

PL ISSN 0065-1583

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

ACTA
PROTOZOOL-
OGICA

VOLUME 18

Number 4

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

<http://rcin.org.pl>

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
NENCKI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL BIOLOGY

ACTA PROTOZOOLOGICA
International Journal of Protozoology

Editors

Stanisław DRYL and Stanisław L. KAZUBSKI

Editorial Board

Chairman: Leszek KUŹNICKI
Vice-chairman: Andrzej GRĘBECKI

Members

Stanisław DRYL
Vassil GOLEMANSKY
Witold KASPRZAK
Stanisław L. KAZUBSKI

Jiri LOM
Georg Ivanovič POLJANSKY
Igor Borysovic RAIKOV
Ksenia Mironovna SUKHANOVA

Managing Editor and Editorial Board Secretary

Julitta PŁOSZAJ

Manuscripts may be submitted to the Editorial Office: Acta Protozoologica, M. Nencki Institute of Experimental Biology, 02-093 Warszawa, 3 Pasteur Street, Poland, or to each member of the Editorial Board.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P.O. Box 1001, Poland. Payments are to be sent to the account of Ars Polona — Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, Poland.

ACTA PROTOZOOLOGICA appears quarterly. The indexes of previous volume will appear in No. 1 of the next volume.

Indexed in Current Contents.

Department of Microbiology, Karnatak University Post-Graduate Centre Gulbarga, Karnataka, India, and Department of Zoology, Karnatak Science College, Dharwad, Karnataka, India

S. D. AMOJI and M. J. DEVDHAR

Echinospora phalangii gen. n., sp. n. An Actinocephaid Gregarine Found in the Intestine of Phalangid Host, *Opalnia* sp.

Synopsis. The *Opalnia* sp., phalangid arthropod collected from Someshwar (near Dharwad) area, Karnataka State, India were found infested with three species of cephaline gregarines. Two of these have been reported earlier. These are: *Sycia arachnoidea* Devdhar et Gourishankar, 1971 and *Contospora opalnia* Devdhar et Amoji, 1978. Present paper gives an account of detailed morphology and biology of a third species of gregarine. The gregarine has been assigned to a new genus, *Echinospora* in the subfamily *Acanthosporinae* Léger of the family *Actinocephalidae* Léger emend. Grassé. The subfamily (*Acanthosporinae*) characters are emended in the light of our new findings.

Arachnids have been reported to be infested with cephaline gregarines belonging to various families and genera (Labbé 1899, Kamm 1922, Erhardova 1955, Geus 1969, Devdhar and Gourishankar 1971, Ormières and Baudoin 1969, 1973, and Devdhar and Amoji 1978 a, b). However, only three species: *Doliospora repelini* (Léger) Ormières et Baudoin, 1969, *Acanthospora troguli* Geus, 1969, and *Contospora opalnia* Devdhar et Amoji, 1978 belong to the subfamily *Acanthosporinae*, Léger of the family *Actinocephalidae*, Léger emend. Grassé.

The present communication deals with the studies made on cephaline gregarine infesting the *Opalnia* sp. This gregarine was found in the intestine and intestinal caeca along with other two gregarines namely *Sycia arachnoidea* Devdhar et Gourishankar, 1971 and *Contospora opalnia* Devdhar et Amoji, 1978. The gregarine species reported herein revealed significant taxonomic features which warranted the creation of a new genus *Echinospora* (*Acanthosporinae*: *Actinocephalidae*).

Material and Methods

The arachnid hosts were collected by Dr. M. J. Devdhar from the vicinity of Someshwar, near Dharwad, Karnataka, India. Hosts were examined for their gut parasites on the day of collection.

The smears of the gut content from anterior to posterior tip were prepared along with gut fluid for studying the gregarines in live condition. The guts showing maximum number of cephalins were fixed in Carnoy's fluid, infiltrated in paraffin (55–58°C) and microtome sections were cut at 5 to 8 μm .

Preparation of permanent slides of gut smears and dewaxed sections was carried out as per method outlined earlier (Devdhar and Amoji 1978).

All the India ink drawings given in this paper are made with the aid of camera lucida. Microphotographs of a few important stages in the life cycle of the gregarine are also presented.

Observations

Generic characters of *Echinospora* gen. n.

- (1) Epimerite simple, globular or spherical knob.
- (2) Protomerite dome-shaped or hemispherical with striated rim around its base and is beset on a short cylindrical collar.
- (3) Sporocysts biconical with a row of 8 to 10 slender spines at each pole and are released in chains of 2 to 3 or more from the gametocyst by simple dehiscence.

Description of species: *Echinospora phalangii* sp. n.

Sporonts: The sporonts are solitary, long slender and tend to be wavy in the posterior region (Pl. I 11). Protomerite is hemispherical and the deutomerite widest just behind protomerite, narrows gracefully and ends in a very slender pointed caudal tip. The size of the mature sporonts varies from 1666 to 2040 μm in length and from 102 to 123 μm in breadth. The average PL : TL ratio is 1 : 20.9 and PW : DW is 1 : 1.8.

The epicyte covering the protomerite and deutomerite is striated all along the body surface. The ectoplasm is about 1.5 to 2.0 μm thick along the contour. The septum is circular and has variable plane viz., flat, concave or convex. The average thickness is 8–10 μm and is formed of both epicyte and ectoplasm.

The protomerite is hemispherical in outline and is beset on a broad and stumpy stalk (Fig. 1 2, 3, Pl. I 12, 13). Anteriorly it is broadly rounded while broadest just above the septum. On an average the proto-

merite measures $70\ \mu\text{m}$ in length and $120\ \mu\text{m}$ in breadth. It is attached to the deutomerite by septum. A constriction little above the septum is conspicuous. This constriction forms a stumpy stalk ($15\text{--}20\ \mu\text{m} \times 80\text{--}100\ \mu\text{m}$) on which the hemispherical portion rests. The broad edge hanging over this stalk appears frilled on account of the conspicuous striations on this rim-like edge. The striated portion is a permanent structure and is of ($7\text{--}8\ \mu\text{m}$ height) uniform thickness. In the surface view, the protomerite looks spherical in shape and the striations of the rim are seen all along the periphery (Fig. 1 4, Pl. I 14). The ectoplasm

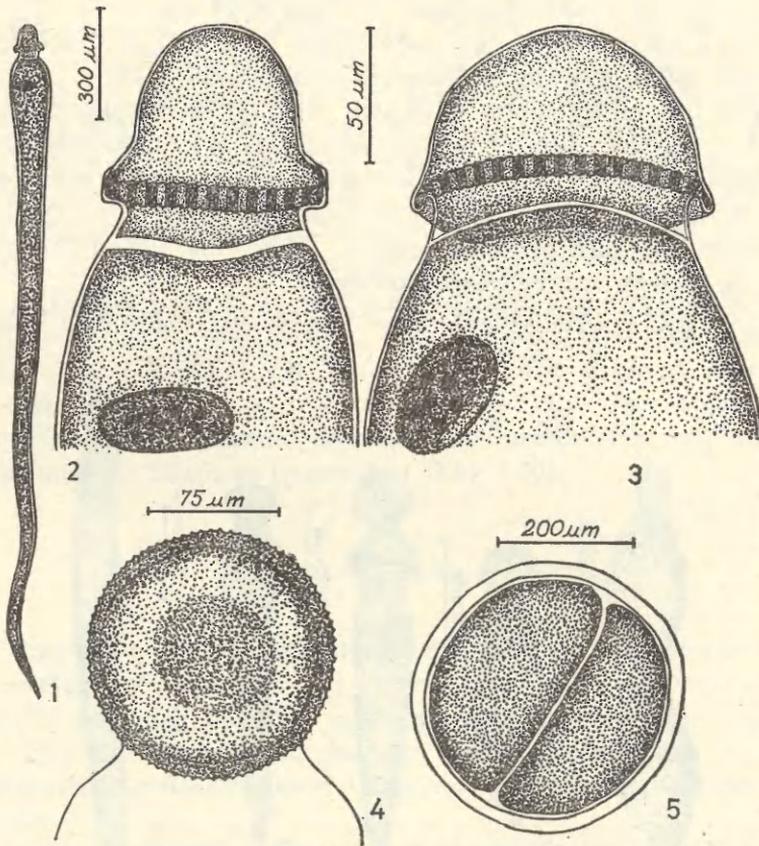


Fig. 1. *Echinospora phalangii* gen. nov. sp. nov. 1 — Mature sporont. $\times 60$, 2–3 — Enlarged anterior region of sporonts showing variations in the shape of the protomerite. $\times 430$, 4 — Front view of the protomerite. $\times 300$, 5 — Newly formed gametocyst with two gamonts and a line of association. $\times 100$

underlying the epicyte is thick and embodies longitudinal myonemes which run from anterior tip and become continuous with those of deutomerite. The endoplasm is finely granulated.

The deutomerite is elongated, being dilated behind septum, gradually narrows towards caudal region and ends in a narrow pointed tail tip. The longitudinal myoneme fibres being in continuous with those of the protomerite maintain the constant shape of the deutomerite. The endoplasm is coarsely granular.

Nucleus rarely visible in live condition. However, stained preparations revealed its presence. The position of the nucleus is variable, being anywhere between anterior half of the deutomerite. The shape of the nucleus is generally oval and rarely ellipsoidal. The nuclear membrane is distinct and includes six to eight small oval endosomes. The average size of the nucleus in adult sporonts is $57 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$.

Gametocysts. The gametocysts are spherical in shape and vary in size from 350 to 475 μm in diameter (Fig. 1 5, Pl. I 15). Newly formed gametocysts are milky white with two unequal, hemispherical gamonts separated by distinct line of association. Cysts are surrounded by thick (25–30 μm) and smooth cyst wall. Gametocysts subjected to moist chamber process for further development attain maturity after 6 or 7 days, during which period the gain brownish colour. After this period the cyst wall ruptures on its own and releases sporocysts.

Sporocysts. Sporocysts are biconical in shape which come out

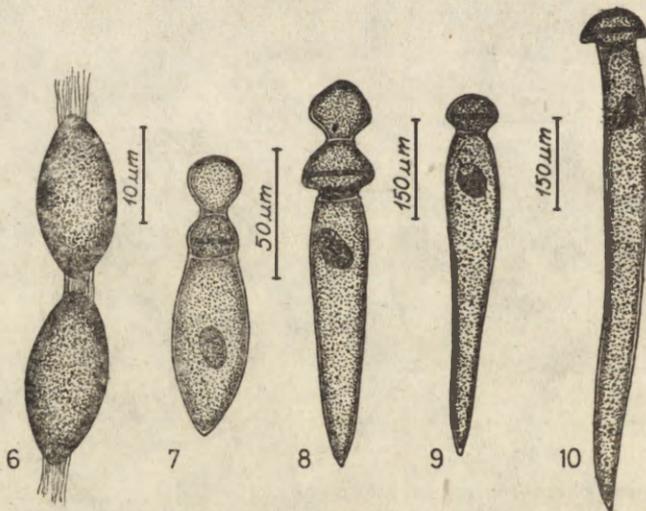


Fig. 2. *Echinospora phalangii* gen. nov. sp. nov. 6 — Sporocysts in chain. Note the fragile spines at each pole. $\times 1500$, 7 — Youngest cephalont with serrated rim in the protomerite and spherical epimerite. $\times 400$, 8 — Advanced stage of cephalont. Note the change in the shape of the epimerite from spherical to rhomboidal. $\times 400$, 9 — Young sporont. $\times 100$, 10 — Advanced stage of sporont. Note the gradual change in the shape of the protomerite from 8–10. $\times 100$

of the matured gametocysts in linear chains of 2 to 3 or more (Pl. I 16). These have 8–10 slender spines in row at each pole (Fig. 2 6). The interlocking of polar spines of preceding and succeeding sporocysts helps to maintain their linear attachment. The sporocysts measure $14.7 \mu\text{m} \times 7.0 \mu\text{m}$.

Cephalins. We have not observed the sporozoite stage of this gregarine. The serial cross sections of the intestine and intestinal caeca did not reveal intracellular stage of the development. The smallest cephalont observed in our preparations was a lumen dwelling form (Fig. 2 7) and measured about $81 \mu\text{m}$ in length. The epimerite is spherical or globular ($18 \mu\text{m} \times 15 \mu\text{m}$) knob in form and is attached to the dome-shaped ($15 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$) protomerite. At this stage, the frilled edge is not conspicuous. The deutomerite is slightly elongated ($55 \mu\text{m}$) with maximum width ($23 \mu\text{m}$) being at the middle. During later stage of the development (Fig. 2 8, Pl. I 17) the epimerite assumes rhomboidal ($20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$) in shape. The protomerite has conspicuous serrated or frilled edge which is demarked by the short ($5 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$) cylindrical stalk. There is considerable increase in the length of the deutomerite. The nucleus in all the cephalins is ovoidal in shape.

The cephalins have been observed to retain the epimerite till they attain $200\text{--}250 \mu\text{m}$ in total length. The cephalins after shedding off the epimerite (Fig. 1 9, Pl. I 18) enter the trophic stage of development. During further growth in size accompanied by the increase in the concentration of endoplasmic granules, the protomerite and the deutomerite assume the shape as in sporonts (Fig. 2 10).

Discussion

The diagnostic features of the hitherto described gregarine viz., solitary nature of sporonts and cephalins, simple dehiscence of the gametocysts releasing biconical sporocysts with polar spines are in conformity with (the exception of shape of the epimerite) those reported for the subfamily *Acanthosporinae* Léger of the family *Actinocephalidae* Léger emend. Grassé.

The subfamily *Acanthosporinae* includes 12 genera like; *Acanthospora* Léger, 1892, *Corycella* Léger, 1892, *Ancyrophora* Legér, 1892 *Cometoides* Labbé, 1899, *Prismatospora* Ellis, 1914, *Tetraedrospora* Tschudovskia, 1929, *Ramicephalus* Obata, 1953, *Dinematospora* Tuzet and Ormières, 1954, *Spinispora* Baudoin, 1967, *Quadruspinispora* Sarkar and Chakravarty, 1969, *Doliospora* Ormières and Baudoin, 1969 and *Con-tospora* Devdhar and Amoji, 1978.

The epimerite of the gregarine in question is simple globular or spherical knob. This feature is not in conformity with the character of the subfamily *Acanthosporinae*. However, the sporocysts with spines definitely assign the gregarine to the subfamily *Acanthosporinae*. Similar exceptions in the nature of the epimerite are reported in genera *Acanthospora* Léger, 1892 and *Doliospora* Ormières et Baudoin, 1969. This permits us to define the epimerite of the subfamily *Acanthosporinae* as either complex or simple.

The hemispherical protomerite with a serrated rim is feature which is unique in this gregarine and not reported so far (in any of the gregarines included in the *Acanthosporinae*). This feature we propose to include as (protomerite simple or complex) one of the characters of the subfamily *Acanthosporinae*.

The sporocysts of the presently reported gregarine are biconical and have a row of 8–10 slender spines at each pole. Out of 12 genera re-

Table 1

Comparative characters of the biconical spore-bearing genera of the subfamily *Acanthosporinae* Léger

Characters	<i>Acanthospora</i> Léger, 1892	<i>Ancyrophora</i> Léger, 1892	<i>Ramicephalus</i> Obata, 1953	<i>Corycella</i> Léger, 1892	<i>Echinospira</i> gen. n.
Epimerite	A simple conical knob	Globular with 5–10 backwardly directed digitiform processes	Disc-like with many upwardly projected dendroidal processes arranged at the periphery of the disc	Globular with 8 large curved hooks	Simple globular or spherical knob
Protomerite	Simple	Simple	Simple	Simple	Hemispherical with striated rim around its base and beset on a cylindrical broad stumpy stalk
Sporocysts	Biconical with a row of equatorial and one of polar spines	Biconical with one row of equatorial and one polar spines	Biconical with one row of equatorial and one of polar spines, the former consists of 6 spines	Biconical with one row of polar spines	Biconical with a row of 8–10 spines at each pole

corded so far, only four genera have biconical sporocysts with spines. Genera *Acanthospora*, *Ancyrophora* and *Ramicephalus* have biconical sporocysts with polar and equatorial spines. While the genus *Corycella* possesses biconical sporocysts with only one row of polar spines. Although the sporocysts are apparently similar in the new gregarine and *Corycella* they radically differ in their unique shape of the epimerite and the protomerite. The comparative account of the biconical spore-bearing *Acanthosporinae* genera, with special reference to the shape of the epimerite, protomerite and sporocysts is given in Table 1, which makes the herein described genus an independent one. In view of the unique combination of characters of this gregarine, not shared by any genus of the *Acanthosporinae*, we propose to create a new genus *Echinospora* to accommodate *Echinospora phalangii* gen. n., sp. n. as its type species.

The generic name *Echinospora* is chosen to indicate sporocysts bearing spines and specific name *E. phalangii* after the phalangid host in which it is found for the first time.

Diagnostic characters of *Echinospora phalangii* gen. n., sp., n.

Cephalins with globular knob-like epimerite directly attached to anterior tip of the protomerite. Protomerite hemispherical with broad edge hanging over broad and stumpy stalk. The edge is a permanent structure and has a frilled rim all along its periphery.

Sporonts solitary without epimerite. Gametocysts spherical, smooth walled, dehisce by simple rupture without pseudocyst. Sporocysts biconical with 8-10 spines in a row at each pole. These are released in linear chains of 2 to 3 or more with interlocking of polar spines. No intracellular development at any stage of gregarine.

Type species: *Echinospora phalangii* gen. nov., sp. nov.

Host: *Opalnia* sp. (Arachnid: Arthropoda).

Site of infection: Intestine and intestinal caeca.

Locality: Someshwar (Dharwad: Karnataka, India).

Repository: The hapantotype specimens (cephalins, sporonts, gametocysts and sporocysts) of this new gregarine stained (Heidenhain's iron alum haematoxylin) and mounted (euparal) on glass slides, are deposited in British Museum (Natural History), Cromwell Road, London S.W.7, bearing Nos. 1979: 8: 7: 6-13.

Subfamily *Acanthosporinae* Léger, 1892 emended

- (1) Epimerite simple or complex.
- (2) Protomerite with or without frilled rim.

- (3) Sporocysts varied (biconical, cylindrobiconical, oval, barrel-shaped, fusiform, cylindrical, hexagonal or tetrahedral) with equatorial and/or polar spines.

RÉSUMÉ

L'*Opalnia* sp., un arthropode récolté dans la région de Someshwar (près de Dharwad), à l'État de Karnataka aux Indes, est infesté par trois espèces des grégaires céphaliques. Deux d'entre eux étaient mentionnées auparavant: *Sycia arachnoidea* Devdhar et Gourishankar, 1971 et *Contospora opalnia* Devdhar et Amoji, 1978. L'étude présente est consacrée à la morphologie et la biologie de la troisième espèce, classifiée comme appartenant à une genre nouvelle: *Echinospora* et à la sous-famille *Acanthosporinae* Leger, la famille *Actinocephalidae* Leger emend. Grasse. La description des caractères de la sous-famille *Acanthosporinae* est ammenéé par la conséquence.

REFERENCES

- Baudoin J. 1967: Contribution à l'étude morphologique, biologique et ecologique des Grégaires d'Insectes à larves aquatiques. Ann. St. Biol. Besse-en-Chandesse, 2, 13-160.
- Devdhar M. J. and Gourishankar G. 1971: on a new gregarine, *Sycia arachnoidea* n. sp. from an arachnid host, *Opalnia* sp. J. Anim. Morph. Physiol. 18, 182-187.
- Devdhar M. J. and Amoji S. D. 1978 a: On a new Actinocephalid gregarine, *Contospora opalnia* gen. nov., sp. nov. from the gut of an arachnid *Opalnia* sp. Arch. Protistenk., 120, 182-189.
- Devdhar M. J. and Amoji S. D. 1978 b: *Sciadiophora gagrellula* n. sp. from the phalangid arthropod, *Gagrellula saddlana* (Roewer). Acta Protozool., 17, 247-253.
- Ellis M. M. 1914: An acanthosporid gregarine from North American Dragonfly nymph. Trans. Am. Microsc. Soc., 33, 215-222.
- Erhardova B. 1955: Neue Gregarinen aus Milben. Ceskol. Parasitology, 2, 35-37.
- Geus A. 1969: Die Gregarinida der land und susswasserbewohnenden Arthropoden Mitteleuropas. Die Tierw. Deutschl., 57, 188-196.
- Kamm M. W. 1922: Studies on gregarines II. Synopsis of the polycystid gregarines of the World, excluding those from the *Myriapoda*, *Orthoptera* and *Coleoptera*. Illinois Biol. Monogr., 7, 1-104.
- Labbé A. 1899: *Sporozoa*. Das Tierreich. Berlin Lief, 5, 1-180.
- Léger L. 1892: Recherches sur les grégaires. Tab. Zool., 3, 1-182.
- Obata K. 1953: Reports on some gregarines from Japanese insects. I. Fac. Sci. Hiroshima Univ. (Zoology), 14, 1-34.
- Ormières R. and Baudoin J. 1969: Proposition de *Doliospora* n.g. por l'Eugregarine *Acanthospora repelini* Léger, 1897, parasite d'Opilions. Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse, 4, 271-279.
- Ormières R. and Baudoin J. 1973: Eugrégaires parasites d'Opilions de la region de Besse-en-Chandesse. Annn. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse, 7, 199-208.
- Sarkar A. and Chakravarty M. M. 1969: Gregarines (*Protozoa: Sporozoa*) from insects 1. New cephaline gregarine of the family *Actinocephalidae*. Proc. Zool. Soc. Calcutta, 22, 17-29.

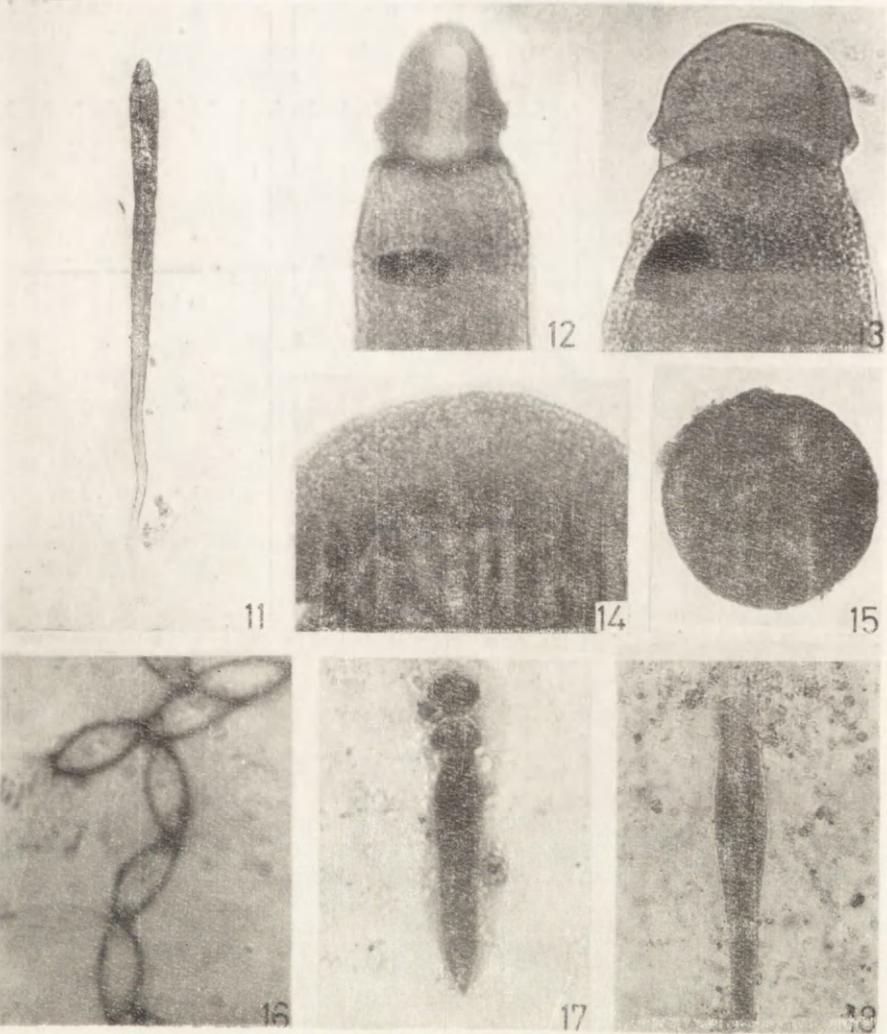
- Tschudovskia I. 1928: Über einige Parasiten aus dem Darmkanal der *Sciara*-Larven. Arch. Protistenk., 60, 287-304.
- Tuzet O. and Ormières R. 1954: Contributions à l'étude des grégarines des Thysanures. 9. *Hyalospora roscoviana* Schneider, 1875 et *Dinematospora grassei* g. n., sp. n. Ann. Sci. nat. Zool., 16, 303-309.

Received on 1 March 1979

EXPLANATION OF PLATE I

Echinospora phalangii gen. nov. sp. nov.

- 11: Microphotograph of sporont. × 35
- 12: Microphotograph of the anterior region of sporont. × 180
- 13: Microphotograph of the anterior region of sporont. × 215
- 14: Part of the front view of the pressed protomerite to show the serrated rim.
× 300
- 15: Advanced stage of gametocyst. × 56
- 16: Sporocysts in chains. Polar spines being very slender are not distinguishable in photograph. × 675
- 17: Cephalont with three segments. Note the rhomboidal shape of epimerite. × 240
- 18: Young sporont. × 67



S. D. Amoji et M. J. Devdhar

auctores phot.

Institut Zoologique de l'Universite Jagellone, Kraków, Oleandry 2a, Pologne

Anna CZAPIK

Frontonia pallida sp. n. un nouveau cilié psammophile
(Hymenostomata, Peniculina)

Synopsis. Une nouvelle espèce psammophile — *Frontonia pallida* a été découverte dans un lac saumâtre au bord de la mer Baltique. Ce cilié se distingue par une structure unique du cytopharynx à savoir la nasse se prolonge en forme d'un tuyau presque trois fois plus long que le péristome même.

Frontonia pallida a été découverte pendant les recherches sur les ciliés psammophiles de la mer Baltique aux environs de Gdańsk. En examinant les prélèvements du sable d'un lac saumâtre sur l'île Bonzak on a remarqué un cilié, dont la forme au premier coup d'oeil ressemblait à celle de *Colpidium campylum*. Étudié sous le microscope le cilié a montré le péristome typique pour le genre *Frontonia*. Cependant les préparations imprégnées au protéinate d'argent ont révélé une structure du cytopharynx différente de celle qu'on connaît chez les autres espèces de *Frontonia* et en général chez les autres Peniculien. Il était évident qu'on avait à faire avec une espèce nouvelle sinon avec un genre nouveau.

Le corps de ce cilié est élancé, sa partie antérieure très légèrement courbée (Fig. 1). Sa longueur est de 150–160 μm . Les ciliés fixés au Bouin pour le protargol gardaient leur forme typique tandis que ceux, qui étaient fixés au Champy pour l'imprégnation au nitrate d'argent, gonflaient. La différence est visible sur les photos. Observé sous la loupe *in vivo*, cette espèce se distingue parmi les autres ciliés par la pâleur de son cytoplasme qui n'est pas grisâtre mais blanc.

L'unique vacuole pulsatile est située dans le dernier quart du corps. Le macronucleus est ellipsoïde. La ciliature somatique comporte 60–66 cinéties dont 5 sont postorales. La suture postorale qui commence au-dessous du péristome continue jusqu'au pôle postérieur. Les trois cinéties

vestibulaires ainsi que toutes les cinéties du côté ventral gauche viennent buter sur cette suture (Fig. 2). La suture préorale est faible, néanmoins visible. Sur la face dorsale de la région antérieure les groupes de cinétosomes sont disposés d'une façon qui donne illusion de cinéties

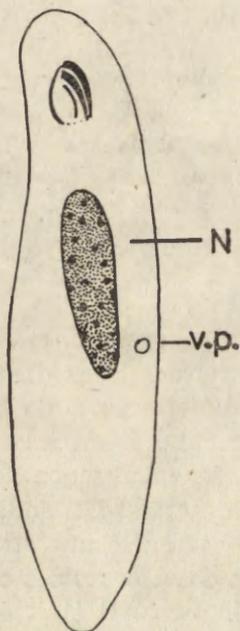


Fig. 1. *Frontonia pallida* sp. n.. La forme générale du cilié. N — macronucleus, v.p. vacuole pulsatile

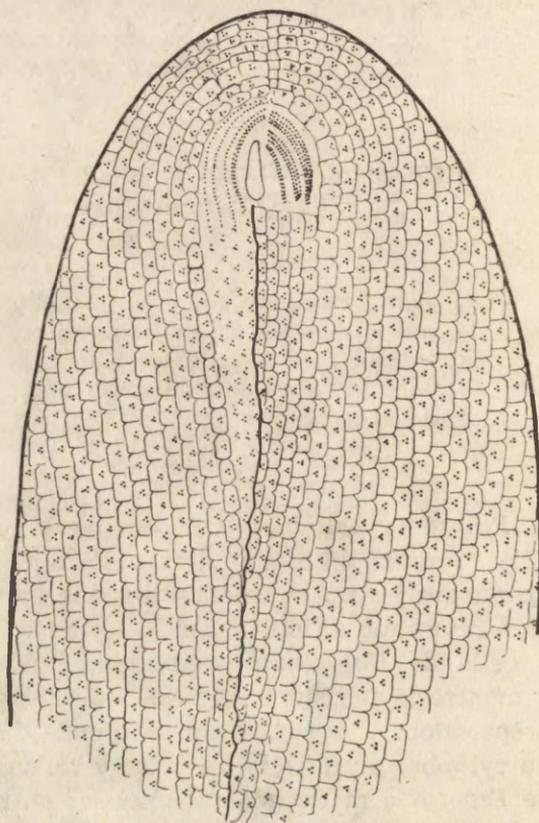


Fig. 2. *Frontonia pallida* sp. n. Le péristome et l'argyrome

annulaires autour du pôle comme chez *Frontonia canadensis* décrite par Roque et de Puytorac (1972). L'argyrome forme un réseau de mailles carrés qui entourent les cinétosomes disposés en triades (Fig. 2).

La parorale qui entoure la bouche du côté droite est double. Trois cinéties vestibulaires en descendant se terminent l'une après l'autre sur la suture postorale. La troisième d'eux atteint à peu près la partie équatoriale du corps. Du côté gauche il y a trois peniculus dont le premier, le plus épais contient 4 rangées de cinétosomes, le deuxième en possède trois et le troisième deux (Fig. 2. Pl. I 1).

Le cytopharynx est construit de baguettes fibreuses comme chez *Frontonia leucas* (Roque 1961 a) mais sa forme est différente. Le protéinate d'argent révèle parfaitement les nemadesmes formant cette structure; parfois ils sont visibles aussi sur les préparations imprégnées de nitrate d'argent, bien que faiblement. Les baguettes prennent l'origine des cinétosomes constituant les cinéties vestibulaires. Elles entourent seulement le côté droite du péristome, puis continuent vers le bas du corps en suivant la suture postorale jusqu'à l'endroit où les cinéties vestibulaires se terminent. Les baguettes ne sont pas plus ou moins droites comme chez les autres espèces de *Frontonia* mais elles s'enroulent en cercles formant ensemble une espèce de tuyau (Fig. 3, Pl. II 3-6). Les baguettes provenant de la première cinétie vestibulaire sont épaisses et leur bouts élargis. Leur nombre est 22-26. Celles qui prennent l'origine de la deuxième cinétie vestibulaire sont fines. Le prolongement de cytopharynx est beaucoup plus long que le péristome même; tandis que le péristome a entre 12-14 μm de long, la partie postérieure de cette curieuse structure mesure 38-44 μm de long. Cette structure est unique car les chercheurs qui s'occupaient de différentes espèces de *Frontonia* trouvaient toujours une simple nasse entourant la bouche seule.

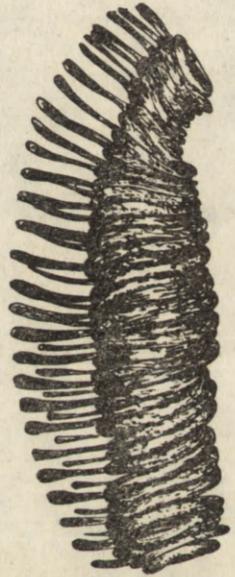


Fig. 3. *Frontonia pallida* sp. n. Le cytopharynx vu du côté gauche: les bouts des baguettes fibreuses provenant des cinéties vestibulaires s'enroulent en formant un tuyau

Il est impossible d'expliquer pour le moment quelle fonction accomplit le tuyau; le cilié se nourrit exclusivement des diatomés; s'il n'absorbait que de petites formes on pourrait supposer que le tuyau oriente peut-être l'algue entrant par la bouche pour qu'elle glisse le long du corps et non à travers. Mais le cilié avale les diatomés qui ne sont pas beaucoup plus petites que lui-même (on trouve p.e. *Navicula radiosa* dans son corps) — Pl. II 7.

Il faut ajouter que ce cilié a été trouvé seulement dans le rivage sablonneux du lac saumâtre dont la salinité est très faible (0.3%). On ne l'a pas rencontré dans les autres milieux. A côté de *Frontonia microstoma* redécrite par Roque (1961 b) se serait alors une deuxième espèce de ce genre vivant dans l'eau saumâtre.

SUMMARY

New psammophilic ciliate, *Frontonia pallida* sp. n., has been found in brackish lake at the coast of the Baltic sea. The species is characterized by peculiar structure of the cytopharynx which forms a basket-like tube three times longer than the peristome.

BIBLIOGRAPHIE

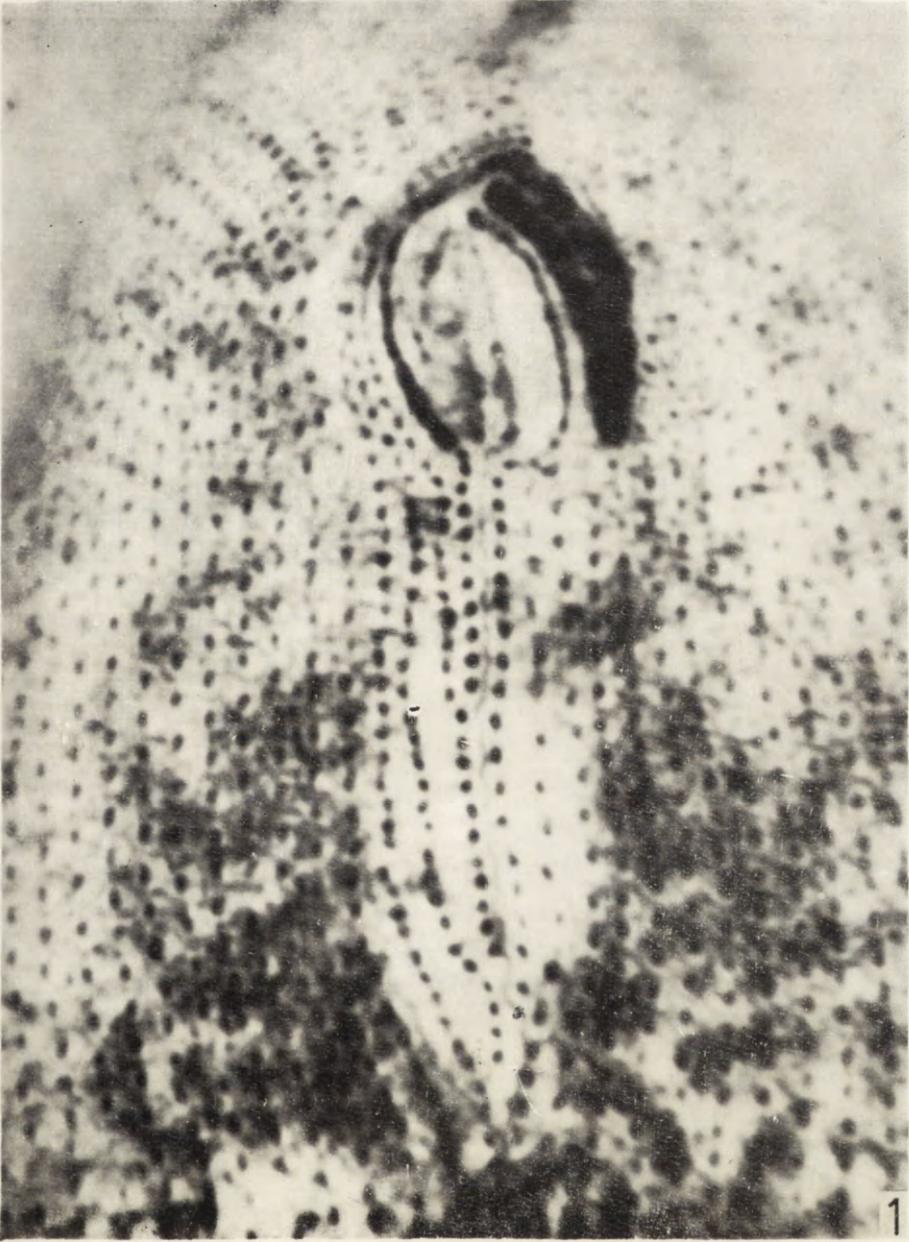
- Roque M. 1961 a: Recherches sur les infusoires ciliés: les Hymenostomes Peniculiens. Bull. Biol. Fr. Belg., 95, 431-510.
Roque M. 1961 b: *Frontonia microstoma* Kahl. J. Protozool., 8, 334-341.
Roque M. et de Puytorac 1972: *Frontonia canadensis* sp. nov. (cilié Hymenostome Peniculien). Nat. Can., 99, 411-416.

Received on 29 March 1979

EXPLICATIONS DE PLANCHES I-II

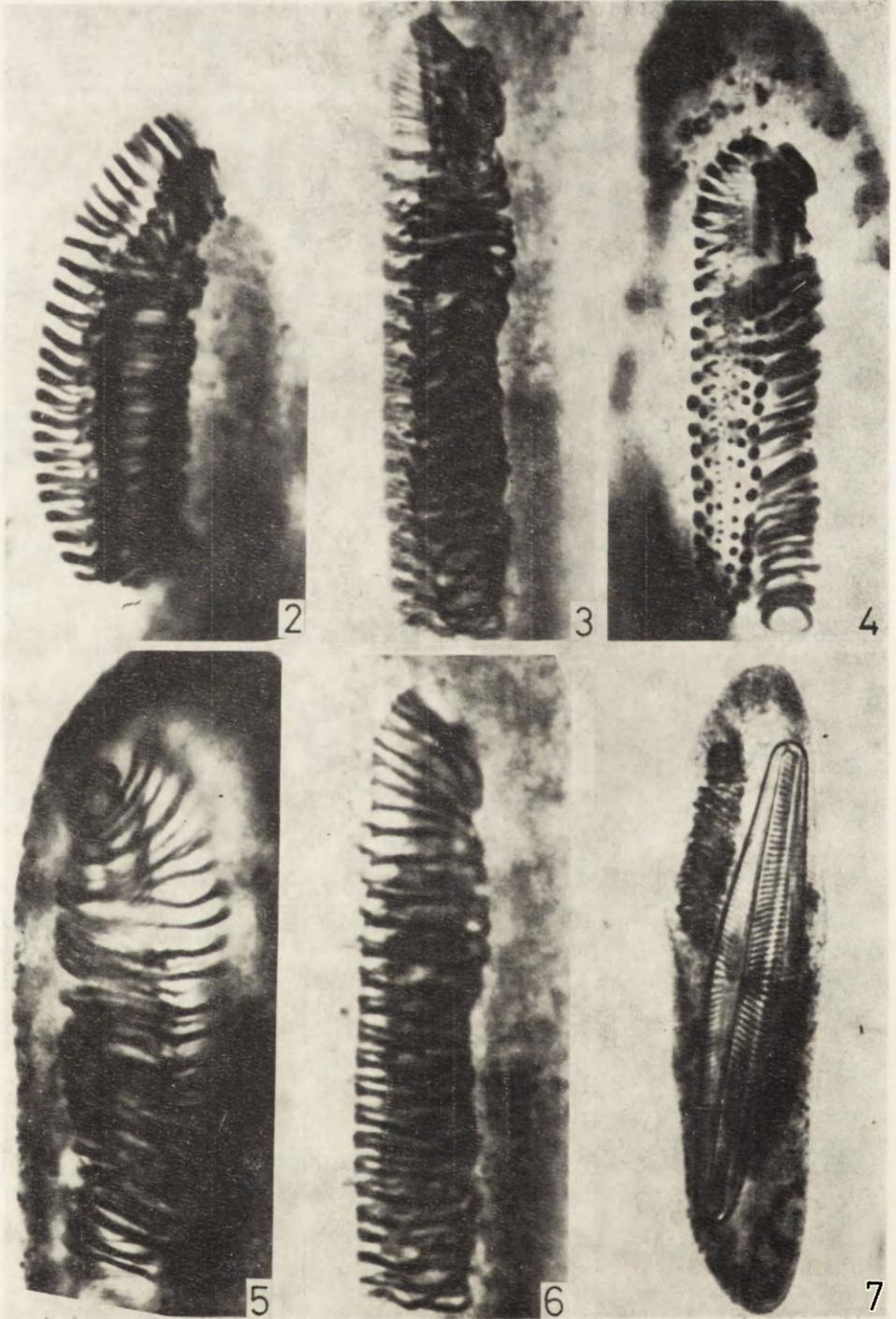
Frontonia pallida sp. n.

