 20% CO_2 . Стимулирующее действие CO_2 показано Бариновой (1953) на других грибах, а рядом авторов — на бактериях (Скалон 1955, Лойцянская 1958 и др.). Митюшова (1952) показала, что при удалении углекислого газа из атмосферы происходит задержка размножения сорбозных бактерий и потеря их жизнеспособности.

Действие повышенных концентраций CO_2 на простейших изучалось мало. В сводке Леви (Loewy 1923) приводятся данные о том, что CO_2 вызывает у амёб, солнечников и миксомицетов прекращение движений и изменения протоплазмы. Эти явления — обратимы. В растворах, содержащих много двуокиси углерода, *Paramecium*, *Colpidium*, *Cyclidium*, *Chilomonas* скучиваются, а на ряд других (*Euplotes*, *Stylonychia*, *Spirostomum*, *Stentor* и др.) CO_2 не оказывает такого действия. Под влиянием небольших количеств CO_2 у парамеций и евглен усиливаются движения, а при высокой концентрации движения прекращаются. В этой работе автор не указывает применяемые концентрации CO_2 .

Известна также работа Voegtlin and Chalkley (1936), которые показали, что углекислый газ, насыщающий до 25% раствор солей, подавлял деление

Amoeba proteus на стадии ранней профазы, а на более поздней стадии не действовал. Указанная концентрация CO_2 является для этих простейших субтоксической. В работе Гитлесона и Сирса (Gittleson and Sears 1964) указывается, что *Paramecium multimicronucleatum* выдерживают давление CO_2 до одной атмосферы по крайней мере в течение 24 часов. Не известно, однако, происходило ли в этих условиях их размножение.

В нашей более ранней работе было показано, что почвенные инфузории *Colpoda maupasii* переживают и могут размножаться в камере с разреженной до 15–60 мм. рт. ст. непроточной атмосферой, содержащей 50–75% CO_2 , и в камере “Фотостата” с проточной атмосферой, состоящей из 98% CO_2 . Иначе говоря, эти простейшие устойчивы к концентрации CO_2 , в 70–260 раз превосходящей его содержание в обычной атмосфере (Лозина-Лозинский и др. 1971, Lozina-Lozinsky et al. 1971), однако, устойчивость этих инфузорий к более высоким парциальным давлениям и субтоксические концентрации CO_2 не были изучены. Изучение устойчивости простейших к повышенным концентрациям CO_2 , как к экстремальному фактору, представляет большой интерес с точки зрения их экологии и физиологии, для выяснения механизмов адаптивных реакций на действие этого фактора.

Настоящая работа явилась продолжением исследований устойчивости к CO_2 у инфузорий *Colpoda maupasii* Enriques.

Материал и методика

В работе использованы инфузории *Colpoda maupasii* в активной стадии и в стадии цисты покоя, которые были выделены из образцов лишайников, собранных в высокогорных районах Северного Кавказа и культивировались в лаборатории в течение нескольких лет. Устойчивость инфузорий оценивалась по их выживаемости, темпу деления и степени эксцистирования. Средой для инфузорий служил эквilibрированный солевой раствор Лозина-Лозинского (1948) с добавлением 0.1% сеного или салатного настоя и *Bacillus subtilis*. Исходная среда характеризовалась рН в пределах 7.4–8.0. Такая кислотность является благоприятной для *C. maupasii*. Для опытов инфузории помещали в многолуночные микроаквариумы, представляющие собой пластинки из органического стекла с 25 лунками. Лунки имеют диаметр 12 мм и глубину 3 мм. В каждую лунку наливали 0.1 мл среды и сажали по одной инфузории. 100 активных особей и 50 цист покоя использовали в каждом опыте. Опыты повторяли 3–5 раз. Микроаквариумы с инфузориями ставили в 2.5-литровые анаэробостаты, из которых различные количества воздуха откачивали вакуумным насосом и замещали равным количеством CO_2 (по давлению). Затем камеру герметически закрывали. Содержание CO_2 в среде не определяли. Однако мы считаем, что благодаря малому объему и относительно большой поверхности и незначительной глубине культуральной среды уравнивание содержания CO_2 в жидкой среде и атмосфере происходило быстро. Опыты проводились в течение 2-х суток при 18–20°. Контрольных инфузорий помещали в нормальную атмосферу при прочих равных условиях.