- 1: Le péristome (impregnation argentique d'après Chatton)
- 2: Le cytopharynx vu du côté gauche
- 3-6: Le cytopharynx observé sur les différents niveaux
- 7: L'individu qui a avalé une diatomé de l'espèce *Navicula radiosa*
- 2-7 — impregnation de protargol



A. Czapik

auctor phot.



A. Czapik

auctor phot.

Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград 190121, пр. Маклина 32, СССР

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR,
Leningrad 190121, Prospekt Maklina 32, USSR

Г. А. ШТЕЙН

G. A. STEIN

Новые данные о паразитических инфузориях (*Peritricha*,
Urceolariidae) с рыб бассейна Тихого океана

New data on Parasitic Ciliates (*Peritricha*, *Urceolariidae*) of Fishes of the
basins of Pacific Ocean

Синопис. На основании стандартной методики импрегнации азотнокислым серебром проведена ревизия урцеоляриид, паразитирующих на рыбах бассейна Тихого океана. Было вскрыто 445 экземпляров рыб, относящихся к 58 видам, на которых обнаружено 20 видов урцеоляриид: *Trichodina cottidarum* Dogiel, 1948, *T. decipiens* Laird, 1961, *T. domerguei* subsp. *domerguei* Haider, 1964, *T. elegini* Schulman-Albova, 1950, *T. hexagrammi* Zhukov, 1964, *T. jadratica* (Raabe, 1958), *T. jarmilae* Lom et Laird, 1969, *T. micromaculata* Stein, 1975, *T. oligocotti* (Lom, 1970), *T. ovonucleata* Raabe, 1958, *T. puytoraci* subsp. *marisalbi* Stein, 1976, *T. raabei* Lom, 1962, *T. elegans* Stein sp. n., *T. frequentis* Stein sp. n., *T. histiocotti* Stein sp. n., *T. minima* Stein sp. n., *T. miranda* Stein sp. n., *T. pala* Stein sp. n., (?) *Paratrichodina incisa* (Lom, 1959), *Trichodinella* sp.

Литература, касающаяся паразитических инфузорий с рыб дальневосточных морей СССР, очень невелика и включает всего три работы. В 1948 г. с жабер рыб залива Петра Великого (Японское море) Догель описал 5 видов инфузорий рода *Trichodina*, в том числе *T. cottidarum* с тремя подвидами. Жуков (1964) приводит описания 15 видов триходин, в том числе 6 новых видов, из Берингова моря и прилежащих водоемов. Штейн (1967) из Уссурийского залива Японского моря отмечает 7 видов, частично соответствующих описаниям Догеля и Жукова, частично известных к тому времени из Белого и Баренцова морей. Все эти работы были выполнены без применения стандартной методики импрегнации азотнокислым серебром по Клейну, и потому возникла необходимость собрать новый материал по урцеоляриидам

из дальневосточных морей и, обработав его в соответствии с современными требованиями, провести ревизию старых данных.

Материал¹ собран в июле–августе 1967 г. в Японском море (заливы Посьет, Уссурийский, остров Попов), в августе 1972 г. в Татарском проливе (пос. Антоново на юго-западе Сахалина), Охотском море (пос. Охотское на юго-востоке Сахалина), в лиманных озерах Тунайча и Изменчивое в районе пос. Охотское, в августе 1974 г. на Тихоокеанском побережье острова Кунашир (район Южно-Курильска, Южные Курилы).

В сборе материала, кроме автора, в разные годы принимали участие сотрудники Института цитологии АН СССР Н. Н. Бобылева, Н. В. Винникова, Е. Е. Махлин, С. И. Васянин, а в обработке — Н. В. Винникова, Е. Р. Ланина и Б. И. Хари. Определение некоторых видов рыб проведено сотрудником Зоологического института АН СССР А. В. Нееловым. Всем этим товарищам автор выражает свою сердечную признательность.

Мазки на предметных стеклах импрегнировали азотнокислым серебром по Клейну. Изучение ядерного аппарата было затруднено из-за того, что на мазках чаще всего одновременно встречались 2, а то и 3 вида. Все измерения выполнены на микрофотографиях (узкоплоченная фотонасадка „Practica” к микроскопам „Lumipan-Zeiss” и „Amplival-Zeiss” при объективах 90×, 100× и компенсационных окулярах 3.2× и 6.3×). Большинство фотографий иллюстраций для наглядности выполнены при одном увеличении, самые мелкие экземпляры дополнительно увеличены в 2 раза. Было вскрыто 445 экз. 58 видов рыб.

Ниже приводится список найденных видов и распределение их по хозяевам.

(1) *Trichodina cottidarum*, Dogiel, 1948: *Occa iburia*, *Limanda yokohamae* (Тихий океан); *Megalocottus platycephalus taeniopterus* (озера Изменчивое, Тунайча); *Enophrys diceraus* (Татарский пролив); *Aboma lactipes* (о. Попов).

(2) *T. decipiens* Laird, 1961: *Liparis punctulatus*, *Liparis* sp. II, *Blepsias cirrhosus*, *Stichaeus grigorjewi*, *Tilesina gibbosa*, *Pallasina barbata*, *Hexagrammos octogrammus*, *Azuma emmnoin* (Татарский пролив).

(3) *T. domerguei domerguei* Haider, 1964: *Pungitius tymensis* (ручей впадающий в оз. Тунайча).

(4) *T. elegini* Schulman-Albova, 1950: *Eleginus gracilis* (Тихий океан, Охотское море, зал. Посьет, о. Попов); *Enophrys diceraus*, *Zoarces viviparus elongatus*, (?) *Theragra halcogramma* (Татарской пролив), *Megalocottus platycephalus taeniopterus* (оз. Тунайча).

(5) *T. hexagrammi* Zhukov, 1964: *Hexagrammos stelleri* (зал. Посьет), *H. octogrammus* (Тихий океан, Охотское море, о. Попов), *Veraspes moseri* (Тихий океан), *Pallasina barbata* (Татарский пролив).

(6) *T. jadratica* (Raabe, 1958): *Occa iburia*, *Veraspes moseri*, *Limanda yokohamae* (Тихий океан), *Liparis punctulatus*, *Liparis* sp. II (Татарский пролив), *Gymnocanthus pistilliger*, *G. intermedius*, *Hexagrammos octogrammus*, *Liparis* sp. I (о. Попов).

(7) *T. jarmilae* Lom et Laird, 1969: *Bero elegans*, *Blepsias cirrhosus*, *Myoxocephalus brandti*, *Icelinus* sp., *Tilesina gibbosa*, *Pallasina barbata*, *Azuma emmnoin* (Татарский пролив), *Myoxocephalus jaok*, *Aboma lactipes*, *Liparis* sp. I (о. Попов) (*Myoxocephalus stelleri* (Охотское море).

¹ The material was collected in June–August 1967 from Japan Sea (Zaliv Posjeta, Ussurijskij Zaliv, Popov Island), Tatarskij in August 1972 from Proлив (village Antonovo in south-western part of Sachalin), Ochotskoje Sea (village Ochotskoje in south-eastern part of Sachalin), and from Tunajca and Izmenčivoje lakes near Ochotskoje village; in August 1974 from the Pacific coast of Kunasir Island (South Kuril Islands).

- (8) *T. micromaculata* Stein, 1975: *Opisthocentrus dybowskii* (Татарский пролив), (?) *Mugil cephalus* (зал. Посъет).
- (9) *T. oligocotti* (Lom, 1970): *Veraspes moseri* (Тихий океан).
- (10) *T. ovonucleata* Raabe, 1958: *Occa iburia* (Тихий океан), *Hexagrammos octogrammus*, *Myoxocephalus jaok* (о. Попов).
- (11) *T. puutoraci marisalbi* Stein, 1976: *Eleginus gracilis* (Тихий океан, Уссурийский зал. о. Попов).
- (12) *T. raabei* Lom, 1962: *Pleurogrammus azonus*, *Limanda yokohamae*, (?) *Occa iburia* (Тихий океан), *Hexagrammos octogrammus*, *Myoxocephalus jaok* (о. Попов).
- (13) *T. elegans* sp. n.: *Pungitius tyumensis* (ручей, впадающий в оз. Тунайча).
- (14) *T. frequentis* sp. n.: *Hexagrammos octogrammus* (Охотское море, Татарский пролив, о. Попов), *H. otakii*, *Eleginus gracilis*, *Pleurogrammus azonus* (Охотское море), *Hexagrammos stelleri* (зал. Посъет), *Azuma emmoin*, *Zoarces viviparus elongatus* (Татарский пролив); *Limanda herzensteini* (оз. Изменчивосе).
- (15) *T. histiocotti* sp. n.: *Histiocottus bilobus* (Татарский пролив).
- (16) *T. minima* sp. n.: *Stichaeus nozawae* (зал. Посъет).
- (17) *T. miranda* sp. n.: *Gasterosteus aculeatus* (Татарский пролив).
- (18) *T. pala* sp. n.: *Zoarces viviparus elongatus* (Охотское море, Татарский пролив).
- (19) (?) *Paratrachodina incisa* (Lom, 1959): *Leuciscus brandti* (зал. Посъет, о. Попов, оз. Тунайча).
- (20) *Trichodinella* sp.: *Cyprinus carpio haematopterus* (пруд в районе пос. Охотское).

Trichodina cottidarum Dogiel, 1948 sensu Raabe, 1959 (Pl. I 1–2)

Син.: *Trichodina domerguei* f. *borealis* Dogiel, 1940, part., *T. abomae* Dogiel, 1948, part., *T. cottidarum* f. *cottidarum* Dogiel, 1948, part., *T. pediculus* f. *borealis* Stryjecka-Trembaczowska, 1953. *T. cottidarum* f. *marisalbi* Schulman et Schulman-Albova, 1953, part., *T. cottidarum* f. *barenzi* Poljansky, 1955, *T. borealis* subsp. *borealis* Haider, 1964, part., *T. borealis* subsp. *cottidarum* Haider, 1964, *T. borealis* subsp. *barenzi* Haider, 1964.

По сравнению с другими, сравнительно слабо изменяющийся вид. Приводим измерения *T. cottidarum* с хозяина, ранее не упоминавшегося в литературе — *Occa iburia* из Тихого океана (Pl. I 1).

Диаметр тела 49.0 (1 экз.), прикрепительного диска 29.5–39.6 (34.9 ± 0.44 , 48)², наружный диаметр венчика 24.5–33.8 (29.9 ± 0.33 , 49), внутренний 15.5–24.5 (21.0 ± 0.32 , 49) μm . Длина наружного отростка 3.6–5.0 (4.3 ± 0.02 , 235), внутреннего 2.8–5.4 (4.1 ± 0.03 ; 225), ширина центральной части зубца 0.7–1.2 (0.99 ± 0.23 . 20) μm . В венчике 23–29 (25.2 ± 0.14 , 79) зубцов, на каждый зубец приходится 6–9 (7.7 ± 0.06 , 153) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 2.9–3.5 (2.9 ± 0.06 , 48) μm . Отношение наружного и внутреннего оторостков, выраженное в процентах, 79.6–150.0 (105.5 ± 0.89 , 229).

² Размах вариаций, в скобках: среднее — ошибка среднего — число промеренных экземпляров

² Extent of variation, in parentheses: mean, mean error, number of specimens measured

Более широкими были наружные отростки зубцов у триходин с *Enophrys diceraus* из Татарского пролива (Pl. I 2), которых мы также относим к этому виду.

Локализация и хозяин: жабры *Occa iburia*, *Megalocottus platycephalus taeniopterus*, *Aboma lactipes*, *Limanda herzensteini*, (?) *Gymnocanthus intermedius*, *Enophrys diceraus*.

Распространение: Японское море (зал. Петра Великого, о. Попов), Татарский пролив, озера Изменчивое, Тунайча, Тихий океан, по Жукову (1964), Берингово море (бухта Провидения).

Trichodina decipiens Laird, 1961 (Pl. I 3–4)

Син.: *T. liparisi* Zhukov, 1964, *T. elizabethae* Lom et Laird, 1969.

Впервые описаны с жабр *Artedius fenestralis* из острова Ванкувер (Тихоокеанское побережье Канады) по препаратам, окрашенным гематоксилином (Laird). Четкие рисунки прикрепительного диска с характерными зубцами и достаточно большое число измерений в работе Laird позволили идентифицировать этот вид на нашем материале и дать его переописание.

Триходины среднего размера. Тело в форме усеченного конуса с низким куполом. Прикрепительный диск хорошо развит. Наружные отростки зубцов в виде слабо изогнутых сравнительно узких лопастей с параллельными краями и закругленной вершиной (или передний край слабо выпуклый, а задний вогнутый). Внутренние отростки тупые, значительно короче наружных, сужающиеся к концам или равномерно палочковидные, косо направлены назад и сдвинуты назад по отношению к наружным. Центральные конические части зубцов короткие и широкие. На импрегнированных препаратах центральная часть диска темная или с многочисленными мелкими светлыми включениями неправильной формы. Макронуклеус (Ма) подковообразный, широкий, микронуклеус (Ми) довольно крупный, округлый или овальный и расположен против левого конца Ма (Laird 1961) или сбоку от него (Жуков 1964, Lom and Laird 1969).

Результаты измерений, приведенные Laird, наиболее близки к *T. decipiens* с *Hexagrammos otakii* из Татарского пролива.

Диаметр прикрепительного диска 28.0–41.3 (32.7 ± 0.41 , 38), наружный диаметр венчика 24.0–38.2 (28.1 ± 0.39 , 38), внутренний 15.2–23.9 (18.2 ± 0.28 , 38) μm . Длина наружного отростка 4.2–6.9 (5.1 ± 0.03 , 190), внутреннего 2.0–4.0 (3.1 ± 0.03 , 190), ширина центральной части зубца 0.6–1.6 (1.0 ± 0.01 , 181) μm . Венчик состоит из 19–27 (23.6 ± 0.12 , 151) зубцов, на каждый зубец приходится 6–9 (7.4 ± 0.05 , 222) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 2.3–4.4 (3.0 ± 0.07 , 38) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 120.0–233.3 (165.9 ± 1.51 , 190). *Trichodina decipiens* с *Blepsias cirrhosus* и *Tilesina*

gibbosa из того же района отличались более мелкими размерами и меньшим в среднем, числом зубцов в венчике. Еще мельче были *Trichodina decipiens* с *Liparis* sp. I с острова Попов.

Локализация и хозяин: жабры *Hexagrammos otakii*, *Liparis punctulatus*, *Liparis* sp. II, *Blepsias cirrhosus*, *Stichaeus grigorjewi*, *Tilesina gibbosa*, *Pallasina barbata*, *Icelinus* sp., *Azuma emmnoin*, *Myoxocephalus brandti*, *Liparis* sp. I, *Occa iburia*.

Распространение: Японское море (о. Попов), Татарский пролив, Тихий, океан.

Отличается значительной изменчивостью биометрических данных, формы и взаиморасположения отростков зубцов.

В нашем материале *T. decipiens* обнаружена у двух *Liparis* sp. с о. Попов, у единственных экземпляров *L. punctulatus* и *Liparis* sp. II, 1 из 2 *Pallasina barbata*, *Stichaeus grigorjewi*, 1 из 3 *Myoxocephalus brandti*, *Tilesina gibbosa*, единственных экземпляров *Azuma emmnoin*, *Hexagrammos otakii* и *Icelinus* sp., 3 из 21 (14.3%) *Blepsias cirrhosus* в Татарском проливе, 1 из 5 *Occa iburia* в Тихом океане. Интенсивность, как правило, незначительная. Одновременно с *Trichodina hexagrammi*, *T. frequentis*.

К этому же виду мы относим триходин с единственного экземпляра *Hexagrammos otakii*, отличавшихся более широкими внутренними отростками и значительно более крупными размерами (см. выше).

Trichodina elegini Schulman-Albova, 1950 (Pl. I 5–6)

В предыдущей статье (Штейн 1976) мы подробно описали два самостоятельных вида: *T. murmanica* Poljansky, 1955 (син. *T. cottidarum* f. *marisalbi* Schulman-Albova, 1953, *T. cottidarum* f. *cyclopteri* Poljansky, 1955, *T. domerguei* subsp. *saintjohnsi* Lom et Laird, 1969) и *T. elegini* Schulman-Albova, 1950. Изучение дальневосточных триходин с разных хозяев и сопоставление их с инфузориями из Баренцова и Белого морей (Штейн 1973, 1976) и с Атлантического побережья Канады Lom and Laird (1969) привело нас к выводу, что *T. murmanica* и *T. elegini* представляют собой единый вид, и таким образом *T. murmanica* является младшим синонимом *T. elegini*. Описание вида дано в нашей статье (Штейн 1976: *T. murmanica* — стр. 449, 452. Табл. 3, 4, Plate I, 1–3, *T. elegini* — стр. 452, 456, 457, Табл. 5, Plate I, 4–5).

Приводим результаты измерений *T. elegini* с *Eleginus gracilis* из зал. Посъет. Диаметр прикрепительного диска 28.4–44.6 (35.5 ± 0.93 , 20), наружный диаметр венчика 25.5–40.1 (31.9 ± 0.80 , 22), внутренний 17.4–28.8 (22.3 ± 0.58 , 23) μm . Длина наружного отростка зубца 3.8–6.3 (4.7 ± 0.06 , 105), внутреннего 3.2–6.7 (4.3 ± 0.07 , 105), ширина центральной части зубца 0.9–1.5 (1.3, 10 экз.) μm . В венчике 22–27 (25.2 ± 0.15 , 59) зубцов, на каждый зубец приходится 8–10

(9.0 ± 0.19 , 14) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 3.2–4.5 (3.9, 5 экз.) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 84.6–150.0 (110.9 ± 1.30 , 105).

Близкие результаты измерений были получены для *T. elegini* с того же вида рыб с о-ва Попов. По мере продвижения на север (Охотское море, Тихий океан) размеры триходин и число зубцов в венчике увеличиваются, сближаясь с результатами, полученными для *T. elegini* с *Eleginus navaga* из Белого моря.

Локализация и хозяин: плавники и жаберы *Eleginus gracilis*, *Megalocottus platycephalus teaniopterus*, *Enophris diceraus*, *Zoarces viviparus elongatus*, (?) *The- ragra halcogramma*.

Распространение: Японское море (зал. Посыет, о. Попов, зал. Петра Великого), Татарский пролив, Охотское море оз. Тунайча, Тихий океан; по Жукову (1964), Берингово море (бухта Провидения), по Lom and Laird (1969), Тихоокеанское побережье США (зал. Сан-Жуан, штат Вашингтон).

Eleginus gracilis в Тихом океане, по нашим данным, была заражена на 16.7% (3 из 18), в Охотском море — 2 из 5, в зал. Посыет — 2 из 3, о. Попов — 2 из 13 (15.4%), *Megalocottus platycephalus* из оз. Тунайча — 4 из 4, *Zoarces viviparus elongatus* из Татарского пролива — 3 из 14 (21.4%, единично).

Встречается в смешанном заражении с *T. puytoraci marisalbi* (*Eleginus gracilis*), *Trichodina frequentis* (*Eleginus gracilis*, *Zoarces viviparus elongatus*), *Trichodina cottidarum* (*Megalocottus platycephalus*, *Enophris diceraus*).

Trichodina hexagrammi Zhukov, 1964 (Pl. II 7–9)

Впервые описаны Жуковым по гематоксилиновым препаратам с жабер *Hexagrammos stelleri* из бухты Провидения (Берингово море). На основании рисунка, хорошо передающего форму зубцов, и биометрических данных, приведенных в работе Жукова, мы сочли возможным идентифицировать описанный им вид с триходинами, обнаруженными нами на том же хозяине — *Hexagrammos stelleri* — и на других видах рыб, в первую очередь на рыбах семейства *Hexagrammidae*.

Мелкие инфузории с хорошо развитым типичным для рода прикрепительным диском. Наружные отростки зубцов в виде широких округлых слабо изогнутых лопастей, сужающихся к вершинам. Последние закруглены или слегка заострены. Внутренние отростки короче наружных, палочковидные, прямые или очень слабо изогнуты в том же направлении, что и наружные и слегка сдвинуты назад. Центральные части зубцов тонкие, зубцы тесно сближены. На импрегнированных препаратах в центральной части прикрепительного диска беспорядочно разбросаны несколько светлых закругленных, палочковидных или веретеновидных включений. Число их варьирует от 1–2

до 9–10. Непосредственно перед делением и сразу же после него светлые включения в центре диска отсутствуют.

Приводим биометрические данные массовой популяции *T. hexagrammi* с *Hexagrammos octogrammus* из Тихого океана. Промеры инфузорий этого вида из других мест обитания не выходят за пределы указанной изменчивости или очень близки к ним. Диаметр прикрепительного диска 17.6–30.2 (23.8 ± 0.46 , 34), наружный диаметр венчика 18.9–26.1 (21.8 ± 0.30 , 35), внутренний диаметр венчика 13.5–19.4 (15.6 ± 0.25 , 39) μm . Длина наружного отростка 1.8–4.1 (3.1 ± 0.03 , 185), внутреннего 1.8–4.1 (2.7 ± 0.03 , 185) μm . В венчике 20–25 (22.6 ± 0.14 , 75) зубцов, на каждый зубец приходится 5–7 (5.7 ± 0.08 , 70) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 1.8–3.2 (2.3 ± 0.07 , 29) μm .

Локализация и хозяин: жабры *Hexagrammos stelleri*, *H. octogrammus*, *H. otakii*, *Veraspes moseri*, *Pallasina barbata*, *Zoarces viviparus elongatus*.

Распространение: Тихий океан, Охотское море, Татарский пролив, Японское море (зал. Посыет, о. Попов), по Жукову (1964), Берингово море (бухта Провидения).

По нашим данным, зараженность отдельных видов рыб *T. hexagrammi* в Японском море: *Hexagrammos octogrammus* 2 из 13 (15.4%), *H. stelleri* — 3 из 18 (16.7%), в Охотском море 9 из 17 *H. octogrammus* (58.8%), в Тихом океане — 2 из 3. Заражение *Veraspes moseri* из Тихого океана было единичным.

Встречается одновременно с *Trichodina frequentis*.

Trichodina jadratica (Raabe, 1958) (Pl. II 10–14)

Син.: *T. borealis* Schulman et Schulman-Albova, 1953, *T. pediculus* f. *pleuronectes* Stryjecka-Trembaczowska, 1953, *T. domerguei* f. *jadratica* Raabe, 1958, *T. domerguei* f. *pleuronectes* Raabe, 1958, *T. domerguei* f. *gobii* Raabe, 1959, *T. anguilli* Wu, 1961 sensu Ergens et Lom, 1970.

Обсуждая синонимию *T. jadratica* (Raabe, 1958), мы не можем рассматривать этот вид в качестве синонима *T. domerguei* f. *borealis*, описанного Догелем (1940) с бычков и камбал Белого моря (позднее триходины с бычков были выделены под названием *T. cottidarum* Dogiel, 1948). Для триходин с камбал Догель указывал значительно большее число зубцов в венчике (26–31, преобладало 28), чем это наблюдалось в большинстве популяций *T. jadratica*. Поскольку в настоящее время невозможно установить, какой вид инфузорий в действительности соответствует названию „*Trichodina domerguei* f. *borealis*” и с какого вида рыб („камбала”, по Догелю), мы вынуждены рассматривать *T. domerguei* f. *borealis* Dogiel, 1940 (= *T. borealis*) в качестве *nomen dubium*. Триходины, описанные Жуковым (1964) и нами (Штейн 1967, 1967, 1973, 1976) с камбал, хорошо идентифицируются с *T. jadratica*.

Приведем биометрические данные *T. jadratica* с *Occa iburia* из Тихого океана. Диаметр прикрепительного диска 24.6–33.9 (28.7 ± 0.58 , 23), наружный диаметр венчика 21.6–30.8 (25.8 ± 0.55 , 23), внутренний диаметр венчика 14.5–20.5 (17.6 ± 0.38 , 24) μm . Длина наружного отростка 3.5–5.3 (4.3 ± 0.03 , 120), длина внутреннего отростка 1.8–3.5 (2.7 ± 0.03 , 116) μm . В венчике 21–25 (22.9 ± 0.13 , 28) зубцов, на каждый зубец приходится 6–9 (7.6 ± 0.06 , 125) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 2.6–4.0 (3.4 ± 0.07 , 24) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 112.9–222.2 (160.3 ± 2.06 , 116).

Следует отметить, что дальневосточные популяции были более крупными и с большим числом зубцов в венчике, по сравнению с черноморско-азовскими.

Локализация и хозяин: жабры, реже поверхность тела *Occa iburia*, *Gymnocanthus pistilliger*, *G. intermedius*, *Liparis* sp. I, *Liparis* sp. II, *Limanda yokohamae*, *Veraspes moseri*, *Lepidopsetta bilineata*.

Распространение: Японское море (зал. Петра Великого, о. Попов); Татарский пролив, Тихий океан, по Жукову (1964), Берингово море (бухта Провидения, зал. Лаврентия).

В нашем материале *Trichodina jadratica* обнаружена одновременно с *T. oligocotti*, *T. hexagrammi* (*Veraspes moseri*), *Trichodina decipiens* (*Liparis* sp. I), *Trichodina cottidarum*, *T. ovonucleata*, *T. jarmilae* (*Occa iburia*).

Зараженность разных видов рыб *T. jadratica* в бассейне Тихого океана была различной. В Японском море у о-ва Попов были заражены 1 из 8 *Gymnocanthus pistilliger*, 1 из 2 *G. intermedius*. Последний вид в районе зал. Посьет (бухта Миноносок) был заражен на 4.9% (1 из 21). В Тихом океане *T. jadratica* обнаружена у 5 из 5 *Occa iburia*, 2 из 10 *Limanda yokohamae*, 4 из 5 *Veraspes moseri*. В Татарском проливе — у единственного экземпляра *Liparis* sp. II.

По-видимому, одной из модификаций *Trichodina jadratica* является *T. jadratica* subsp. *noblei* Lom, 1970 с жабер *Eleotris sandwicensis* с о. Оаху (Гавайские острова) в Тихом океане.

Trichodina jarmilae Lom et Laird, 1969 (Pl. III 15–16)

Син.: *T. abomae* Dogiel, 1948 *T. cottidarum* f. *cottidarum* Dogiel, 1948, part., *T. cottidarum* f. *hemitripteri* Dogiel, 1948, *T. borealis* subsp. *cottidarum* Haider, 1964, *T. borealis* subsp. *hemitripteri* Haider, 1964, (?) *T. cottidarum* f. *alcichthys* Dogiel, 1948.

Все перечисленные виды были описаны по гематоксилиновым препаратам. Переисследование дальневосточных триходин с тех же хозяев, которые были обследованы Догелем (*Aboma lactipes*, *Blepsias cirrhosus*, *Bero elegans*, *Tilesina gibbosa*, *Hemitripterus villosus*), с применением методики импрегнации дало возможность установить их идентичность с *T. jarmilae* — видом, описанным (Lom and Laird 1969) с *Hemitripterus americanus* из Северной Атлантики (Ньюфаундленд).

Наши измерения *Trichodina jarmilae* с *Blepsias cirrhusus* из Татарского пролива. Диаметр прикрепительного диска 21.8–33.3 (27.6 ± 0.29 , 59), наружный диаметр венчика 18.5–27.7 (22.7 ± 0.23 , 60), внутренний 11.9–20.8 (15.2 ± 0.19 , 60) μm . Длина наружного отростка зубца 3.0–4.6 (3.7 ± 0.02 , 292), внутреннего 2.0–4.0 (2.9 ± 0.02 , 292), центральной части зубца 0.3–1.3 (0.9 ± 0.01 , 211) μm . Венчик состоит из 19–24 (21.4 ± 0.13 , 97) зубцов, на каждый зубец приходится 6–9 (7.3 ± 0.04 , 200) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 2.0–3.7 (2.7 ± 0.05 , 51) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 81.1–185.0 (129.0 ± 1.09 , 292). Популяции с других хозяев и из иных мест обитания незначительно отклонялись в ту или иную сторону.

Локализация и хозяин: жабры *Hemitripterus villosus*, *Bero elegans*, *Blepsias cirrhusus*. *Myoxocephalus jaok*, *M. brandti*, *M. stelleri*, *Icelinus* sp., *Tilesina gibbosa*, *Pallasina barbata*, *Aboma lactipes*. *Liparis* sp. I, *Azuma emmnoin*, *Occa iburia*, *Pholis pictus*.

Распространение: Тихий океан, Охотское море, Татарский пролив, Японское море (зал. Петра Великого, о. Попов).

В нашем материале очень часто наблюдалось смешанное заражение *T. jarmilae* и *T. decipiens* (*Blepsias cirrhusus*, *Tilesina gibbosa*, *Azuma emmnoin*, *Pallasina barbata*). Кроме того отмечено смешанное заражение *Trichodina jarmilae* с *T. raabei* (*Myoxocephalus jaok*), *Trichodina cottidarum* (*Aboma lactipes*), *Trichodina frequentis* (*Azuma emmnoin*), с *Trichodina ovonucleata* и *T. jadratica* (*Occa iburia*).

Наибольшая интенсивность и экстенсивность заражения *Trichodina jarmilae* наблюдались у *Blepsias cirrhusus* из Татарского пролива (8 из 18–44%). По нашим данным, *Blepsias cirrhusus* в этом районе (пос. Антоново) следует считать основным хозяином *Trichodina jadratica*. Другие виды рыб были заражены следующим образом: *Tilesina gibbosa* — 3 из 3, *Pallasina barbata* 2 из 3, *Bero elegans* — 1 из 2, *Myoxocephalus brandti* — единично 1 из 2, *Icelinus* sp. и *Azuma emmnoin* — единственные экземпляры. В Охотском море отмечено единичное заражение 1 из 2 экз. *Myoxocephalus stelleri*. В Японском море: 2 из 10 (20%) *Aboma lactipes*, единично 1 из 2 *Liparis* sp. I и 2 из 3 *Myoxocephalus jaok*.

Trichodina micromaculata Stein, 1975 (Pl. III 17–18)

Впервые описаны с черноморских и азовских рыб в Определителе паразитов позвоночных Черного и Азовского морей (Штейн 1975). Так как форма определителя не позволила привести подробное описание нового вида, мы даем его в данной работе.

Инфузории среднего размера. Зубцы широко расставлены, с широкими центральными частями. Наружные отростки широкие лопастевидные с вы-

пуклой передней и почти прямой или слабо вогнутой задней стороной, слегка сужаются к закругленной или слабо заостренной вершине. Внутренние отростки прямые, равномерно палочковидные или немного расширяющиеся на концах, на одном уровне с наружными или сдвинуты назад. Выrost перед внутренним отростком не всегда четко выражен. На импрегнированных препаратах центральная зона прикрепительного диска чаще всего в виде единственного небольшого светлого пятна или состоит из нескольких пятен разной формы и размера. Концы внутренних отростков на значительном расстоянии не доходят до светлого центра.

Триходины с *Opisthocentrus dybowskii* из Татарского пролива имели следующие размеры: диаметр прикрепительного диска 32.4 — 46.9 (39.5 ± 0.36 , 71), наружный диаметр венчика 28.4—41.9 (35.9 ± 0.31 , 78), внутренний 18.0—29.1 (24.8 ± 0.24 , 79) μm . Длина наружного отростка 4.8—6.4 (5.6 ± 0.02 , 395), внутреннего 3.6—6.7 (5.1 ± 0.03 , 393), ширина центральной части зубца 1.4—2.4 (1.7 ± 0.03 , 162) μm . В венчике 20—27 (23.2 ± 0.12 , 125) зубцов, на каждый зубец приходится 7—12 (8.9 ± 0.05 , 354) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 2.7—5.0 (3.8 ± 0.06 , 72) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 73.1—158.3 (110.0 ± 0.67 , 391).

Триодины с поверхности тела и жабер *Mugil cephalus* из залива Посьет по форме зубцов и размерам прикрепительного диска близки к черноморским *Trichodina micromaculata* с жабер *Trachurus mediterraneus* и *Syngnathus argentatus*, отличаясь несколько большими размерами наружных и внутренних отростков и преобладающим числом полос, приходящихся на один зубец. Для инфузорий с *Opisthocentrus dybowskii* и *Pholis pictus* (Татарский пролив) характерны более резко сужающиеся к вершинам наружные отростки зубцов, слабо изогнутые в том же направлении, что и наружные, внутренние отростки. По числу зубцов они немного отличаются от черноморских триодин, а по числу полос оказываются ближе к триодидам с *Mugil cephalus* из залива Посьет.

Описываемый вид наиболее близок к *Trichodina vancouverense* Laird, 1961 и *T. arctica* Zhukov, 1964. От *T. vancouverense* отличается закругленными вершинами наружных отростков, закругленными на концах палочковидными (а не шиповидными как у *T. vancouverense*) внутренними отростками, преобладающим у тихоокеанских рас числом полос, приходящихся на один зубец. От *T. arctica* — более крупными размерами, меньшим числом зубцов в венчике и преобладанием большего числа полос. Однако, возможно, что эти отличия связаны как с различной обработкой материала (*T. vancouverense* и *T. arctica* описаны по препаратам, окрашенным гематоксилином), так и с проявлением внутривидовой изменчивости.

Локализация и хозяин: жабры, плавники, реже поверхность тела и носовые ямки *Opisthocentrus dybowskii*, *Pholis pictus*, *Mugil cephalus*.

Распространение: Японское море (зал. Посьет), Татарский пролив.

Trichodina oligocotti (Lom, 1970) (Pl. III 19–20)

Син.: *T. cottidarum* subsp. *oligocotti* Lom, 1970.

Описаны с жабер *Oligocottus maculosus* у острова Сан-Жуан (Тихоокеанское побережье США, штат Вашингтон) (Lom 1970). Нами обнаружены на жабрах, реже на плавниках камбалы *Veraspes moseri* в Тихом океане.

Триходины среднего размера. Серповидно изогнутые наружные отростки, наиболее широкие в нижней части, сужаются к заостренным вершинам. Внутренние отростки прямые или слегка изогнуты назад, как правило заметно длиннее наружных, сужаются к концам или равномерно палочковидные, сдвинуты назад, по сравнению с наружными. Небольшой вырост перед внутренним отростком не всегда отчетливо вишен. На импрегнированных препаратах центральная часть диска темная или с бесформенными мелкими включениями.

Размеры: диаметр прикрепительного диска 24.8–36.9, наружный диаметр венчика 23.2–33.8, внутренний 16.0–24.8 μm . Длина наружного отростка 3.2–5.6 внутреннего, 2.4–6.3, ширина центральной части зубца 0.8–2.0 μm . Венчик состоит из 19–26 зубцов, на каждый зубец приходится 6–10 (преобладает 8) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 1.6–3.6 μm . Отношение длины наружного и внутреннего отростков 87.7–91.4.

От типичных *Trichodina cottidarum*, *T. oligocotti* отличаются формой наружных и внутренних отростков, от *T. histiocotti* формой наружных отростков, положением внутренних отростков по отношению к окружности венчика.

Были обследованы 5 экземпляров *Veraspes moseri*, все они были заражены *Trichodina oligocotti*.

Статистическая обработка промеров инфузорий с камбал разного размера (270, 310 и 540 mm) не обнаружила достоверных различий в размерах и количестве зубцов в венчике инфузорий в зависимости от размеров (возраста) хозяев.

Trichodina ovonucleata Raabe, 1958, (Pl. IV 21–24)

Син.: *Tripartiella globonucleata* Lom, 1963, *Trichodina ovonucleata* f. *gracilis* Zaika, 1966, *T. ovonucleata* f. *subtilis* Zaika, 1966, *T. parvula* Lom, 1970, *T. ovonucleata* subsp. *globonucleata* Lom, 1970.

Наиболее характерным видовым признаком *T. ovonucleata* является овальный или бобовидный Ма, в отличие от большинства других представителей рода с подковообразным или колбасовиным ядром. Сравнение литературных (Raabe 1958, Lom 1962, Zaika 1966, Lom 1970, Найденова 1974, Штейн 1975) и собственных данных показало большую изменчивость количественных признаков, в том числе и длины адоральной спирали у *T. ovonucleata*.

Lom (1970) на основании сходства формы зубцов, размеров тела и ядер объединил *T. ovonucleata* с описанной им ранее (Lom 1963) *Tripartiella (Paratrichodina) globonucleata*, рассматривая последний вид в качестве подвида *Trichodina ovonucleata*. Одновременно в этой же работе им был описан новый вид *T. parvula*, обнаруженный одновременно с *T. ovonucleata* на одних и тех же хозяевах. Сам Lom отмечает сходство между *T. ovonucleata* и *T. parvula* по форме зубцов, у последнего вида лишь более заостренные наружные и внутренние отростки. Сравнение биометрических данных и приведенных в работе фотографий (Lom 1970: Табл. 1–2, Plate II, Figs. 1–3; Plate V, Figs. 3–6) убедило нас в том что *T. parvula* и *Tripartiella globonucleata* (= *T. ovonucleata*) относятся к одному и тому же виду. К сожалению Lom приводит лишь размеры Ма *T. parvula*, не упоминая о его форме.

В нашем черноморском материале единичные особи типа „*T. parvula*” встречались одновременно с типичными *T. ovonucleata* или преобладали, как это имело место на мазках с различных видов рыб в районе Севастополя. В бассейне Тихого океана нами были обнаружены только инфузории типа „*T. parvula*” с более грубыми, по сравнению с типичными *T. ovonucleata*, зубцами: широкие наружные отростки зубцов с заостренными вершинами, внутренние отростки шиповидные или клиновидные, срединные части зубцов относительно широкие.

Размеры инфузорий с жабер *Occa iburia* из Тихого океана: диаметр прикрепительного диска 25.5–26.4 (21.0 ± 0.37 , 44), наружный диаметр венчика 13.6–24.6 (18.0 ± 0.39 , 44), внутренний диаметр венчика 8.6–17.6 (12.9 ± 0.29 , 44) μm . Длина наружного отростка 1.9–4.4 (2.6 ± 0.03 , 204), внутреннего 1.8–4.0 (2.5 ± 0.04 , 181) μm . В венчике 16–24 (19.7 ± 0.16 , 73) зубцов, на каждый зубец приходится 5–8 (7.0 ± 0.06 , 128) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 1.4–3.1 (2.2 ± 0.05 , 43) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 71.0–200.0 (108.2 ± 1.80 , 182).

Возможно, что формы типа *T. parvula* представляют собой какую-то неуточненную пока стадию жизненного цикла *Trichodina ovonucleata* и являются следствием фенотипической изменчивости. Это предположение подтверждается находкой экземпляров, сочетающих одновременно признаки „*T. parvula*” (широкие заостренные на вершине наружные отростки и *T. ovonucleata* (палочковидные закругленные на концах внутренние отростки).

Локализация и хозяин: жабры, реже плавники *Myoxocephalus jaok*, *Occa iburia*, *Hexagrammos octogrammus*.

Распространение: Тихий океан, Японское море (о. Попов), по данным Lom (1970), Тихоокеанское побережье США (о. Сан-Жуан, штат Вашингтон).

По нашим данным, были заражены 5 из 5 *Occa iburia*, 6 из 13 (46.2%) *Hexagrammos octogrammus*, 1 из 5 *Myoxocephalus jaok*. Наблюдала смешанное заражение *Trichodina ovonucleata* с *T. raabei* (*Hexagrammos octogrammus*, *Myoxocephalus jaok*) и с *Trichodina jadratica*, *T. cottidarum* и *T. jarmilae* (*Occa iburia*).

Trichodina raabei, 1962 (Pl. IV 25–26)

Син.: *T. multidentis* Laird, 1953, part.

Обнаружены нами на жабрах *Pleurogrammus azonus* из Тихого океана. *Hexagrammos octogrammus* и *Myoxocephalus jaok* с о. Попов. Наиболее многочисленной была популяция с *Pleurogrammus azonus*.

Диаметр прикрепительного диска $22.9-31.9$ (27.5 ± 0.40 , 38), наружный диаметр венчика $20.7-28.5$ (24.6 ± 0.35 , 40), внутренний $15.8-21.3$ (18.3 ± 0.23 , 41) μm . Длина наружного отростка $2.7-3.8$ (3.2 ± 0.03 , 145), внутреннего $1.8-3.8$ (2.7 ± 0.04 , 145) μm . В венчике 23–29 (25.7 ± 0.12 , 102) зубцов, на каждый зубец приходится 5–8 (6.6 ± 0.07 , 94) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны $2.2-3.2$ (2.5 ± 0.03 , 40) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков $84.4-156.5$ (119.7 ± 1.26 , 145).

В Японском море *Trichodina raabei* обнаружена у 10 из 13 (77%) *Hexagrammos octogrammus* одновременно с *Trichodina ovonucleata*, в Тихом океане у единственного экземпляра *Pleurogrammus azonus*.

Laird (1953) на побережье Новой Зеландии (Северный остров) с нескольких видов рыб описал новый вид — *Trichodina multidentis*, отличавшийся большой изменчивостью. Мы предполагаем, что, по-видимому, *T. multidentis*, в понимании Laird, представляет собой смесь видов, одним из которых, судя по форме зубцов (Laird 1953, Fig. 89), является *T. raabei*.

Trichodina elegans sp. n. (Pl. IV 27)

Инфузории среднего размера. Прикрепительный диск с тонкими зубцами. Наружные отростки зубцов слегка изогнуты, треугольной формы, вершины их заострены или слегка закруглены. Внутренние отростки изогнуты в том же направлении, что и наружные, тонкие палочковидные, прикрепляются на уровне заднего края наружного отростка. Центральные части зубцов тонкие, сужающиеся к концам. На импрегнированных препаратах центральная светлая зона чаще всего раздроблена на 2–3 фрагмента, внутренние отростки на значительном расстоянии не доходят до нее. Отмечены экземпляры с нераздробленной светлой зоной.

Диаметр прикрепительного диска $24.0-31.5$ (28.5, 11 экз.), наружный диаметр венчика $24.9-30.2$ (26.3, 12 экз.), внутренний $14.7-20.7$ (18.2, 12 экз.) μm . Длина наружного отростка $3.3-4.9$ (4.0 ± 0.05 , 59), внутреннего $3.0-4.8$ (3.8 ± 0.05 , 59), ширина центральной части зубца $0.6-1.2$ (0.8 ± 0.04 , 40) μm . Венчик состоит из 21–25 (23.3, 11 экз.) зубцов, на каждый зубец приходится 8–10 полос прикрепительного диска (8.8 ± 0.18 , 20). Ширина краевой мембраны $2.7-3.6$ (3.3, 11 экз.) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков $85.7-130.0$ (106.5 ± 1.36 , 59).

От *Trichodina micromaculata* *T. elegans* отличаются треугольными наружными отростками, отсутствием выроста перед внутренним отростком, от *T. tenuidens* — значительно меньшими размерами, формой и числом зубцов, строением центральной светлой зоны.

Локализация и хозяин: жабры *Pungitius tymensis*.

Распространение: ручей, впадающий в озеро Тунайча.

Заражение слабое, главным образом на 1 из 15 вскрытых экземпляров колюшек. Одновременно с *Trichodina domerguei domerguei*.

Trichodina frequentis sp. n. (Pl. V 28–29)

Син.: *T. spheroides* Dogiel, 1948, ошибочно *T. trichiuri* Dogiel, 1948 (Штейн 1967, Рис. 4).

Инфузории среднего размера с хорошо развитым прикрепительным диском. Наружные отростки зубцов широкие серповидно изогнутые, сужаются к закругленным или слегка заостренным вершинам; внутренние длинее наружных, тонкие, равномерно палочковидные или сужающиеся к концам, прямые, слегка сдвинуты назад, по сравнению с наружными, и направлены концами вперед. Центральные части зубцов узкие, почти цилиндрические или слабоконические. По мере роста они заметно удлиняются, так что у вполне сформированных экземпляров зубцы оказываются широко расставленными. На импрегнированных препаратах характерна обширная темная центральная зона прикрепительного диска.

Ма подковообразный, Ми овальный, среднего размера и расположен против конца Ма или на небольшом расстоянии сбоку от него.

Биометрические данные *T. frequentis* с *Hexagrammos octogrammus* из Охотского моря: Диаметр прикрепительного диска $26.8-39.4$ (34.2 ± 0.73 , 23), наружный диаметр венчика $25.2-34.8$ (30.9 ± 0.61 , 23), внутренний $19.2-28.0$ (24.1 ± 0.57 , 23) μm . Длина наружного отростка $2.8-3.6$ (3.3 ± 0.02 , 100), внутреннего $2.4-4.8$ (3.8 ± 0.05 , 100), ширина центральной части зубца $0.4-0.8$ (0.8 ± 0.01 , 40) μm . Венчик состоит из $27-36$ (31.8 ± 0.26 , 62) зубцов, на каждый зубец приходится $6-10$ (7.1 ± 0.10 , 60) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны $1.7-2.8$ (2.4 ± 0.05 , 23) μm . Отношение наружных и внутренних отростков $66.7-150.0$ (89.4 ± 1.23 , 100).

Более крупными были инфузории с *Hexagrammos otakii* из Татарского пролива. Размеры единичных экземпляров *Trichodina frequentis* с *Pleurogrammus azonus*, *Azuma emmnoin*, *Limanda herzensteini* и других видов рыб не выходят за пределы указанной изменчивости.

Адоральная спираль совершает чуть больше одного оборота.

От *Trichodina trichiuri* Dogiel, 1948 отличаются иной формой зубцов, большим числом зубцов в венчике, большими размерами прикрепительного диска

и венчика, от *T. galiae* Lom et Laird, 1969 — иной формой зубцов, большим их числом и меньшими размерами, от *T. halli* Padnos et Nigrelli, 1942 — иной формой зубцов и меньшими размерами.

Вероятно одной из рас³ *T. frequentis* являются триходины, описанные Догелем с жабер *Spheroides rubripes* в заливе Петра Великого под названием *Trichodina spheroides*. Размеры: диаметр тела 53–73 (63), прикрепительного диска 45–57 (51), венчика, в среднем, 35 μm . Венчик состоял из 25–29 зубцов, на каждый зубец приходилось 8 полос прикрепительного диска. Как писал Догель, наряду с другими признаками „нежность структуры венчика крючьев также может считаться одним из признаков” (1948, стр. 49). Сближая инфузорий с *Spheroides* с *Trichodina frequentis*, мы основываемся на сходстве схематического рисунка, приведенного в работе Догеля (1948, Табл. VI, 1), с изображениями *T. frequentis* (широко расставленные зубцы, внутренние отростки направлены вперед). По размерам они ближе всего к инфузориям с *Hexagrammos otakii* из Охотского моря.

Так как видовое название *Trichodina spheroides* оказалось преокупированным (см. *T. spheroidesi* Padnos et Nigrelli, 1942), мы вынуждены были заменить его новым названием — *Trichodina frequentis* sp. n.

Локализация и хозяин: жабры *Hexagrammos octogrammus*, *H. otakii*, *H. stelleri*, *Pleurogrammus azonus*, *Eleginus gracilis*, *Azuma emmnoin*, *Limanda herzensteini*, *Zoarces viviparus elongatus*, (?) *Myoxocephalus jaok*, вероятно, *Spheroides rubripes*, *S. pardalis*.

Распространение: Охотское море, оз. Изменчивое, Татарский пролив, Японское море (заливы Посьет, Петра Великого).

Зараженность одного и того же вида рыб в различных местообитаниях заметно отличалась. Так *Hexagrammos octogrammus* был заражен следующим образом: Охотское море — 4 из 5, Татарский пролив — 1 из 12 (8,3%), Японское море (о. Попов) — вскрыто 13 экземпляров, зараженных не было. *H. stelleri*; Охотское море — единственный экземпляр не заражен; Японское море (зал. Посьет) — 5 из 25 (20%) 2 из 5 на о. Попов. *H. otakii*: Охотское море — 2 из 3, Татарский пролив — единственный экземпляр не заражен. *Eleginus gracilis* из Охотского моря — 3 из 5. На остальных видах рыб отмечены лишь единичные инфузории.

Обитает одновременно с *Trichodina hexagrammi* и *T. pala*

Кроме биометрической, наблюдается изменчивость формы зубцов, прежде всего внутренних отростков, которые могут быть то тонкими шиповидными, то довольно широкими палочковидными.

³ Под расой мы понимаем, (Майр 1971, стр. 61) локальные популяции внутри подвида, расы по хозяину у паразитов

³ As a race we understand (according to Mayr 1971) local populations within subspecies, in the case of parasites — host races

Trichodina histiocotti sp. n. (Pl. V 30)

Сравнительно мелкие инфузории. Наружные отростки широкие лопастевидные, слегка сужаются к вершине. Передний край наружного отростка выпуклый, задний слегка вогнутый. Внутренние отростки прямые равномерно палочковидные, направлены вперед под углом к окружности венчика. Центральные части зубцов сравнительно узкие. Зубцы тесно сближены. На импрегнированных препаратах центральная часть диска темная или с бесформенными светлыми включениями.

Диаметр прикрепительного диска $20.8-30.4$ (27.8 ± 0.37 , 23), наружный диаметр венчика $19.8-26.4$ (23.7 ± 0.16 , 24), внутренний $14.4-19.1$ (16.9 ± 0.23 , 25) μm . Длина наружного отростка $2.6-3.8$ (3.3 ± 0.6 , 125), внутреннего $3.2-5.6$ (4.3 ± 0.04 , 115), ширина центральной части зубца $0.3-1.0$ (0.7 ± 0.02 , 102) μm . Венчик состоит из 21–27 (24.6 ± 0.08 , 153) зубцов, на каждый зубец приходится 6–8 (7.3 ± 0.05 , 135) полос прикрепительного диска. Отношение наружного и внутренне отростков $60.5-108.6$ (77.4 ± 0.71 , 115).

От *T. frequentis* отличаются значительно меньшими размерами, иной формой наружных отростков тесно сдвинутых зубцов, меньшим числом зубцов в венчике, относительно более длинными внутренними отростками, от типичных *T. cottidarum* — формой наружных и внутренних отростков, положением внутреннего отростка по отношению к окружности венчика, более мелкими размерами, от *T. oligocotti* — формой и положением внутренних отростков, более округлой формой наружных лопастей.

Локализация и хозяин: жабры *Histiocottus bilobus*.

Распространение: Татарский пролив.

Единственный экземпляр *H. bilobus* был заражен очень сильно.

Trichodina minima sp. n. (Pl. V 31–32)

Мелкие триходины с небольшим числом зубцов в венчике, обнаружены на жабрах *Stichaeus nozawae* из зал. Посьет. Наружные отростки изогнуты, с выпуклой передней и вогнутой задней стороной и закругленной вершиной. Более короткие прямые палочковидные внутренние отростки сдвинуты назад. Направленный вперед вырост перед внутренним отростком не всегда отчетливо виден. На импрегнированных препаратах центральная часть диска в виде небольшого цельного или раздробленного на несколько фрагментов светлого пятна. Внутренние отростки на значительном расстоянии не доходят до светлого центра.

Диаметр прикрепительного диска $17.6-19.2$, наружный диаметр венчика

15.7–16.6, внутренний 9.6–11.5 μm . Длина наружного отростка 2.9–3.5, внутреннего 1.9–2.9 μm . Венчик из 17–19 зубцов. Число полос из-за плохой сохранности инфузорий сосчитать не удалось. Отношение наружного и внутреннего отростков 100.0–168.4.

От *T. hexagrammi* отличается формой зубцов и включений в центральной части прикрепительного диска, меньшим числом зубцов в венчике.

Единственный экземпляр *Stichaeus nozawae* был слабо заражен.

Trichodina miranda sp. n. (Pl. V 33)

Довольно крупные инфузории. Наружные отростки зубцов треугольные широкие с выпуклым передним и прямым задним краями, расположены перпендикулярно или под небольшим углом к окружности венчика. Внутренние отростки прямые палочковидные, слегка сдвинуты назад по отношению к наружным отросткам. Небольшой направленный вперед вырост перед внутренним отростком не всегда отчетливо виден. Центральные части зубцов сравнительно узкие и сужаются к концам. Центральная часть диска на импрегнированных препаратах имеет своеобразное строение: светлые палочковидные структуры расположены по радиусам в виде правильной розетки, часто они как бы продолжают внутренние отростки и отделены от них небольшими темными промежутками. Число центральных включений примерно вдвое меньше числа зубцов в венчике. По-видимому, это образование представляет собой остатки зубцов предыдущего поколения.

Диаметр прикрепительного диска 42.3–57.1 (50.7 ± 1.34 , 17), наружный диаметр венчика 38.0–54.1 (46.99 ± 1.22 , 18), внутренний 26.6–39.9 (34.4 ± 0.95 , 18) μm . Длина наружного отростка 4.6–7.3 (6.3 ± 0.07 , 85), внутреннего 4.9–9.2 (7.3 ± 0.10 , 80), ширина центральной части зубца 1.3–2.3 (1.8 ± 0.04 , 51) μm . В венчике 27–31 (29.2 ± 0.22 , 26) зубцов, на каждый зубец приходится 8–11 (9.2 ± 0.14 , 49) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 3.4–5.6 (4.3 ± 0.21 , 11) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 67.6–116.3 (87.4 ± 1.02 , 80).

От всех описанных ранее с рыб видов триходин *T. miranda* отличается своеобразным строением центральной части прикрепительного диска. По форме зубцов наиболее сходна с *T. tenuidens*. От *T. unionis* с пресноводных моллюсков отличается формой зубцов, более мелкими размерами и упорядоченным строением центральной зоны прикрепительного диска.

Локализация и хозяин: жабры, реже плавники *Gasterosteus aculeatus*.

Распространение: Татарский пролив.

Из 10 вскрытых *Gasterosteus aculeatus* были заражены 7 (70%). Интенсивность на жабрах невысокая, на плавниках — единичные экземпляры.

Trichodina pala sp. n. (Pl. V 34)

Среднего размера. Наружные отростки зубцов с параллельными краями и широко закругленными вершинами, иногда слегка скошенными, перпендикулярны или немного наклонены по отношению к окружности венчика. Внутренние отростки палочковидные с закругленными вершинами, как правило, прямые и сдвинуты назад по отношению к наружным. Небольшой вырост перед внутренним отростком не всегда отчетливо виден. Центральные части зубцов сравнительно тонкие и короткие. На импрегнированных препаратах центральная часть диска темная или с неоформленными мелкими светлыми включениями.

Диаметр прикрепительного диска 28.8–40.0 (34.2 ± 0.66 , 22), наружный диаметр венчика 24.4–36.5 (30.8 ± 0.65 , 23), внутренний 16.4–25.0 (20.6 ± 0.53 , 22) μm . Длина наружного отростка 4.4–6.0 (5.1 ± 0.03 , 128), внутреннего 2.8–5.6 (4.7 ± 0.05 , 103), ширина центральной части зубца 0.5–1.6 (1.2 ± 0.03 , 85) μm . В венчике 21–26 (23.5 ± 0.20 , 35) зубцов, на каждый зубец приходится 7–11 (8.9 ± 0.11 , 69) полос прикрепительного диска. Ширина краевой мембраны 2.4–4.4 (3.4 ± 0.09 , 28) μm . Отношение наружного и внутреннего отростков 90.9–171.4 (110.9 ± 1.29 , 103).

От *T. nigra* subsp. *cobitis* отличается широко расставленными зубцами с закругленными наружными отростками, меньшими, в среднем, размером и числом зубцов в венчике, от *T. platyformis* значительно меньшими размерами и меньшим числом зубцов в венчике, закругленными на концах внутренними отростками, от *T. trigonofibulae* более крупными размерами, меньшим числом зубцов и полос, взаиморасположением наружного и внутреннего отростков. Весьма вероятно, что *T. pala* sp. n. и *T. trigonofibulae* Zhukov, 1964 представляют собой разные расы одного и того же вида, а их различия — результат изменчивости, связанный с обитанием на разных хозяевах. Это предположение поддерживается указанием Жукова (1964, стр. 240), что у *T. trigonofibulae* "наружная ветвь отходит от тела крючка почти под прямым углом", как в случае *T. pala*, и тем, что в нашем материале были обнаружены инфузории с более широкими внутренними отростками, которые не были столь резко сдвинуты назад. Однако, это предположение нуждается в дополнительной проверке.

Локализация и хозяин: жабры *Zoarces viviparus elongatus*.

Распространение: Охотское море, Татарский пролив.

Единичное заражение одного из двух экземпляров *Z. viviparus* из Охотского моря и 4 из 14 (28.6%) из Татарского пролива. Одновременно с *Trichodina frequentis*.

Таким образом, в обследованных районах нами были обнаружены 20 видов инфузорий, из которых 18 относятся к роду *Trichodina*. Представляет

интерес находка *Paratrichodina incisa*, широко распространенного пресноводного паразита, на *Leuciscus brandti* — единственном представителе сем. *Cyprinidae*, обитающем в соленой воде.

Приведенный нами в начале статьи список может быть дополнен за счет видов, описанных в литературе для северной части бассейна Тихого океана и не обнаруженных нами в обследованных районах.

(1) *Trichodina vancouverense* Laird, 1961 — *Artedius fenestralis* (нуждается в проверке на импрегнированных препаратах),

(2) *T. trichiuri* Dogiel, 1948 — *Trichiurus japonicus* (нуждается в проверке на импрегнированных препаратах);

(3) *T. inversa* Dogiel, 1948 — *Trichiurus japonicus*,

(4) *T. arctica* Zhukov, 1964 — *Melletes papilio* (нуждается в проверке на импрегнированных препаратах),

(5) *T. ploveri* Zhukov, 1964 — *Clupea harengus pallasii* (нуждается в проверке на импрегнированных препаратах);

(6) *T. trigonofibulae* Zhukov, 1964 — *Melletes papilio* (нуждается в проверке на импрегнированных препаратах).

Учитывая видовое разнообразие ихтиофауны бассейна Тихого океана и то обстоятельство, что нами было обследовано лишь 58 видов рыб, причем некоторые виды единично, можно ожидать, что список паразитических инфузорий далеко не завершен. Необходимо продолжение исследований с расширением круга хозяев и включением новых мест обитания.

SUMMARY

In the smears taken from 58 species of fishes the presence of 20 ciliate species was ascertained: *Trichodina cottidarum* Dogiel, 1948, *T. decipiens* Laird, 1961, *T. domerguei* subsp. *domerguei* Haider, 1964, *T. elegini* Schulman-Albova, 1950, *T. hexagrammi* Zhukov, 1964, *T. jadratica* (Raabe, 1958), *T. jarmilae* Lom et Laird, 1969, *T. micromaculata* Stein, 1975, *T. oligocotti* (Lom, 1970), *T. ovonucleata* Raabe, 1958, *T. puytoraci* subsp. *marisalbi* Stein, 1976, *T. raabei* Lom, 1962, *T. elegans* Stein sp. n., *T. frequentis* Stein sp. n., *T. histiocotti* Stein sp. n., *T. minima* Stein sp. n., *T. miranda* Stein sp. n., *T. pala* Stein sp. n. (?) *Paratrichodina incisa* (Lom, 1959), *Trichodinella* sp. The revision of the fauna of *Urceolariidae* of fishes of the basins of Pacific Ocean made on the basis of the standard silver impregnation method.

ЛИТЕРАТУРА

- Догель В. А. 1940: К вопросу о систематике рода *Trichodina*. Тр. Ленингр. общества естествоисп., 68, 4, 8-30.
 Догель В. А. 1948: Паразитические простейшие рыб залива Петра Великого, Известия Вннорх, 27, 17-66.

- Ergens R. and Lom J. 1970: Původci parazitárních nemoci ryb. Academia, Praha, 116-140.
- Haider G. 1964: Monographie der Familie *Urceolariidae* (Ciliata, Peritricha, Mobilia) mit besonderer Berücksichtigung der im süddeutschen Raum vorkommenden Arten. Veb Gustav Fischer Verlag Jena, Parasitol. Schr. Reihe, 17, 251.
- Laird M. 1953: The protozoa of New Zealand intertidal zone fishes. Trans. R. Soc. New Zealand, 81, 79-143.
- Laird M. 1961: Trichodinids and other parasitic protozoa from the intertidal zone of Nanaimo, Vancouver Island. Can. J. zool., 39, 6, 833-844.
- Lom J. 1962: Trichodinid ciliates from fishes of the Rumanian Black Sea coast. Parasitology, 52, 1-2, 49-61.
- Lom J. 1963: The Ciliates of the Family *Urceolariidae* inhabiting gills of fishes (The *Trichodinella*-group) Věstník Československé Společnosti Zoologicki, 27, 1, 7-19.
- Lom J. 1970: Trichodinid Ciliates (*Peritrichida: Urceolariidae*) from some marine fishes. Folia parasit., (Praha), 17, 113-125.
- Lom J. and Laird M. 1969: Parasitic protozoa from marine and euryhaline fish of Newfoundland and New Brunswick. I. Peritrichous ciliates. Can. J. zool., 47, 6, 1367-1380.
- Майр Э. 1971: Принципы зоологической систематики. Издательство „Мир“, Москва, 454 стр.
- Найденова Н. Н. 1974: Паразитофауна рыб семейства бычковых Черного и Азовского морей. Издательство „Наукова думка“, Киев, 180 стр.
- Padnos M. and Nigrelli N. 1942: *Trichodina spheroidesi* and *Trichodina halli* parasitic on the gills and skin of marine fishes with special reference to the life history of *Trichodina spheroidesi*. Zoologica, 27, 65-72.
- Полянский Ю. И. 1955: Материалы по паразитологии рыб северных морей СССР. Паразиты рыб Баренцова моря. Тр. Зоолог. Института АН СССР, 19, 5-170.
- Raabe Z. 1958: On some species of *Trichodina* (Ciliata-Peritricha) of gills of Adriatic fishes. Acta parasit. pol., 6, 15, 355-362.
- Raabe Z. 1959: *Urceolariidae* of gills of *Gobiidae* and *Cottidae* from Baltic Sea. Acta parasit. pol., 7, 441-452.
- Strujecka-Trembaczowska M. 1953: Badania nad *Urceolariidae* (Ciliata-Peritricha) skrzeli ryb polskiego Bałtyku. Acta parasit. pol., 1, 85-119.
- Штейн Г. А. 1962: Семейство *Urceolariidae* Stein, 1867. В кн. Определитель паразитов пресноводных рыб СССР, под общим руководством Б. Е. Быховского. Издание АН СССР, Москва-Ленинград, 151-188.
- Штейн Г. А. 1967: Паразитические инфузории (*Peritricha, Urceolariidae*) рыб Японского моря. Зоол. журн., 46, 5, 657-667.
- Штейн Г. А. 1973: Паразитические инфузории (*Peritricha, Urceolariidae*) некоторых рыб Баренцова моря. Паразитология, 7, 6, 489-496.
- Штейн Г. А. 1975: Определитель инфузорий сем. *Urceolariidae* с рыб Черного и Азовского морей. В кн. Определитель паразитов позвоночных Черного и Азовского морей. Издательство „Наукова думка“, Киев, 54-80.
- Штейн Г. А. 1976: Паразитические инфузории (*Peritricha, Urceolariidae*) рыб Белого моря. Acta protozool., 15, 4, 447-468.
- Шульман С. С. и Шульман-Альбова Р. Е. 1953: Паразиты рыб Белого моря. Издательство АН СССР, Москва-Ленинград, 199 стр.
- Зайка В. Е. 1966: К фауне простейших — паразитов рыб Черного моря. Сб. Гельминтофауна животных южных морей. Республиканский межведомственный сборник, серия „Биология моря“. Издательство „Наукова думка“, Киев, 13-31.
- Жуков Е. В. 1964: Паразитофауна рыб Чукотки. 3. Простейшие (*Protozoa*) морских и пресноводных рыб. Паразитол. сб. Зоолог. Института АН СССР, 22, 224-262.

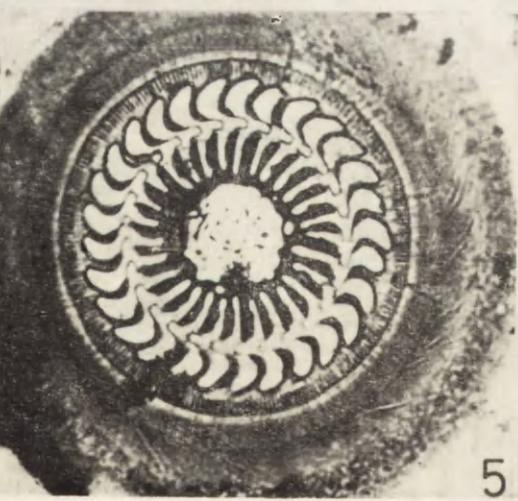
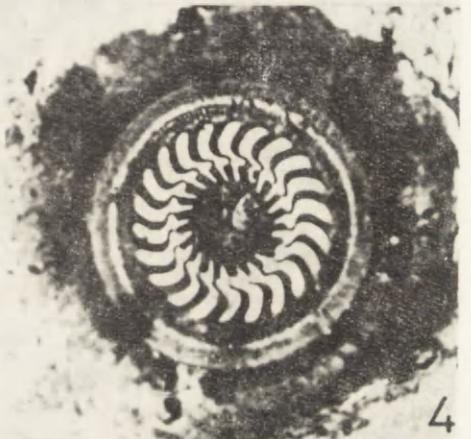
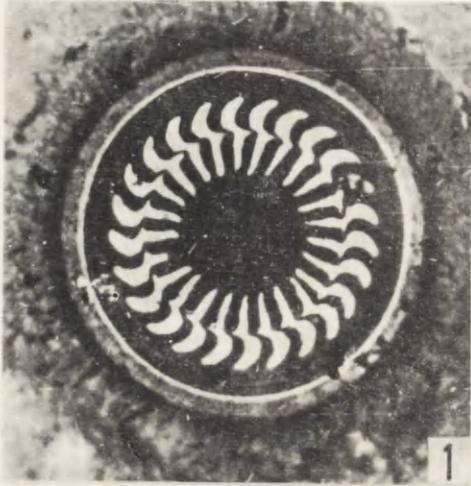
Received on 17 February 1979

ПОДПИСИ К ТАБЛИЦАМ I-V

- 1: *Trichodina cottidarum* Dogiel, 1948 с *Osca iburia*, Тихий океан
- 2: *Trichodina cottidarum* Dogiel, 1948 с *Enophrys diceraus*, Татарский пролив
- 3: *Trichodina decipiens* Laird, 1961 с *Myoxocephalus brandti*, Татарский пролив
- 4: *Trichodina decipiens* Laird, 1961 с *Blepsias cirrhosus*, Татарский пролив
- 5: *Trichodina elegini* Schulman-Albova, 1950 с *Eleginus gracilis*, о. Попов
- 6: *Trichodina elegini* Schulman-Albova, 1950 с *Enophrys diceraus*, Татарский пролив
- 7: *Trichodina hexagrammi* Zhukov, 1964 с *Hexagrammos octogrammus*, Тихий океан
- 8: То же самое, часть венчика зубцов увеличена в 2 раза
- 9: *Trichodina hexagrammi* Zhukov, 1964 с *Veraspes moseri*, Тихий океан
- 10: *Trichodina jadranica* (Raabe, 1958) с *Osca iburia*, Тихий океан
- 11: То же самое, часть венчика зубцов увеличена в 2 раза
- 12: *Trichodina jadranica* (Raabe, 1958) с *Veraspes moseri*, Тихий океан
- 13: *Trichodina jadranica* (Raabe, 1958) с *Gymnocanthus pistilliger*, о. Попов
- 14: *Trichodina jadranica* (Raabe, 1958) с *Limanda yokohamae*, Тихий океан
- 15: *Trichodina jarmilae* Lom et Laird, 1969 с *Blepsias cirrhosus*, Татарский пролив
- 16: *Trichodina jarmilae* Lom et Laird, 1969 с *Azuma emmnoin*, Татарский пролив
- 17: *Trichodina micromaculata* Stein, 1975 с *Opisthocentrus dybowskii*, Татарский пролив
- 18: *Trichodina micromaculata* Stein, 1975 с *Mugil cephalus*, залив Посьет
- 19-20: *Trichodina oligocotti* (Lom, 1970) с *Veraspes moseri*, Тихий океан
- 21: *Trichodina ovonucleata* Raabe, 1958 с *Osca iburia*, Тихий океан
- 22: То же самое, венчик зубцов, увеличена в 2 раза
- 23: *Trichodina ovonucleata* Raabe, 1958 с *Hexagrammos octogrammus*, о. Попов
- 24: То же самое, часть венчика зубцов увеличена в 2 раза
- 25: *Trichodina raabei* Lom, 1962 с *Hexagrammos octogrammus*, о. Попов
- 26: *Trichodina raabei* Lom, 1962 с *Pleurogrammus azonus*, Тихий океан
- 27: *Trichodina elegans* sp. n. с *Pungitius tymensis*, ручей, впадающий в оз. Тунайча
- 28: *Trichodina frequentis* sp. n. с *Hexagrammos octogrammus*, Охотское море
- 29: *Trichodina frequentis* sp. n. с *Zoarces viviparus elongatus*, Татарский пролив
- 30: *Trichodina histiocotti* sp. n. с *Histiocottus bilobus*, Татарский пролив
- 31: *Trichodina minima* sp. n. с *Stichaeus nozawaе*, зал. Посьет
- 32: То же самое, венчик зубцов увеличена в 2 раза
- 33: *Trichodina miranda* sp. n. с *Gasterosteus aculeatus*, Татарский пролив
- 34: *Trichodina pala* sp. n. с *Zoarces viviparus elongatus*, Охотское море

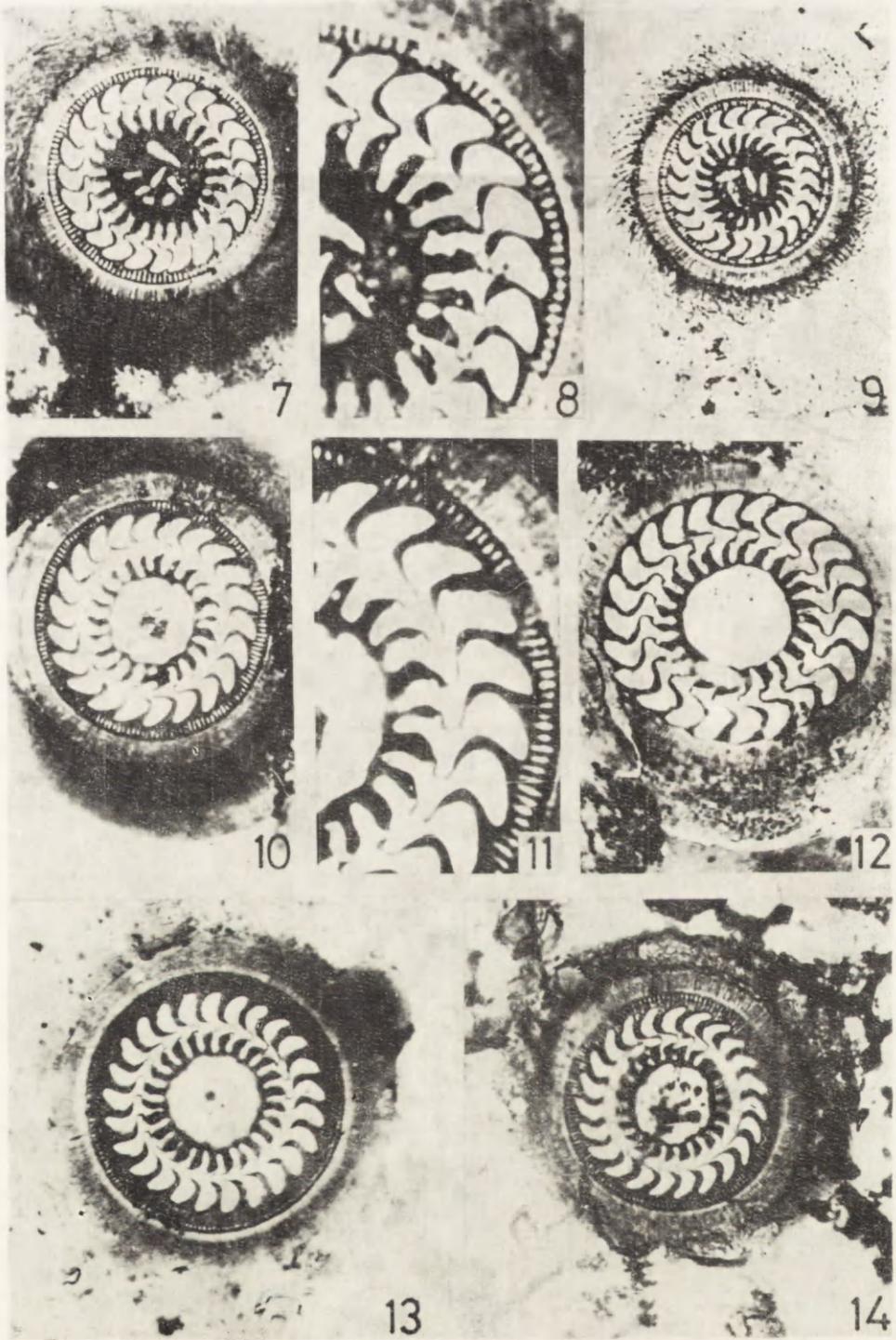
EXPLANATION OF PLATES I-V

- 1: *Trichodina cottidarum* Dogiel, 1948 from *Occa iburia*, Pacific Ocean
- 2: *Trichodina cottidarum* Dogiel, 1948 from *Enophrys diceraus*, Tatarskij Proliv
- 3: *Trichodina decipiens* Laird, 1961 from *Myoxocephalus brandti*, Tatarskij Proliv
- 4: *Trichodina decipiens* Laird, 1961 from *Blepsias cirrhosus*, Tatarskij Proliv
- 5: *Trichodina elegini* Schulman-Albova, 1950 from *Eleginus gracilis*, Popov Island
- 6: *Trichodina elegini* Schulman-Albova, 1950 from *Enophrys diceraus*, Tatarskij Proliv
- 7: *Trichodina hexagrammi* Zhukov, 1964 from *Hexagrammos octogrammus*, Pacific Ocean
- 8: The same, part of denticulate ring magnified twice
- 9: *Trichodina hexagrammi* Zhukov, 1964 from *Veraspes moseri*, Pacific Ocean
- 10: *Trichodina jadratica* (Raabe, 1958) from *Occa iburia*, Pacific Ocean
- 11: The same, part of denticulate ring magnified twice
- 12: *Trichodina jadratica* (Raabe, 1958) from *Veraspes moseri*, Pacific Ocean
- 13: *Trichodina jadratica* (Raabe, 1958) from *Gymnocanthus pistilliger*, Popov Island
- 14: *Trichodina jadratica* (Raabe, 1958) from *Limanda yokohamae*, Pacific Ocean
- 15: *Trichodina jarmilae* Lom et Laird, 1969 from *Blepsias cirrhosus*, Tatarskij Proliv
- 16: *Trichodina jarmilae* Lom et Laird, 1969 from *Azuma emmoin*, Tatarskij Proliv
- 17: *Trichodina micromaculata* Stein, 1975 from *Opisthocentrus dybowskii*, Tatarskij Proliv
- 18: *Trichodina micromaculata* Stein, 1975 from *Mugil cephalus*, Zaliv Posjeta
- 19-20: *Trichodina oligocotti* (Lom, 1970) from *Veraspes moseri*, Pacific Ocean
- 21: *Trichodina ovonucleata* Raabe, 1958 from *Occa iburia*, Pacific Ocean
- 22: The same, denticulate ring magnified twice
- 23: *Trichodina ovonucleata* Raabe, 1958 from *Hexagrammos octogrammus*, Popov Island
- 24: The same, part of denticulate ring magnified twice
- 25: *Trichodina raabei* Lom, 1962 from *Hexagrammos octogrammus*, Popov Island
- 26: *Trichodina raabei* Lom, 1962 from *Pleurogrammus azonus*, Pacific Ocean
- 27: *Trichodina elegans* sp. n. from *Pungitius tymensis*, stream discharging to Tunajča lake
- 28: *Trichodina frequentis* sp. n. from *Hexagrammos octogrammus*, Ochotskoje Sea
- 29: *Trichodina frequentis* sp. n. from *Zoarces viviparus elongatus*, Tatarskij Proliv
- 30: *Trichodina histiocotti* sp. n. from *Histiocottus bilobus*, Tatarskij Proliv
- 31: *Trichodina minima* sp. n. from *Stichaeus nozawae*, Zaliv Posjeta
- 32: The same, denticulate ring magnified twice
- 33: *Trichodina miranda* sp. n. from *Gasterosteus aculeatus*, Tatarskij Proliv
- 34: *Trichodina pala* sp. n. from *Zoarces viviparus elongatus*, Ochotskoje Sea



G. A. Stein

auctor phot.



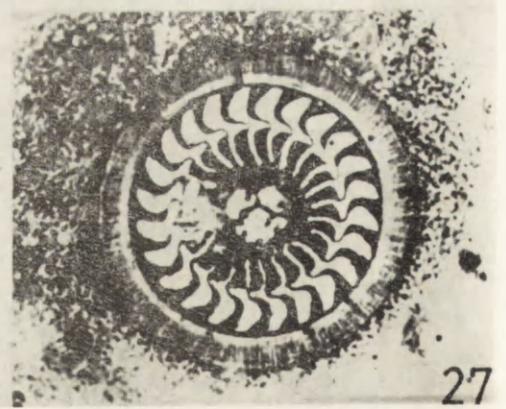
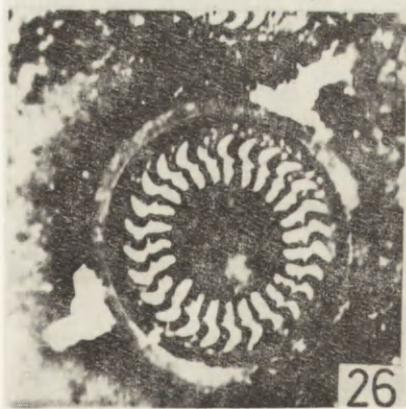
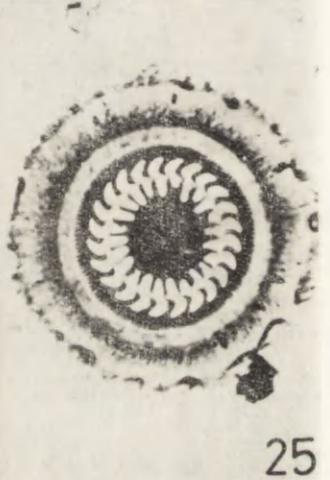
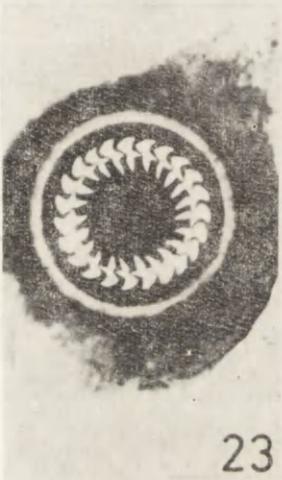
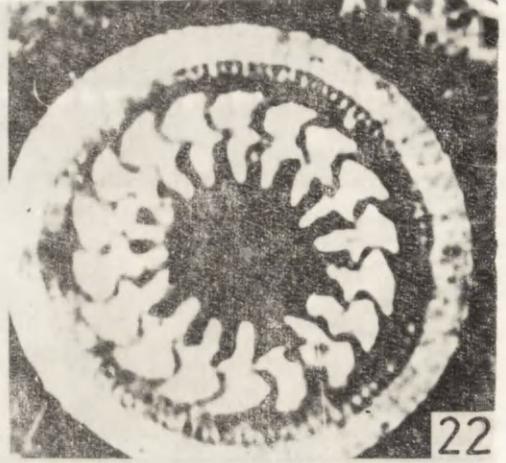
G. A. Stein

auctor phot.



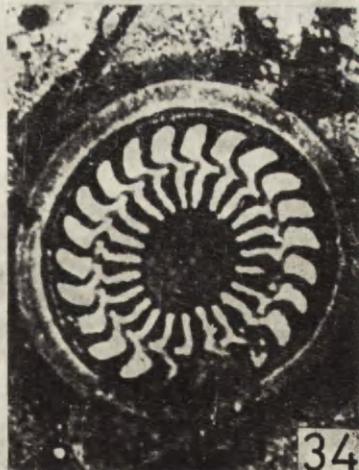
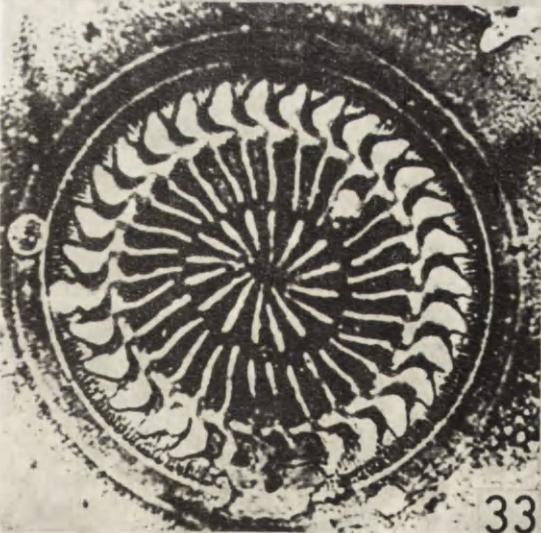
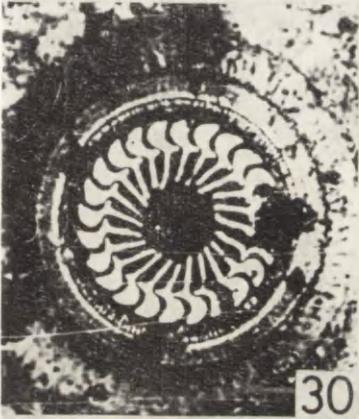
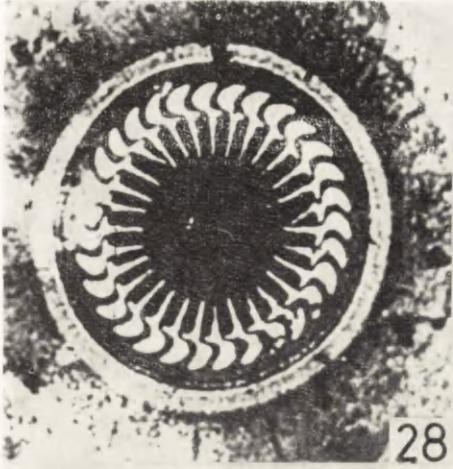
G. A. Stein

auctor phot.



G. A. Stein

auctor phot.



G. A. Stein

auctor phot.

Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград 190121, пр. Маклина 32, СССР

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR,
Leningrad 190121, Prospekt Maklina 32, USSR

А. Л. ЮДИН

A. L. YUDIN

Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб I. Подавление генетического взаимовлияния ядер в гетерокарионах

Mechanisms of Destabilization of Hereditary Characters in Amoebae. I. Inhibition of Genetical Interactions of Nuclei in Heterokaryons

Синопис. Ранее было показано (Юдин и Николаева 1968), что временная имплантация ядра амёбы одного штамма *Amoeba proteus* (штамм L) в клетку другого (штамм С) вызывает у потомства клетки-реципиента нестабильность по маркерному признаку. В настоящей работе обнаружено, что такую дестабилизирующую активность имплантируемого ядра в отношении маркерного признака „устойчивость к этанолу” можно подавить предварительной обработкой амёб-доноров растворами актиномицина D (1000 $\mu\text{g/ml}$, 2 часа) или эритромицина (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа). При обработке доноров хлорамфениколом (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа), циклогексимидом (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа) или эметином (10^{-4} M, 24 часа) подавление дестабилизирующей активности их ядер обнаружить не удалось.