Результаты

Влияние CO_2 на устойчивость и эксцистирование цист покоя

Как показали наши опыты цисты покоя *C. taupasi* при нормальном давлении атмосферы обнаруживают большую устойчивость к действию повышенных концентраций углекислого газа (Рис. 1 а). При замещении 0.5 атмосфе-

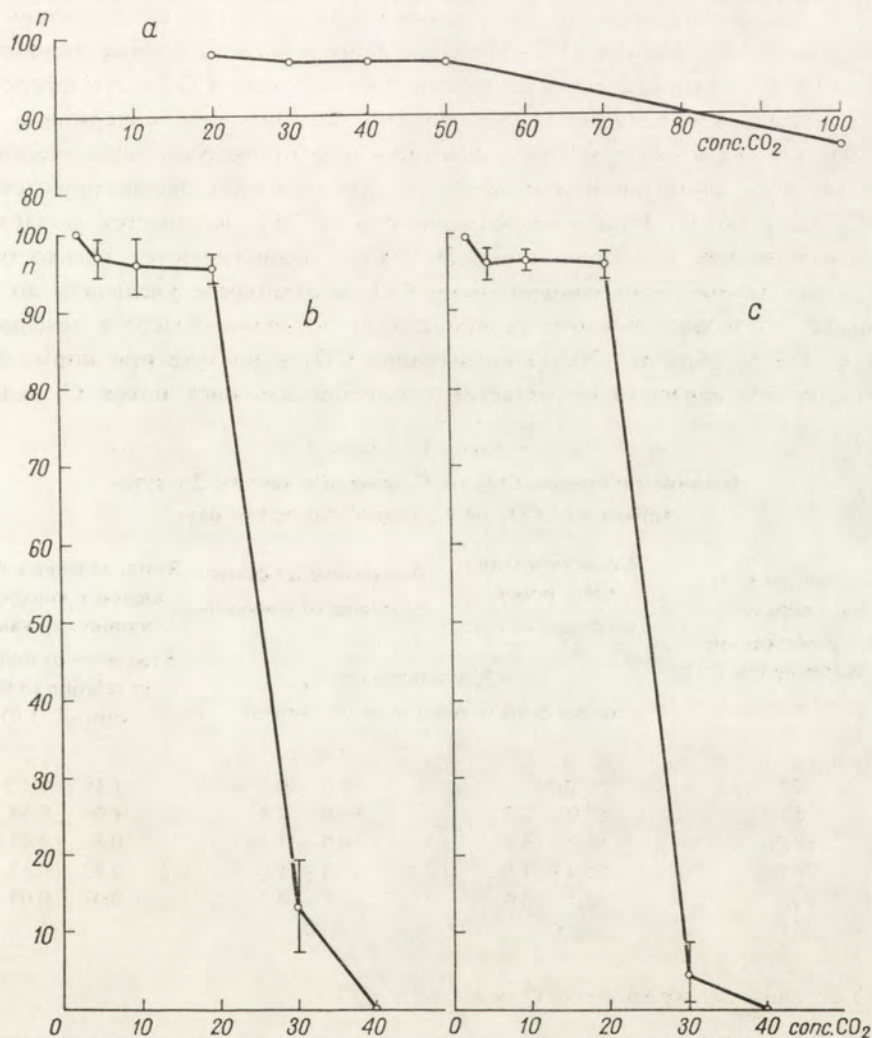


Рис. 1. Выживание и эксцистирование *C. taupasi* при разных концентрациях CO_2 в атмосфере, а — выживание цист покоя, б — эксцистирование цист покоя, с — выживание трофантов, conc. — концентрации CO_2 в процентах от атм., n — число инфузорий в процентах от контрольных

Fig. 1. Surviving and excystment of *C. taupasi* at various CO_2 concentrations in atmosphere, a — surviving of cysts, b — excystment of cysts, c — surviving of trophonts, conc. CO_2 — concentration in per cents, n — number of ciliates in per cents in relation to the control. Mean square deviations are marked

ры воздуха углекислым газом (380 мм рт. ст.) выживает свыше 90% цист, а в атмосфере почти чистого CO₂ с 2–4% примесей других газов, в том числе воздуха, сохраняют жизнеспособность и эксцистируются при возвращении в нормальную атмосферу до 90% цист покоя. Таким образом, концентрация CO₂ около 100% оказывает небольшое токсическое действие на цисты покоя *C. taupasi*, немного снижая их выживаемость.

Процесс эксцистирования цист покоя подавляется при более низких концентрациях CO₂. На Рис. 1 б и Таблице 1 представлены данные эксцистирования цист в течение 2 суток при разных количествах CO₂ в атмосфере воздуха нормального давления. Они показывают, что при содержании 20% углекислого газа в атмосфере эксцистирование происходит практически так же, как при нормальной атмосфере. В этих условиях эксцистируются 90–100% цист покоя. При концентрации свыше 20% начинается подавление эксцистирования, а в присутствии 30% CO₂ эксцистируются только около 20% цист покоя. Если концентрацию CO₂ в атмосфере увеличить до 40% и выше, то эксцистирование не происходит по крайней мере в течение 2-х суток. Таким образом, 20% концентрация CO₂ в воздухе при нормальном атмосферном давлении не является токсичной для цист покоя *C. taupasi*.