Калинина и Юдин (1964) обнаружили, что в двуядерных клетках-гетерокарионах у амёб *Amoeba proteus* имеет место генетическое взаимовлияние ядер. Оно приводит к наследуемым изменениям обоих ядер. Эти изменения проявляются в наследуемой нестабильности ряда признаков клетки, находящихся под ядерным контролем. У потомков одноядерных фрагментов гетерокариона при повторных тестированиях могут быть обнаружены такие значения этих признаков, какие никогда не обнаруживаются в тех же условиях культивирования у амёб исходного штамма, к которому по своему происхождению относится ядро данного фрагмента гетерокариона.

Было показано далее, что даже временная (в некоторых случаях всего

на несколько секунд) имплантация ядра одного штамма в целую клетку другого (т.е. временный гетерокариоз) вызывает у потомства клетки-реципиента нестабильность по маркерным признакам (Юдин и Николаева 1968). На основании таких опытов был сделан вывод, что в ядре амёб содержится некий фактор, способный выходить в цитоплазму клетки-реципиента, проникать в её собственное ядро и индуцировать в нем изменения (нестабильность) по ряду наследственных признаков. В связи с этим он был назван „дестабилизирующим фактором” (ДФ).

Ядро амёбы дестабилизируется и в том случае, если его имплантировать в предварительно денуклеированную цитоплазму амёбы другого штамма. Однако это наблюдается лишь при условии, что время между удалением собственного ядра клетки-реципиента и подсадкой ей чужого ядра невелико, порядка нескольких десятков секунд (Юдин 1973). Если же это время порядка 2–3 мин или больше (как это обычно бывает при получении ядерно-цитоплазматических „гибридов”), имплантированное ядро остается неизменным (Yudin and Sorina 1970). Эти данные привели к заключению, что и в обычной одноядерной клетке амёбы в интерфазе имеет место постоянно идущий с высокой скоростью двусторонний обмен ДФ между ядром и цитоплазмой. Из этих данных следует также, что оставаясь в цитоплазме, ДФ довольно быстро утрачивает свою активность.

Последнее обстоятельство позволяет предположить, что нормальный уровень содержания ДФ в клетке амёбы в целом и в её ядре в частности поддерживается за счет постоянного синтеза ДФ и, вероятно, может быть снижен, если тем или иным путем подавить (хотя бы временно) этот синтез. Можно ожидать, что ядро такой амёбы уже не будет обладать дестабилизирующей активностью при временной имплантации в клетку другого штамма.

В настоящей работе предпринята попытка экспериментально проверить эти предположения. Оказалось, что обработка амёб актиномицином D или эритромицином подавляет дестабилизирующую активность их ядер: временная имплантация таких ядер амёбам другого штамма уже не приводит к наследственной дестабилизации клеток-реципиентов по маркерному признаку.

Материал и методика

(1) Штаммы амёб

Были использованы штаммы L и C *Amoeba proteus* из коллекции Института цитологии АН СССР. Амёб культивировали по принятой в лаборатории методике Прескотта и Кэриера (Юдин 1975) при 25°C. Клонирование производили в многолуночных микроквартах из органического стекла (Заар и Лозина-Лозинский 1964) при той же температуре.

(2) Трансплантация ядер

Ядра пересаживали в масляной камере по Фонбрюну с помощью микроманипулятора ММ-1, как это описано Юдиным (1968, 1974).

(3) Экспериментальные варианты (Рис. 1)

В варианте 1 клонировали амёб С и выращенные клоны тестировали на стабильность по маркерному признаку. Всего было выращено и протестировано 324 таких клона. В варианте 2 ядро амёбы С имплантировали на 3 мин. в целую амёбу того же штамма, после

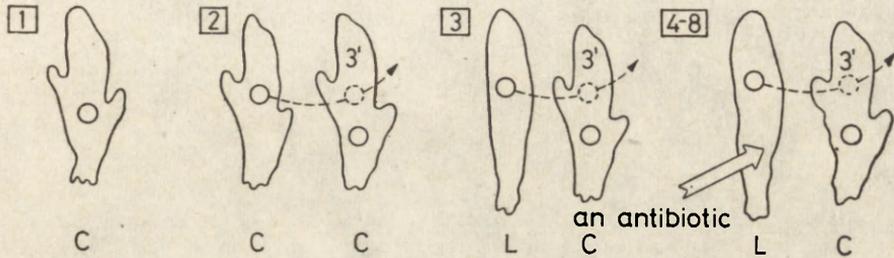


Рис. 1. Варианты опыта (1-8). Пояснения в тексте. С и L — штаммы амёб, стрелка — действие антибиотика

Fig. 1. Variants of the experiment (1 to 8). See details in the text. C and L, the amoeba strains, arrow, an antibiotic treatment

чего от оперированной амёбы выращивали клон. Всего было выращено и протестировано 8 таких клонов ($C_{яц}$) ($C_{яц}$ — я — ядро, ц — цитоплазма). В варианте 3 ядро интактной амёбы L имплантировали на 3 мин в целую амёбу штамма С, после чего от оперированной амёбы выращивали клон. Всего было выращено и протестировано 7 таких клонов ($L_{яц}$) ($L_{яц}$ — я — ядро, ц — цитоплазма). В вариантах 4-8 амёб инкубировали в растворах актиномицина D („Serva”, ФРГ; 1000 $\mu\text{g/ml}$, 2 часа), эритромицина (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа; получен из Всесоюзного н.-и. технологического института антибиотиков и ферментов медицинского назначения, Ленинград), зметина (10^{-4} М, 24 часа, получен от д-ра Д. М. Прескотта, США), хлорамфеникола („Calbiochem”, США, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа) или циклогексимида („Serva”, ФРГ; 1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа). Растворы актиномицина приготавливали на бидистиллированной воде, растворы остальных антибиотиков — на среде, в которой культивировали амёб. Выбор дозы каждого антибиотика обосновывается в разделе „Обсуждение”. После окончания инкубации амёб промывали свежей культуральной средой и сразу же использовали для операций. Ядро такой амёбы L на 3 мин имплантировали в целую амёбу С, от которой затем выращивали клон и тестировали его на стабильность. Операции производили небольшими сериями, так, чтобы с момента окончания инкубации амёб с антибиотиком до последней операции проходило не более 1-2 час

(4) Тестирование клонов на стабильность

Контрольные и подопытные клоны амёб тестировали на стабильность по маркерному признаку „выживаемость к концу 5-минутного пребывания в 7%-ном растворе этилового спирта”, или, сокращенно, „устойчивость к этанолу”. Характеристика этого наследственного признака, контролируемого ядром, дана ранее (Полянский и др. 1967, Yudin and Soripa 1970). Устойчивость того или иного клона всегда тестировали спустя не менее 48 час после последнего кормления. 50 амёб помещали в микроаквариум с 1 ml 7%-ного раст-

вора этанола, приготовленного на дистиллированной воде. По прошествии 5 мин раствор разбавляли примерно вдвое культуральной средой, амёб пересаживали в другой микроаквариум с новой порцией культуральной среды и через 20–40 мин подсчитывали число живых, нормально передвигающихся клеток.

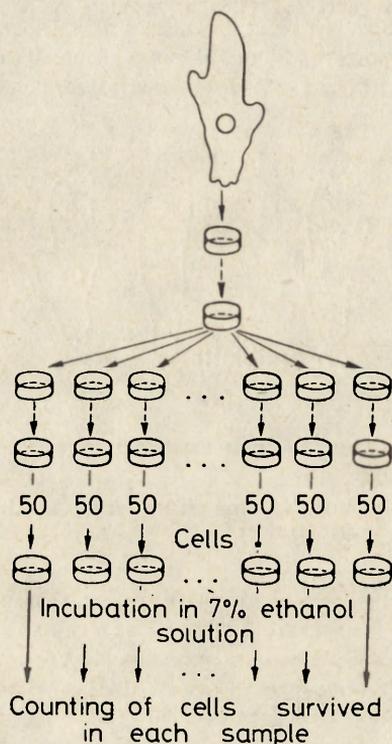


Рис. 2. Схема примененного в работе способа тестирования стабильности клонов по маркерному признаку

Fig. 2. The procedure used to test the clones for their stability with respect to the marker character

Схема тестирования клона на стабильность изображена на Рис. 2. От каждого подлежащего тестированию клона закладывали 25 параллельно выращиваемых субклонов. Все они по достижении достаточной численности (более 50 клеток) одновременно тестировались на устойчивость к этанолу. Как правило, субклонирование повторялось еще раз, следующие 25 субклонов закладывали обычно от одного из субклонов первой серии. Поскольку по тем или иным причинам не всегда удавалось протестировать все заложенные субклоны, всего для каждого тестируемого клона получали данные об устойчивости 15–50 (в отдельных случаях — большего числа) субклонов этого клона. Если все эти субклоны имели устойчивость к этанолу, типичную для амёб С, тестируемый клон считался стабильным по этому признаку. Если хотя бы некоторые из субклонов имели не свойственную амёбам С устойчивость, тестируемый клон считался нестабильным. Этот способ тестирования стабильности оживляется на прежних наблюдениях, согласно которым нестабильность является наследуемым свойством каждой клетки дестабилизированного клона, связанные с нестабильностью фенотипические изменения маркерных признаков происходят во времени, по-видимому, случайным образом, синхронно у всех клеток одного субклона и несинхронно у нескольких параллельно ведущих субкультур одного нестабильного клона (Yudin 1973).

Кроме оценки стабильности каждого клона оценивали тот или иной вариант в целом, сравнивая его с тем или иным контрольным вариантом (2 или 3) по соотношению стабиль-

ных и нестабильных клонов. Для этой цели использовали „Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям” (Генес 1964), в которых использован точный метод Фишера для расчета вероятности четырехпольной таблицы и принят 2.5%-ный уровень значимости. Сравнить клоны друг с другом по среднему уровню выживаемости, среднему квадратичному отклонению и другим обычным параметрам мы считали нецелесообразным из-за существенного отличия распределений выживаемости как в опытных, так и в контрольных клонах от нормального распределения.

Результаты

Амебы исходного штамма С (вариант 1), как и в более ранних наших опытах, характеризовались относительно высокой (по сравнению с некоторыми другими штаммами коллекции) устойчивостью к 5-минутному воздействию 7%-ным этиловым спиртом. 323 клон обнаружили выживаемость в пределах 60–100% и лишь в одном клоне выжило 58% амеб. Исходя из этих данных, в настоящей работе мы приняли в качестве типичной для штамма С выживаемость 60–100%. Нелишним будет отметить при этом, что средняя выживаемость во всех этих клонах равнялась 91.3% и 93% клонов обнаружили выживаемость 80% и выше.

Подсадка на короткое время гомологичного ядра сама по себе не изменила наследственных свойств амеб С по этому признаку. Все 8 клонов от оперированных таким образом амеб также характеризовались выживаемостью в этаноле, типичной для амеб С (Табл. 1, вариант 2).

Напротив, подсадка на такое же время гетерологичного ядра индуцировала типичную нестабильность в клонах, выращенных от амеб, которые были подвергнуты такой операции (Табл. 1, вариант 3). В 6 клонах этого типа часть субклонов обнаружила при испытании устойчивость, выходящую за нижние пределы выживаемости амеб С. Таким образом, эти клоны приходится признавать наследственно отличающимися от амеб С и приписать это отличие влиянию каких-то продуктов подсаженного гетерологичного ядра на собственное ядро оперированной клетки, ставшей родоначальницей клона. Как и раньше, будем называть эти неизвестные продукты ядерного происхождения, индуцирующие нестабильность, „дестабилизирующим фактором” (ДФ). Лишь один клон этого варианта не проявил нестабильности. Тем не менее, разница в поведении клонов в вариантах 2 и 3, если оценивать эти варианты в целом, по соотношению стабильных и нестабильных клонов, достоверна ($P < 0.010$) и несомненно, что временно имплантированное ядро L проявило отчетливо выраженную дестабилизирующую активность в клетке С.

Эта дестабилизирующая активность ядер L, как оказалось, подавлялась обработкой амеб L перед операцией актиномицином D (Табл. 2, вариант 4). Из 5 протестированных клонов 4 оказались стабильными; во всяком случае, при сравнимом с вариантом 3 числе испытаний у них не удалось обнаружить

Таблица 1

Выживаемость в этаноле амёб из контрольных вариантов

Table 1

Survival rate of amoebae from the control variants

Вариант	№ клонов	Всего опытов	Число опытов с выживаемостью	
			<60%	60-100%
Variant	Clones	Total number of tests	Number of tests with survival rate	
			<60%	60-100%
(1) Клоны исходного штамма С	1-324	324	1	323
(1) Clones of the original C strain				
(2) Клоны от амёб С, которым на 3 мин имплантировали ядра амёб С	1	20	0	20
(2) Clones from the C amoebae which received the C amoeba nuclei for 3 min	2	38	0	38
	3	42	0	42
	4	46	0	46
	5	47	0	47
	6	49	0	49
	7	49	0	49
	8	67	0	67
(3) Клоны от амёб С, которым на 3 мин имплантировали ядра амёб L.	1	35	6	29
	2	39	14	25
	3	47	7	40
	4	47	3	44
(3) Clones from the C amoebae which received the L amoeba nuclei for 3 min	5	48	7	41
	6	48	0	48
	7	66	19	47

признаков нестабильности. В 5-м клоне лишь один субклон из 103 обнаружил выживаемость, не свойственную амёбам С (52% выживших амёб), хотя и очень близкую к минимальному для них значению. Даже если считать — в соответствии с принятыми критериями — этот 5-й клон нестабильным, в целом весь вариант 4 статистически не отличается от стабильного варианта 2 ($P < 0.025$), хотя и отличие его от нестабильного варианта 3 также недос-

товерно при таком небольшом числе клонов. Оно становится значимым ($P < 0.010$), если рассматривать это единственное уклоняющееся значение в клоне 5 как результат технической ошибки.

Несомненный подавляющий эффект получен также с эритромицином

Таблица 2

Действие антибиотиков на дестабилизирующую активность ядер L, имплантируемых на 3 мин амёбам C

Table 2

Effect of some antibiotics on destabilizing activity of L nuclei implanted into C amoebae for 3 min

Вариант	№ клонов	Всего опытов	Число опытов с выживаемостью	
			< 60%	60-100%
Variant	Clones	Total number of tests	Number of tests with survival rate	
			< 60%	60-100%
(4) Актиномицин D (1000 µg/ml, 2 часа)	1	16	0	16
	2	38	0	38
(4) Actinomycin D (1000 µg/ml, 2 h)	3	43	0	43
	4	67	0	67
	5	103	1	102
(5) Эритромицин (1000 µg/ml, 24 часа)	1	18	0	18
	2	25	0	25
(5) Erythromycin (1000 µg/ml, 24 h)	3	25	0	25
	4	46	0	46
(6) Эметин (10 ⁻⁴ M, 24 часа)	1	21	0	21
	2	24	0	24
(6) Emetine (10 ⁻⁴ M, 24 h)	3	25	0	25
	4	47	0	47
	5	41	1	40
	6	49	1	48
(7) Хлорамфеникол (1000 µg/ml, 24 часа)	1	15	0	15
	2	18	0	18
(7) Chloramphenicol (1000 µg/ml, 24 h)	3	45	1	44
	4	48	2	46
(8) Циклогексимид (1000 µg/ml, 24 часа)	1	38	0	38
	2	42	0	42
(8) Cycloheximide (1000 µg/ml, 24 h)	3	43	0	43
	4	43	2	41
	5	47	2	45
	6	42	7	35
	7	49	12	37
	8	23	21	2

(Табл. 2, вариант 5). Все 4 клона в этом варианте вели себя как стабильные. Различие с вариантом 3 достоверно ($P = 0.025-0.011$).

В опыте с эметинумом (Табл. 2, вариант 7) в 2 клонах из 6 оказалось по одному субклону, обнаружившему не типичную для С выживаемость. Правда, в обоих случаях эта выживаемость близка к нижней границе выживаемости С (50 и 58%). Однако эти нетипичные значения проявились в двух независимых, происходящих от разных оперированных амеб клонах, на фоне относительно небольшого числа субклонов с типичной для С выживаемостью. В соответствии с принятым критерием нестабильности (проявление значений признака, несвойственных исходному штамму), клоны 5-й и 6-й в этом варианте следует считать нестабильными. Тогда весь вариант в целом не будет статистически отличаться от обоих контрольных вариантов — 2-го и 3-го. Другими словами, определенного результата в этом варианте получить при имевшихся выборках не удалось.

В опыте с хлорамфениколом (Табл. 2, вариант 7) 2 клона из 4 также обнаружили формальные признаки нестабильности. В одном из них два субклона характеризовались не свойственной амебам С выживаемостью (48 и 56%), в другом — один (50%). В целом вариант по своему поведению сходен с вариантом 3 и отличается от варианта 2.

Наконец, в опыте с циклогексимидом (Табл. 2, вариант 8) получен вполне определенный результат: циклогексимидом не удастся подавить дестабилизирующую активность ядер L. У 5 клонов из 8 в этом варианте была зарегистрирована нестабильность, причем у 3 клонов она была выражена достаточно ярко. Отличие этого варианта от варианта 2 и его сходство с вариантом 3 статистически оправдывается ($P = 0.025-0.010$ и $P > 0.025$, соответственно).

Итак, из 5 испробованных ингибиторов актиномицин D и эритромицин определенно блокировали дестабилизирующую активность ядер L, хлорамфеникол и циклогексимид в испытанных дозировках таким действием не обладали, для эметина же определенного результата получить не удалось.

Обсуждение

В опытах были использованы актиномицин D (АМД), циклогексимид (ЦГИ), эметин (ЭМ), эритромицин (ЭРИ) и хлорамфеникол (ХАФ). Выбор именно этих ингибиторов биосинтезов был в значительной мере обусловлен наличием в литературе хотя бы некоторых сведений о действии этих антибиотиков на *Amoeba proteus*. Ввиду большой трудоемкости выращивания многочисленных клонов амеб и существующего способа их тестирования на стабильность мы были вынуждены в опытах с каждым антибиотиком ограни-

читься всего лишь одной его дозой, тестирование провести всего по одному маркерному признаку, каждый раз на сравнительно небольшой группе клонов. Выбирая эту единственную дозу, исходили из имеющихся в литературе данных о действии этого антибиотика на амёб. При этом стремились подобрать максимальную нелетальную дозу, чтобы, с одной стороны, повысить вероятность эффекта от воздействия, а с другой стороны, — иметь после такого воздействия еще жизнеспособные клетки. Конечно, выбранные таким образом дозы могли не отвечать этому условию. Поэтому если положительному результату в наших опытах (варианты 4 и 5) можно придавать безусловное значение, отрицательный результат (варианты 6–8) может означать лишь, что неэффективной оказалась выбранная доза, а не антибиотик вообще. По этой же причине было ясно, что не все клоны в пределах каждого из вариантов 4–8 должны вести себя одинаковым образом, поскольку они происходят от разных, независимо оперированных амёб. В связи с этим и был введен дополнительный критерий — сравнение вариантов в целом, по соотношению стабильных и нестабильных клонов в них.

Имеющиеся в литературе сведения о действии выбранных нами антибиотиков на *Amoeba proteus* могут быть суммированы следующим образом. АМД — наиболее широко используемый специфический ингибитор ДНК-зависимого синтеза РНК практически во всех типах клеток, которые были исследованы. Считают, что биологическое действие АМД заключается в его связывании с ДНК, вследствие чего он избирательно нарушает способность ДНК служить матрицей для синтеза РНК (Gale et al. 1972). У амёб меченный ^3H АМД обнаруживается автордиографически не только в ядре, но и в цитоплазме (Lorch and Jeon 1969 b), в которой находятся содержащие ДНК симбионты (Andresen 1973).

Уже в концентрациях порядка 50–100 $\mu\text{g/ml}$ АМД в той или иной степени, иногда до 100%, подавляет включение меченых нуклеотидов в чувствительный к РНКазе материал ядра (Goldstein 1965, Stevens 1967, Hawkins 1973 a; Goldstein et al. 1978). Однако даже в концентрации 200 $\mu\text{g/ml}$ АМД, хотя и может подавлять включение на 95–99%, не всегда дает надежные результаты (Goldstein 1973). Лишь в концентрации 500, а еще лучше 1000 $\mu\text{g/ml}$ он всегда быстро и полностью подавляет включение метки в ядро (Goldstein et al. 1969, Goldstein and Trescott 1970, Goldstein 1973, Hawkins 1973 a, и др.). Максимум подавления при относительно небольших дозах (70–100 $\mu\text{g/ml}$) наблюдается после 1–2-часового воздействия (Goldstein 1965, Stevens 1967), а при 1000 $\mu\text{g/ml}$ — уже через 18–20 мин. (Rao and Prescott 1970, Stevens and Prescott 1971).

АМД может влиять и на миграцию уже синтезированных макромолекул между ядром и цитоплазмой амёб. Так, при 24-часовом воздействии в концентрации 500–1000 $\mu\text{g/ml}$ он существенно, хотя всё же не полностью подавляет выход из ядра в цитоплазму меченых РНК, в частности 4-6S и 16S РНК, но

меньше влияет на миграцию РНК из цитоплазмы в ядро (Goldstein et al. 1969, Goldstein and Trescott 1970). С другой стороны, если амебам имплантировать дополнительное ядро, меченное [³H]-лейцином, и затем в течение многих часов инкубировать этих амев в растворе АМД (70 $\mu\text{g/ml}$), то в имплантированном ядре сохраняется примерно столько же метки, сколько и у амев, не инкубированных с АМД (Goldstein 1965, 1973).

У амев, испытывавших воздействие АМД (10–250 $\mu\text{g/ml}$) в течение 6–24 час., отмечали ультраструктурные изменения ядра, в частности исчезновение „спиралей” и концентрацию ядрышек в центре ядра (Stevens 1967, Lorch and Jeon 1969 b).

Изменяется и ультраструктура ядрышек (Flickinger 1968). Если в раствор АМД (500 $\mu\text{g/ml}$) поместить делящихся амев, деление завершается, но спустя 3 часа хроматин их ядер оказывается очень конденсированным. Некоторая, но меньшая конденсация хроматина наблюдается при таком же воздействии во время интерфазы (Goldstein et al. 1978).

Ультраструктурные изменения в цитоплазме наблюдали лишь после длительного (3–4-суточного) пребывания амев в растворах АМД (100 $\mu\text{g/ml}$); они сходны с изменениями, возникающими после денуклеации (Flickinger 1973).

После отмены воздействия в дозах 50–250 $\mu\text{g/ml}$ синтез РНК в ядрах остается подавленным на протяжении ближайших 28–48 час. и лишь затем возобновляется (Stevens 1967, Jeon and Lorch 1969, Lorch and Jeon 1969 b), синтез же ДНК не затрагивается (Stevens and Prescott 1971). По данным всех исследователей, амевы после действия даже максимальных из испытанных доз АМД в течение первых 1–3 суток выглядят и ведут себя нормально (Lorch and Jeon 1969 b, Goldstein et al. 1969, Stevens and Prescott 1971, Goldstein 1973, Hawkes and Halberton 1973) и не обнаруживают сколько-нибудь заметных изменений в ультраструктуре цитоплазмы (Flickinger 1968). Тем не менее, после 24-часового воздействия 10–250 $\mu\text{g/ml}$ АМД они редко делятся и все погибают в ближайшие две недели (Lorch and Jeon 1969 a, b). Лишь после более кратковременных воздействий АМД даже в концентрациях 200–500 $\mu\text{g/ml}$ наблюдали полное восстановление всех клеток (Goldstein 1973). По данным Кованько и Сопиной (1977), после 1.5-часового воздействия 1000 $\mu\text{g/ml}$ в конечном счете выживают 68% амев, а после 3-часового — всего 2%.

В наших опытах после выбранного воздействия амевы L также выглядели совершенно нормальными первые несколько суток. Однако у них наблюдалась значительная задержка очередного деления, часть из них в конце концов погибала и только часть давала жизнеспособные клоны. Так, в одном из опытов после 30-минутного воздействия раствора АМД (1000 $\mu\text{g/ml}$) лишь 14 амев из 25 дали клоны. В другом опыте к 10-му дню после такого же воздействия лишь 7 амев из 25 разделились 1–3 раза, остальные оставались нераз-

делившимися, однако гибель первых четырех клеток отмечена лишь на 13-е сутки. Всего же в этом опыте получено 11 жизнеспособных клонов.

ЦГИ, как известно, ингибирует синтез белка в эукариотических клетках, в основном процесс элонгации полипептидной цепи. Он не влияет на синтез белка в митохондриях эукариот и в прокариотических клетках (Gale et al. 1972). По еще не выясненным причинам ЦГИ даже в высоких концентрациях (до 3 $\mu\text{g/ml}$) не влияет на рост *Amoeba proteus* и близких форм (Hawkins and Hainton 1971) даже при внутриклеточных инъекциях раствора антибиотика Hawkes and Halberton 1973) и лишь на 10% угнетает включение аминокислот в бесклеточной системе, приготовленной из амев (Hawkins 1973). Предполагается, что причина высокой устойчивости амев к ЦГИ либо в его детоксикации клеткой, либо в особенностях структуры цитоплазматических рибосом у амев (Hawkes and Halberton 1973).

В наших опытах воздействие ЦГИ в концентрации 1000 $\mu\text{g/ml}$ в течение 24 час. не оказывало никакого заметного влияния на внешний вид, поведение и клонируемость амев L. В одном из опытов после такой обработки 23 амевы из 25 дали клоны, причем 15 из них разделились уже к 4-м суткам после воздействия. В другом опыте после такого же воздействия выжили и размножились 45 из 50 амев.

Учитывая, что, по литературным данным, ЦГИ не влияет на синтез белка у амев, мы планировали вариант с этим антибиотиком как своего рода дополнительного контроля к другим вариантам. В то же время нельзя было заранее исключить, что ЦГИ, не влияя на белковый синтез, повлияет на миграцию макромолекул между ядром и цитоплазмой и подавит дестабилизирующую активность имплантируемых ядер таким способом.

ЭМ также является ингибитором синтеза белка в эукариотических клетках, подавляя элонгацию полипептидной цепи (Gale et al. 1972). У *Amoeba proteus* ЭМ в концентрации 1×10^{-4} М за 24 часа снижает включение меченых аминокислот в кислотонерастворимый материал до 30% от нормального уровня, не вызывая при этом гибели клеток на протяжении, по крайней мере, недели. При действии ЭМ в той же концентрации в течение 1–3 суток тельца Гольджи становятся необычно крупными, с большим чем в норме числом цистерн. После еще более продолжительного действия число и диаметр цистерн, наоборот, уменьшаются (Flickinger 1971). В цитоплазме появляются многочисленные частицы, сходные по величине, форме и электронной плотности с рибосомами и расположенные по спирали — группами по 4–16 штук (Flickinger 1972). В более высокой концентрации (1×10^{-3} М) ЭМ за 4 часа подавляет по крайней мере 97% включения меченых аминокислот (Maruta and Goldstein 1975). О влиянии ЭМ на внутриклеточную миграцию макромолекул у амев ничего не известно, но на другом объекте — яйцах морского ежа — показано, что синтез и РНК и её транспорт в цитоплазму продолжается даже при значительном подавлении синтеза белка с помощью ЭМ (Hogan and Gross 1971).

Учитывая эти немногочисленные сведения, мы действовали на амёб-доноров ЭМ в концентрации 1×10^{-4} Н в течение 24 час. После такого воздействия амёбы L не только выглядели и вели себя совершенно нормально, но и давали клоны в неменьшем проценте, чем в контроле.

ЭРИ угнетает синтез белка в клетках прокариот, связываясь с 50 S-субъединицами рибосом и подавляя прежде всего транслокацию (Gale et al. 1972). Соответственно, в эукариотических клетках он подавляет синтез белка в митохондриях (Pestka 1971, Schatz and Manson 1974). Вместе с тем, на ряде клеток показана взаимозависимость биосинтетических процессов в митохондриях и цитоплазме. Например, у дрожжей *Kluveromyces lactis* ЭРИ может влиять на синтез белка не только в митохондриях, но — опосредованно — и в цитоплазме, в результате блокируя размножение клеток в таких концентрациях, которые еще не подавляют дыхание (Algeri et al. 1977, Zennaro et al. 1977).

О действии этого антибиотика на *Amoeba proteus* известно немного. Так, оценивали подавляющее действие ЭРИ на размножение амёб при постоянном их пребывании с антибиотиком в течение 10 суток. Скорость деления амёб клона π P снижалась уже при концентрации 100 $\mu\text{g/ml}$. При 275 $\mu\text{g/ml}$ их генерационное время увеличивалось по сравнению с контролем в 1.57 раза, при 400 $\mu\text{g/ml}$ они делились за указанный период 0–1 раз, а при 1000 $\mu\text{g/ml}$ деление полностью подавлялось. Размножение амёб клона π D не замедлялось, пока концентрация ЭРИ не достигала 500 $\mu\text{g/ml}$, и даже в этих условиях они могли разделиться хотя бы один раз. Полностью деления подавлялись лишь при 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Hawkins and Hainton 1972, Hawkins 1973 a).

С учетом этих скудных данных для воздействия на амёб L была выбрана концентрация 1000 $\mu\text{g/ml}$ и время воздействия 24 часа. Для соблюдения равенства условий в этом и других вариантах опыта использовали растворы ЭРИ в обычной культуральной среде, хотя, по нашим предварительным наблюдениям, растворы с рН 8.0 обладают большей активностью. Выбранное воздействие не оказывало никакого видимого влияния на амёб по сравнению с контролем. Например, в одном из опытов после такой обработки все 25 амёб продолжали делиться.

Наконец, ХАФ также известен как ингибитор белкового синтеза у бактерий. Его действие сводится к подавлению элонгации и перемещения рибосом вдоль РНК, т.е. к подавлению трансферазной реакции на 50S-субъединице рибосомы (Gale et al. 1972). У эукариот ХАФ в умеренных концентрациях подавляет синтез белка в митохондриях, но не на циторибосомах; в высоких же концентрациях, кроме того, непосредственно подавляет дыхание и параллельно — белковый синтез в цитоплазме (Lamy and Melton 1972).

При действии на *Amoeba proteus* ХАФ в концентрации 70 $\mu\text{g/ml}$ уже через 48 час. почти полностью (но обратимо) подавляет деление клеток, а после 120-часового пребывания амёб в 100 $\mu\text{g/ml}$ блок деления уже необратим (Chat-

terjee 1971). При постоянном пребывании амёб штаммов $T_1 P$ и $T_1 D$ в среде с $75 \mu\text{g/ml}$ наблюдали замедление роста на 25%, а в среде с $600 \mu\text{g/ml}$ — на 50% по сравнению с контролем (Hawkins 1973a). В этих условиях амёб можно было культивировать по крайней мере три недели. При более высоких концентрациях ХАФ (500, 800 или $1600 \mu\text{g/ml}$) после двух недель культивирования амёб их генерационное время было в 2.4 раза больше обычного, а после четырех недель размножение прекращалось и начиналась гибель амёб. Однако и на этой стадии повреждения, вызванные ХАФ в концентрации $500 \mu\text{g/ml}$, у части амёб оказывались обратимыми после переноса клеток в обычную культурную среду. Указывается также, что даже в концентрациях 500–1600 $\mu\text{g/ml}$ ХАФ не оказывает вредного влияния на амёб штамма D на протяжении трех недель (Jeon 1977, Jeon and Nah 1977).

С учетом этих данных мы выбрали для наших опытов 24-часовое воздействие раствором ХАФ с концентрацией $1000 \mu\text{g/ml}$. После такого воздействия не наблюдалось никаких признаков повреждения амёб L по сравнению с контролем. Так в одном из опытов все 25 обработанных таким образом амёб продолжали делиться.

Итак, при выбранных дозировках ЦГИ и ХАФ не подавляли дестабилизирующей активности ядер L (варианты 7 и 8). Неясно, могут ли они обладать таким действием при других, более высоких дозах или же вообще неактивны в этом отношении. В варианте с ЭМ (вариант б) получен лишь намек на возможность подавления, определенного же ответа на имевшемся материале, к сожалению, получить не удалось. По-видимому, имело смысл использовать несколько более высокую концентрацию этого ингибитора.

Отчетливое подавляющее действие на дестабилизирующую активность ядер L проявили АМД и ЭРИ, чем и достигнута цель настоящей работы. Это действие несомненно было оказано на клетку-донора, а не было обусловлено переносом некоторого количества антибиотика из клетки-донора в клетку-реципиент вместе с имплантируемым ядром. В последнем случае можно было бы ожидать, наоборот, нестабильность клетки-реципиента, ибо и АМД, и ЭРИ при непосредственном действии на амёб С дестабилизируют их (Юдин 1979 а).

Каким образом подавляется этими ингибиторами дестабилизирующая активность ядер? Возможны два предположения. Учитывая процитированные выше сведения о влиянии АМД на переход уже синтезированных макромолекул из ядра в цитоплазму амёб, можно предположить, что у амёб-доноров под действием антибиотиков оболочка ядра изменяется таким образом, что на некоторое время затрудняется выход из него всех или некоторых из содержащихся в нем метаболитов, в норме легко мигрирующих в цитоплазму. Однако маловероятно, чтобы два антибиотика со столь разным механизмом действия на клетку одинаково изменяли бы свойства ядерной оболочки. Кроме того, как показано нами в другой работе (Юдин 1979 б), по край-

ней мере АМД не препятствует выходу из ядра „детального фактора.

Более вероятным кажется, что АМД и ЭРИ подавляют синтез нуклеиновых кислот и/или белков, в том числе ДФ. Поскольку „время жизни” ДФ невелико, блок его синтеза быстро приводит к снижению его содержания в клетке в целом и в ядре. Обеднённое по содержанию ДФ ядро, будучи имплантировано в гетерологичную клетку, за короткое время пребывания в ней „неуспевает” высвободить в её цитоплазму эффективных количеств ДФ и таким образом не проявляет своей дестабилизирующей активности. В этой связи представляют интерес предварительные данные (Hawkins 1973). В своих опытах она неоднократно наблюдала передачу некоторых наследственных признаков при инъекциях цитоплазмы *Amoeba discoides* амебам *A. proteus*. (Мы, в отличие от Hawkins объясняем это индукцией нестабильности у *A. proteus* по маркерному признаку под влиянием ДФ, привносимого с цитоплазмой *A. discoides* — Yudin and Sopina 1970). Если же *A. discoides* перед операцией 23 часа инкубировали с 5 $\mu\text{g/ml}$ АМД, их цитоплазма более не вызывала никаких изменений у *A. proteus*. Возможно, что даже в такой концентрации АМД при длительном воздействии снижал концентрация ДФ в клетке *A. discoides*.

Можно ли на основании действия АМД и ЭРИ на дестабилизирующую активность ядра сказать что-либо о биохимической природе ДФ? Очевидно, АМД может блокировать как синтез некоей специфической РНК, так — в конечном счете — и синтез специфического белка. Действие ЭРИ оценить в этом отношении еще труднее, так как возможно, что этот антибиотик лишь опосредованно влияет на синтез метаболита, в конце концов оказывающегося в клеточном ядре.

Помимо основного результата — доказательства возможности экспериментального подавления дестабилизирующей активности ядра амебы в клетке гетерологичного штамма — в настоящей работе удалось подтвердить на большем материале два ранее сделанных наблюдения. Во-первых, мы еще раз убедились, что в гомокарионах взаимовлияние двух ядер одинакового происхождения не приводит к их дестабилизации (см. вариант 2) и что, следовательно, дестабилизация в результате взаимовлияния ядер есть специфическое следствие гетерокариоза. Этот вывод подкреплен недавно результатами тестирования клонов типа ($C_{\text{я}}$) $C_{\text{яц}}$ и ($L_{\text{я}}$) $L_{\text{яц}}$ и по другому маркеру — скорости прикрепления амеб к субстрату (Сопина и Юдин 1979). Он находится в согласии с прежними данными (Калинина и Юдин 1964, Lorch and Jeon 1969 a) и противоречит наблюдениям Калининой (1970).

Во-вторых, еще раз показано (варианты 3, 7 и 8), что параллельно ведущиеся субкультуры одного и того же нестабильного клона могут проявлять свою нестабильность (т.е. изменяться фенотипически) несинхронно несмотря на, казалось бы, совершенно одинаковые условия культивирования. Показано, что используя это свойство, можно тестировать клоны и выявлять их нестабильность несколько иначе, чем это делалось до сих пор — не путем много-

кратных последовательных испытаний одной и той же культуры, а путем однократного испытания нескольких параллельно ведущихся субкультур одновременно. Пока еще трудно окончательно решить, какой из этих двух способов тестирования эффективнее и выгоднее. По предварительным впечатлениям, одно и то же число независимых испытаний можно провести вторым способом за несколько меньшее время. Тестируя дестабилизированные клоны вторым способом, мы еще раз убедились в том, что нестабильность наследуется каждой клеткой такого клона. Действительно, фенотипическая гетерогенность группы субкультур сплошь и рядом обнаруживалась после двух-трех последовательных субклонирований исходного клона.

И при том, и при другом способе тестирование нестабильности у амёб остается пока что весьма трудоемким делом, дающим не вполне однозначные результаты. До сих пор единственный используемый критерий нестабильности клона — выявление у него таких значений маркерного признака, которые не свойственны исходному для этого клона штамму в нормальном состоянии. В появлении таких нетипичных значений признака у нестабильного клона до сих пор не удалось установить каких-либо закономерностей. Это делает весьма неравнозначными — в отношении надежности и убедительности — положительный и отрицательный результаты тестирования клона на нестабильность, на что мы уже неоднократно указывали ранее (Yudin 1967, Юдин и Николаева 1968, и др.). Даже при положительном результате нельзя исключить того, что в отдельных опытах нетипичные значения признака получены вследствие технической ошибки при тестировании признака. Отрицательный же результат всегда может означать, что нестабильность имеется, но в данной серии испытаний просто не выявилась. Эти моменты вносят, конечно, некоторый элемент субъективизма в оценку результатов опытов с тем или иным клоном. Более надеждой представляется оценка поведения целой группы однотипных клонов, то есть того или иного варианта опыта в целом в сравнении с контролем, как это делалось, в частности, в настоящей работе.

SUMMARY

It has been shown earlier (Юдин и Николаева 1968) that temporary implantation of the nucleus from an amoeba of one *Amoeba proteus* strain (L strain) into a cell of another (C strain) induces instability of the recipient cell progeny with respect to the marker character. The present study shows that such destabilizing activity of the implanted nucleus (with respect to the marker character, namely resistance to ethanol) may be inhibited by a preliminary treatment of the donor amoebae with actinomycin D (1000 $\mu\text{g/ml}$, 2 h) or erythromycin (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 h). We have failed to detect such inhibition when using chloramphenicol (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 h), cycloheximide (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) or emetine (10^{-4} M, 24 h) for the treatment of the donors.

ЛИТЕРАТУРА

- Algeri A., Marmiroli N., VIOLA A. and Puglisi P. P. 1977: Dependence of cytoplasmic on mitochondrial protein synthesis in *K. lactis* CBS 2360. *Mol. Gen. Genet.*, 150, 141-145.
- Andresen N. 1973: General morphology. In: *The Biology of Amoeba*. Academic Press, New York-London, 99-123.
- Chatterjee S. 1971: Growth and division of chloramphenicol treated amoebae. *Folia Biol. (PRL)*, 19, 89-93.
- Flickinger C. J. 1968: The fine structure of nucleoli of normal and actinomycin D-treated *Amoeba proteus*. *J. Ultrastruct. Res.*, 23, 260-271.
- Flickinger C. J. 1971: Alterations in the Golgi apparatus of amoebae in the presence of an inhibitor of protein synthesis. *Exp. Cell Res.*, 68, 381-387.
- Flickinger C. J. 1972: Influence of inhibitors of energy metabolism on the formation of Golgi bodies in amoebae. *Exp. Cell Res.*, 73, 154-160.
- Flickinger C. J. 1973: Cellular membranes of amoebae. In: *The Biology of Amoeba*, Academic Press, New York-London, 171-199.
- Gale E. F., Cundliffe E., Reynolds P. E., Richmond M. H. and Waring M. J. 1972: The molecular basis of antibiotic action. John Wiley and Sons, London-New York-Sydney-Toronto.
- Генес В. С. 1964: Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. „Медицина”, Москва.
- Goldstein L. 1965: Interchange of protein between nucleus and cytoplasm. In: *The use of Radioautography in Investigation of Protein Synthesis*. Academic Press, New York-London, 79-94.
- Goldstein L. 1973: Nucleocytoplasmic interactions in amoebae. In: *The Biology of Amoeba*. Academic Press, New York-London, 479-504.
- Goldstein L. and Trescott O. H. 1970: Characterization of RNA's that do and do not migrate between cytoplasm and nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 1367-1374.
- Goldstein L., Rao M. V. N. and Prescott D. M. 1969: The migration of RNA from cytoplasm to nucleus in *Amoeba proteus*. *Ann. Embryol. Morphol., Suppl.* 1, 189-197.
- Goldstein L., Wise G. E., Stephenson C. and Ko C. 1978: Small nuclear RNA's: An association with condensed chromatin in amoebae. *J. Cell Sci.*, 30, 227-235.
- Hawkes R. B. and Halberton D. V. 1973: Resistance of amoeba cytoplasm to cycloheximide. *Exp. Cell Res.*, 78, 481-483.
- Hawkins S. E. 1973: The response of amoebae to antibiotics. In: *The Biology of Amoeba*, Academic Press, New York-London, 371-400.
- Hawkins S. E. and Hainton J. M. 1971: Resistance to cycloheximide in amoebae. *Exp. Cell Res.*, 65, 258-272.
- Hawkins S. E. and Hainton J. M. 1972: Sensitivity of amoebae to chloroquine and erythromycin. *Microbios*, 5, 57-63.
- Hogan B. and Gross P. R. 1971: The effect of protein synthesis inhibition on the entry of messenger RNA into the cytoplasm of sea urchin embryos. *J. Cell Biol.*, 49, 629-701.
- Jeon K. W. 1977: Further evidence for the host cell's dependence on newly acquired cytoplasmic components in amoebae. *Abstr. Fifth. int. Congr. Protozool.*, New York 1977, 445.
- Jeon K. W. and Hah J. C. 1977: Effect of chloramphenicol on bacterial endosymbionts in a strain of *Amoeba proteus*. *J. Protozool.*, 24, 289-293.
- Jeon K. W. and Lorch I. J. 1969: Lethal effect of heterologous nuclei in amoeba heterokaryons. *Exp. Cell Res.*, 56, 233-238.
- Калинина Л. В. 1970: Новые данные о наследственной нестабильности у *Amoeba proteus*. В сб.: *Проблемы биологии развития, материалы конф. молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рожд. В. И. Ленина*, Москва, 43.
- Калинина Л. В. и Юдин А. Л. 1964: Генетическое взаимодействие ядер в гетерокарионах у амёб. *Цитология*, 6, 695-709.
- Кованько Е. Г. и Сопина В. А. 1977: Влияние денуклеации на фагоцитоз амёб. *Acta Protozool.*, 16, 23-36.