Таблица 1 — Table 1
Влияние атмосферы CO₂ на *C. taupasi* в течение 2-х суток
Influence of CO₂ on *C. taupasi* during two days

Содержание CO ₂ в атмосфере (в %) CO ₂ concentration in atmosphere (in %)	Эксцистирование цист покоя Excystment of cysts	Выживание трофонтов Surviving of trophonts	Темп. деления в отношении к контролю принятому как 1 Frequency of division in relation to the control (1.0)
	в % к контролю in per cents in relation to the control		
2.5	100	99.6 ± 0.3	1.19 ± 0.1
5.0	97.0 ± 2.7	96.0 ± 2.3	1.04 ± 0.03
10.0	96.2 ± 3.3	96.5 ± 1.3	0.81 ± 0.05
20.0	95.4 ± 1.8	95.8 ± 1.8	0.42 ± 0.15
30.0	13.5 ± 6.0	4.8 ± 4.2	0.07 ± 0.05
40.0	0	0	—

Устойчивость трофонтов *C. taupasi* к CO₂

Активные инфузории так же, как и их цисты, обнаруживают значительную устойчивость к повышенным концентрациям CO₂ в атмосфере нормального давления. Представленные на Рис. 1с и Таблице 1 данные опытов показывают, что в воздушной непроточной атмосфере, содержащей 10% CO₂, инфузории выживают так же хорошо, как и в нормальной атмосфере. Даже при 20% CO₂ в атмосфере выживает свыше 95% ифузорий. В одном опыте

из шести в этих условиях погибли все инфузории, по-видимому от другой причины. Если принять во внимание данные этого опыта, то средняя выживаемость в этих условиях будет составлять 80%. Однако в атмосфере, содержащей свыше 30% CO_2 погибают уже 100% трофонтов.

Инфузории *C. maupasi* не только выживают при концентрации, в сотни раз превышающей обычное содержание CO_2 в атмосфере но и могут в этих условиях размножаться. При этой темп. деления их находится в обратной зависимости от концентрации CO_2 . На Рис. 2 и Таблице 1 показано, что кон-

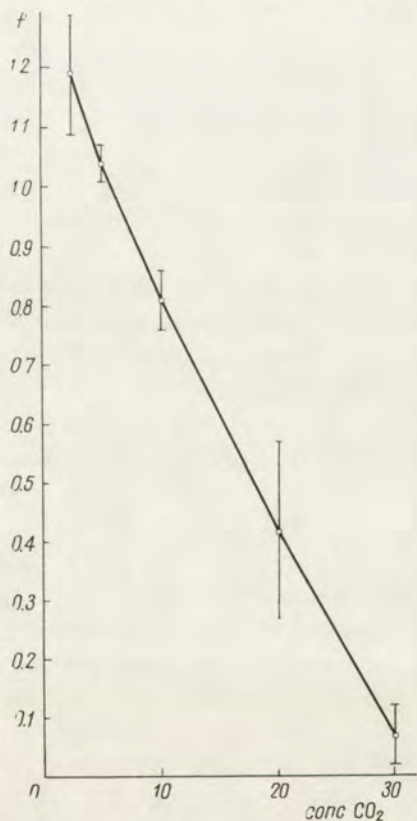


Рис. 2. Темп. деления *C. maupasi* при разных концентрациях CO_2 в атмосфере, conc. — концентрации CO_2 в процентах от атм., f — темп. деления в отношении к контролю. Вертикальные линии показывают средние квадратичные отклонения

Fig. 2. Frequency of divisions of *C. maupasi* at various CO_2 concentrations in atmosphere, conc. CO_2 concentration in per cents, f — frequency of divisions in relation to the control. Mean square deviations are marked

центрация CO_2 2.5–5% в 60–160 раз превышающая количество его в нормальной атмосфере, не подавляет размножение инфузорий, и даже оказывает несколько стимулирующее действие. При концентрации CO_2 свыше 10% скорость размножения инфузорий снижается до 80%, а при 20% содержании CO_2 инфузории размножаются в 2 раза медленнее чем в нормальной атмосфере.

Таким образом устойчивость *C. maupasi* в активной стадии несколько ниже чем у *Amoeba proteus* и значительно ниже чем у *Paramecium*, в то же время цисты покоя *C. maupasi* по устойчивости не уступают указанным простейшим.

Обсуждение

В сводке Голодова (1946) довольно подробно обсуждается механизм действия двуокси углерода на клетки и ткани млекопитающих животных. Приводятся ранние данные ряда авторов о том что токсическое действие CO_2 на клетки объясняется угнетением окислительных процессов и тканевого дыхания в связи с нарушением доставки кислорода в ткани и клетки. Позже было показано, что угнетение дробления и других жизненных процессов у яиц морского ежа под действием CO_2 наступает при таких концентрациях, которые не вызывают изменение в скорости окислительных процессов. Установлено, что при чистом углекислотном отравлении (без недостатка кислорода) напряжение O_2 в тканях не снижается а благодаря усилению диссоциации оксигемоглобина даже несколько повышается (эффект Бора). Таким образом токсическое действие CO_2 заключается, не в нарушении доставки кислорода в клетки и ткани. По данным Голодова наркотическое действие CO_2 на теплокровных также не может быть объяснено угнетением окислительных процессов, хотя не исключено влияние CO_2 на ферменты клеточного дыхания и таким образом на газообмен, что, по-видимому, является одним из важных звеньев сложного механизма действия высоких концентраций углекислого газа на организм теплокровных.