- Lamy L. and Melton C. G., Jr. 1972: Reversible re-fusion of frog blastomeres and additional cleavage effects of chloramphenicol and other respiratory inhibitors. *J. Exp. Zool.*, 180, 319-332.
- Lorch I. J. and Jeon K. W. 1969 a: Character changes induced by heterologous nuclei in amoeba heterokaryons. *Exp. Cell Res.*, 57, 223-229.
- Lorch I. J. and Jeon K. W. 1969 b: Reversible effect of actinomycin D on nuclei of *Amoeba discoides*: Nuclear transplantation study. *Nature (Lond.)*, 221, 1073-1074.
- Maruta H. and Goldstein L. 1975: The fate and origin of the nuclear envelope during and after mitosis in *Amoeba proteus*. I. Synthesis and behavior of phospholipids of the nuclear envelope during the cell life cycle. *J. Cell Biol.*, 65, 631-645.
- Pestka S. 1971: Inhibitors of ribosome functions. *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 697-710.
- Полянский Ю. И., Суханова К. М., Сопина В. А. и Юдин А. Л. 1967: Устойчивость *Amoeba proteus* к действию летальной температуры и этилового спирта. В сб.: Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе. „Наука”, Ленинград, 43-62.
- Rao M. V. N. and Prescott D. M. 1970: Inclusion of predivision labeled nuclear RNA in post division nuclei in *Amoeba proteus*. *Exp. Cell Res.*, 62, 286-292.
- Schatz G. and Manson T. L. 1974: The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 51-87.
- Сопина В. А. и Юдин А. Л. 1979: Скорость прикрепления амёб к субстрату: исследование ядерно-цитоплазматических взаимоотношений. *Цитология*, 21, 347-353.
- Stevens A. R. 1967: Machinery for exchange across the nuclear envelope. In: *The Control of Nuclear Activity*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 189-271.
- Stevens A. R. and Prescott D. M. 1971: Reformation of nucleolus-like bodies in the absence of post-mitotic RNA synthesis. *J. Cell Biol.*, 48, 3, 443-454.
- Yudin A. L. 1967: Nuclear-nuclear interactions in *Amoeba*. In: *The Control of Nuclear Activity*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N. J., 299-318.
- Юдин А. Л. 1968: Некоторые варианты операции по пересадке ядер у амёб. *Цитология*, 10, 777-781.
- Юдин А. Л. 1973: О возможной ошибке в оценке роли цитоплазмы в наследственности при трансплантации ядер у амёб. *Генетика*, 9, 30-38.
- Yudin A. L. 1973: Nuclear-nuclear interactions in heterokaryons. In: *The Biology of Amoeba*, Academic Press, New York-London, 505-523.
- Юдин А. Л. 1974: Трансплантация ядер у амёб. В кн.: *Методы биологии развития*, „Наука”, Москва, 39-45.
- Юдин А. Л. 1975: Амёба (*Amoeba*). В кн.: *Объекты биологии развития*, „Наука”, Москва, 5-12.
- Юдин А. Л. 1979 a: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. II. Наследуемые изменения, индуцированные некоторыми антибиотиками. *Acta Protozool.* 19, 571-579.
- Юдин А. Л. 1979 b: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. III. Наследуемые изменения, обусловленные трансплантационной несовместимостью с амёбами других штаммов. *Acta Protozool.*, 18, 581-589.
- Юдин А. Л. и Николаева Г. В. 1968: Дополнительные данные о времени, необходимом для генетического взаимодействия ядер в гетерокарионах у амёб. *Цитология*, 1006-1023.
- 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.
- Заар Э. И. и Лозина-Лозинский Л. К. 1964: Многолуночные микроаквариумы для цитофизиологических и альгологических исследований. *Ботанический журнал*, 49, 10, 1455-1457.
- Zennaro E., Falcone C., Frontali L. and Puglisi P. P. 1977. Dependence of cytoplasmic on mitochondrial protein synthesis in *K. lactis* CBS 2360. I. Biochemical analysis. *Mol. Gen. Genet.*, 150, 137-140.

Received on 19 February 1979

Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград 190121, пр. Маклина 32, СССР

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR,
Leningrad 190121, Prospekt Maklina 32, USSR

А. Л. ЮДИН

A. L. YUDIN

Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб.
II. Наследуемые изменения, индуцированные некоторыми
антибиотиками

Mechanisms of Destabilization of Hereditary Characters in Amoebae.
II. Heritable Variations Induced by Some Antibiotics

Синопис. Обработка амёб *Amoeba proteus* (штамм С) растворами актиномицина D (1000 $\mu\text{g/ml}$, 2 часа) или эритромицина (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа) индуцировала у них с высокой частотой наследуемые изменения по маркерному признаку „устойчивость к этиловому спирту”. Эти изменения выявлялись в потомстве обработанных клеток в форме ранее описанной (Калинина и Юдин 1964) нестабильности проявления признака. Такие же изменения, вероятно, могут быть индуцированы хлорамфениколом (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа). После обработки амёб растворами эметина (10^{-4} М, 24 часа) или циклогексимида (1000 $\mu\text{g/ml}$, 24 часа) такие изменения не обнаружены.

У крупных пресноводных амёб типа *Amoeba proteus* описан и исследуется особый тип изменчивости — наследуемая нестабильность по ряду признаков, контролируемых клеточным ядром (обзор и литературу см.: Yudin 1967, 1973, 1979b). Возникновение и проявление нестабильности наблюдали на ряде клонов, до сих пор лишь в экспериментальных условиях. Вначале она была обнаружена у клонов-потомков клеток-гетерокарионов (Калинина и Юдин 1964) как наследуемый результат взаимовлияния ядер, осуществляющегося через цитоплазму (Yudin 1973). Позже было показано, что в отношении тех же самых признаков нестабильность может возникать как результат рентгеновского облучения амёб (Калинина 1967), инъекций им препаратов тотальной РНК из амёб того же или других штаммов (Olenov et al. 1968), обработки актиномицином D (Калинина 1968), рибонуклеазой (Калинина 1969), N-метил-N-нитрозо-N'-нитрогуанидином (предварительные данные

А. Л. Юдина и Е. Р. Ланиной), дистамицином А (Калинина 1976) и даже микрургической фрагментации амёб во время деления (Калинина и Горюнова 1975 а, б).

Уже сам по себе набор воздействий, индуцирующих нестабильность, а также очень высокая, доходящая до 100% частота ее возникновения заставляли сомневаться в том, что нестабильность обусловлена обычными мутациями, связанными с редкими и ненаправленными изменениями ядерных генов. Можно было предполагать, что это какой-то особый по своей природе тип наследственной изменчивости. С этой точки зрения, дальнейшее изучение наследуемой нестабильности у амёб представляет, как нам кажется, большой интерес. В частности, желательно расширить наши представления о факторах и воздействиях, вызывающих у амёб изменения этого рода.

С этой целью мы исследовали действие на амёб нескольких антибиотиков — ингибиторов биосинтезов и обнаружили, что многие клоны, выращенные от амёб, которые были обработаны актиномицином или эритромицином в нелетальных дозах, обнаруживали наследуемую нестабильность по маркерному признаку — устойчивости к этиловому спирту.

Материал и методика

(1) Штаммы амёб

Были использованы амёбы штамма *C. Amoeba proteus* из коллекции Института цитологии АН СССР, которые культивировались по методике Prescott and Carrier (1964) при 25°C. Клонировали амёб в многолуночных микроаквариумах из оргстекла (Заар и Лозина-Лозинский 1964) при той же или при комнатной температуре (различий по нашему показателю в этих двух вариантах не установлено). Культуры кормили тетрахименами через день, культуральную среду меняли ежедневно.

(2) Ингибиторы

Небольшие группы амёб помещали в микроаквариумы с одним из следующих растворов: (1) актиномицин D (АМД, „Serva”, ФРГ), 1000 µg/ml, 2 часа, (2) эметин (ЭМ, получен от д-ра Д. М. Прескотта, США), 10^{-4} М, 24 часа, (3) циклогексимид (ЦГИ, „Serva”, ФРГ), 1000 µg/ml, 24 часа, (4) эритромицин (ЭРИ, получен из Всесоюзного н.-и. технологического института антибиотиков и ферментов медицинского назначения Министерства медицинской промышленности), 1000 µg/ml, 24 часа, (5) хлорамфеникол (ХАФ, „Calbiochem”, США), 1000 µg/ml, 24 часа. Раствор АМД готовился на бидистиллированной воде, остальные растворы — на культуральной среде. Выбор антибиотиков определялся главным образом наличием в литературе хотя бы каких-нибудь сведений об их действии на амёб типа *proteus* (см.: Юдин 1979 б). Из этих же данных исходили, выбирая дозировку ингибиторов, при этом стремились обеспечить максимальное нелетальное воздействие. После окончания воздействия амёб промывали свежей культуральной средой и рассаживали поодиночке для последующего клонирования.

(3) Тестирование клонов на стабильность

Клоны, выращенные от обработанных тем или иным антибиотиком амёб, в возрасте не менее 1 месяца тестировали на стабильность по маркерному признаку „выживаемость к концу 5-минутного пребывания в 7%-ном растворе этилового спирта”, или — сокращенно — „устойчивость к этанолу”. Характеристику этого наследственного признака контролируемого ядром, можно найти в работе Yudin and Sorina (1970). Как и раньше, устойчивость амёб к этанолу определяли спустя не менее 48 час после последнего их кормления, помещая 50 клеток в микроаквариум с 1 ml 7%-ного раствора этилового спирта на дистиллированной воде на 5 мин, после чего раствор разбавляли примерно вдвое культуральной средой, амёб пересаживали в новую порцию среды и через 20–40 мин подсчитывали число живых, нормально движущихся клеток.

От каждого подлежащего тестированию на стабильность клона закладывали 25 параллельно выращиваемых субклонов, которые по достижении численности не менее 50 клеток каждый все одновременно тестировались на устойчивость к этанолу описанным выше способом. Обычно после этого процедура субклонирования повторялась еще раз. Следующие 25 субклонов закладывались от одного из субклонов первой серии. В результате для каждого тестируемого клона получали данные об устойчивости нескольких десятков его субклонов. Если все эти субклоны имели устойчивость, типичную для амёб исходного штамма С-тестируемый клоп считался стабильным. Если же хотя бы некоторые из субклонов имели несвойственную амёбам С устойчивость, клон в целом признавался нестабильным.

Характеристика устойчивости к этанолу исходного штамма С в период проведения настоящего исследования была получена в параллельно проводившейся работе (Юдин 1979 b). Из 324 испытанных субклонов С один обнаружил выживаемость 58%, а остальные — 60–100%, причем выживаемость 93% субклонов находилась в пределах 80–100%. Поэтому в качестве типичной для С, эталонной выживаемости были приняты значения 60–100%. В этой же работе были испытаны на стабильность (также способом тестирования субклонов) 8 клонов, выращенных от амёб С, которым на короткое время подсаживалось, а потом удалялось дополнительное ядро того же штамма. Все эти клоны при большом суммарном числе испытаний характеризовались устойчивостью, типичной для амёб С. Эти 8 клонов и будут использованы в качестве контроля к клонам, описываемым в настоящей работе. Группа клонов, выращенных от амёб, которые были обработаны тем или иным антибиотиком, будет сравниваться с этим контролем по соотношению стабильных и нестабильных клонов. Для этой цели используются „Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям” (Генес 1964), в которых применен точный метод Фишера для расчета вероятности четырехклеточной таблицы и принят 2,5%-ный уровень значимости.

Результаты

В Таблице 1 приведены результаты испытаний клонов, выращенных от амёб, обработанных тем или иным антибиотиком, на стабильность по маркерному признаку — устойчивости к этанолу. В варианте с обработкой амёб АМД наблюдалась наиболее явно выраженная дестабилизация. Здесь нестабильность проявили 4 из 6 испытанных клонов. Наблюдавшиеся у этих клонов наименьшие значения выживаемости намного меньше минимальных значений выживаемости, зарегистрированных у контрольных амёб С. Число

Таблица 1

Дестабилизирующее действие антибиотиков на амёб С

Table 1
Destabilizing effect of antibiotics on C amoebae

Антибиотик	№ клонов	Число протестированных субклонов	Число субклонов с выживаемостью в 7%-ном этаноле	
			< 60%	60-100%
Antibiotic	Clones	Number of subclones tested	Number of subclones with survival rate in 7% ethanol	
			< 60%	60-100%
Актиномицин Actinomycin	1	49	12	37
	2	43	10	33
	3	71	6	65
	4	68	4	64
	5	24	0	24
	6	40	0	40
Эритромицин Erythromycin	1	41	5	36
	2	49	1	48
	3	46	1	45
	4	44	1	43
	5	22	0	22
Хлорамфеникол Chloramphenicol	1	45	7	38
	2	47	1	46
	3	46	1	45
	4	38	0	38
	5	47	0	47
	6	46	0	46
	7	81	0	81
	8	43	0	43
Эметин Emetine	1	18	0	18
	2	49	0	49
	3	69	0	69
	4	40	0	40
Циклогексиимид Cycloheximide	1	30	0	30
	2	43	0	43
	3	44	0	44
	4	44	0	44
	5	46	0	46
	6	47	0	47

таких нетипичных для С значений также значительно. В целом, по соотношению клонов, проявивших и не проявивших нестабильность, этот вариант существенно отличается от контрольного ($P = 0.025-0.011$).

В варианте с ЭРИ лишь один клон в 5 испытаниях из 41 показал выжива-

емость, не типичную для контроля, в том числе такую низкую, как 18, 30, 30 и 36%. Еще три клона обнаружили всего по 1 нетипичному значению выживаемости при 46–49 испытаниях каждого из них. По крайней мере два из этих значений достаточно низкие (22 и 38%), третье приближается к нижней границе контроля (56%). У одного клона выявить нестабильность не удалось. Таким образом, у 4 из 5 клонов получено хотя и небольшое, но все же достаточное число нетипичных значений выживаемости, чтобы считать, что и в этом варианте наблюдалась дестабилизация подопытных амёб по маркерному признаку. По соотношению стабильных и нестабильных клонов и этот вариант в целом существенно отличается от контрольного ($P \leq 0.010$).

В варианте с ХАФ лишь три клона из 8 обнаружили хотя бы по одному не характерному для С значению выживаемости. Лишь у клонов № 1 и 2 эти значения довольно низкие: 28, 30, 32% у одного и 46% у другого. У клона же № 3 единственное показанное им нетипичное значение (56%) близко к нижней границе контроля. Таким образом, приходится признать, что ХАФ дестабилизировал лишь небольшую долю обработанных им амёб. По соотношению числа стабильных и нестабильных клонов этот вариант не отличается достоверно от контрольного ($P > 0.025$).

Среди 4 клонов варианта с ЭМ и 6 клонов варианта с ЦГИ нестабильных клонов выявить не удалось, хотя число испытаний каждого из них было не меньшим, чем в предыдущих вариантах. Следовательно, эти два антибиотика — по крайней мере в выбранных дозировках — дестабилизирующего действия на амёб С не оказали.

Обсуждение

Трудности выращивания многочисленных клонов и субклонов амёб и тестирования их по маркерному признаку вынудили нас ограничиться небольшим набором ингибиторов, всего одной дозой для каждого из них и сравнительно небольшим числом клонов в каждом варианте опыта. В этих условиях положительные результаты тестирования (т.е. обнаружение дестабилизирующего действия антибиотика) имеют, очевидно, больший вес и доказательность, чем отрицательные результаты.

Литературные данные о действии выбранных нами антибиотиков на амёб типа *Acanthamoeba proteus* рассмотрены нами в другой работе (Юдин 1979 в). Здесь же можно лишь кратко охарактеризовать их действие на амёб штамма С в наших опытах. После 2-часового воздействия АД в концентрации 1000 $\mu\text{g/ml}$ амёбы первые несколько суток выглядели нормальными. Однако отмечалась значительная задержка очередного деления, часть амёб в конце концов погибала и только некоторые давали жизнеспособные клоны. Так, в одном из опытов только 4 клетки из 25 разделились на 4-е сутки после воздействия, а на 8-е сутки было всего 5 небольших клонов. Как было показано,

в этой дозе АМД проявил отчетливое дестабилизирующее действие на амёб С по выбранному маркерному признаку — устойчивости к этанолу. Ранее этот эффект был обнаружен Калининой (1968), в том числе на этом же штамме и с этим же маркером, но при другой дозе АМД (100 $\mu\text{g/ml}$, 6 час). Напротив, Hawkins не обнаружила никаких изменений по устойчивости к стрептомицину у 23 клонов *A. proteus*, подвергшихся 3–40-часовому воздействию АМД в концентрации 5–20 $\mu\text{g/ml}$ (Hawkins 1968).

Для наших опытов с ЭРИ мы выбрали концентрацию 1000 $\mu\text{g/ml}$ и продолжительность воздействия 24 часа. Чтобы уравнивать остальные условия этого и других вариантов, раствор готовили на обычной культуральной среде, хотя известно (и подтверждается нашими наблюдениями), что в слегка щелочной среде (рН 8) ЭРИ более активен. После выбранного воздействия амёбы С оставались совершенно нормальными: в одном из опытов все 25 испытанных его амёб дали клоны. В то же время в другом опыте, где амёбы постоянно находились в растворе вдвое меньшей концентрации, они прожили лишь 12 суток. По нашей оценке, ЭРИ в использованной дозировке проявил дестабилизирующее действие на амёб С, хотя и не очень отчетливо выраженное.

ХАФ в концентрации 1000 $\mu\text{g/ml}$ при воздействии в течение 24 час. не оказывал сколько-нибудь заметного повреждающего действия на амёб С. Например, в одном из опытов все 25 обработанных амёб размножились и дали клоны. Результаты испытания дестабилизирующей активности ХАФ, как мы видели, неоднозначны. С одной стороны, среди 8 клонов этого варианта по крайней мере два нестабильны в соответствии с принятым критерием. С другой стороны, доля нестабильных клонов слишком мала: по соотношению стабильных и нестабильных клонов вариант в целом не отличается от контроля, и при таком более строгом подходе мы должны считать, что дестабилизирующее действие ХАФ в нашем опыте не выявлено.

Что касается ЭМ, то 24-часовое воздействие этого ингибитора в концентрации 1×10^{-4} М не снижало эффективности клонирования амёб С по сравнению с контролем и не индуцировало у них нестабильность.

Наконец, ЦГИ также не оказывал никакого влияния на внешний вид, поведение и клонируемость амёб С в концентрации 1000 $\mu\text{g/ml}$ при 24-часовом воздействии и не индуцировал у них нестабильность. Учитывая литературные данные об отсутствии влияния ЦГИ на рост амёб типа *proteus* (Hawkins and Hainton 1971, Hawkes and Halberton 1973), трудно было ожидать, что ЦГИ проявит дестабилизирующую активность при действии на амёб даже в высоких дозах, и мы включили этот вариант скорее как еще один контроль.

Итак, в наших опытах явную дестабилизирующую активность при действии на амёб проявили АМД и ЭРИ (возможно, таким же действием обладает и ХАФ). Мы уже отмечали, что по своим характеристикам нестабильность представляет собой какой-то особый тип наследственной изменчивости,

вряд ли обусловленный обычными генными мутациями. Обнаружение дестабилизирующей активности АМД и ЭРИ также свидетельствует в пользу этих представлений. Данных о мутагенной активности АМД почти нет, и если он и является мутагеном, то слабым (Fishbein et al. 1970). Что касается ЭРИ и ХАФ, то по данным Уилки (1977), они вызывают нарушения репликации мтДНК и с высокой частотой индуцируют *petite*-мутации у дрожжей. Данных же о мутагенной активности этих антибиотиков в отношении ядерных генов нам найти не удалось. Между тем, и АМД и ЭРИ вызывают наследственную нестабильность у амёб с частотой, которая для обычных мутации слишком высока — как, впрочем, и все другие изученные до сих пор дестабилизирующие воздействия. При этом показано, что дестабилизация связана с изменениями в ядре амёбы (Калинина 1965).

Каким же тогда может быть механизм дестабилизирующей активности АМД и ЭРИ? Известно, что у амёб между интерфазным ядром и цитоплазмой постоянно мигрирует некий метаболит (или метаболиты), по всей видимости участвующий в регуляции феногенетической активности ядра (так называемый „дестабилизирующий фактор”, или ДФ — обзор см.: Yudin 1973). Биохимическая природа и место синтеза в клетке ДФ не известны, но показано, что как раз АМД и ЭРИ при действии на амёб блокируют дестабилизирующую активность их ядер в клетках другого штамма — вероятно, за счет подавления синтеза ДФ и тем самым снижения его содержания в ядре, (Юдин 1979 а). Сопоставляя эти данные с результатами настоящей работы, можно предположить, что дестабилизирующее действие АМД и ЭРИ на амёб каким-то образом связано именно с временным подавлением синтеза ДФ в них, снижением его содержания в клетке и, как следствие, с нарушением его нормальной миграции между ядром и цитоплазмой. Можно думать, что, напротив, нормальный непрерывный обмен ДФ между ядром и цитоплазмой является непременным условием поддержания стабильности клетки по маркерному признаку. Эти и целый ряд других соображений легли в основу предложенной нами модели эпигенетической детерминации дестабилизируемых наследственных признаков у амёб (Yudin 1979 а).

Очевидно, что АМД и ЭРИ могут ингибировать разные звенья одного и того же биосинтетического процесса, протекающего либо в митохондриях (митохондриальный синтез белка), либо в цитоплазме (синтез белка на циторибосомах). Последнее не противоречит принятым представлениям о месте первичного действия ЭРИ в клетке. На ряде моделей показана взаимозависимость биосинтетических процессов в митохондриях и в цитоплазме эукариотических клеток (Schatz and Manson 1974). В частности, недавно на дрожжах *Kluuyveromyces lactis* показано, что ЭРИ в концентрациях, еще не угнетающих дыхание, может подавлять синтез белка не только в митохондриях, но — опосредованно — и в цитоплазме, в результате подавляя размножение клеток (Algeri et al. 1977, Zennaro et al. 1977).

SUMMARY

Heritable changes with respect to the marker character (resistance to ethanol) were induced at a high frequency after the treatment of *Amoeba proteus*, strain C, with actinomycin D (1000 µg/ml, 2 h) or erythromycin (1000 µg/ml, 24 h). These changes showed up in the progeny of the thus treated cells in the form of the earlier described (Калинина и Юдин 1964) phenotypic instability of the marker character. The same changes are likely to be also induced with chloramphenicol (1000 µg/ml, 24 h) but we failed to detect them after treating the amoebae with emetine (10⁻⁴ M, 24 h) or cycloheximide (1000 µg/ml, 24 h).

ЛИТЕРАТУРА

- Algeri A., Marmioli N., Viola A. and Puglisi P. P. 1977: Dependence of cytoplasmic on mitochondrial protein synthesis in *K. lactis* CBS 2360. *Mol. Gen. Genet.*, 150, 141-145.
- Fishbein L., Flamm W. G. and Falk H. L. 1970: *Chemical Mutagens*. Academic Press, New York-London.
- Генес В. С. 1964: Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. „Медицина”, Москва.
- Hawkes R. B., and Halberton D. V. 1973: Resistance of amoeba cytoplasm to cycloheximide. *Exp. Cell Res.*, 78, 481-483.
- Hawkins S. E. 1968: Effect of actinomycin D on the assimilation of a cytoplasmic determinant in amoebae. *Nature (Lond.)*, 220, 5170, 923-924.
- Hawkins S. E. and Hainton J. M. 1972: Sensitivity of amoebae to chloroquine and erythromycin. *Microbios*, 5, 57-63.
- Калинина Л. В. 1965: О генетическом взаимодействии ядер в гетерокарионах у амёб. *Цитология*, 7, 66-72.
- Калинина Л. В. 1967: Наследственные изменения, вызываемые у амёб рентгеновском облучением. *Цитология*, 9, 1543-1549.
- Калинина Л. В. 1968: Наследуемые изменения у амёб, вызываемые действием актиномицина Д. *Цитология*, 10, 1589-1597.
- Калинина Л. В. 1969: Наследственные изменения у амёб, вызываемые рибонуклеазой. *Журнал общ. биологии*, 30, 80-86.
- Калинина Л. В. 1976: Действие дистамицина А на наследственные характеристики *Amoeba proteus*. В сб.: *Материалы II Всесоюзного съезда протозоологов, ч. I*, „Наукова Думка”, Киев, 60.
- Калинина Л. В. и Горюнова Л. Б. 1975 а: Изменения наследственных свойств амёб при микрургическом воздействии во время деления (метафаза — ранняя анафаза). *Цитология*, 17, 474-476.
- Калинина Л. В. и Горюнова Л. Б. 1975 б: Изменения наследственных свойств амёб при микрургическом воздействии во время деления (анафаза — ранняя телофаза). *Цитология*, 17, 580-582.
- Калинина Л. В. и Юдин А. Л. 1964: Генетическое взаимодействие ядер в гетерокарионах у амёб. *Цитология*, 6, 695-709.
- Olenov J. M., Kalinina L. V., Yudin A. L., Podgayetskaya D. J., Fridlanskaya I. I. and Vorobjev V. I. 1968: The effect of RNA preparations from B amoebas on L amoebas. *Proc. XIIth Internat. Congress of Genetics, Tokyo*, 1, 168.
- Prescott D. M. and Carrier R. F. 1964: Experimental procedures and cultural methods for *Euplotes eurystomus* and *Amoeba proteus*. In: *Methods in Cell Physiol.*, Academic Press, New York-London, 1, 85-95.
- Schatz G. and Manson T. L. 1974. The biosynthesis of mitochondrial proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 51-87.
- Уилки Д. 1977: Биогенез митохондрий: ингибиторы митохондриального синтеза белка. В сб.: *Молекулярная генетика митохондрий*, „Наука”, Ленинград, 149-152.

- Yudin A. L. 1973: Nuclear-nuclear interactions in heterokaryons. In: The Biology of *Amoeba*, Academic Press, New York-London, 505-523.
- Yudin A. L. 1979 a: Nuclear transplantation studies in *Amoebae proteus*. Int. Rev. Cytol., Suppl. 9, 63-100.
- Юдин А. Л. 1979 b: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. I. Подавление генетического взаимодействия ядер в гетерокарионах. Acta Protozool., 19, 553-569.
- 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.
- Заар Э. И. и Лозина-Лозинский Л. К. 1964: Многолуночные микроаквариумы для цитофизиологических и альгологических исследований. Ботанический журнал, 49, 10, 1455-1457.
- Zennaro E., Falcone C., Frontali L. and Puglisi P. P. 1977: Dependence of cytoplasmic on mitochondrial protein synthesis in *K. lactis* CBS 2360. I. Biochemical analysis. Mol. Gen. Genet., 150, 2, 137-140.

Received on 19 February 1979

Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград 190121, пр. Маклина 32, СССР

Institute of Cytology, Academy of Sciences of the USSR,
Leningrad 190121, Prospekt Maklina 32, USSR

А. Л. ЮДИН

A. L. YUDIN

Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. III. Наследуемые изменения, обусловленные трансплантацион- ной несовместимостью с амёбами других штаммов

Mechanisms of Destabilization of Hereditary Characters in Amoebae. III. Heritable Variations Induced by Transplantation Incompatibility with Amoebae of other Strains

Синопис. При работе с двумя трансплантационно совместимыми штаммами *Amoeba proteus* — L и С — было показано (Юдин 1979 b), что предварительная обработка амёб актиномицином D или эритромицином подавляет дестабилизирующую активность их ядер. Временная имплантация таких ядер амёбам другого штамма уже не приводит (в отличие от контроля!) к наследственной дестабилизации клеток-реципиентов по маркерному признаку „устойчивость к этанолу”. В настоящей работе применили такое же воздействие актиномицином (1000 $\mu\text{g/ml}$, 2 часа) к одному из двух трансплантационно несовместимых штаммов — А и С. Считали, что тем самым подавлялась дестабилизирующая активность их ядер. Оказалось, что трансплантационная несовместимость клеток этих двух штаммов после примененного воздействия сохранялась. Даже кратковременная имплантация ядер амёб А, обработанных актиномицином, приводила к гибели большинство клеток-реципиентов С. Вместе с тем, редкие выживающие клоны оказывались, несмотря на примененное воздействие, наследственно нестабильными по маркерному признаку „устойчивость к этанолу”. Этот эффект в данном случае приходится отнести за счет трансплантационной несовместимости как таковой. Делается вывод, что в обычных условиях при получении ядерно-цитоплазматических „гибридов” и трансплантатов других типов между „несовместимыми штаммами амёб редкие выживающие клоны практически всегда будут наследственно измененными (нестабильными) по тем или иным признакам в силу самой несовместимости исходных штаммов.

У *Amoeba proteus* временная (в некоторых случаях всего на несколько секунд) имплантация ядра одного штамма в целую клетку другого штамма вызывает у клетки-реципиента изменения по ряду признаков, контролируемых ядром (Юдин и Николаева 1968). Эти изменения проявляются в наследуемой нестабильности затронутых признаков и могут быть обнаружены у потомков оперированной клетки в форме таких значений этих признаков, какие никогда не обнаруживаются в тех же условиях культивирования у амёб исходного штамма, из которого была взята оперированная клетка (Калинина и Юдин 1964). На основании таких опытов был сделан вывод, что в ядре амёб содержится некий фактор, способный выходить в цитоплазму клетки-реципиента, оттуда проникать в её собственное ядро и индуцировать в нем изменения (нестабильность) по ряду наследственных признаков. В связи с этим он был назван „дестабилизирующим фактором” (ДФ).

В других комбинациях штаммов точно такая же операция (т.е. временная подсадка амёбе гетерологичного ядра) приводит к гибели подавляющего большинства клеток-реципиентов (Jeon and Lorch 1969, Махлин 1974). В этом случае также делается вывод, что из имплантируемого ядра в цитоплазму клетки-реципиента выходит некий „летальный фактор” (ЛФ), который и обуславливает наблюдаемую трансплантационную несовместимость таких штаммов (Махлин и Юдин 1969).

Можно было бы предположить, что ДФ и ЛФ — один и тот же метаболит, по-разному проявляющий себя в клетках разных штаммов. Однако некоторые особенности позволяют думать, что это не так и что ДФ и ЛФ — действительно разные факторы. Так, время сохранения активности ДФ и ЛФ в денуклеированной цитоплазме амёб существенно различно (см. обзоры в: Jeon 1973).

Вместе с тем, есть основания считать, что ядра любого штамма амёб содержат „свой” ЛФ, который оказывает летальное действие на клетки одних штаммов, но безвреден для других (Юдин 1975 а; см. однако: Jeon and Lorch 1973). ДФ также обнаруживается в ядрах любого из исследованных в этом отношении штаммов амёб. Поэтому можно считать, что при описанной выше операции ядро клетки-реципиента всегда подвергается действию обоих гетерологичных факторов — ДФ и ЛФ, какой бы штамм не был использован в качестве донора. Однако в случае трансплантационно совместимых штаммов ЛФ не проявляет своего летального действия на клетку-реципиента, и возникающие у неё наследуемые изменения мы должны относить за счет действия ДФ. Что же касается несовместимых комбинаций, то здесь ситуация менее определенная. Выше уже отмечалось, что при трансплантации ядер или цитоплазмы между несовместимыми штаммами лишь редкие клетки сохраняют жизнеспособность и дают клоны. Юдин с соавторами (1971) обнаружили, что такие клоны нестабильны, по крайней мере по некоторым маркерным признакам. Однако чем была индуцирована эта нестабильность,

сказать в данном случае трудно: ведь клетки-родоначальницы этих клонов подверглись действию сразу обоих ядерных факторов — ДФ и ЛФ.

Возникает вопрос: может ли ЛФ в тех редких случаях, когда он не убивает клетку несовместимого штамма, оказывать на неё, прямо или опосредованно, дестабилизирующее действие подобно ДФ? От ответа на этот вопрос зависит, в частности, можно ли использовать несовместимые штаммы амёб для получения ядерно-цитоплазматических „гибридов” между ними с целью определения сравнительной роли ядра и цитоплазмы в наследовании тех или иных признаков. Итак, желательно выяснить, происходит ли дестабилизация амёб в условиях, когда на них действуют только ЛФ амёб несовместимого штамма, а действие ДФ этих же клеток тем или иным способом вообще исключено.

Нами при работе с двумя трансплантационно совместимыми штаммами L и C было показано (Юдин 1979 b), что предварительная обработка амёб актиномицином D или эритромицином подавляет дестабилизирующую активность их ядер: временная имплантация таких ядер амёбам другого штамма уже не приводила к наследственной нестабильности клеток-реципиентов по маркерному признаку. В настоящей работе мы применили такое же воздействие актиномицином D к одному из двух трансплантационно несовместимых штаммов амёб, считая, что тем самым мы подавляем дестабилизирующую активность их ядер. Оказалось, что это воздействие не лишало эти ядра летальной активности: даже кратковременная имплантация таких ядер амёбам второго штамма приводила к гибели большинство клеток-реципиентов. Вместе с тем, редкие выживающие клетки оказались дестабилизированными по маркерному признаку, хотя влияние ДФ на них как будто бы было исключено. Этот эффект в данном случае приходится отнести за счет действия ЛФ. На этом основании делается вывод, что при получении ядерно-цитоплазматических „гибридов” и трансплантантов других типов между несовместимыми штаммами амёб в обычных условиях редкие выживающие клоны практически всегда будут дестабилизированными по тем или иным признакам под влиянием если не ДФ, то во всяком случае ЛФ.

Материал и методика

(1) Штаммы амёб

Были использованы штаммы A и C *Amoeba proteus* из коллекции Института цитологии АН СССР. Амёб культивировали по принятой в лаборатории методике Прескотта и Кэриера (Юдин 1975 b) при 25°C. Клонирование производили в многолуночных микрокварихах из органического стекла (Заар и Лозина-Лозинский 1964) при той же температуре.

(2) Трансплантация ядер

Операции производили в масляной камере Фонбрюна с помощью микроманипулятора ММ-1, как это описано Юдиным (1968, 1974).

(3) Варианты опыта

В варианте 1 ядро интактной амебы А имплантировали на время от 30 сек. до 3 мин в целую амебу С, после чего от каждой оперированной амебы С пытались вырастить клон. Всего было получено и протестировано на стабильность по маркерному признаку 5 жизнеспособных клонов типа $(A_{\text{я}})C_{\text{яц}}$ (применяемую номенклатуру см.: Yudin 1979a). В варианте 2 амеб штамма А предварительно инкубировали 2 часа в растворе актиномицина D (1000 $\mu\text{g/ml}$, „Serga”, ФРГ). Сразу по окончании ядро такой амебы (обозначаемой далее A^+) имплантировали на 30–80 сек. в целую амебу С. Далее опять-таки в условиях индивидуальной культуры наблюдали за жизнеспособностью оперированной таким образом клетки С и от амеб, сохранивших жизнеспособность, выращивали клоны. Всего было выращено и протестировано на стабильность 5 клонов $(A_{\text{я}}^+)C_{\text{яц}}$.

(4) Тестирование клонов на стабильность

Тестирование производили по маркерному признаку „выживаемость к концу 5-минутного пребывания в 7%-ном растворе этилового спирта”, или сокращенно „устойчивость к этанолу”. Характеристика этого наследственного признака, контролируемого ядром, дана ранее (Полянский и др. 1967, Yudin and Sopina 1970). Устойчивость того или иного клона амеб тестировали каждый раз спустя не менее 48 час. после последнего кормления. 50 амеб помещали в микроаквариум с 1 ml 7%-ного раствора этилового спирта на дистиллированной воде. По прошествии 5 мин раствор разбавляли примерно вдвое культуральной средой, амеб пересаживали в другой микроаквариум с новой порцией культуральной среды и через 20–40 мин подсчитывали число живых, нормально передвигающихся клеток. Как и в прежних наших работах, каждый клон тестировали многократно на протяжении длительного времени (нескольких месяцев), но не чаще одного раза в сутки. Клон, обнаруживший во всех испытаниях устойчивость, характерную для исходного штамма С, считался стабильным. Напротив, если хотя бы в одном из испытаний клон обнаруживал выживаемость, не свойственную амебам С, он считался нестабильным.

Стабильность клонов в вариантах 1 и 2 оценивали, сравнивая эти клоны с контролем. В качестве последнего использовали данные из другой нашей работы (Юдин 1979 а), характеризующие устойчивость к этанолу амеб исходного штамма С. Согласно этим данным, 323 клон С обнаружили выживаемость в 7%-ном этаноле в пределах 60–100% и лишь в одном клоне выжило 58% амеб. Более того, 93% этих клонов обнаружили выживаемость 80% и выше. Тем не менее, в качестве типичной для штамма С (т.е. контрольной) мы приняли выживаемость 60–100%.

Результаты

Вначале определяли, подавляет ли предварительная обработка амеб А актиномицином летальное действие их ядер на амеб С (Табл. 1). В подтверждение прежних данных (Махлин 1974 а, б, 1977), небольшие выборки амеб С, которым на 2–3 мин имплантировали по одному ядру А, полностью погибли. Лишь при сокращении времени пребывания ядер А в клетках С до 1 мин или до 30 сек от небольшого числа амеб удалось получить жизнеспособные клоны.

Таблица 1

Выживаемость амёб С после имплантации им на короткое время ядер амёб А

Table 1

Survival of C amoebae after a short-term implantation of the A amoebae nuclei

Вариант	Время пребывания ядра А в клетке С, мин. Duration of the A nucleus stay in the C cell, min.	Всего оперировано амёб С Total number of C amoebae operated	Из них разделились один и более раз Number of amoebae which divided once or more	Получено жизнеспособных клонов Number of viable clones obtained
Интактные амёбы А Intact A amoebae	3 2	10 11	1 4	0 0
Амёбы А, предварительно 2–2.5 часа находившиеся в растворе актиномицина D (1000 µg/ml) A amoebae preliminarily treated with actinomycin D (1000 µg/ml) for 2–2.5 h	0.66–1.33 0.5	18 58	2 13	1 4

собные клоны (в дальнейшем — вариант 1). Такая зависимость летального эффекта от времени пребывания несовместимого ядра в клетке-реципиенте была установлена ранее (Махлин и Юдин 1969). По всей видимости, она обусловлена тем, что при разных экспозициях в цитоплазму реципиента успевает поступить разное количество ЛФ. Обработка амёб А непосредственно перед операциями в течение 2–2.5 час. актиномицином не повлияла на летальную активность их ядер. После 40–80- и даже 30-секундного пребывания таких ядер в клетках С большинство последних погибло, и жизнеспособные клоны удалось получить только от 5 из них (в дальнейшем — вариант 2).

Эти пять клонов ($A_{\text{н}}^+$)С_{яц}, а также пять клонов ($A_{\text{н}}$)С_{яц} были испытаны далее на устойчивость к этанолу (Табл. 2, варианты 1 и 2 соответственно). Видно, что и в том и в другом вариантах имелись явно нестабильные клоны. В варианте 1 эта нестабильность могла быть индуцирована ДФ и/или ЛФ. В варианте же 2 выход ДФ из ядер А должен быть подавлен обработкой амёб-доноров актиномицином, и есть основания считать, что в цитоплазму клеток С попадал только ЛФ. Если при этом редкие выживающие клоны оказываются нестабильными, этот результат приходится приписать действию ЛФ.

Таблица 2

Действие актиномицина D на дестабилизирующую активность ядер амёб А, имплантируемых на короткое время амёбам С

Table 2

Effect of actinomycin D on the destabilizing activity of the amoeba A nuclei implanted into C amoebae for a short time

Вариант	№ клонов	Всего опытов	Число опытов с выживаемостью	
			< 60%	60–100%
Variant	Clones	Total number of tests	Number of tests with the survival rate	
			< 60%	60–100%
(1) Интактные амёбы А	1	18	0	18
(1) Intact A amoebae	2	19	8	11
	3	22	0	22
	4	23	3	20
	5	29	2	27
(2) Амёбы А предварительно находились 2–2.5 часа в растворе актиномицина (1000 µg/ml)	1	14	8	6
	2	16	1	15
	3	16	1	15
	4	18	1	17
(2) A amoebae were preliminarily incubated with actinomycin D (1000 µg/ml) for 2–2.5 h	5	19	2	17

Обсуждение

Итак, в работе — в условиях, по-видимому исключающих действие „дестабилизирующего фактора” — была обнаружена дестабилизирующая активность „летального фактора” в тех клетках несовместимого штамма, которые по тем или иным причинам не были убиты ЛФ и сохранили жизнеспособность. Этот результат позволяет считать, что при трансплантациях ядер или цитоплазмы между несовместимыми штаммами амёб изредка выживающие трансплантанты часто или даже всегда будут нестабильными по крайней мере по некоторым наследственным признакам, какие бы меры не принимались для того чтобы предотвратить при таких операциях действие ДФ.

Если это так, то трансплантационно несовместимые штаммы вообще

не могут использоваться для получения ядерно-цитоплазматических „гибридов” с целью оценки сравнительной роли ядра и цитоплазмы в наследственности амёб, ибо в этом случае должны получаться не „настоящие”, стабильные, а дестабилизированные „гибридные” клоны. Ранее мы неоднократно указывали, что использование нестабильных „гибридов” для оценки роли ядра и цитоплазмы в наследственности тех или иных признаков у амёб может служить источником ошибочных выводов (Yudin 1973, и др.). Между тем, значительная часть опубликованных исследований такого рода выполнена как раз на трансплантационно несовместимых штаммах, и именно в этих исследованиях авторы приходят к выводу о существенной роли цитоплазмы в наследовании многих признаков (см. обзор: Yudin 1979 a).

Говоря о дестабилизирующем действии ЛФ, необходимо подчеркнуть, что оно проявляется только в клетках несовместимых штаммов. Действительно, в опытах, совершенно аналогичных описанным в настоящей работе, но выполненным на паре совместимых штаммов (L и C), ядра амёб, обработанных актиномицином, не обнаруживали дестабилизирующую активность в клетках совместимого штамма (Юдин 1979 b). Таким образом, можно предполагать, что дестабилизирующее действие ЛФ на клетки несовместимого штамма как-то связано с его летальным действием на эти клетки.

Известно, что одним из первых эффектов, наблюдаемых в амёбе после введения ей ЛФ из клетки несовместимого штамма, является прекращение синтеза РНК, а затем и белка (Jeon and Logch 1970, 1971, Cameron and Hawkins 1976). В этом отношении ЛФ, по-видимому, действует на клетку так же, как и целый ряд других воздействий, индуцирующих нестабильность у амёб: актиномицин D, РНКаза, рентгеновы лучи, эритромицин и др. (обзор см.: Yudin 1979 a). Мы попытались объяснить одинаковое действие столь разнородных по своей природе агентов на основе наших представлений о механизмах генетической детерминации многих наследственных признаков у амёб и о механизмах поддержания их стабильности в клеточных поколениях (Yudin 1979 a). Согласно нашей гипотезе, любое воздействие, которое хотя бы на некоторое время блокирует синтез ДФ или любым другим способом уменьшает его содержание в клетке или же нарушает его нормальную миграцию между ядром и цитоплазмой, должно вызывать дестабилизацию амёб хотя бы по некоторым из тех признаков, которые вообще способны дестабилизироваться. Очевидно, не последнее место в этом ряду должны занимать воздействия, так или иначе нарушающие транскрипцию и/или трансляцию у амёб. К таким воздействиям относится, в частности, и действие гетерологичных „летальных факторов”.

Заканчивая обсуждение полученных данных, мы хотели бы отметить еще один, частный момент. В настоящей работе ЛФ из амёб штамма А индуцировал в амёбах С нестабильность по устойчивости к этанолу, а в работе Юдина с соавторами (1971) ЛФ из амёб *Chaos carolinensis* не дестабилизировал

амеб С по этому признаку. Было бы интересно выяснить, обусловлено ли это расхождение различиями в каких-то деталях техники эксперимента или же в свойствах этих двух ЛФ.

SUMMARY

When working with two micrurgically compatible *Amoeba proteus* strains (L and C), it has been shown (Yudin 1979 b) that preliminary treatment of donor amoebae with actinomycin D or erythromycin inhibits the destabilizing activity of their nuclei. In such case the temporary implantation of the nuclei into the cells of another strain does not result (unlike in the control!) in hereditary destabilization of recipient cells with respect to the marker character, "resistance to ethanol". In the present study the same treatment with actinomycin D (1000 µg/ml, 2 h) was applied to one of the two micrurgically non-compatible strains (A strain). The treatment was believed to inhibit the destabilizing activity of the A amoebae nuclei. The non-compatibility of the A strain amoebae with the C strain cells was found to persist after the treatment applied. As usual, even a short-term implantation of nuclei from the treated A amoebae into the C amoebae caused lethality in most of the recipient cells. At the same time, some rare clones which have survived were found to be hereditarily unstable with respect to the marker character (resistance to ethanol) despite of the treatment applied. In our case this effect must be accounted for by the transplantation non-compatibility as such. It is concluded that rarely surviving nucleo-cytoplasmic "hybrids" or any other kinds of transplants between non-compatible strains of amoebae, will practically always be hereditarily changed (unstable) with respect to one or another of their characters due to the non-compatibility of the original strains.

ЛИТЕРАТУРА

- Cameron J. M. and Hawkins S. E. 1976: Inhibition of cell division in amoebae: The incorporation of tritiated precursors into *Amoeba proteus* after injection of non-homologous cytoplasm. *J. Cell Sci.*, 20, 525-537.
- Jeon K. W. (editor). 1973: *The Biology of Amoeba*. Academic Press, New York-London.
- Jeon K. W. and Lorch I. J. 1969: Lethal effect of heterologous nuclei in amoeba heterokaryons. *Exp. Cell Res.*, 56, 233-238.
- Jeon K. W. and Lorch I. J. 1970: Strain-specific mitotic inhibition in large mononucleate amoebae. *J. Cell Physiol.*, 75, 193-198.
- Jeon K. W. and Lorch I. J. 1973: Strain specificity in *Amoeba proteus*. In: *The Biology of Amoeba*. Academic Press, New York 549-567.
- Калинина Л. В. и Юдин А. Л. 1964: Генетическое взаимодействие ядер в гетерокарионах у амеб. *Цитология*, 6, 695-709.
- Махлин Е. Е. 1974 а. О нарушении функциональной активности ядер амеб после введения летального фактора из амеб другого штамма. *Цитология*, 16, 1406-1410.
- Махлин Е. Е. 1974 б: О скорости повреждения ядер амеб, в которых введен летальный фактор из амеб другого штамма. В сб.: *Функциональная физиология, генетика и биохимия клетки*, Ленинград, 299-300.
- Махлин Е. Е. 1977: Предотвращение гибели амеб, в которых был введен летальный фактор из амеб другого штамма, путем имплантации в них дополнительных ядер из клеток „своего” штамма. *Цитология*, 19, 445-451.

- Махлин Е. Е. и Юдин А. Л. 1969: Явления несовместимости при трансплантации ядер у амёб. I. Нежизнеспособность гетерокарионов, полученных при трансплантации ядра *Amoeba proteus* в клетку *Chaos chaos*. Цитология, 11, 744-759.
- Полянский Ю. И., Суханова К. М., Сопина В. А. и Юдин А. Л. 1967: Устойчивость *Amoeba proteus* к действию летальной температуры и этилового спирта. В сб.: Изменчивость теплоустойчивости клеток животных в онто- и филогенезе, „Наука”, Ленинград, 43-627.
- Юдин А. Л. 1968: Некоторые варианты операции по пересадке ядер у амёб. Цитология, 10, 777-781.
- Yudin A. L. 1973: Nuclear-nuclear interactions in heterokaryons. In: The Biology of *Amoeba*. Academic Press, New York and London, 505-523.
- Юдин А. Л. 1973: О возможной ошибке в оценке роли цитоплазмы в наследственности при трансплантации ядер у амёб. Генетика, 9, 30-38.
- Юдин А. Л. 1974: Трансплантация ядер у амёб. В кн.: Методы биологии развития, „Наука”. Москва, 39-45.
- Юдин А. Л. 1975 а: Явления несовместимости при трансплантации ядер у амёб. IV. Трансплантационная совместимость разных штаммов *Amoeba proteus*. Генетика, 11, 122-128.
- Юдин А. Л. 1975 б: Амёба (*Amoeba*). В кн.: Объекты биологии развития, „Наука”, Москва, 5-12.
- Yudin A. L. 1979 а: Nuclear transplantation studies in *Amoeba proteus*. Int. Rev. Cytol., Suppl. 9, 63-100.
- Юдин А. Л. 1979 б: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. I, Подавление генетического взаимовлияния ядер в гетерокарионах. Acta Protozool. 18, 553-579.
- Юдин А. Л. и Николаева Г. В. 1968: Дополнительные данные о времени, необходимом для генетического взаимодействия ядер в гетерокарионах у амёб. Цитология, 10, 1008-1023
- Yudin A. L. and Sopina V. A. 1970: On the role of nucleus and cytoplasm in the inheritance of some character in Amoebae (nuclear transfer experiments). Acta Protozool., 8, 1-39.
- Юдин А. Л., Махлин Е. Е. и Николаева Г. В. 1971: Наследственная дестабилизация ядер в нежизнеспособных гетерокарионах у амёб. Генетика, 7, 49-57.
- Заар Э. И. и Лозина-Лозинский Л. К. 1964: Многолуночные микроаквариумы для цитофизиологических и альгологических исследований. Ботанический журнал, 49, 1455-1457.

Received on 19 February 1979

Ewa MIKOŁAJCZYK and Bodo DIEHN¹

Mechanosensory Responses and Mechanoreception in *Euglena gracilis*

Synopsis. The mechanoreponse and mechanoreception of *Euglena gracilis* have been examined in cells held by a suction pipette. In some experiments an insulating ring between the anterior and posterior end of the cell was formed by "Fluorinert" electronic liquid. In a cell held anteriorly a narrow-tipped pipette, both anterior/posterior and peristaltic contractions commonly occurred. Direct mechanical stimulation of the flagellum of a posteriorly held cell led to both flagellar reorientation and body contraction. Body contraction also resulted when flagellar straightening of a posteriorly-held cell was induced by a photic stimulus, i.e., when flagellar thrust appeared to be the only mechanical stimulus specifically correlated in time with the mechanoreponse. The Fluorinert liquid affects the cell's mechanoreponses. Light stimulation of an anteriorly held cell can initiate contraction of the posterior end. Mechanical stimulation of the free posterior end often causes immediate or delayed contractions of that end. It is suggested, that the receptor function for mechanosensory responses in *Euglena* resides in the membrane lining the cell's reservoir and canal.

Recent studies of the protozoan cell *Euglena gracilis* show that both the mechano- and chemosensory pathways in this organism interact with the photosensory transduction system (Mikołajczyk and Diehn 1976, Colombetti and Diehn 1978, Diehn 1979 a, b).

The receptor molecule for the photosensory system has been identified as a flavin derivative in the paraflagellar swelling (Tollin and Robinson 1969, Diehn and Kint 1970, Kivic and Vesik 1972, Benedetti and Checcucci 1975, Mikołajczyk and Diehn 1975, Checcucci et al. 1976 a, b, Benedetti and Lenci 1977).

¹ Department of Zoology Natural Science Building, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, USA.

It is small ($0.4 \mu\text{m}^2$) organelle situated near the base of the locomotor flagellum (Pl. I 3). In contrast, very little is known about the location of the receptors for chemical and mechanical stimulation, though cytochrome oxidase has been implicated as the chemoreceptor molecule for oxygen (Miller and Diehn 1978).

Both the photo- and chemo-induced motor responses consist of bending of the flagellum from a trailing to a sideways orientation, and in consequence a change in the direction of the cell's movement ("tumbling" of the cell). With strong stimuli, the response persists for several seconds, resulting in prolonged turning of the cells around a lateral axis. This "photic response" (for terminology, see Diehn et al. 1977) is terminated by restoration of the previous stimulus intensity, or by adaptation to the applied stimulus. In the presence of a light stimulus that induces flagellar reorientation, a mechanical stimulus will trigger anterior-posterior contractions leading to a flattened sphere shape of the cell (Mikołajczyk and Diehn 1976).

The intent of the studies reported here is an attempt to localize by topical stimulation the mechanoreceptor of the cell, based on our initial suggestion that the receptor might be localized either within the flagellum, or at the anterior end of the cell (Mikołajczyk and Diehn 1976). This was also suggested by previous studies of the mechanosensory behavior of *Euglena* (Lowndes 1944, Chen 1950, Jahn and Bovee 1968). Other investigations were not strictly concerned with the stimulus receptor problem, however, they gave an important contribution to our knowledge of the behavior of *Euglena* to mechanical stimulation (Stahl 1880, Jennings 1904, Lowndes 1936, Byrne and Marsland 1965, Gross 1965).

Material and Methods

Euglena gracilis, strain Z, was grown in Bloomington Medium (Starr 1964) at 25°C under constant cool fluorescent illumination (1.0 W/m^2). For experiments, cells were centrifuged, washed twice in a solution containing $5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ and $5 \text{ mM (NH}_4)_3\text{PO}_4$, usually also containing 1 mM EGTA to prevent autotomy of the flagellum (see Nichols and Rikmenspoel 1977), or 10 mM Tris/HCl buffer (all at pH 7.2), and resuspended in the washing solution. No significant differences in cell behavior were observed in either of these solutions.

Holding in a suction pipette and mechanical stimulation of the cells by a glass needle (tip diameter approximately $0.1 \mu\text{m}$) were carried out with a Carl Zeiss micromanipulator. The suction pipettes usually had a diameter slightly smaller than the diameter of the cell (approximately $15 \mu\text{m}$) to allow *Euglena* to be sucked into one quarter or one half of their length. Sucking a cell into such a micropipette leads to a slight deformation of the cell body. Occasionally, cells were suction-held,

without entering the capillaries, and without cell deformation, by pipettes with very fine (1–3 μm) tips. Suction was applied via paraffin-oil filled Teflon tubing connected to a screw-driven 5 cm^3 syringe.

“Fluorinert” electronic liquids were a gift from the 3M Company, Minneapolis, Minnesota. Table 1 lists the physical properties of the liquids used by us. These

Table 1
Physical properties of the Fluorinert electronic liquids

	FC 43	FC 48
Density, 25°C g/cm ³	1.86	1.94
Kinematic viscosity, 25°C cs	2.6	3.1
Thermal conductivity, watts/cm ² /°C (cm)	0.00067	0.00072
Surface tension, 25° dynes/cm	16	19
Refractive index, 25°	1.291	1.312
Volume resistivity, 25°C, ohm-cm	3.4×10^{15}	4.2×10^{15}
Average molecular weight	670	525

liquids, providing electrical insulation, resemble water in their capacity to dissolve gases such as oxygen and carbon dioxide, and hence allow long-term survival (1 h or more) of the cells.

The following manipulations were carried out to create a Fluorinert bridge across the exterior of the cell, between the anterior and posterior ends (Fig. 1).

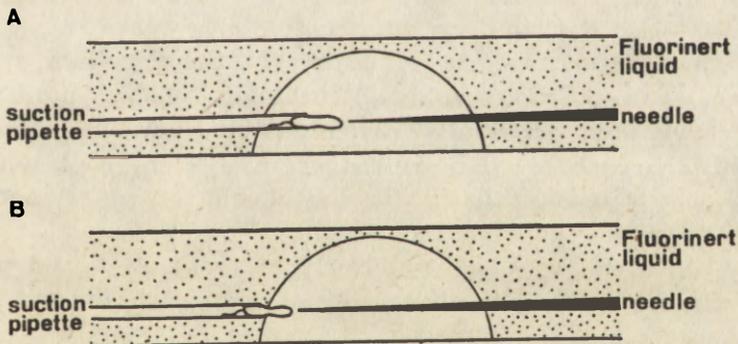


Fig. 1. Scheme of experiments: A — with *Euglena* in aqueous solution, B — with *Euglena* separated by Fluorinert liquid

A drop of *Euglena* suspension in experimental solution was placed on a 50 mm diameter “Falcon” Petri dish the rim of which had been machined down to a height of 2 mm. The Fluorinert liquid was then carefully pipetted into the dish until the drop of suspension was completely covered by it. A suction pipette filled with aqueous solution was then introduced through the Fluorinert into the *Euglena* suspension, a specimen captured by suction, and the half-entered cell partially or

completely withdrawn into the electronic liquid. The Fluorinert will form an insulating ring between anterior and posterior ends of the cell, simultaneously strongly constricting the cell in this annular region.

We have used this technique for conducting non-invasive electrophysiological measurements with *Euglena* (Mikołajczyk et al., unpublished studies).

Microscope illumination was with monochromatic yellow light (577 nm) which cannot be perceived by the cells, while stimulating light (100 W PZO halogen lamp) was applied laterally. The behavior of *Euglena* was recorded on 16 mm film at 16 frames/s using a 16 SP-M camera.

Results

I. Experiments in Aqueous Medium with Cells Held in a Capillary

In all of the experimental situations described in this section, no part of the cell contacted the cuvette or the air/water interface.

1. Behavior of cells stimulated only by suction pipette, in the absence of additional stimuli.

1.1. When a cell was sucked into a pipette posteriorly, i.e., by the end opposite the flagellum, the flagellum often reoriented from its normal trailing position, either sideways (90°) or forward (180°). In the latter case, contraction followed flagellar reorientation. Apparently, direct anterior stimulation is not required for triggering the contractile response. If, however, a pipette was used that was a little wider than the diameter of the organism, such that there was no deformation of the cell upon entering the capillary, body contractions were rare.

1.2. When *Euglena* was sucked anteriorly, the flagellum was usually in front of the cell. Though it maintains such "phobic" position, it can operate slowly and apparently normally, but without showing any excitability. However, in these cells there was strong contraction of the posterior end. It appears that a flagellar phobic response is not essential for the body contraction response.

1.3. When a cell was held anteriorly to a narrow-tipped pipette by suction, without entering the bore, both anterior/posterior and peristaltic contractions commonly occurred.

2. Behavior of cells upon additional mechanical or light stimulation.

2.1. Behavior of photically stimulated cells held in a suction pipette.

Application of white light stimuli of 15 W/m² or more to anteriorly or posteriorly held cells cause a step-up photophobic flagellar response and body contraction of the free end of *Euglena*.

In anteriorly held cells, body contraction of the free posterior end appears usually with a delay of approximately 10 s.

2.2. In a posteriorly held cell, no additional body stimulation was required to induce cell contraction. It was sufficient to stimulate the flagellum only. When the needle touched the flagellum the latter reoriented, and if this reorientation led to complete straightening, body contraction usually followed it.

II. Behavior of Cels Immersed in or Separated by "Fluorinert" Liquids

1.1. When the cell was half immersed in the Fluorinert, with the other half in the suction pipette, the Fluorinert-immersed part usually became rounded and only occasionally retained its elongated shape. The cells no longer exhibited any body contraction, regardless of which end was immersed in Fluorinert, and regardless of whether the stimulus was photic or mechanical. When the cells were transferred back to the aqueous solution, they once again became able to respond with body contraction to light or mechanical stimulation.

1.2. When only the flagellum was immersed in Fluorinert, the flagellum became immobilized and shortly thereafter broke off from the cell body.

1.3. The annular region of the cell surrounded by Fluorinert narrowed to one-half or less of the original diameter of the cell. This narrow region can be made very long (Pl. I 4, 5). All visible organelles were extruded from this region into one of the ends. The narrow region immediately relaxed to its normal diameter upon removal from the Fluorinert liquid.

1.4. In posteriorly held cells, the Fluorinert-separated anterior end, in the aqueous solution, can exhibit spontaneous flagellar reorientation followed by body contraction.

In an anteriorly held cell, the posterior end of spontaneously contracting organism did exhibit contractions whose timing depended on the contraction state at the instant when the Fluorinert ring was created between the two ends of the cell (Pl. I 4, 5). When the separation of the two ends by Fluorinert was taking place while the cell was contracting, contractions of the posterior end continued without delay. Such posterior contractions resumed with a delay of approximately 30 s if separation took place in the elongated phase of a contraction cycle. Occasionally when body contractions began at the posterior end, the anterior end inside the pipette began to twist within 3–4 s (contraction being impossible because this end was confined) (Pl. II 6–10). Because the flagellum of a cell inside a capillary often shows spontaneous phobic responses with or without contractions, it was difficult to establish any correlation between flagellar response and contraction of the posterior end.

1.5. Light stimulation of the anteriorly held cell can also initiate contraction of the posterior end.

1.6. Mechanical stimulation of the free posterior end often caused immediate or delayed (3–4 s) contractions of this end which usually were not accompanied by twisting of the anterior.

In contrast to antero-posterior contractions which were little affected by Fluorinert separation of the two ends, the same manipulation stopped peristaltic contractions. In this case, antero-posterior contractions appear after 1–2 min.

A pictorial description of the above experiments is given in Fig. 2.

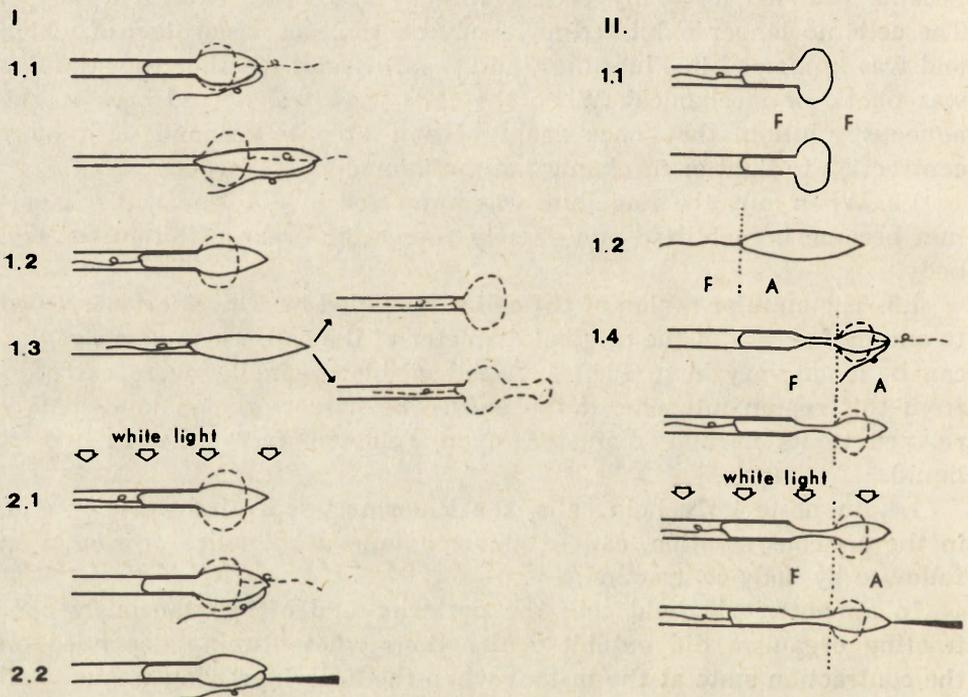


Fig. 2. A pictorial description of the experiments. A — aqueous solution, F — Fluorinert liquid. Dots mark the border between Fluorinert and water solution

Discussion

There are two types of motor responses that *Euglena* can execute upon mechanical stimulation: flagellar reorientation and body contraction. The flagellar responses to mechanical stimulation are mechano-phobic in nature (for definitions, see Diehn et al. 1977) i.e., they do not persist for the duration of stimulation. This is difficult to establish for

direct mechanical stimulation of the flagellum, but more easily seen when the cell body is stimulated. In contrast, body contractions are an example of a mechanokinesis: The contraction cycles cease only when the stimulus is removed. Our results indicate that the two responses, while often coupled can be exhibited independently of each other.

In view of recent work in our laboratory concerning the effect of detergents on sensory membranes in *Euglena* (Mikołajczyk and Diehn 1978) as well as another studies of the euglenoid membranes (Bouck et al. 1978, Miller and Miller 1978), the results reported here are consistent with the hypothesis that the receptor function for both mechanosensory responses may reside in the membrane of the reservoir and canal surrounding the lower part of the flagellum. We propose that deformation of this membrane, which can be caused via the flagellum or by hydrostatic pressure within the cell resulting from stimulation of the cell body, may trigger flagellar reorientation and body contraction. Suggestion, that the flagellar reorientation appears as a result of canal deformation was previously postulated by Piccini and Omodeo (1975).

This hypothesis is in agreement with the experimental facts observed by us:

(1). Cells whose flagellum had broken off were still able to exhibit body contractions. Clearly, in intact cells the emergent part of the locomotor flagellum does not act as mechanoreceptor proper, but simply transmits the mechanical stimulus to that receptor.

(2). Direct mechanical stimulation of the flagellum of a posteriorly held cell can lead to both flagellar reorientation and body contraction. We have previously observed that body contraction follows the flagellar response with a delay time of several seconds (Mikołajczyk and Diehn 1976). If the stimulus is shorter in duration than this delay time, such as a collision of the cell with a non-viscous interface, only flagellar reorientation occurs and the cell turns away from that interface.

(3). Body contraction occurs when a flagellar response is so intense as to be executed as a 180° reorientation, i.e., when the flagellum straightens completely. In this case, maximal thrust is acting upon the flagellar attachment point. Body contraction also results when flagellar straightening of a posteriorly-held cell is induced by a photic stimulus, i.e., when flagellar thrust appears to be the only mechanical stimulus specifically correlated in time with the mechanoreponse.

(4). The Fluorinert liquid probably affects the cell's mechanoreponses through the mechanical forces exerted upon the cell at the liquid/cell interface. These forces are clearly very strong, considering the resulting

deformation of the cell body (Pl. I 4, 5). When the cell is entirely confined, one end within the capillary and other end compressed by Fluorinert, the hydrostatic pressure within the cell is maximal. The observed immobilization of the organism may be purely due to mechanical confinement, or may be caused by overloading of the mechanosensory system. In the latter case, one would expect the flagellum, too, to be unable to exhibit mechanophobic responses. This is what we observed, however, since phobic responses by definition (Diehn et al. 1977) cease after an adaptation time, the absence of a flagellar response may well indicate that by the time observation of the flagellum was possible, adaptation of the flagellar response system had occurred.

The transmission across a Fluorinert bridge of peristaltic contractions, unlike that of antero-posterior ones, is apparently very difficult. This reaffirms the earlier suggestion (Kuźnicki and Miokołajczyk 1973, Hofman and Bouck 1976) that the two types of contraction are controlled by different mechanisms. Peristaltic movement may require an uninterrupted self-propagating contraction-relaxation cycle, while antero-posterior contraction could well be under central control of the mechanoreceptor system.

While we have observed body contractions of the posterior end without flagellar reorientation, this was in experimental situations where the mechanical stimulus had been unavoidably applied for many seconds while the cell was sucked into the pipette, thus the flagellar response system had probably adapted to the stimulus.

It appears that upon moderate stimulation of the mechanoreceptor the response is immediate sideways orientation of the flagellum. A stronger stimulus causes complete erection of the flagellum and subsequent antero-posterior contractions of the cell body. As we have observed previously, the latter also occurs when lateral flagellar thrust triggered by a photic stimulus is magnified by increased viscous drag on the cell body (Miokołajczyk and Diehn 1976).

As an alternate hypothesis for the location of the receptor, one might consider our original suggestion that the mechanoreceptor resides at the flagellar base. However, electron microscopic observations indicate that the "kinetosome" end of the flagellum is simply inserted into the pellicle (see also Bouck et al. 1978) without showing any unusual organizational features. On the other hand, it has been shown (Bouck et al. 1978, Miller and Miller 1978, Miokołajczyk and Diehn 1978) that the membrane lining the canal and reservoir differs from the cortical one. Thus it is not unreasonable to assume that it can fulfill a sensory function. Moreover, this membrane is connected by microfibrils to the longitudinal microtubules surrounding the canal and reservoir of the

cell (see Mikołajczyk and Diehn 1978). Assuming, that these fibrils are the contractile elements, they would act as the effector for mechanical stimulation and by interacting with microtubules change the shape of the cell. (The role of microtubules in cell contraction was previously suggested by Arnott and Walne 1966, 1967, Arnott and Smith 1969, Hofmann and Bouck 1976).

RÉSUMÉ

La perception des stimulants mécaniques et la réponse ont été étudié chez les cellules de *Euglena gracilis* maintenues à l'aide d'une pipette à suction. Dans certains exépriments elles étaient maintenues par un anneau du liquide Fluorinerte disposé entre l'extrémité antérieure et postérieure de la cellule.

Les cellules maintenues avec la pipette par leurs bouts antérieurs manifestent couramment des contractions antéro-postérieures, ainsi que les contractions péristaltiques. Le stimulation mécanique directe de la flagelle d'une cellule maintenue du côté postérieur peut provoquer également la réorientation des flagelles et la contraction du corps. Chez les cellules maintenues postérieurement la contraction du corps se produit aussi quant la flagelle est stimulée par la lumière, c'est-à-dire quand la tension de la flagelle agit comme le seul stimulant mécanique spécifiquement corelé dans le temps avec la réponse mécanique.

Le liquide Fluorinerte exerce une influence sur les réponses mécaniques de la cellule. La stimulation par la lumière d'une cellule maintenue à son bout antérieur peut initier la contraction à son bout postérieur. La stimulation mécanique du bout postérieur libre provoque souvent des contractions immédiates ou décalées de cette région. On suggère, que le récepteur responsable des réponses de *Euglena* aux stimulants mécaniques est localisé dans la membrane tapissant le réservoir et le canal chez cette cellule.

REFERENCES

- Arnott H. J. and Walne P. L. 1966: Metaboly in *Euglena granulata*. J. Phycol., 2 (Suppl.), 4 a (Abstr.)
- Arnott H. J. and Walne P. L. 1967: Observation on the fine structure of the pellicle pores of *Euglena granulata*. Protoplasma, 64, 330-344.
- Arnott H. J. and Smith H. E. 1969: Analysis of microtubule structure in *Euglena granulata*. J. Phycol., 5, 68-75.
- Benedetti P. A. and Checucci A. 1975: Paraflagellar body (PFB) pigments studied by fluorescence microscopy in *Euglena gracilis*. Plant Sci. Letters, 4, 47-51.
- Benedetti P. A. and Lenci F. 1977: *In vivo* microspectrofluorometry of photoreceptor pigments in *Euglena gracilis*. Photochem. Photobiol., 26, 315-318.
- Bouck G. B., Rogalski A. and Valaitis A, 1978: Surface organization and composition of *Euglena*. II. Flagellar mastigonemes. J. Cell Biol., 77, 805-826.
- Byrne J. and Marsland D. 1965: Pressure-temperature effects on the form-stability and movements of *Euglena gracilis* var. Z. J. Cell Comp. Physiol., 65, 277-284.
- Checucci A., Colombetti G., Ferrara R. and Lenci F. 1976 a: Action spectra for photoaccumulation of green and colorless *Euglena*: evidence for identification of receptor pigments. Photochem. Photobiol., 23, 51-54.

- Checucci A., Colombetti G., Ferrara and Lenci F. 1976 b: Further analysis of the mass photoresponses of *Euglena gracilis* Klebs (*Flagellata Euglenoidina*). *Monit. Zool., Ital.*, 10, 271-277.
- Chen Y. T. 1950: Investigation of the biology of *Peranema trichophorum* (*Euglenineae*). *Q. J. Microsc. Sci.*, 91, 279-308.
- Colombetti G. and Diehn B. 1978: Chemosensory responses toward oxygen in *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* 25, 211-217.
- Diehn B. 1979 a: The interactions of phobic and chemical stimulus/response systems in *Euglena gracilis*. *Acta Protozool.*, 18, 7-16.
- Diehn B. 1979 b: Photic responses and photosensory transduction in motile protists. In: *Handbook of Sensory Physiology*. VII/6A, Springer, Berlin-Heidelberg-New York (in press).
- Diehn B. and Kint B. 1970: The flavin nature of the photoreceptor molecule for phototaxis in *Euglena*. *Physiol. Chem. Phys.*, 2, 483-488.
- Diehn B., Feinleib M., Haupt W., Hildebrandt E., Lenci F. and Nultch W. 1977: Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, 26, 559-560.
- Gross J. A. 1965: Pressure induced color mutation of *Euglena gracilis*. *Science*, 147, 741-742.
- Hofman C. and Bouck G. B. 1976: Immunological and structural evidence for patterned intosusceptive surface growth in unicellular organism. A postulated role for submembranous proteins and microtubules. *J. Cell Biol.*, 69, 693-715.
- Jahn T. L. and Bovee E. C. 1968: Locomotive and motile responses in *Euglena*. In: *The Biology of Euglena*. (ed. Buetow D. E.), Academic Press, New York-London, Vol. 1, 45-108.
- Jennings H. S. 1904: Contributions to the study of the behavior of lower organisms. *Carnegie Inst. Washington Publ.*, 16, 225 pp.
- Kivic P. A. and Vesik M. 1972: Structure and function of the Euglenoid eyespot. *J. Exp. Bot.*, 23, 1070-1075.
- Kuźnicki L. and Mikołajczyk E. 1973: Contraction and elasticity involved body movements of *Euglena gracilis*. *Progress in Protozoology*, Abstr. Fourth. int. Congr. Protozool., Clermont-Ferrand, 1973.
- Lowndes A. G. 1936: Flagellar movement. *Nature*, 138, 210-211.
- Lowndes A. G. 1944: The swimming of unicellular flagellate organisms. *Proc. Zool. Soc., London*, 113, 99-107.
- Mikołajczyk E. and Diehn B. 1975: The effect of potassium iodide on photophobic responses in *Euglena*: evidence for two photoreceptor pigments. *Photochem. Photobiol.*, 22, 269-271.
- Mikołajczyk E. and Diehn B. 1976: Light-induced body movement of *Euglena gracilis* coupled to flagellar photophobic responses by mechanical stimulation. *J. Protozool.*, 23, 144-147.
- Mikołajczyk E. and Diehn B. 1978: Morphological alterations in *Euglena gracilis* induced by treatment with CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) and Triton x-100: Correlations with effects on photophobic behavioral responses. *J. Protozool.*, 25, 461-470.
- Miller K. R. and Miller G. J. 1978: Organization of the cell membrane in *Euglena*. *Protoplasma*, 95, 11-24.
- Miller S. and Diehn B. 1978: Cytochrome oxidase as the receptor molecule for chemoaccumulation "chemotaxis" of *Euglena* toward oxygen. *Science*, 200, 548-549.
- Nichols K. M. and Rikmenspoel R. 1977: Mg²⁺-dependent electrical control of flagellar activity in *Euglena*. *J. Cell. Sci.*, 23, 211-225.
- Piccini E. and Omodeo P. 1975: Photoreceptors and phototactic programs in protista. *Boll. Zool.*, 42, 57-79.
- Stahl E. 1880: Über den Einfluss von Richtung und Stärke der Beleuchtung auf einige Bewegungserscheinungen im Pflanzenreiche. *Botanische Zeitschrift*, 38, 297-304.
- Starr R. C. 1964: The culture collection of algae at Indiana University. *Am. J. Bot.*, 51, 1013-1044.
- Tollin G. and Robinson M. I. 1969: Phototaxis in *Euglena*. V. Photosuppression of phototactic activity by blue light. *Photochem. Photobiol.*, 9, 411-416.

Received on 2 May 1979

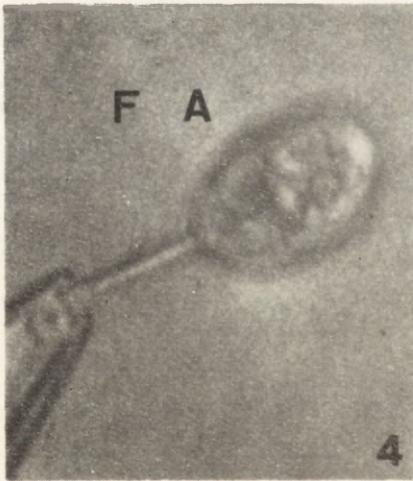
EXPLANATION OF PLATES I-II

3: *Euglena gracilis* with photoreceptor (paraflagellar body) visible inside the reservoir

4,5: Fluorinert bridge between the anterior (inside the pipette) and the posterior end (in water solution) of the cell. 4 — posterior end in elongated form, 5 — contracted to the sphere

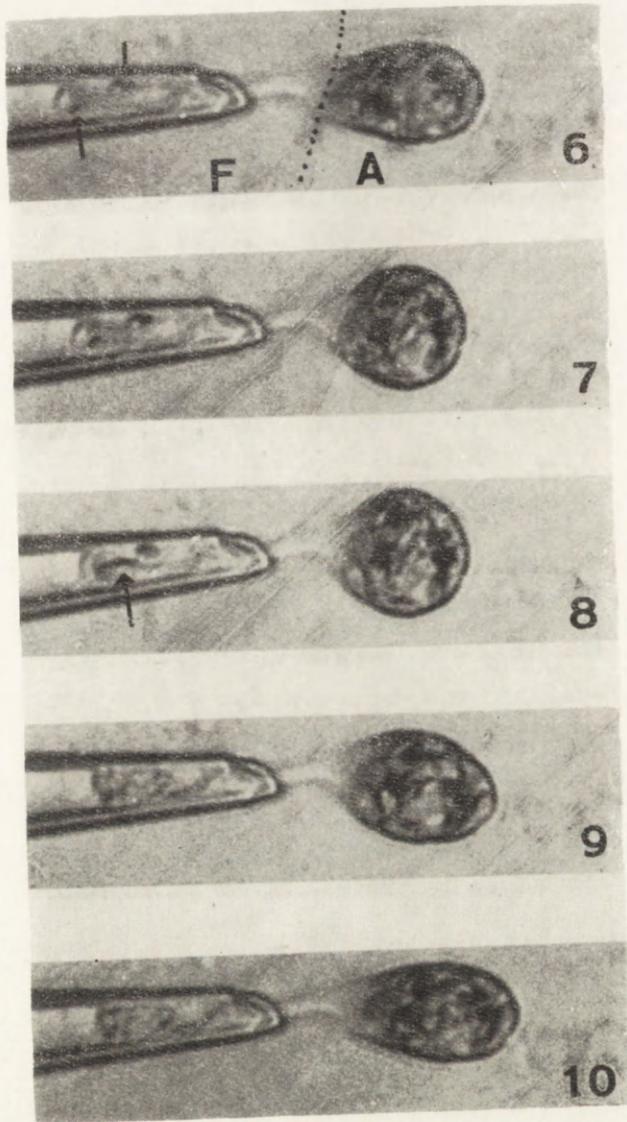
6-10: Body contractions of an anteriorly held cell separated by the Fluorinert liquid, 6 — cell separated by Fluorinert liquid, 7 — contraction of the posterior end, while the anterior one does not contract (compare cell markers — arrows), 8 — beginning of twisting of the anterior end, 9, 10 — elongation of the cell

Abbreviations: F — Fluorinert liquid, A — aqueous solution, dots mark the border between Fluorinert and aqueous solution.



E. Mikołajczyk et B. Diehn

auctores phot.



E. Mikołajczyk et B. Diehn

auctores phot.

A. N. Bach Institute of Biochemistry, Academy of Science of USSR, Moscow W-71,
Leninskij Prospekt 33, USSR

S. A. BURNASHEVA and G. A. SOLOVJEVA

Cytochemical Localization of Ca^{2+} -ATPase Activity in Cilia and Basal Bodies of *Tetrahymena pyriformis*

Synopsis. Ca^{2+} -ATPase activities in cilia and basal bodies of *Tetrahymena pyriformis* were demonstrated by cytochemical method. Reaction product deposition along the length of the doublets and central microtubules of cilia and of the part of outer microtubules running into the basal bodies was observed. The similarity of the periodicity of reaction product depositions with arrangement of subunits which constitute the microtubules of cilia revealed that the sites of Ca^{2+} -ATPase activity are associated with the globular subunits of microtubules of cilia.

Evidence has been accumulated by various authors that ATP-ATPase system is responsible for the utilization of energy necessary for motility of cilia and flagella. The proteins with the ATPase activity were extracted from flagella and cilia (Nelson 1955, 1967, Engelhardt and Burnasheva 1957, Burnasheva 1958, Gibbons 1963, 1965, 1967, Mohri 1964, Ogawa and Mohri 1972). Dynein, a ciliary or flagellar ATPase first described by Gibbons and Rowe (1965), is a high molecular weight enzyme associated with the arms of the doublet microtubules. Dynein participates in the mechanochemical activity that is responsible for sliding tubule mechanism of ciliary and flagellar motion (Satir 1968, Summers and Gibbons 1971, Warner and Mitchell 1978). Ca^{2+} -activated ATPase different from dynein ATPase was found in *Chlamydomonas* flagella (Watanabe and Flavin 1973) in cilia (Blum and Lubliner 1973) and cytozol fraction of *Tetrahymena pyriformis* (Chua et al. 1977).