По мнению других исследователей, высокие концентрации CO_2 тормозят ресинтез фосфорных соединений, т.е. повышение количества фосфатов в мышцах (Беркович и др. 1932, Веселкина и др. 1934).

На разных простейших было показано, что CO_2 быстро проникает в клетки, вызывая изменение вязкости цитоплазмы. Углекислый газ изменяет рН в ядре и может вызывать коллоидные изменения в нуклеотидах. CO_2 быстро растворяет плазмолемму *Amoeba proteus*, повышает текучесть протоплазмы. Если в амебу инъецировать большой пузырек CO_2 , то он разрушает плазматическую мембрану, и амеба погибает. Маленький пузырек CO_2 в амебе постепенно сокращается и исчезает из клетки. В этом случае амеба восстанавливается и выживает. Авторами было показано, что CO_2 быстрее проникает из клетки, чем воздух (Reznikoff and Chambers 1927)]

По данным других авторов CO_2 влияет на митоз клетки. Деление клеток подавляется, если CO_2 действует на раннюю профазу. Углекислый газ может вызывать неравномерное распределение хроматина при митозе и что под влиянием CO_2 нарушается функция ферментов, занятых в обмене клеточного ядра (Voegthlin and Chalkley 1936).

Выживание клеток и организмов в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 предполагает способность нейтрализации в них вредного действия углекислого газа. По данным Голодова (1946) нейтрализация CO_2 осуществля-

ется главным образом за счет щелочей, освободившихся под влиянием высоких концентраций CO_2 из неорганических и органических соединений, с образованием бикарбонатов (в этом принимают участие также тканевые белки с образованием карбаминовых соединений).

У простейших CO_2 связывается во время ферментации глюкозы и анаэробного эндогенного обмена. Это показано при использовании изотопа углерода (Seaman 1955). Большая часть CO_2 восстанавливается в янтарную кислоту и в другие кислоты путем реакции Вуд-Веркмана. На то же указывает Бранд (1951). У трипаносом в анаэробных условиях углекислота потребляется эквивалентно количеству янтарной кислоты (0.25–1.0 М CO_2 на 1.0 М глюкозы). При восстановлении нормального напряжения кислорода после анаэробных условий у простейших наблюдается связывание CO_2 . Последний служит для ресинтеза бикарбонатов, которые были разрушены при анаэробнобиозе.

В наших опытах токсическое действие CO_2 оказывает на *C. taupasi* в концентрации свыше 20%, так как гибель инфузорий при этом количестве CO_2 наблюдается даже в присутствии 0.7 атм воздуха когда кислорода достаточно для их нормальной жизни. Из этого следует, что высокая концентрация CO_2 оказывает токсическое действие на активных инфузорий *C. taupasi* и на их размножение независимо от содержания кислорода в атмосфере. Цисты покоя этих инфузорий нечувствительны к CO_2 даже при содержании его в 96% концентрации по крайней мере в течение двух суток. Однако, повышенные количества CO_2 в атмосфере частично подавляют эксцистирование. Возможно это связано с нарушением проницаемости оболочки цисты для кислорода и эксцистирующих веществ под влиянием CO_2 . С другой стороны, известно, что кислая среда подавляет эксцистирование (Goodey 1913). По нашим данным активные *C. taupasi* хорошо выживают и размножаются даже при рН — 5.0; а при рН — 4.7 они также выживают, но скорость размножения снижается при рН — 4.5 начинается гибель инфузорий. Эксцистирование цист покоя может происходить в среде, имеющей рН — 4.0, а вышедшие из них активные инфузории выживают и могут размножаться при таком низком рН. При насыщении атмосферы углекислым газом до 40–50% рН среды понижалось с 7.4 до 5.8–6.0. Такая кислотность сама по себе не должна препятствовать эксцистированию и выживанию активных инфузорий. Следовательно, остается наиболее вероятным предположение, что в клетках происходит нейтрализация двуокиси углерода, как непосредственно токсического агента, но до известного предела. Выше этого предела CO_2 вызывает повреждающий эффект. Естественно, что цисты, в которых обмен значительно понижен, являются более устойчивыми. Переход к активному состоянию требует восстановления нейтральной среды.

Резюме

Инфузории *Colpoda maupasii* на разных стадиях жизненного цикла имеют разную устойчивость к действию повышенных концентраций CO_2 .

Цисты покоя *C. maupasii* обнаруживают наибольшую устойчивость. Свыше 90% цист выживают в атмосфере нормального давления, содержащей 96% углекислого газа.

Экцистирование цист покоя *C. maupasii* подавляется при 20% концентрации CO_2 в присутствии достаточного количества кислорода.

Для трофонтов *C. maupasii* 20% концентрация CO_2 при достаточном количестве кислорода в атмосфере является субтоксической.

Токсическое действие CO_2 на *C. maupasii*, по-видимому, не связано с понижением pH культуральной среды.

SUMMARY

The study was made on the resistance of *Colpoda maupasii*, cysts and trophonts, to higher concentration of CO_2 in atmosphere at normal pressure. The following results were obtained.

Protective cysts of *C. maupasii* show the greatest resistance; more than 90% of cysts survived in the atmosphere containing 96% of CO_2 .

The excystment of cysts of *C. maupasii* inhibited at 20% of CO_2 concentration, in sufficient quantity of oxygen in the atmosphere.

Concentration, of CO_2 , amounting to 20%, in sufficient quantity of oxygen, is sublethal to the trophonts of *C. maupasii*.

Toxic action of CO_2 on *C. maupasii* seems not to be connected with the decreasing of pH value in culture medium.

ЛИТЕРАТУРА

- Барина С. А. 1953: Влияние CO_2 на рост плесневых грибов. Микробиология, 22, 391–398.
- Беркович Е. М., Випус Ф. И., Мешкова М. Л. 1932: Распределение фосфора в мышцах под влиянием CO_2 . Госиздат.
- Бранд Т. 1951: Анаэробизм у беспозвоночных. Москва.
- Brown W. 1922: On the germination and growth of various temperatures and in various concentrations of oxygen and of carbon dioxide. Ann. Bot., 36, 257–283.
- Gittleston S. M. and Sears D. F. 1964: Effects of CO_2 on *Paramecium multimicronucleatum*, J. Protozool. 11, 191–199.
- Голодов И. И. 1946: Влияние высоких концентраций углекислоты на организм. Москва.
- Goodey T. 1913: The excystations of *Colpoda cucullulus* from its resting cysts, and the nature and properties of the cyst membranes. Proc. Soc., Ser. B, 86, 427.
- Лебедев А. Ф. 1919: Об ассимиляции углерода сапрофитами. Изв. Донского Гос. Унив., кн. 1, 25–37.
- Loewy A. 1923: Handbuch der exper. Pharmakologes von Heffter, Bd. I, 73–121.
- Лойцянская М. С. 1958: О значении CO_2 для уксуснокислых бактерий. Вестн. Ленингр. Унив., 9, 73–78.
- Лозина-Лозинский Л. К. 1948: Влияние солей на холодоустойчивость инфузорий и причины смерти при охлаждении. Ж. общ. Биол., 9, 441–453.

- Лозина-Лозинский Л. К., Быченкова В. Н. и Заар Э. И. 1971a: Влияние на инфузорий физических условий, имитирующих среду на поверхности планеты Марс. Сб. Проблемы космической биологии, 16, 281–292.
- Lozina-Lozinsky L. K., Bychenkova V. N., Zaar E. I., Levin V. L. and Rumyantseva V. M. 1971b: Some potentialities of living organism under simulated martian conditions. In: Life Sciences and Space Research, 9, 159–165.
- Митюшова К. М. 1952: О необходимости CO_2 для бактерий, окисляющих сорбит в сорбозу. Микробиология, 21, 265–272.
- Reznicoff P. and Chambers R. 1927: The action of CO_2 and some salts of Na, Ca and K on the protoplasm of *Amoeba dubia*. J. gen. Physiol., 10, 731–738.
- Seaman G. R. 1955: Metabolism of free-living ciliates. In: Biochemistry and Physiology of Protozoa (eds. Hutner S. H. and Lwoff A.), Academic Press, New York, 91–158.
- Скалон И. С. 1955: Влияние углекислоты на развитие гетеротрофных микроорганизмов в связи с условиями среды. Сб. Изотопы в микробиологии, Изд. АН. СССР, 147–155.
- Веселкина В. М., Ильин В. С., Тихальская В. З. 1934: Изменение содержания фосфатов в покоящейся мышце и в момент отдыха после работы в атмосфере H_2 и CO_2 . Известия науч.-иссл. инст. им. Лесгафта, 17–18, 279–286.
- Voegtlin C. and Chalkley H. W. 1936: The influence of H_2S , HCN, CO_2 and some other chemicals on mitosis *Amoeba proteus*. Protoplasma, 24, 364.

BOOKS RECEIVED

THE BIOLOGY OF AMOEBEA

A Volume in the **CELL BIOLOGY** Series

Edited by KWANG W. JEON, Academic Press New York and London, 1973, 628 pp., price: \$ 34.00

CONTENTS:

Part I. GENERAL BIOLOGY, 1. I. J. Lorch — Some Historical Aspects of Amoeba Studies (Introduction, From observation to experimentation, The role of the interphase nucleus in cell behavior, Concluding remarks), 2. Eugene C. Bovee and Theodore L. Jahn — Taxonomy and Phylogeny (Introductory remarks, Problems in taxonomy and phylogeny, Gross morphological distinction of amoebae, Taxonomic schemes for higher sarcodine taxa, Taxonomic groupings of lobose amoebae, Fine structure and taxonomic distinction, Ecological bases for distinction, Physiological differences, Biochemical differences, Mutants, Hybrids, A taxonomic summary of data, Phylogeny of large free-living amoebae), 3. Joe L. Griffin — Culture: Maintenance, Large Yields, and Problems of Approaching Axenic Culture (Introduction, Culture methods, Discussion, Concluding remarks), Part II. MORPHOLOGY. 4. Nils Andresen — General Morphology (Introduction, Morphology of representative amoebae, Other large freshwater amoebae), 5. Edward W. Daniels — Ultrastructure (Introduction, *Pelomyxa palustris* Greef, *Pelomyxa carolinensis* Wilson, *Pelomyxa illinoisensis* Kudo, *Amoeba proteus* (Pallas), 6. Charles J. Flickingier — Cellular Membranes of Amoebae (Introduction, Fine structure, cytochemistry, and functions, Variations with physiological state, Origins and relationships of membranous organelles, Concluding remarks), Part III. MOVEMENT and RELATED PHENOMENA. 7. Robert D. Allen — Biophysical Aspects of Pseudopodium Formation and Retraction (Introduction, Characteristics of lobopodial amoebae, Pseudopodia and cytoplasmic streaming, Streaming in isolated cytoplasm, Models, hypotheses and theories of amoeboid movement, Concluding remarks), 8. Eugene C. Bovee and Theodore L. Jahn — Locomotion and Behavior (Introduction, The physicochemical mechanism of amoeboid motion, Nonlocomotive movements, Responses of amoebae to stimuli, Interactions of stimuli, Role of cell surface in behavior, Nuclear control of amoeboid movement and behavior), 9. Thomas D. Pollard — Progress in Understanding Amoeboid Movement at the Molecular Level (Introduction, The mechanism of force generation, The mechanism controlling amoeboid movement, The mechanism for maintaining regional variations in consistency within the cell, Concluding remarks), 10. Cicily Champan-Andresen — Endocytic Processes (Introduction, The morphology of endocytosis The physiology of endocytosis, Enzymes in relation to endocytosis, Factors affecting the rate of endocytosis, Concluding remarks), Part IV. EFFECT of CHEMICAL and PHYSICAL AGENTS 11. M. J. Ord — Chemical Mutagenesis (Introduction, Classification of changes observed in amoebae, Mutagens, Mutant strains of *A. proteus* induced by methyl nitrosourethane, Studies on the initial damage by *N*-methyl-*N*-nitrosourethane (MNU) correlated with cell cycle activity. Induction of mutations, Conclusion), 12. Shirley E. Hawkins — The Response of Amoebae to Antibiotics (Introduction, Methods of assay, Antibiotics with known sites of action, Inhibitors with less well-known sites of action, Concluding remarks), 13. Muriel J. Ord — Radiation Studies (Introduction, Ionizing radiations, Ultraviolet radiation, β — irradiation of amoeba DNA, The repair of damage from radiations, Conclusion), 14. Arthur M. Zimmerman and Selma B. Zimmerman — High-Pressure Studies on Amoeba (Introduction, Morphological studies, Physiological studies, Chemical studies, Concluding remarks), Part V. BIOCHEMICAL and PHYSIOLOGICAL STUDIES. 15. Carl T. Friz —

Nucleic Acids of Amoebae (Introduction, Isolation of the nucleic acids, Analysis of the nucleic acids, Conclusions), 16. Howard J. Allen and Richard J. Winzler — The Chemistry of Amoeba, Surface (Introduction, Methods of analysis, Analysis by light microscopy, Analysis by electron microscopy, Chemical analysis of subcellular fractions, epilogue), 17. David M. Prescott — The cell Cycle in Amoebae (Introduction, The subsections of the cell cycle. Attempts to induce a G₁ period in *A. proteus*, How is the cell cycle arrested when amoebae cease proliferation? Nucleocytoplasmic interactions in the control of DNA synthesis, Some observations on the G₂ period, Concluding remarks), 18. Lester Goldstein — Nucleocytoplasmic Interactions in Amoebae (Introduction, Nucleocytoplasmic interactions in cell heredity, Nucleocytoplasmic interactions in the control of RNA synthesis, Nucleocytoplasmic interactions in the control of protein synthesis, Nucleocytoplasmic interactions in the control of DNA synthesis and the cell growth cycle. The interdependence of nucleus and cytoplasm, The movement of macromolecules between nucleus and cytoplasm, Nucleocytoplasmic interactions in amoeboid movement, Conclusion), 19. Alexander L. Yudin — Nuclear-Nuclear Interactions in Heterokaryons (Introduction, Methods of obtaining heterokaryons and types of possible heterokaryons, Nuclear-nuclear interactions in nonviable heterokaryons, Nuclear-nuclear interactions in the determination of the heterokaryon phenotype, Genetic nuclear-nuclear interactions in heterokaryons, Concluding remarks), 20. Shirley E. Hawkins — Genetic Information in the Cytoplasm of Amoebae (Early experiments, Selection of reliable characters, Transfer of information by injection of cytoplasm, Nature of the molecules involved — DNA versus RNA, Discussion), 21. Kwang W. Jeon and I. Joan Lorch — Strain Specificity in *Amoeba proteus* (Introduction, Amoebae, Strain-specific phenotypic characters, Compatibility at the subcellular level. Variations in phenotypic characters, Concluding remarks), Appendix by Kwang W. Jeon. I — Selected references to methods used in amoeba studies, Some statistics on amoebae.