Previously we have described the isolation and properties of Ca^{2+} -activated ATPase of *T. pyriformis* cilia (Burnasheva et al. 1963, Burnasheva et al. 1965, Daya et al. 1971) and of *Strigomonas oncopelti* flagella (Ostrovskaya et al. 1973). The studies of the

properties of Ca^{2+} -ATPase of *T. pyriformis* cilia and *S. oncopelti* flagella showed a similarity in some respects to myosin-like proteins: Ca^{2+} -ATPases of cilia and flagella can be extracted by salt solutions of high ionic strength (0.5–0.6 M) and form aggregates if ionic strength is lowered to 0.025–0.05 M. The activity of these ATPases was stimulated only by Ca ions while was inhibited by Mg ions, and was highly specific for ATP with two optima of pH. The molecular weight is about 380 000–400 000 daltons. Ca^{2+} -ATPase of *Tetrahymena* cilia can form complex with the muscle actin (Burnasheva and Raskidnaja 1968). Relative viscosity of the complex of muscle actin and Ca^{2+} -ATPase of cilia was being sensitive to ATP.

The purpose of the present investigation was to determine the localization of sites of Ca^{2+} -ATPase activities in *Tetrahymena* cilia and basal bodies of cilia using the cytochemical techniques. The lead salt method introduced by Wachstein and Meisel (1957) to the cytochemical localization of phosphatase activities was used to determine the sites of Ca^{2+} -ATPase.

Materials and Methods

Culture of *T. pyriformis* strain GL was grown and harvested as previously described (Burnasheva and Raskidnaja 1968). The reaction was run with cells prefixed for 10–30 min with freshly prepared 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate pH 7.0. All fixation and subsequent washings were carried out at 4°C. After fixation, cells were washed in 0.08 M Tris-maleate buffer at pH 7.0. Fixed cells were incubated at 30°C for 30 min in medium containing 0.5–2 mM ATP, 2–10 mM CaCl_2 , 2–10 mM MgCl_2 , 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 0.2 M Tris-maleate buffer at pH 7.0. The pH of the reaction medium was checked both before and after the incubation period. The omission of substrate was used as controls. After incubation, the cells were pelleted, rinsed in distilled water and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1% sodium cacodylate at pH 7.0 for 60 min. Following postfixation, cells were dehydrated in ethanol and acetone and embedded in Epon-812. All specimens were sectioned with a LKB ultramicrotome, sections were mounted on carbon-coated copper grids and examined with JEM-7 A electron microscope operating at 80 KW at the initial magnifications 30 000–50 000. The preparations were counterstained with lead citrate according to Reynolds (1963). Some sections were examined without further staining. The sites of ATPase activity were visualized with the electron microscope.

Results

Most investigations of ultrathin sections of *T. pyriformis* cilia demonstrated that the axoneme of cilia are composed of the two single microtubules circularly surrounded by nine pairs of microtubules or doublets

(Gibbons 1965, 1967, Burnasheva et al. 1968). The two microtubules composing each doublet were designated A and B, with two "arms" being attached to the A tubule (Pl. I 1). The axonemal A and B-tubules are continuous with the A- and B-tubules in the basal body (Pl. I 2, 3). The central pair of microtubules terminates in a basal granule immediately above the basal plate in the distal end of the basal body (Pl. I 3). The third, or C-tubule in *Tetrahymena* basal bodies, is short and is attached to the B-tubule (Pl. I 4). The peripheral and central microtubules are composed of spherical subunits (Pl. I 1 su) with an internal diameter 35–40 Å and external one of 60 Å (Burnasheva et al. 1968). The repeated periodicity along the central and peripheral microtubules is revealed in the electron micrographs of longitudinal sections (Pl. I 3). This periodicity is conditioned by a specific regulated packing of globular subunits which constitute the microtubules of cilia and flagella (Chasey 1972, Amos and Klug 1974, Samsonidze et al. 1976).

The present cytochemical studies have demonstrated Ca²⁺-ATPase activities in cilia and basal bodies of *Tetrahymena pyriformis*. The reaction product deposition in the presence of ATP and Ca²⁺ was identical with respect to density and localization both in cilia and basal bodies: On the longitudinal sections of cilia and of basal body (Pl. II 5 a, b) reaction product deposition was observed along the length of the central and peripheral microtubules of cilia and of the part of microtubules, running into the basal bodies and the core of one (Pl. II 5, arrows). As seen in Pl. II 6 a, b) which represent the electron micrographs of a cross sections of cilia which was incubated with 2 mM ATP and 10 mM Ca²⁺ at pH 7.0, reaction product deposition were observed in massive quantities on the doublet peripheral microtubules (Pl. II 6, arrows). The scattering distribution of the lead phosphate precipitate was observed on the central microtubules and within the axonemal core (Pl. II 6, a, b). A more fine deposition of the reaction product was revealed, when the cytochemical reaction was run in the incubated medium, which contained 0.5 mM ATP, 10 mM Ca²⁺ and 10 mM Mg²⁺ at pH 7.0. As seen on the electronmicrograph of longitudinal section of cilia, represented in Pl. III 7, the lead phosphate precipitates were deposited more finely along the central and outer doublet microtubules with periodicity of 60 Å. The periodicity of the deposition of reaction product along the microtubules corresponded to the specific regulated packing of globular spherical subunits which constitute the microtubules of cilia of *T. pyriformis* (Burnasheva et al. 1968). The similarity of the periodicity of reaction product depositions with the arrangement of subunits constituting the ciliary microtubules are revealed that the

sites Ca^{2+} -ATPase activity are associated with the globular subunits of ciliary microtubules.

On the cross sections of basal bodies, which were incubated with ATP (2 mM) and Ca^{2+} (2 mM) reaction product was found both on and in the basal body microtubules A, B, C, as seen in Pl. III 8 a, b).

No reaction product was observed in any part of the cilia or basal bodies, incubated in the presence of ATP and Mg^{2+} and substrate-less controls (Pl. III 9, 10).

In conclusion we can suggest that the Ca^{2+} -ATPase, which is localized on microtubules of cilia and basal body and revealed myosin like properties, actually participate in the mechanochemical activity that must be responsible for motility of *T. pyriformis* cilia.

РЕЗЮМЕ

Цитохимическими исследованиями на уровне электронной микроскопии показана локализация Ca^{2+} -АТФазы в ресничках и базальных телах *T. pyriformis*. Распределение продукта реакции наблюдалось вдоль длины центральных и периферических микротрубок ресничек и вдоль микротрубок, простирающихся в базальные тела. Соответствие периодичности расположения продукта АТФазной реакции с линейной упаковкой субъединиц, составляющих периферические и центральные фибриллы, свидетельствует об ассоциации центров Ca^{2+} -АТФазы с глобулярными белковыми субъединицами микротрубок ресничек *T. pyriformis*.

REFERENCES

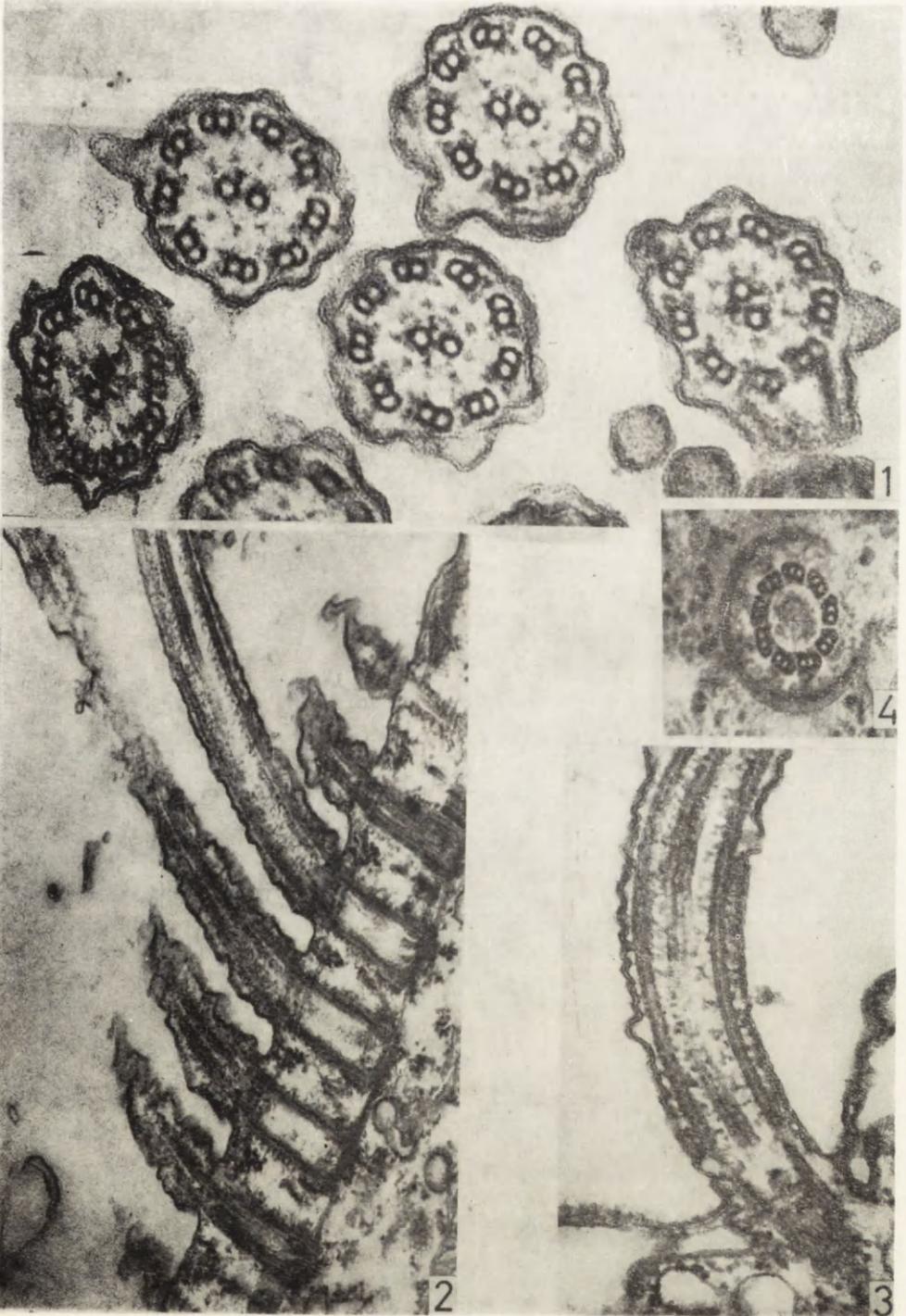
- Amos L. A. and Klug A. 1974: Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J. Cell Sci.*, 14, 523-549.
- Burnasheva S. A. 1958: K harakteristike sokratitelnogo belka semennyh kletok spermosina. *Biokhimiya*, 23, 558-563.
- Burnasheva S. A., Jefremenko M. V. and Ljubimova M. N. 1963: Issledovanie adenosintrifosfataznoj aktivnosti izolirovannyh resnichek infuzorij *Tetrahymena pyriformis* i vydelenie iz nih adenosintrifosfatazy. *Biokhimiya*, 28, 547-551.
- Burnasheva S. A., Jefremenko M. V., Chumakova L. P. and Zuyeva L. V. 1965: Vydelenie sokratitelnyh belkof iz resnichek *Tetrahymena pyriformis* i issledovanie ich svoistv. *Biokhimiya*, 30, 756-771.
- Burnasheva S. A. and Raskidnaja N. V. 1968: K harakteristike ATPase resnichek *Tetrahymena pyriformis*. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 179, 719-722.
- Burnasheva S. A., Yurzina G. A. and Beskrovnova N. F. 1968: Ultrastructura fibril resnichek *Tetrahymena pyriformis*. *Citologija*, 10, 249-252.
- Blum J. J. and Lubliner J. 1973: Biophysics of flagellar motility. *Ann. Rev. Biophys. Bioengineering*, 2, 181-221.
- Chasey D. 1972: Subunit arrangement in ciliary microtubules from *Tetrahymena pyriformis*. *Expl. Cell Res.*, 74, 140-146.
- Chua B., Elson C. and Shrago E. 1977: Purification and properties of a cytozol Ca^{2+} -activated ATPase from *Tetrahymena pyriformis*. *J. biol. chem.* 252, 7548-7554.
- Daya D. Y. Burnasheva S. A. and Ljubimova M. N. 1971: Issledovanie

- adenozintrifosfataznych svojstv belkof resniček *Tetrahymena pyriformis*. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 197, 962-965.
- Engelhardt V. A. and Burnasheva S. A. 1957: O lokalizatsii belka spermazina v semmenykh kletkah. Biokhimiya, 22, 554-560.
- Gibbons J. R. 1963: Studies on the protein components of cilia from *Tetrahymena pyriformis*. Proc. natn. Acad. Sci. USA, 50, 1002-1010.
- Gibbons J. R. 1965: Chemical dissection of cilia. Arch. biol., 76, 317-352.
- Gibbons J. R. 1967: The organization of cilia and flagella. In: Molecular Organization and Biological Function. (ed. J. M. Allen), New-York-London, Harper Row Publishers, pp. 211-237.
- Gibbons J. R. and Rowe A. J. 1965: Dynein, a protein with adenosinetriphosphatase activity from cilia. Science, 149, 424-426.
- Mohri H. 1964: Extraction of ATPase from sea-urchin and fish sperm tails. Biol. Bull., 127, 181.
- Nelson, L. 1955: Adenosinetriphosphatase of *Mytilus* spermatozoa. Biol. Bull., 109, 295-305.
- Nelson L. 1967: Sperm motility. Fertilization, v I, New York, Academic Press. Inc. 27-85.
- Ogawa K. I. and Mohri H. 1972: Studies on flagellar ATPase from sea-urchin spermatozoa. Biochim. biophys. Acta, 256, 142-155.
- Ostrovskaja M. V., Yurzina G. A., Alexeieva M. L., Burnasheva S. A. and Ljubimova M. N. 1973: Issledovanie Ca²⁺-ATPase zgutikov *Strigomonas oncopelti*. Biokhimiya, 38, 999-1005.
- Reynolds E. S. 1963: The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 17, 208-213.
- Samsonidze T. Z., Zuprun V. L. and Solovjeva G. A. 1976: O strukture mikrotruboček v resničkach *Tetrahymena pyriformis*. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 229, 1475-1487.
- Satir P. 1968: Studies on cilia. III. Further studies on the cilium tip and "Sliding filament" model of ciliary motility. J. Cell Biol., 39, 77-94.
- Summers K. E. and Gibbons J. R. 1971: Adenosinetriphosphate induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. Proc. natn. Acad. Sci. USA, 68, 3092-3096.
- Wachstein M. and Meisel E. 1957: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiology pH. Am. J. Clin. Path., 27, 13-23.
- Warner F. D. and Mitchell D. R. 1978: Structural confirmation of ciliary dynein arms and the generation of sliding forces in *Tetrahymena* cilia. J. Cell. Biol., 76, 261-277.
- Watanabe T. and Flavin M. 1973: Two types of adenosine triphosphatase from flagella of *Chlamydomonas reinhardi*. Biochem. biophys. Res. Commun., 52, 195.

Received on 20 March 1979

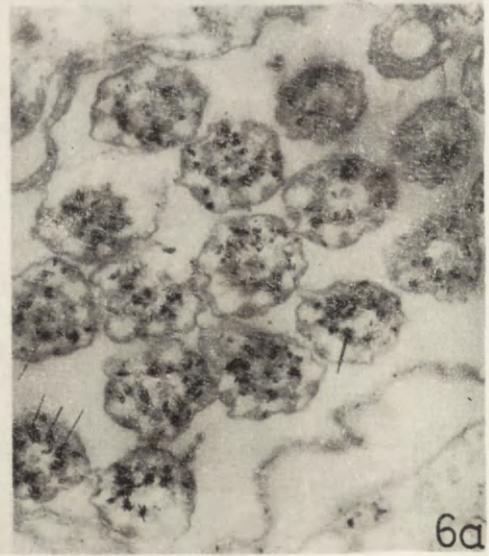
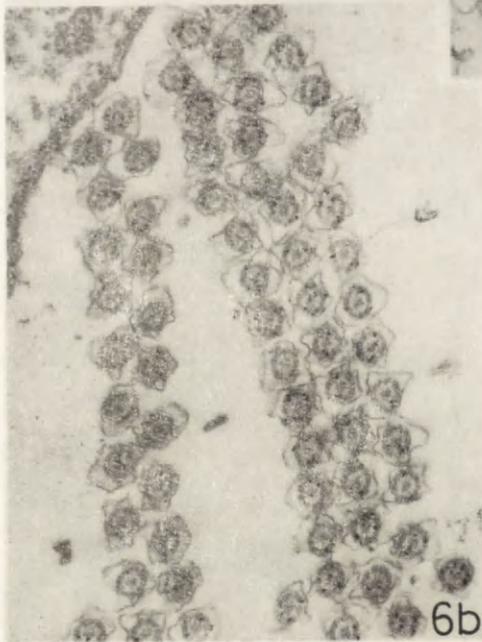
EXPLANATION OF PLATES I-III

- 1: Electron microgram of cross sections of *T. pyriformis* cilia: two central (cmi) and 9 peripheral doublet (pmi) microtubules A- and B- are seen. The arms are seen on the A-microtubules (arm). Peripheral and central microtubules consist of a spherical subunits (su) with the internal diameter of 35-40 Å and external one of 60 Å. The spoke heads (sh) and radial (rs) spokes are seen between the central and peripheral microtubules. 250 000 ×
- 2, 3: Electron micrograms of longitudinal sections throughout cilia and basal bodies of *T. pyriformis*. Central and peripheral microtubules running along the cilium length and basal body are seen. The axonemal A- and B-microtubules are continuous with the A- and B-tubules in the basal body (2). The central pair of microtubules terminate in a basal granule (3, bg) situated above the basal plate in the distal end (3, bp) of the basal body. 2 — 69 000 ×, 3 — 125 000 ×
- 4: Electron microgram of cross section of basal body. The deposition of the peripheral A-, B-, C-tubules are seen. 125 000 ×
- 5: Longitudinal section throughout cilia (a) and their basal bodies (b), which were incubated with ATP (2mM) and Ca^{2+} (2mM). Reaction product depositions are found along the length of the central and peripheral microtubules of cilia and of the part of microtubules, running into the basal bodies (arrows). 72 000 ×
- 6 a, b: Cross sections of *T. pyriformis* cilia which was incubated with ATP (2 mM) and Ca^{2+} (10 mM). Massive quantities of reaction product were found on the doublet microtubules (arrows), a — 60 000 ×, b — 30 000 ×
- 7: Longitudinal section of cilia, incubated with ATP (0.5 mM), Ca^{2+} (10 mM) and Mg^{2+} (10 mM) at pH 7.0. A finally deposition of the reaction product was found along the doublet and central microtubules, 120 000 ×
- 8: Cross sections of basal bodies incubated with ATP (2 mM) and Ca^{2+} (2 mM). Reaction product is found both in and on the basal body microtubules A, B, C (a, b). The scattering distribution of the lead phosphate precipitate is found within the core of basal bodies (b), a — 120 000 ×, b — 60 000 ×
- 9: Longitudinal section of cilia, incubated with ATP (2 mM) and Mg^{2+} (2-10 mM). No reaction product was observed, 90 000 ×
- 10: Electron microgram of cross section of basal body, incubated with ATP (2 mM) and Mg^{2+} (2-10 mM). No reaction products are observed, 120 000 ×



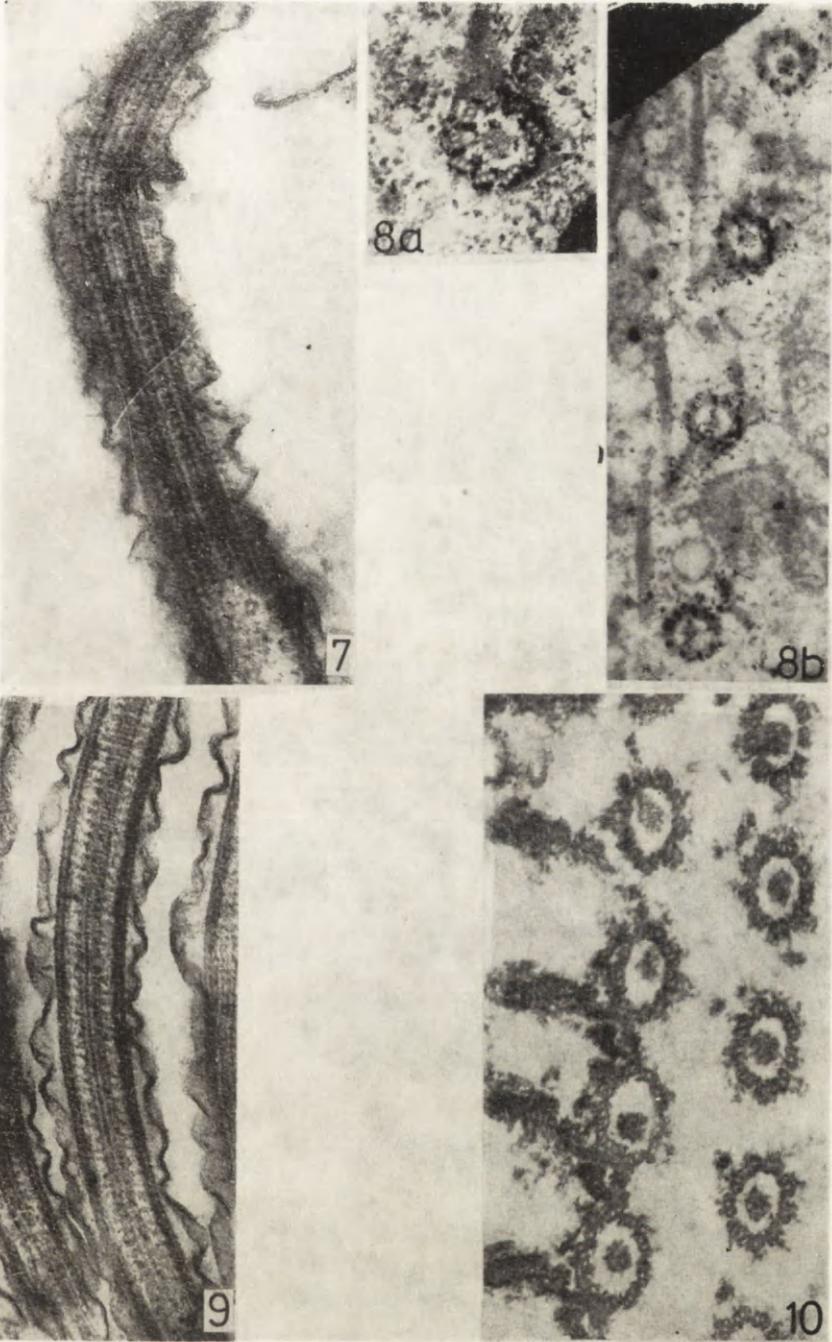
S. A. Burnasheva et G. A. Solovjeva

auctores phot.



S. A. Burnasheva et G. A. Solovjeva

auctores phot.



S. A. Burnasheva et G. A. Solovjeva

auctores phot.

Институт цитологии Академии Наук СССР, Ленинград Ф-121, пр. Маклина 32, СССР

Institute of Cytology, Academy of Sciences of USSR,
Leningrad F-121, Prospekt Maklina 32, USSR

Л. К. ЛОЗИНА-ЛОЗИНСКИЙ

L. K. LOZINA-LOZINSKY

Адаптивное поведение *Paramecium caudatum* при фотодинамическом действии красителей

Adaptive Behaviour of *Paramecium caudatum* to Action of Photodynamic Dyes

Синопис. Принято считать, что фотодинамический эффект (ФДЭ) заключается в возникновении необратимых повреждений клетки, связанных с фотоокислением и изменениями, происходящими в ДНК, белках, аминокислотах, и поэтому он не представляет большого интереса для изучения поведения одноклеточных организмов. С помощью предложенного метода исследования на инфузориях *Paramecium caudatum* было установлено, что при умеренном фотодинамическом действии эти организмы способны адаптироваться к нему своим поведением. Парамеции подвергались освещению разными длинами волн (путем использования светофильтров) при освещенности видимым светом в пределах от 4200–11 570 люкс, в присутствии фотодинамических красителей эозина и-метиленового голубого. Поведение изучалось в условиях освещения камеры наполовину закрывающейся светофильтром (СФ). Инфузории имели возможность „выбирать” сторону камеры. При определенных интенсивностях освещения и концентрациях красителей инфузории выбирали половину камеры, закрытую СФ, и находились в ней значительно дальше, чем в зоне без СФ, вследствие чего они избегали повреждающего действия ФДЭ. Выбор менее освещенной стороны камеры в данных опытах не зависит от температуры и химических изменений в среде.

Поведение одноклеточных организмов привлекает внимание биологов в связи с общебиологической проблемой эволюции психической жизни животных и физиологической основы поведения. Большое число работ посвящено таким явлениям у простейших как условные рефлексы, научение, привыкание, выбор пищи и др. (см. обзоры: Alwerdes 1939, Дембовский 1959,

Серавин 1969, 1978, сб.: Движение и поведение одноклеточных животных, 1978).

Свет является одним из важных факторов, влияющих на поведение одноклеточных организмов и его действие рассматривается под разным углом зрения. В одних исследованиях (см. обзоры Серавина) свет использовался в качестве условного (индифферентного) раздражителя, на который инфузории реагировали при сочетании его с каким-либо безусловным раздражителем, с целью выяснить возможность образования у простейших условных рефлексов.

В других работах было показано, что для многих простейших свет не является индифферентным раздражителем, так как они реагируют на него изменением направления и скорости движения (фототаксис, фотокинез) или метаболизмом тела (Mast 1911, Mast and Hawk 1936, Mast and Stahler 1937, Bunning und Schneiderhohn 1956, Wolker and Shin 1958, Лозина-Лозинский и Заар 1963 и др.).

В третьей группе работ изучалось состояние и поведение простейших при их сенсбилизации к свету под влиянием веществ, например некоторых красителей, вызывающих так называемый фотодинамический эффект (ФДЭ). Так инфузории, не обладающие пигментами (*Paramecium* и другие) практически индифферентны к изменениям светового режима и к различным участкам спектра видимого света, становятся чувствительными к ним и погибают в присутствии незначительных количеств фотодинамических веществ. Считается, что ФДЭ вызывает необратимые повреждения и все реакции, связанные с ним имеют патологический характер (Ефимов 1922, Metzner 1921 1924, Blum 1941, Дембовский 1959). Из этого был сделан вывод, что для изучения поведения ФДЭ не представляет интереса, с чем, однако нельзя согласиться.

Механизмы фотокинетических реакций и клеточной чувствительности к свету у простейших остаются невыясненными. Иногда эти механизмы связывают с имеющимися в теле пигментами, так как последние поглощают свет и, возможно, являются фотосенсибилизаторами. С другой стороны оказалось, что чувствительным к свету органоидом, например у жгутиконосца *Paranema*, является жгутик (Shettles 1937). Общебиологический интерес представляют такие вопросы как способы восприятия и трансформации лучистой энергии у одноклеточных организмов, адаптация к повреждающему действию оптической радиации, выяснение механизмов, изменяющих поведение простейших при воздействии света.

Сенсбилизацию к свету с помощью слабо повреждающих концентраций фотодинамических веществ мы сочли возможным использовать для изучения поведения простейших, так как одноклеточные организмы способны адаптироваться к различным экстремальным факторам (Лозина-Лозин-

ский 1958, 1968, 1971). Поэтому целью данного исследования было выяснение влияния ФДЭ на поведение и адаптацию *Paramecium caudatum*.

Методика

Изучение поведения инфузорий *Paramecium caudatum* в условиях ФДЭ проводилось несколькими методами. Для опытов использовались два типа стеклянных камер: прямоугольная размером 20 × 35 мм и глубиной 1 мм и круглая камера 12 мм диаметром, покрывавшиеся соответствующих размеров покровными стеклами. В камеру помещалась стерильная минеральная среда Лозина-Лозинского (1931), в которой был растворен фотодинамический краситель — эозин или метиленовый голубой. Часть опытов была поставлена с инфузориями, выдержанными в красителе, но при его отсутствии в среде во время опыта. При этом инфузории содержались в среде с красителем в темноте или при слабом неповреждающем свете. Использовались разные концентрации красителя. Опыт начинался с того, что половина камеры, содержащая инфузории, закрывалась светофильтром (СФ) и затем включался свет пунктирной лампы накаливания (40 вт) для микроскопирования с параллельным пучком света. Лампа фиксировалась на определенном расстоянии от камеры, а ее свет направлялся плоским зеркалом лупы, на столике которой находилась камера. Создавая совершенно равномерное освещение, получали четкую границу между освещенной половиной без светофильтра и со светофильтром. Освещенность измерялась люксметром: при употреблении матового стекла она равнялась 4200 люксам, без него 11 570 люксам. Одни опыты в прямоугольной камере проводились сразу с большим числом инфузорий — от 50 до 60, а в опытах с использованием разных СФ — от 300 до 600. Из них красный СФ пропускал длины волн 770–580 нм, оранжевый — 770–550 нм, зеленый — 570–500 нм, синий — 510–420 нм, фиолетовый — 460–400 нм.

Через каждые 2–3 мин сосчитывалось число парамеций в той части камеры, которая не была покрыта СФ, поскольку инфузорий в более освещенной половине оказывалось значительно меньше, и они были хорошо видны. Большинство опытов с массовым материалом (популяция) проведено с эозином и красным светофильтром (КСФ),

Другие опыты ставились с одиночными парамециями. Для наблюдения над их поведением использовалась малая круглая камера, которая с помощью рисовально-проекционного аппарата проецировалась на бумажный экран. Отмечались характер движения и физиологическое состояние инфузорий при плавании под СФ и при белом свете, определялась секундомером продолжительность нахождения парамеции в каждой половине камеры. Длина пути, проделанного инфузорией, во многих опытах зарисовывалась и измерялась курвиметром и в итоге определялась скорость плавания (принимая во внимание увеличение изображения на экране).

Изучалась возможность привыкания парамеций к определенной половине камеры. Для этого ставились опыты, в которых после некоторого времени пребывания в камере инфузорий, место СФ менялось, т.е. освещенная сторона белым светом закрывалась СФ, ранее закрытая — освещалась. Через каждые 2–3 мин подсчитывалось число инфузорий при переменах освещения, которые проводились через каждые 10 мин, или другие промежутки времени.

Определялась продолжительность жизни парамеций при разной интенсивности освещения в присутствии красителя.

До опыта инфузории содержались в специальном фототермостате при 22° и постоянном

слабом освещении лампочкой карманного фонаря. В опыт брались инфузории, содержащиеся в среде Лозина-Лозинского с пекарскими дрожжами без красителя или сенсбилизированные (в течение от 1 до 3 суток) в результате прибавления слабых растворов красителя к среде, не вызывавших признаков повреждения.

В контрольных опытах инфузории, не бывшие в среде с красителем, помещались в камеру без красителя, как наполовину закрытую СФ, так и в отсутствие СФ, после чего наблюдалось распределение парameций.

Основные типы реакций парameций на фотодинамическое действие

При помещении инфузорий в среду с фотодинамическими красителями и с последующим освещением, наблюдаются различные реакции, в зависимости от интенсивности, длины волны светового потока и от концентрации красителя. Как показали эксперименты, поведение инфузорий в среде с красителем обусловлено и другими причинами.

Можно выделить 4 основных типа реакций на ФДЭ.

(1) При концентрации эозина выше 0.1% парameции, попав в зону без светофильтра, быстро повреждаются и их движения становятся дезорганизованными и замедляются: в результате они не выходят из освещенной зоны и погибают.

(2) При концентрации эозина 0.1% в среде и освещенности около 8000 люкс в камере наполовину закрытой СФ парameции в течение нескольких минут плавают без признаков повреждений, но затем характер движений меняется. Увеличивается число поворотов вокруг продольной оси тела и в стороны, движение замедляется. В дальнейшем возникает общая депрессия и округление тела. При такой патологической картине инфузории распределялись по всей камере равномерно.

(3) С понижением концентрации эозина до 0.05 и 0.025% или метиленового голубого до 0.0025–0.000025% парameции, распределенные в камере до включения осветителя равномерно, после освещения приходят в состояние возбуждения, которое проявляется в ускорении движения. Через несколько минут скорость движения становится обычной, но в присутствии метиленового голубого она выше, чем в среде с эозином. Через 3–5 мин. после начала опыта под СФ инфузорий становится больше, чем на освещенной половине: концентрация достигает максимума через 10–15 мин. Никаких резких поворотов на границе „свет” и СФ не происходит, но после проникновения парameций в более освещенную зону без СФ они совершают большее число поворотов и петель и скоро возвращаются в зону под СФ.

(4) При концентрациях красителя еще более слабых парameции не реагируют на освещенную без СФ сторону камеры и распределяются по всей камере равномерно. Однако в присутствии даже следов метиленового голубого фотодинамический эффект проявляется в том, что прекращаются обра-

зование пищеварительных вакуолей и прижизненное окрашивание не происходит.

Исходя из цели нашего исследования интерес представляет прежде всего реакция типа 3, заключающаяся в том, что парамеции выбирают менее освещенную сторону и концентрируются под СФ. Примеры приведены на Рис. 1, 2, Табл. 1, 2.

В опытах с эозином и различными СФ получены однозначные результаты (см. также Рис. 3), хотя длина лучей, пропускаемая светофильтрами, имеет известное значение. При 0.05% концентрации эозина, являющейся высокой, под оранжевым СФ инфузории погибают в результате интенсивности осве-

Таблица 1

Реакция *Paramecium caudatum* на разные участки видимого света в присутствии эозина

Table 1

Response of *Paramecium caudatum* to various regions of visible light in presence of eosine

Концентрация эозина в % Concentration of eosine (%)	Светофильтр Light-filter	Общее число парамеций The whole number of paramecia	Среднее число парамеций в опыте Average number of paramecia in experiment	Средний % парамеций за 30 мин Percentage of paramecia after 30 min incubation	
				Под светофильтром Under light-filter	В зоне без светофильтра Without light-filter
0.05	красный red	2298	328.3	86.3	13.7
	оранжевый orange	600	около 300 about	погибают died	
	зеленый green	500	около 250 about	равномерно dispersed	
	синий blue	1200	около 400 about	равномерно dispersed	
	фиолетовый violet	700	350.0	69.4	31.6
	красный red	1384	346.0	96.5	3.5
0.025	оранжевый orange	600	300.0	97.0	3.0
	зеленый green	600	300.0	86.7	13.3
	синий blue	848	424.0	92.8	7.2
	фиолетовый violet				

Таблица 2. Реакция одиночных парameций на свет под влиянием метиленового голубого
 Table 2. The response of individual paramecia to rhotodynamic action of methylen blue

№ опыта №. of exper.	Освещенность в люксах Illumination (lux)	Концентрация красителя в % Dye concentration (%)	Условия действия красителя Conditions of dye action*	Общая продолжительность плавания (в сек.)** Swimming duration (sec)**				Скорость движения (см/мин) The rate of movement (cm/min)
				Под КСФ Under light-filter		Без СФ Without light-filter		
				Всего total	(%)	Всего total	(%)	
104	4200	0.00025	0	I.430	62.2	261	37.8	3.7-6.2
105	11570		0	II.416	66.1	213	33.9	
107	4200	0.00025	+	II.471	75.3	155	24.7	11.4
108	4200		+	I.305	71.4	122	28.6	
109	4200	0.00025	0	II.387	76.6	118	23.4	7.0
110	4200		0	I.410	63.6	235	36.4	
				II.197	30.0	463	70.0	4.5
				I.430	65.0	231	35.0	4.8-8.3
				II.522	60.8	336	30.2	
				I.325	67.2	159	32.8	7.5-9.0
				II.972	91.8	86	8.2	
114	11570	—	—	Контроль (без сенсбилизации) Control (without sensibilization)				
				I.283	42.7	379	57.3	
				II.371	61.5	232	38.5	
115	4200	—	—	654	50.9	611	49.1	6.2-7.5
				I.290	50.0	291	50.0	
				II.284	56.4	237	43.6	
116	4200	—	—	574	52.1	528	47.9	4.9-6.0
				I.346	48.5	368	51.5	
				II.340	53.5	296	46.5	
				686	49.3	664	50.7	

* 0 — обозначает, что инфузорики находились в среде с метиленовым голубым до опыта в камере; во время опыта красителя нет, + — обозначает присутствие красителя во время опыта.

** Эксперименты разделены на две равные части I и II. Для ю-группы приводятся также суммарные данные.

* 0 — indicates the absence of the dye in the camera, however, ciliates were exposed in the medium with methylen blue before experiments, + — indicates the presence of the dye during the experiment.

** Experiment performed twice I and II. For control summarized data are also adduced.

щения, а под зеленым и синим СФ наступает реакция 1 (см. стр. 612), соответствующая началу повреждения. Фиолетовый СФ, несмотря на то, что пропускает коротковолновые лучи, вызывающие ФДЭ, защищает инфузорий от повреждения. Это можно объяснить только тем, что при этом плотном СФ очень мало света достигает до парameций.

В среде с 0.025% эозином реакция избегания одинакова, независимо от СФ, и не сопровождается депрессией. Численность парameций под СФ быстро повышается. В типичном опыте через 9–12 мин. после освещения время пребывания под КСФ в среднем увеличивается почти в 3 раза.

В опытах с массовым количеством инфузорий, находившихся в среде с метиленовым голубым (концентрация 0.00025%) получены аналогичные результаты. Однако чувствительность к метиленовому голубому при белом свете оказалась значительно выше. При концентрации метиленового голубого 0.01–0.005% и интенсивности света от 8000 до 11 570 люкс парameции погибают, не окрашиваясь, через несколько минут.

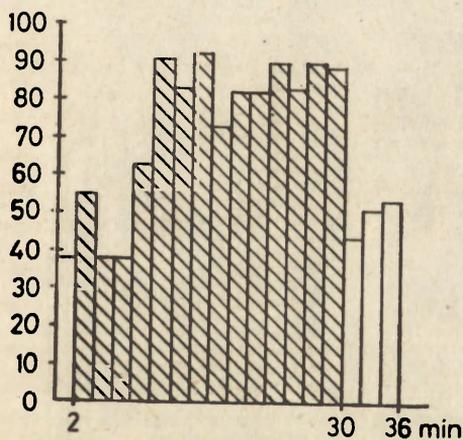


Рис. 1. Распределение *Paramecium caudatum* (11 инфузорий) в камере наполовину закрытой красным светофильтром в присутствии 0.025% раствора эозина. Освещенность 4800 люкс. Столбики обозначают количество парameций через каждые 2 мин в левой половине камеры: заштрихованные — процент парameций после закрытия левой половины камеры красным светофильтром, незаштрихованные — ло помещения и после снятия светофильтра (опыт № 35)

Fig. 1. Distribution of *Paramecium caudatum* (11 ciliates) in the camera half-shut by red-filter in the presence of solution of 0.025 eosine. The illumination 4800 lux.

Ordinate: Percentage of paramecia in left half camera after shutting by red-filter (chaded columns) and without light-filter. Abscissa: The time intervals every 2 min. (Experiment No. 35)

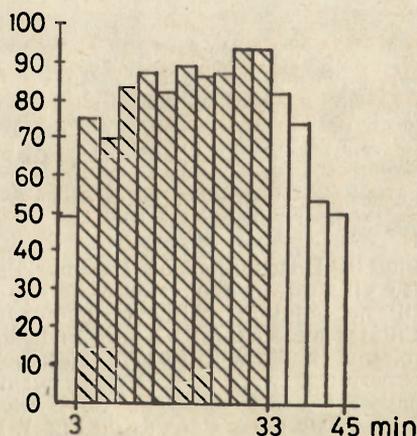


Рис. 2. Распределение *P. caudatum* (50 инфузорий) в камере наполовину закрытой светофильтром в присутствии 0.00025% раствора метиленового голубого. Освещенность 8540 люкс. Отсчеты через 3 мин. Обозначения как на Рис. 1. (Опыт № 78).

Fig. 2. Distribution of *Paramecium* (50 ciliates) in the camera half-shut by red-filter. Solution with 0.00025% methylen blue. Illumination 8540 lux. The other signs are the same as on Fig. 1. (Experiment No. 78)

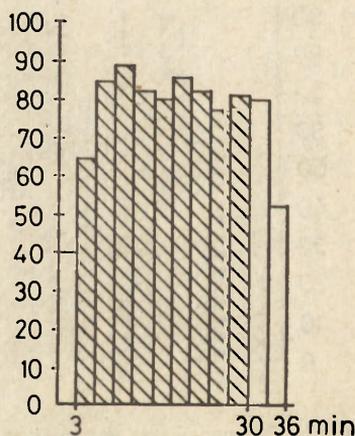
Основными выводами из этих опытов являются следующие. Парамеции в присутствии фотодинамических красителей в относительно слабых концентрациях уплывают в сторону, покрытую СФ, избегая более интенсивно освещенную сторону. Степень избегания „белого” света уменьшается вследствие увеличения ФДЭ и повреждения клеток. Защитная роль светофильтра зависит в большей степени от его оптической плотности, чем от спектра пропускания. Реакция избегания света наступает через 2–5 мин после начала освещения, а когда условия освещения или затемнения становятся одинаковыми в обеих половинах камеры, инфузории равномерно распределяются по всей камере.

Поведение одиночных инфузორий

У парамеций в присутствии метиленового голубого чувствительность к свету выше, чем в среде с эозином, поэтому отрицательная реакция наступает быстрее и ее можно наблюдать в маленькой круглой камере, отбрасывая ее изображение на экран.