THE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY OF *TETRAHYMENA*

A Volume in the **CELL BIOLOGY** series

Donald L. HILL, Academic Press New York and London, 1972, 230 pp., price \$ 14.00

CONTENTS:

1. INTRODUCTION (Introduction, Taxonomy, Occurrence, Morphology, Ingestion and digestion, Pattern formation, Cell size, Growth conditions, Synchronization), 2. CARBOHYDRATE METABOLISM (Introduction, Utilization of carbohydrates, Glycogen, Low molecular weight carbohydrates, Glycolysis, Krebs cycle, End products of carbohydrate metabolism, Phosphogluconate oxidative pathway, Crabtree and Pasteur effects, Conversion of lipid to carbohydrate, Other aspects of glyconeogenesis), 3. LIPID METABOLISM (Introduction, Requirements, Composition, Metabolism of fatty acids and phosphatides, Tetrahymanol and sterol metabolism, Cholinesterase, Phosphonolipids, Synthetic lipids as growth factors), 4. ENERGY METABOLISM (Mitochondria, Respiration, Enzymes associated with electron transport, Cytochromes, Uncoupling agents, Utilization of energy, Peroxisomes), 5. AMINO ACID and PROTEIN METABOLISM (Introduction, Amino acid requirements, Proteinases, Protein biosynthesis, Division protein, Proteins of cilia, Characterization of nonprotein nitrogen, Arginine, proline, and the absence of a urea cycle, The question of a phosphagen, Serine and threonine, Glycine and porphyrins, Methionine and cysteine, Valine, leucine, and isoleucine, Lysine, alanine, glutamic acid, and histidine, Tryptophan and serotonin, Phenyl-alanine and tyrosine, Ubiquinones, Catecholamines), 6. PURINE, PYRIMIDINE, and NUCLEIC ACID METABOLISM (Purine and pyrimidine requirements, Purine and pyrimidine metabolism, Phosphatases, Effect of purine analogs, Characterization of nucleic acids, Histones, Ribonucleases and deoxyribonucleases, Biosynthesis of ribonucleic acids, Biosynthesis of deoxyribonucleic acids), 7. BIOCHEMICAL GENETICS (Nuclei, Conjugation, Genomic exclusion, Mutants, Mating types, Immobilization antigens, Esterases, Acid phosphatases, Polymorphism), 8. VITAMIN and INORGANIC REQUIREMENTS (Introduction, Thiamine and

lipoate (Thioctic acid) Riboflavin, Pyridoxal and pyridoxamine, Pantothenate, Folate (Pteroylglutamate), Niacin, Biotin, Vitamin B₁₂, Vitamin E, Biochemical assays. Water, Sodium, potassium, and chloride ions, Orthophosphate, Other inorganic ions), 9. EFFECTS OF RADIATION, DRUGS, and HYDROSTATIC PRESSURE (Radiation, Repair of radiation damage, The photodynamic effect, *Tetrahymena* as a toxicological tool, Hydrostatic pressure), 10. EVOLUTION (Phylogenetic relationships, Evolutionary oddities, Loss of synthetic ability).

MOLECULAR BIOLOGY. BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

Editors: A. Kleinzeller, G. F. Springer, H. G. Wittmann, P. Reeves, University of Adelaide (Australia)

THE BACTERIOCINS

Vol. 11, 9 fig, XI, 142 pages. 1972, Cloth DM 48,-, US \$ 15,30 Berlin — Heidelberg — New York: Springer-Verlag (C)
ISBN 3-540-05735-8

PROTOZOAN PARASITES OF DOMESTIC ANIMALS AND OF MAN

(Second edition)

Norman D. LEVINE

Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota 406 pp., \$34.95

CONTENTS:

1. Introduction to Parasitology, 2. Introduction to the *Protozoa*, 3. The Hemoflagellates, 4. *Histomonas*, *Parahistomonas*, and Related Forms, 5. The Trichomonads, 6. Other Flagellates, 7. The *Amoebae*, 8. The *Apicomplexa* and the *Coccidia* Proper, 9. *Klossiella* and *Hepatozoon*, 10. *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon*, 11. *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, and Related Protozoa, 12. The *Piroplasmida*, 13. The *Microspora*, 14. The Ciliates, 15. Laboratory Diagnosis of Protozoan Infections, Appendix, Index.

Fasciculi praeparati:

M. Jerka-Dziadosz: Cortical development in *Urostyla*. II. The role of positional information and preformed structures in formation of cortical pattern [Rozwój struktur powierzchniowych u *Urostyla*. II. Rola informacji pozycyjnej i struktur preformowanych w tworzeniu wzoru powierzchniowego] — H. B. Винникова: Конъюгация *Dileptus anser* O. F. M. (*Gymnostomatida*, *Tracheliidae*) [Conjugation in *Dileptus anser* O. F. M. (*Gymnostomatida*, *Tracheliidae*) — K. Golińska: Effect of puromycin on regeneration processes in *Dileptus anatinus* Golińska 1971 [Wpływ puromycyny na procesy regeneracyjne u *Dileptus anatinus* Golińska, 1971] — A. Jurand and D. M. Saxena: Ultrastructural features of the trichless mutant of *Paramecium aurelia* [Les particularités de l'ultrastructure de mutant de *Paramecium aurelia* sans trichocystes] — T. A. Shibalova: Electron microscope observations on the development of *Eimeria tenella* (*Sporozoa*, *Coccidia*) in tissue culture. I. The fine structure of the sporozoite [Электронномикроскопическое исследование *Eimeria tenella* (*Sporozoa*, *Coccidia*) при развитии в культуре ткани. I. Ультраструктура спорозоитов] — A. R. Kasturi Bai and S. V. Tara: Volume changes in *Blepharisma intermedium* [Changements de volume dans le *Blepharisma intermedium*] — A. J. Repak and I. R. Isquith: The systematics of the genus *Spirostomum* Ehrenberg, 1838 [Die Systematik der Gattung *Spirostomum* Ehrenberg, 1838] — A. K. Das: On the genus *Oxymonas* Janicki (*Pyrsonymphidae*: *Mastigophora*) from Indian termites [Remarques sur le genre *Oxymonas* Janicki (*Pyrsonymphidae*: *Mastigophora*) le parasite des termites Indiens] — K. K. Misra, N. Nandi, S. Raut and A. Choudhury: *Haemogregarina simondi* sp. n. a new haemogregarine from a river turtle, *Trionyx gangeticus* Cuvier [*Haemogregarina simondi* sp. n. la nouvelle hémogregarine de la tortue *Trionyx gangeticus* Cuvier — A. Mandal and K. N. Nair: *Clevelandella kidderi* sp. n. (*Clevelandellidae*) new heterotrichous ciliate from Wood-feeding Roach (*Panesthia* sp.) of Andaman Islands, India [*Clevelandella kidderi* sp. n. (*Clevelandellidae*), un nouveau Cilié Hétérotriche de *Blattes xylophage* (*Panesthia* sp.) des Iles Andaman, Inde] — A. Warton and W. D. Kallinikova: Cytochemistry of some *Trypanosoma* species as related to their capacity for diskinetoplastia. II. *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma evansi* [Цитохимическое сравнение некоторых видов трипаносом в связи со способностью к дискинетопластии. II. *Trypanosoma lewisi* и *Trypanosoma evansi*]

SUBSCRIPTION

price is \$ 13.05 for one volume consisting of four parts appearing quarterly

Place your order with your bookseller or directly with:

Export 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.

Państwowe Wydawnictwo Naukowe
(PWN — Polish Scientific Publishers)
Warszawa

Fasciculi:

15. D. V. Ossipov and I. I. Skoblo: Morphogenetic activity of generative nucleus in the sexual cell reorganization of ciliates [Морфогенетическая активность генеративного ядра инфузорий в период половой реорганизации клетки] 151
16. J. Janiszewska and M. Krztoń: *Raabeia furciligera* sp. n. (Cnidosporidia, Actinomyxidia) from the body cavity of *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862 [*Raabeia furciligera* sp. n. (Cnidosporidia, Actinomyxidia) z jamy ciała *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparède, 1862] 165
17. S. L. Kazubski: Buccal apparatus of *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861) Raabe, 1934 (*Thigmotricha*) [Aparat gębowy *Myxophyllum steenstrupi* (Stein, 1861) Raabe, 1934 (*Thigmotricha*)] 169
18. J. Kink: The organization of fibrillar structures in the trophic and encysted *Dileptus visseri* (Ciliata, Rhabdophorina) [Organizacja struktur włóknistych w formach troficznych i incystowanych *Dileptus visseri* (Ciliata, Rhabdophorina)] 173
19. M. Marinček: Développement d'*Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia) — parasite de la carpe [Razvíce *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia) — parazita šarana] 195
20. M. Marinček: Les changements dans le tube digestif chez *Cyprinus carpio* à la suite de l'infection par *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia) [Promene u crevnom traktu *Cyprinus carpio* usled infekcije vrstom *Eimeria subepithelialis* (Sporozoa, Coccidia)] 217
21. В. Н. Быченкова и Л. К. Лозина-Лозинский: Устойчивость инфузорий *Colpoda maurasi* к действию двуокиси углерода [Resistance of *Colpoda maurasi* to the action of carbon dioxide] 225