Рис. 3. Распределение *P. caudatum* (55 инфузორий) в камере наполовину закрытой синим светофильтром. Освещенность 4800 люкс. Инфузории до опыта в течение 2 суток находились в среде Лозина-Лозинского с 0.025% эозином. Опыт поставлен с отмытыми инфузориями в чистой среде без эозина. Отсчеты через каждые 3 минуты. Обозначения как на Рис. 1. (Опыт № 59)

Fig. 3. Distribution of *Paramecium caudatum* (55 ciliates) in the camera half-shut by blue-filter. Solution without photodynamic dye. Ciliates were exposed 2 days in Lozina-Lozinsky mineral media with 0.025% of eosine, and before experiment were kept in pure medium. Illumination — 4800 lux. The time intervals every 3 min. The other signs as on Fig. 1. (Experiment No. 59)



Характер движений парамеций подробно описан (Parducz 1954). В наших опытах при отсутствии повреждения инфузории плывут передним концом тела вперед с вращением вокруг продольной оси. Как правило, парамеции не обнаруживают резко отрицательной реакции и реверсии на границе между белым и красным светом и свободно пересекают ее, но путь движения в более освещенной зоне короче (Рис. 4, 5). Чаще в этой зоне отрезки пути заканчиваются крутыми поворотами, с более острым углом, чем под СФ. Так, в опыте № 107, представленном на Рис. 4 в освещенной половине камеры парамеции за 240 секунд совершила 14 петель и резких поворотов, а под КСФ всего 9–10 за 642 сек. Может быть, в связи с этим инфузории чаще попадают на границу с КСФ и переходят ее. Некоторые парамеции после перехода в более освещенную

щенную зону недалеко от границы КСФ (но не на границе) начинают делать передним концом тела резкие повороты вправо и влево и чаще „выбирают” направление обратное первоначальному, в сторону КСФ. Направление движения часто зависит от угла, под которым парамеция входит в освещенную зону. Переход границы под тупым углом обычно продолжается плавным движением вдоль нее и возвращением под КСФ.

Продолжительность плавания под СФ и в противоположной половине камеры может изменяться в течение опыта, поэтому в большинстве опытов, представленных на Табл. 2, мы разбили на две части. По секундомеру отсчитывалось время нахождения в каждой половине камеры до и после пересечения границы, образуемой СФ. После 10 переходов из одной части камеры в другую и обратно (всего 20 отсчетов времени) определялось общее время пребывания под КСФ и в половине без него. Затем такие подсчеты делались

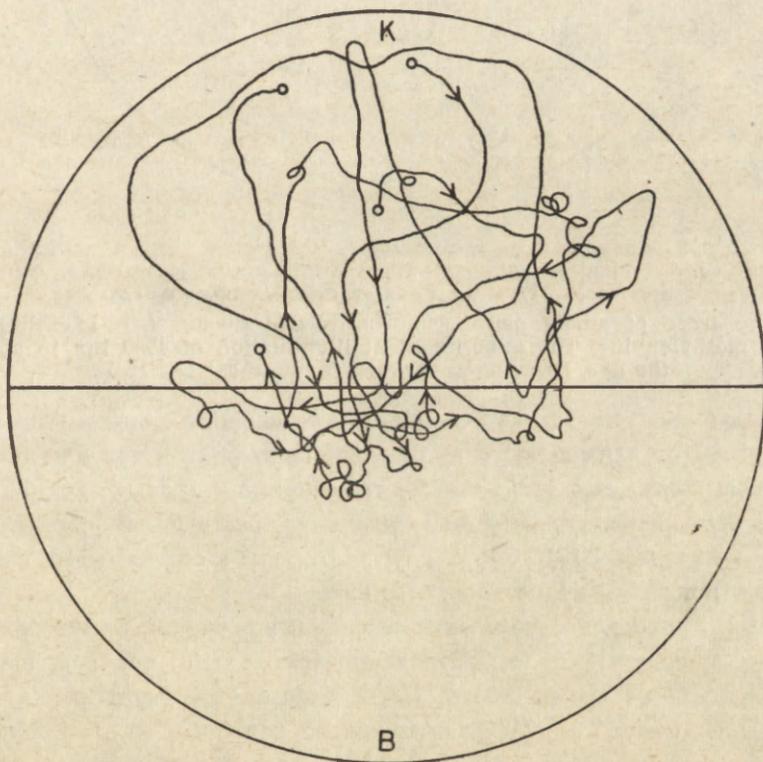


Рис. 4. Путь одной парамеции *P. caudatum* в камере в присутствии 0.00025% метиленового голубого при освещенности 4200 люкс. К — зона под красным светофильтром, В — зона без светофильтра. Зарисовано с помощью рисовально-проекционного аппарата (Опыт № 107)

Fig. 4. The trace of single paramecia in camera with 0.00025% methyleneblue. Illumination — 4200 lux. К — the zone shut by the red filter, В — the zone without light-filter. Drawing-apparatus. (Experiment No. 107)

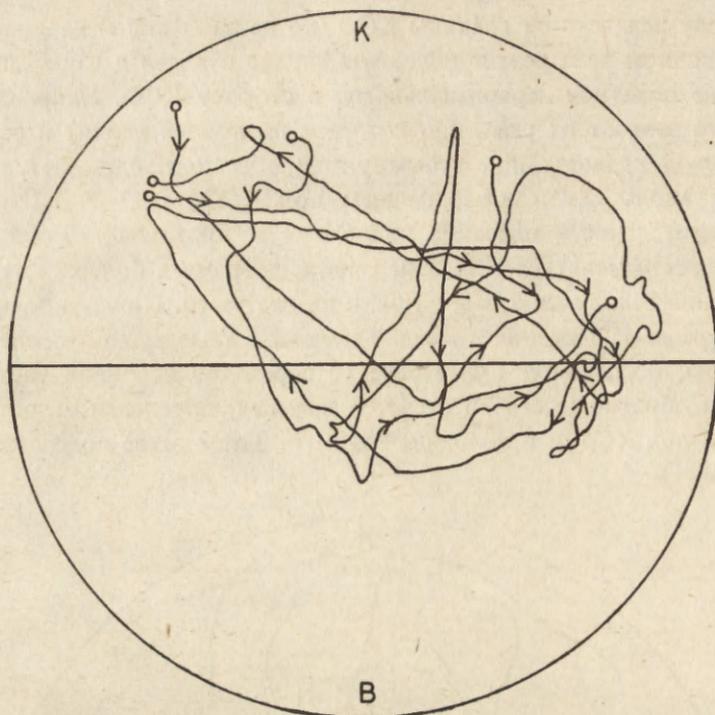


Рис. 5. Путь одной парамеции *P. caudatum* сенсibilизированной 4 часа в 0.000025% растворе метиленового голубого при освещенности 4200 люкс. В камере во время опыта краситель отсутствует. Остальное как на Рис. 4. (Опыт № 126)

Fig. 5. The trace of single paramecia, sensibilized during 4 h in solution with 0.000025% methylenblue. The experiment at illumination of 4200 lux in absence of the dye. Drawing-apparatus. (Experiment No. 126)

после следующих 10 переходов. Продолжительность опыта варьировала в зависимости от длительности пребывания инфузории в той или иной части камеры. Она колебалась от 15 до 25 мин например, в опыте № 107 парамеция очень часто пересекала границу СФ с более освещенной зоной и плавала в ней очень недолго — 1–10 сек. С другой стороны в опыте № 110, инфузория находилась под КСФ по несколько минут.

Из Табл. 2 видно, что поведение сенсibilизированной инфузории сходно при концентрациях красителя, различающихся на один порядок, при отсутствии красителя во время опыта. Но, если в камере растворен краситель, то при концентрации 0.0025% метиленового голубого, во второй половине опыта наступает депрессия (опыт № 108), в результате которой, как было отмечено ранее, инфузории оказываются в освещенной зоне.

В контрольных опытах в редких случаях наблюдается неравномерное распределение в камере наполовину закрытой СФ. Такой пример мы привели в Табл. 2 (опыт № 114). В разные отрезки времени парамеция находилась

дальше то в одной половине камеры, то в другой. Это отмечено при сильной освещенности, которая в некоторой степени, по-видимому влияет на выбор стороны.

Так или иначе, пребывание инфузорий под КСФ значительно продолжительнее, чем на освещенной стороне. Отношение времени пребывания под КСФ к освещенной зоне без СФ (БС) обозначено коэффициентом КСФ/БС: он колеблется в опытах с эозином от 1.57 до 1.82.

Факторы, влияющие на поведение инфузорий в связи с ФДЭ

Отрицательная реакция к видимому свету возникает и при отсутствии красителя в среде. Достаточно выдержать инфузорий в среде с красителем — метиленовым голубым или эозином, а затем отмыть их в чистой среде, чтобы получить столь же четкую концентрацию в половине камеры закрытой КСФ. На Табл. 2 в графе, где отсутствие красителя показано 0, коэффициент КСФ/БС колебался в среднем от 1.71 до 2.27.

Подобные опыты были проведены в разных вариантах. Так, парамеции, содержащиеся в растворе с 0.25% эозина 1,2 и 3 суток, после отмывания помещались в камеру со средой, закрытой на половину СФ, уже без красителя. Светофильтры использовались разные. При более слабой концентрации эозина результаты опытов с фильтрами и черной фотобумагой различались незначительно: инфузории всегда дольше находились в той части камеры, где интенсивность света была слабее. Таким образом, опыты показали, что отрицательная реакция сенсibilизированных инфузорий к свету обусловлена присутствием молекул красителя внутри клетки: в среде краситель практически может отсутствовать.

В литературе высказывались предположения, что изменение отношения простейших к свету (как индифферентному раздражителю) может возникать в результате химических и температурных изменений в среде.

Действительно, было показано, что инфузории становятся чувствительны к свету под влиянием сильного нагрева (Grabowski 1939, Best 1954). Что касается наших опытов, то в них сенсibilизации под влиянием температуры не обнаружено и не могло быть. Если при разной освещенности частей камеры могла возникать разница в температуре, то она была ничтожна, так как сам нагрев был очень мал вследствие того, что применялся рассеянный свет через матовое стекло и толщина слоя воды в камере была всего в 1 мм. Практически температура в камере не отличалась от температуры воздуха. Подтверждением того, что избегание „белого” света и концентрация парамеций под светофильтром не зависела от теплового фактора, являлись результаты контрольных опытов. Они показали, что при отсутствии фотосенсibilизаторов, в освещенной камере, наполовину закрытой светофильтром инфузории распределяются совершенно равномерно.

Наконец, если бы реакция инфузорий была бы связана с разницей температуры в камере со светофильтром, то она бы проявлялась сильнее в тех опытах, где освещенность ярче, а на самом деле выбор стороны под КСФ был отчетливее тогда, когда свет лампы проходил через матовое стекло, рассеивающее свет и уменьшающее разность температур.

Концентрацию под СФ нельзя объяснить также хемотаксисом, так как в опытах, где краситель в среде отсутствовал, химических изменений в среде не происходит. Их не создавали и сами инфузории: результаты были одинаковыми в опытах с массовым материалом и с одиночными парамециями.

Некоторую роль может играть при выборе освещенности „привыкание” к определенной стороне камеры, в наших опытах — к закрытой светофильтром. Если СФ, после того, как под ним сконцентрировались сенсibilизированные к свету парамеции, переместить на другую половину камеры, то инфузории не сразу переходят на половину, закрытую СФ. Так, в трех опытах в первые 10 мин (принятые за 100) 74.5, 84.1 и 73.5% времени инфузории находились под КСФ. После перемещения СФ в течение 10 мин под ним находилось столько же инфузорий, сколько на освещенной стороне: 52.7, 53.9 и 44.4% времени. И только после четырехкратного перемещения СФ через каждые 10 мин наступала четкая ориентация на сторону покрытую СФ — в среднем 76.2%. Из этого можно сделать вывод, что над дезориентирующим влиянием, вызываемым перемещением СФ, начинает преобладать фактор освещенности, действующий на инфузорий, сенсibilизированных как эозином, так метиленовым голубым. Для этого выбора требуется не менее 10 мин. При более частом перемещении СФ происходит более или менее равномерное распределение парамеций по камере. С другой стороны, если в камеру поместить сильно фотосенсibilизированных парамеций (например, после суток пребывания в среде с эозином) в среду без красителя на 1 час, они концентрируются под СФ и после снятия СФ почти целый час плавают на стороне камеры, которая была закрыта СФ, и уже позднее распространяются по всей камере. Таким образом, известное привыкание к „фактору пространства” все же наблюдается.

Адаптивное значение поведения парамеций при фотодинамическом эффекте

Адаптивное значение имеет только такое поведение инфузорий при токсическом фотодинамическом действии, когда у них возникает отрицательная реакция на свет, благодаря чему они избегают повреждений и гибели. Такое поведение наблюдается в одной из ситуаций (реакция 3, см. стр. 612), вызванных ФДЭ. В этой ситуации парамеции реже пересекают границу „свет-СФ”, продельвают более короткий путь в световой зоне, не повреждаются или слабо повреждаются и тем самым продлевают жизнь.

Если бы инфузории равномерно распределялись в камере, наполовину закрытой СФ, смертность наступала бы примерно, в два раза медленнее, чем в камере без СФ. Однако благодаря способности различать освещенность, продолжительность жизни резко увеличивается. На Рис. 6 представлены кривые смертности от ФДЭ при концентрациях эозина от 0.1% до 0.01% в отсутствии СФ и когда камера наполовину закрыта красным СФ. Чем ниже концентрация эозина, тем больше разница в продолжительности жизни в камере наполовину закрытой СФ и без СФ. Так, например, при концентрации эозина 0.05% 90% гибель без СФ наступает в среднем через 100 мин, а в камере наполовину закрытой красным СФ — примерно через 8 часов. Эти отношения остаются довольно близкими при изменении процента смертности от 10 до 100 (через интервалы в 20%).

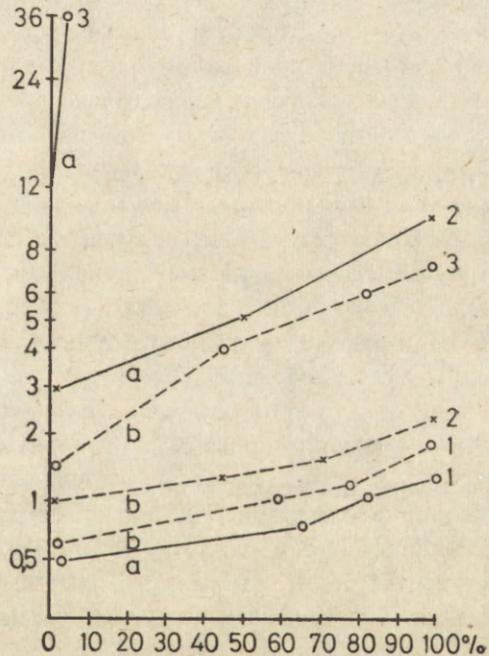


Рис. 6. Выживаемость *P. caudatum* в условиях фотодинамического действия красителя эозина в камере наполовину закрытой красным светофильтром (а) и в камере без светофильтра (б) при освещенности 4800 люкс. По оси абсцисс — смертность в процентах, по оси ординат — продолжительность жизни в часах. 1 — 0,1% эозина, 2 — 0,05%, 3 — 0,01%

Fig. 6. Survival time of *Paramecium caudatum* at condition of photodynamic effect of eosine in the camera half-shut by red-filter (a) and without light-filter (b). The illumination — 4800 lux.

Ordinate: Duration of life in hours.
Abscissa: Percentage of survival.
1 — 0.1% of eosine, 2 — 0.05% of eosine, 3 — 0.01% of eosine

Если концентрация эозина 0,025% и ниже, то в опытах с СФ продолжительность жизни возрастает в десятки и сотни раз, не пропорционально продолжительности плавания парамедий под КСФ и БС. Это объясняется тем, что кумуляции фотодинамического действия не происходит, или незначительное повреждение, полученное во время пребывания „на свету” репарируется, когда инфузории попадают под КСФ.

При повышении концентрации эозина до 0.1% адаптации нет и наблюдается обратная картина: продолжительность жизни уменьшается — пара-

меди, попадая в зону без СФ, сильно повреждаются и задерживаются в ней, в результате коэффициент продолжительности жизни уже не 3.6 в среднем, а 1.4 (1.3–1.6).

Обсуждение

Исследователи, изучавшие ФДЭ на простейших, применяли высокие концентрации фотодинамических красителей и большие интенсивности света, вызывая у них состояние депрессии и гибель. На основе закона Тальбота и физических вычислений в литературе имеются указания, что ФДЭ вызывает необратимые изменения в клетке.

В связи с ФДЭ Дембовский писал (1959), что явление так называемого фототаксиса в присутствии фотосенсибилизаторов мало исследовано, довольно кратковременно, требует насыщения среды кислородом и крайне сильного света, вообще происходит в аномальных, сублетальных условиях. Такая точка зрения, которая верна только при наиболее сильных проявлениях ФДЭ, не способствовала тому, чтобы изучение ФДЭ на простейших развивалось. С другой стороны, свет использовался как условный раздражитель, ошибочно принимаемый за индифферентный.

Нечеткие результаты, полученные с попытками выработать у инфузорий условные рефлексy на свет, принимая его за условный раздражитель, привели Дембовского, возглавлявшего школу зоопсихологов в Польше, к мнению: „нужно признать, что все использованные до сих пор методы непригодны для исследования реакции *Paramecium* на свет” (там же, стр. 199). Действительно, то, что инфузории одинаково относятся к свету и темноте, не будучи сенсублизированы, не говорит еще о том, что они не чувствительны к свету. Свет и темнота являются экологическими факторами, к которым инфузории адаптированы, и в обычных условиях являются равнозначными. Сенсублизация к свету, по-видимому, широко распространена в природе, и в соответствии с мнением Grabowski (1939) и Machemer (1966) может вызвать изменение поведения вне связи с условным рефлексом. Это необходимо учитывать при изучении действия света на инфузорий. Поставленные нами специальные опыты показали, что в этих условиях ФДЭ не вызывает изменений в среде и такой фактор, как температура, не оказывал влияния на выбор парамециями той или иной стороны камеры при их разной освещенности.

Некоторые амебы (*Amoeba proteus*) и жгутиконосцы (*Peranema trichoforum*) способны адаптироваться к свету и темноте путем изменения скорости движения (Mast and Hawk 1936, Mast and Stahler 1937, Shettles 1937). По нашим данным инфузории (*Paramecium caudatum*) адаптируются к фотодинамическому эффекту тем, что пытаются избегать его повреждающего

действия, а к коротковолновой ультрафиолетовой радиации путем повышения своей устойчивости (Лозина-Лозинский 1958, 1968). Опыты Ефимова (1922) и Metzner (1921, 1924) с фотодинамическим действием светом не могли ответить на вопрос являются ли фотокинетические реакции парameций адаптивными и целесообразными, так как они применяли очень высокие интенсивности света и концентрации эозина (и других красителей), убивающие инфузорий. Metzner вызывал, например, положительный и отрицательный фототаксис у *Paramecium caudatum*, используя красители при свете дуговой лампы, пропускаемом через линзы, т.е. создавал условия, вызывающие быстрое повреждение клетки, при которых не могло быть и речи о поведении, о выборе инфузориями такой освещенности, которая могла быть им полезна.

В наших опытах с ФДЭ показано, что в присутствии в организме небольших количеств фотодинамических красителей возникает отрицательная реакция к „белому” свету, имеющая адаптивный характер. Об этом говорит то, что инфузории более длительно плавают и концентрируются в той половине камеры, которая закрыта светофильмом или менее освещена, вследствие чего они не подвергаются повреждающему действию наиболее активных лучей видимого спектра, не погибают и сохраняют длительное время нормальное состояние.

Каковы же механизмы адаптивного поведения при ФДЭ? Выбор парameциями менее освещенной стороны возникает благодаря сенсibilизации клетки к свету, содержащей частицы фотодинамического красителя, но при условии, что степень сенсibilизации не переходит определенных границ, повреждающих клетку. В патологическом состоянии выбора уже нет.

Известно, что ФДЭ наступает под влиянием света, избирательно поглощаемого органическими молекулами, например, красителями, в присутствии кислорода. При этом происходит их фотоокисление, ведущее за собой химические изменения, полностью еще не изученные (Blum 1941, Clare 1956, Smith and Hanewalt 1969). Под влиянием фотодинамического действия происходят изменения структур белков, ДНК и мембран клетки, которые вызывают гибель клетки или мутационный эффект. Особенно чувствительны к фотоокислению остатки ароматических аминокислот.

Так как удаление кислорода из среды предохраняет клетки от повреждающего действия ФДЭ, а поглощение кислорода клеткой в аэробной среде усиливается во время освещения, ФДЭ связывают с фотоокислением (Giese 1957). В связи с этим, особый интерес представляет краситель метиленовый голубой, адсорбированный клеткой. В его присутствии на свету наступают химические изменения в аминокислотах: гистидине, тирозине, триптофане, метионине и цистине: происходят также сшивки ДНК-белок *in vitro* и *in vivo* (Smith and Hanewalt 1969).

По нашим наблюдениям при значительном ФДЭ в парameциях наблюда-

ется быстрое восстановление метиленового голубого в бесцветную лейкоформу, происходящее при участии дегидраз, катализирующих окисление. При этом нарушается не только регуляция движения ресничек, покрывающих поверхность тела парамеции, но и прекращается фагоцитоз, связанный с функцией ресничек перистома. Из этого следует заключить, что патологические реакции у парамеций при ФДЭ связаны с окислением веществ в клетке. Напрашивается дальнейший вывод, что в случае слабого сенсibiliзирующего действия света, происходящие при этом окислительные реакции, влияют на регуляторные механизмы инфузории, определяющие направление движения, работу ресничек, поведение в целом. О необычайной чувствительности парамеций к такому фотоокислению можно судить по тому, что фагоцитоз прекращается на свету при ничтожной концентрации метиленового голубого (10^{-6} – 10^{-7} по нашим неопубликованным данным).

Самое интересное то, что при слабом фотодинамическом действии возникают такие химические процессы и физиологические реакции, которые в совокупности вызывают аппетентное (целенаправленное) поведение. Хотя этот механизм остается невыясненным, он не нуждается в психологической интерпретации, как и другие механизмы адаптации. Этому не противоречат наблюдаемые у инфузорий явления запечатлевания, или импринтинга, которые объясняются молекулярными процессами, связанными с нуклеиновыми кислотами (чаще с РНК). В качестве гипотезы можно предположить, что предпочтительное пребывание (плавание) парамеций в менее освещенной не повреждающей половине камеры в некоторой степени зависит от импринтинга. Используя общую схему ФДЭ, предложенную Коневым и Волотовским (1974), фотодинамическое действие на организм инфузории (при определенных условиях) мы представляем следующим образом: свет→фотосенсибилизация (в присутствии красителя)→окислительные превращения, влияющая на двигательный аппарат,→координационные процессы в двигательном „центре”→избегание ФДЭ→импринтинг→выживаемость→восстановительные процессы („забывание”)→переход в освещенную зону ФДЭ.

Наиболее сложной, с нашей точки зрения, проблемой является выяснение механизма образования аппетентной реакции при фотосенсибилизации, когда парамеция отнюдь не случайно движется в сторону меньшей освещенности. То, что инфузории реагируют на свет в среде без красителя, но имея в клетке адсорбированные молекулы красителя, в цветной или лейкоформе, имеет принципиально важное значение. Благодаря этому отпадает аргумент, объясняющий выбор среды на основе хемотаксиса, так как среда в камере, при отсутствии в нем красителя, химически одинакова, но инфузории направляются тем не менее в сторону светофильтра, отличая менее освещенную сторону от более освещенной.

О способности инфузорий различать субстрат на расстоянии писал ранее Alverdes (1939). Наряду с этим указывают на привыкание к пространству,

форме сосуда (Bramstedt 1935, Дембовский 1959), но объяснить концентрацию парameций под светофильтром только этим нельзя. Действительно, как только удаляем светофильтр, инфузории сразу же начинают распределяться по всей камере, хотя процесс рассредотачивания протекает медленнее, чем сосредотачивания под светофильтром. Частая перемена места светофильтра способствовала дезориентации в большей степени, чем „научению”.

Явления „научения”, которые не раз описывали у инфузорий, связывали со своего рода памятью (или, по современной терминологии, импринтингом), ассоциациями и условными рефlekсами. Но как ни соблазнительно объяснить концентрацию сенсibilизированных парameций под светофильтром импринтингом, он играет в этом случае небольшую роль. Выбор инфузориями менее освещенной стороны в связи с ФДЭ нельзя назвать научением. По-видимому, от понятия „научения” при описании поведения простейших нужно отказаться. Явления научения в смысле Метальникова (1911, 1917) и других исследователей у простейших не доказаны (см. обзоры: Серавин 1969, 1978). Но важнее то, что применение психологических понятий и терминов, таких как научение, ассоциация, привыкание не раскрывают механизмов индивидуальных целесообразных реакций у простейших, против существования которых однако трудно возражать. Прежде чем обращаться к психологической интерпретации этих явлений, на современном этапе биологии необходимо пытаться исследовать явления поведения с помощью методов физиологии, биофизики и молекулярной биологии.

По той же причине нельзя базироваться на теории таксисов и тропизмов (в частности фототаксиса) для объяснения ФДЭ и других форм поведения. Как правильно указывал Дембовский (1959) понятие таксисов весьма упрощенно описывает поведение инфузорий и не вскрывает биологических механизмов, определяющих направление, характер и физиологические причины, лежащие в основе выбора направления движения и поведения в целом.

Существует много гипотез о молекулярных механизмах поведения животных, главным образом позвоночных (Gaito 1966). Некоторые гипотезы связаны с функцией нуклеиновых кислот, влияющих на формирование поведения. Однако возникает вопрос, можно ли быстрые изменения в поведении организмов объяснить метаболическими процессами с участием нуклеиновых кислот? По-видимому, нельзя, так как, согласно Hochacka and Somero (1973), эти процессы будут „оказывать более медленное влияние на обмен веществ, чем прямое воздействие среды на активность уже существующего регуляторного фермента”.

Имеющиеся данные позволяют предположить только то, что адаптивное поведение инфузорий при сенсibilизации к свету связано с определенной интенсивностью окислительных процессов в клетке, влияющих на координацию движений, и возникающей при этом способностью различать степень освещенности. На примере поведения сенсibilизированных инфузорий к свету

можно видеть, что нет необходимости прибегать к нечеткой интерпретации поведения с позиций психологии животных и соответствующей терминологии. Сложное поведение инфузорий следует рассматривать как физиологический адаптивный процесс (Lozina-Lozinsky 1931, Kipastowski 1963), в основе которого находятся молекулярные механизмы. В этом направлении изучения движения и поведения простейших достигнуты большие успехи. (см. обзоры: Бурнашева и Любимова-Энгельгардт 1978, Доронин 1978, Юдин 1978).

SUMMARY

Main types of the responses of *Paramecium caudatum* to visible light in the process of its sensibilization by various concentrations of photodynamic dyes eosine and methylene blue have been studied. Strong photodynamic effect induced immediate damage of ciliates which accumulated in more illuminated zone and then died rapidly. When the dye concentration was lower in a chamber half closed by a light-filter the paramecia were distributed more evenly but they died gradually soon after injury. At a still lower concentration of the dye there arises an adaptive reaction: the ciliates avoid the lighter zone and most of the time they swim within less illuminated zone under the light-filter. Owing to this the length of their life span increases several times or no lethal affect was observed within 24 h. Thus paramecia are able to avoid a deleterious photodynamic effect of the dye or reduce it to the minimum by appropriate motor response.

The adaptive reaction of *Paramecium* to light depends on the presence of a dye inside the cell since the sensibilized organisms react to illumination in the same way in the absence of the dye in the medium (Lozina-Lozinsky mineral solution). This means that the behaviour of the *P. caudatum* in above mentioned conditions is independent of chemical changes of the medium. In separate series of experiments the possible thermic effect caused by illumination of chamber could be also excluded.

It is suggested that the adaptative behaviour of light sensibilized ciliates is caused by molecular rearrangements related to photooxydation.

ЛИТЕРАТУРА

- Alverdes F. 1939: Zur Psychologie der niederen Tiere. Z. Tierpsychol., 2, 258-264.
 Best J. B. 1954: The photosensitization of *Paramecium aurelia* by temperature check. A study of a reported conditioned response in unicellular organisms. J. exp. Zool., 126, 87-100.
 Blum H. F. 1941: Photodynamic Action and Diseases Caused by Light. New-York. Reinhold.
 Bramstedt F. 1935: Dressurversuche mit *Paramecium caudatum* und *Stylo-nychia mytilus*. Z. Vergl. Physiol., 22, 490-516.
 Bunning E. und Schneiderhohn G. 1956: Über des Actionspectrum der phototactischen Reaction Von Euglene. Arch. Microbiol., 24, 80-90.
 Бурнашева С. А., Любимова-Энгельгардт М. Н. 1978. Биохимические основы движения ресничек и жгутиков. В кн.: Движение и поведение одноклеточных животных. Сб.: „Протозоология”, в. 2, „Наука”, 12-30.
 Clare N. T. 1956: Photodynamic action and its pathological effects. In: Radiation Biol., 3, 693. (ed. A. Hollander).

Department of Zoology, University of Delhi, Delhi-110007, India

Sisinty SHIVAJI, D. M. SAXENA and M. K. K. PILLAI

Effect of Metepa on the Growth of *Tetrahymena pyriformis*
(Ciliata)

Synopsis. Effects of metepa on cell population, growth and cell dimensions on a ciliate *Tetrahymena* have been investigated. Metepa (above 500 ppm) caused cytolysis of cells which was dose and time dependent. Both 1000 and 2000 ppm metepa caused a reduction in volume by 33% and in surface area by 72% as compared to the control by fifth day of treatment. The data on cell number during growth of culture indicate inhibition of cell division by 1000 and 2000 ppm metepa.

Many aziridiny l alkylating agents are known for their antifertility effects in insects and their possible use in insect control is being seriously considered (Borkovec 1966). These compounds are extremely reactive and are shown to be cytotoxic, mutagenic or carcinogenic in many animals (Ross 1962, Auerback 1976). In the event of their possible use in insect control it is of immense importance to know whether traces of such chemicals would become an environmental hazard. With this in view, it was considered desirable to study the toxicity and other effects of a promising insect chemosterilant, metepa, tris-(2-methyl-1-aziridiny l) phosphine oxide, on a laboratory colony of the ciliate *Tetrahymena pyriformis* which is an ideal organism for drug action studies (Hutner et al. 1973, Geike and Parasher 1976).

Material and Methods

Stock cultures of *T. pyriformis* were maintained in culture tubes containing 2 ml of sterile proteose-peptone medium. The medium consisted of 1% proteose-peptone (Difco) supplemented with meat extract and sodium chloride at a final concentration of 0.3% and 0.5% respectively. The culture tubes were placed in a B.O.D. incubator at a temperature of $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

The effect of metepa on *T. pyriformis* was studied over a period of 8 days. For this purpose, the cultures were set up by transferring three loops (nichrome loop of diameter 0.5 cm) full of a 7-day-old stock culture into conical flasks containing 50 ml of the sterile growth medium. The cultures were allowed to grow for 24 h (cell number at the end of 24 h was about 3.25×10^4 cells/ml medium in all the flasks) after which appropriate quantities of metepa were added directly to the culture medium under aseptic conditions. The doses of metepa tested ranged from 250 to 10 000 ppm. Cultures without metepa served as controls. Five replicates were set up for each treatment and each experiment was repeated at least thrice.

From each of the flasks after 1, 2, 4, 6, 12, 18 and 24 h of treatment, 1 ml of the culture was removed aseptically and observed under a binocular microscope for the occurrence of cytolysis, changes in body shape and locomotion of the ciliates as parameters for the assessment of toxicity of metepa. Subsequently, these observations were made at intervals of 24 h for a period of 7 days. At 24 h intervals the cell number in each flask was determined by fixing 1 ml of the culture with an equal volume of buffered neutral formalin and counting the cells by using a haemocytometer (Injeyan and Meerovitch 1974). Simultaneously, the major and minor axes of the treated and control ciliates were also measured using a calibrated oculometer. These measurements were used in determining the surface area and volume of the ciliates (Rohatgi and Krawiec 1973).

Result and Discussion

Concentrations of metepa above 4000 ppm proved to be highly toxic as 10 000 ppm caused cytolysis of the ciliates in 2 h. At 4000 ppm the ciliates cytolysed within 6 h. Cytolysis was always preceded by intense vacuolization of the cytoplasm, change in body contour from pyriform to spherical shape and sluggishness in the movements of the ciliates. At a lower concentration of 3000 ppm metepa such changes were initiated only after 12 h of exposure and the ciliates cytolysed after 24 h. With 2000 ppm rounding up of cells occurred on the fourth day and by the eighth day all the cells cytolysed. 1000 ppm metepa induced these abnormalities only on the fifth day and by the ninth day all the ciliates cytolysed. Ciliates exposed to 250 and 500 ppm metepa did not show any visible changes during the period of experimentation. Two other ciliates viz., *Blepharisma* and *Stylonychia* also cytolysed on exposure to metepa at concentrations above 1000 ppm (Shivaji et al. 1975, 1978). Cytolysis of the ciliates due to metepa treatment may be occurring due to the alteration of the SH and S-S balance which is necessary for the maintenance of the stability of the cortex (Zimmerman 1964). This imbalance in the SS-SH groups can be brought about by alkylating agents which have a strong affinity for thiol groups (Stock 1971). Both 1000 and 2000 ppm metepa reduced the surface area and volume of the treated ciliates (Fig. 1). These parameters were

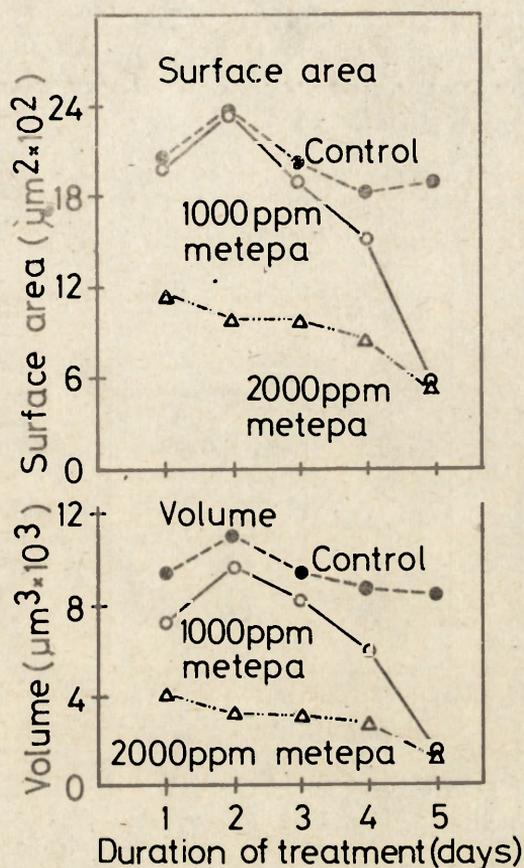


Fig. 1. Effects of metepa on the surface area and volume of *T. pyriformis*

monitored only during the first five days of treatment because beyond 5 days the ciliates became irregular and it was not possible to measure the major and minor axes. In the normal ciliates the volume and surface area increased upto the second day, decreased on the third day and thereafter remained almost constant (Fig. 1). Both 1000 ppm and 2000 ppm metepa caused a reduction in volume as well as surface area of the ciliates. It is interesting that though 2000 ppm metepa caused a greater reduction in volume and surface area compared to 1000 ppm metepa upto fourth day, both the concentrations reduced the volume by 33% and surface area by 72% as compared to the control by fifth day. These changes probably represent a natural response of the ciliates to an adverse environment (Rohatgi and Krawiec 1973).

Spherical cells were prevalent in metepa-treated cultures. According to Wana t a b e (1971) the presence of spherical cells in cultures may

be the result of inhibition of cell division. The data on cell number during the growth of the culture (Table 1) indicate inhibition of cell division. The control cultures exhibited a four fold increase in cell number by the

Table 1
Effect of continuous treatment of metepa (1000 and 2000 ppm)
on the cell number of *T. pyriformis*

Duration of treatment (days)	Control	Cell number $\times 10^4$ /ml medium	
		Metepa 1000 ppm	Metepa 2000 ppm
1	5.5	4.75(13.6)	4.00(27.2)
2	12.0	5.50(54.1)	4.50(62.5)
3	23.0	6.75(70.6)	4.50(80.4)
4	22.5	4.00(82.2)	4.00(82.2)
5	20.5	4.00(65.0)	3.00(85.3)
6	20.5	4.00(65.9)	2.10(82.7)
7	20.4	3.75(81.6)	1.25(93.9)
8	20.5	3.10(84.9)	—

The values in parantheses represent percentage decrease in number compared to the control.

end of 3 days of growth and subsequently this number remained almost constant till the eighth day. But in presence of 1000 ppm metepa the cell number showed 14 to 85% reduction from the first to the eighth day. This effect was more pronounced with 2000 ppm. However, there was no reduction in cell number in metepa treatments upto 500 ppm.

It is evident from the present studies that *T. pyriformis* does not exhibit any visible abnormalities in body shape or any reduction in growth rate when treated with metepa upto 500 ppm.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. A. B. Borkovec, U.S.D.A., Maryland, U.S.A. for the generous gift of metepa. One of us (S.S.) acknowledges C.S.I.R., New Delhi, for the award of Senior Research Fellowship.

RÉSUMÉ

On a étudié les effets qu'exerce le metepa sur la population, la croissance et les dimensions du cilié *Tetrahymena*. Le metepa (au dessus de 500 ppm) provoque le cytolyse dépendent de la dose et du temps de son action. Le metepa de 1000 et

2000 ppm aboutit le cinquième jour du traitement à une réduction de 33% de volume et de 72% de surface chez les cellules étudiées. L'analyse du nombre des cellules pendant la croissance des cultures indique une inhibition des divisions cellulaires par le metepa de 1000 et 2000 ppm.

REFERENCES

- Auerback C. 1976: Chemical mutagens. In: Mutation Research Problems, Results and Perspectives (C. Auerback ed.). Champan and Hall, London, 279-298.
- Borkovec A. B. 1966: Insect chemosterilants. Interscience Publishers, New York.
- Geike F. and Parasher C. D. 1976: Effect of hexachlorobenzene (HCB) on growth of *Tetrahymena pyriformis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 16, 347-354.
- Hutner S. H., Baker H., Frank O. and Cox D. 1973: *Tetrahymena* as a nutritional pharmacological tool. In: Biology of *Tetrahymena* (M. Elliot ed.). Dowden, Hutchinson and Ross Inc. Stroudsburg, 411-434.
- Injeyan H. S. and Meerovitch E. 1974: The effect of juvenile hormone on the growth of some protozoans *in vitro*. I. *Crithidia* sp. J. Protozool., 21, 738-742.
- Rohtagi K. and Krawiec S. 1973: Some effects of chloramphenicol and ethidium bromide in *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool., 20, 425-430.
- Ross L. E. 1962: Biological alkylating agents. Butterworths, London.
- Shivaji S., Saxena D. M. and Pillai M. K. K. 1975: Mode of action of alkylating agents using a cilia to protozoan as a model system. I. Effect of metepa on cell division and DNA synthesis in *Stylonychia notophora* (*Ciliata: Hypotrichida*). Arch. Protistenk., 117, 303-313.
- Shivaji S., Saxena D. M. and Pillai M. K. K. 1978: Mode of action of alkylating agents using ciliate protozoan as a model system. III. Effects of metepa on cell division and DNA synthesis in the ciliate *Blepharisma intermedium*. Indian J. Exp. Biol., 16, 450-454.
- Stock J. A. 1971: The design of tumor inhibitory alkylating drugs. In: Drug Design (E. J. Ariens ed.) Academic Press, New York, 531-571.
- Watanabe Y. 1971: Mechanism of synchrony induction. I. Some features of synchronous rounding of *Tetrahymena pyriformis*. Exp. Cell Res., 68, 431-436.
- Zimmerman A. M. 1964: Effect of mercaptoethanol on the furrowing capacity of *Arabacia* eggs. Biol. Bull., 127, 345-352.

Received on 23 March 1979

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 faunistic notices of the local character and purely clinical reports. The papers should 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 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 and title in the language of the text. The titles in German and French should be translated into English according to the demands of Current Contents. The paper should be accompanied by synopsis in the language of the text not exceeding 100 words and by short summary in one of 4 languages accepted in the Journal. In the Russian text 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.

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

References must be cited in the text indicating only the author and year thus: "Kinosita (1954) found that, etc."

Only all references cited in the text should be listed. The list must be arranged as follows:

Ehrt 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 Parameciumkörpers. *Arch. Protistenk.*, 92, 245-272.

Titles of references are given in their original language (not translated). In papers written in English, French or German, the Cyrillic type of the Russian references is transliterated according to the international system (ISO Recommendation R 9 September). This regulation is not applied to names if there exists in their traditional spelling. Also author may freely choose in 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 be also marked in pencil, as well in the legends as in the text.

Galley proofs are sent to the authors. Authors receive 75 reprints without covers.

In preparation:

G. Antipa: A Temporal Analysis of Cell Cycle and Morphogenetic Events in *Tetrahymena pyriformis* — M. Wolska: *Tetratoxum unifasciculatum* (Fiorent) (*Ciliata, Entodiniomorpha*). I. Somatic and Adoral Infraciliature — M. Wolska: *Tetratoxum unifasciculatum* (Fiorent) (*Ciliata, Entodiniomorpha*). II. Electron Microscope Investigations — W. Foissner: Taxonomische Studien über die Ciliaten des Grossglocknergebietes (Hohe Tauern, Österreich). VI. Familien *Woodruffidae Colpodidae* und *Marynidae* — A. K. Chandra and A. Choudhury: A New Opalinid *Hegneriella mukundai* sp. n. from an Old World Hylid *Kaloula pulchra taprobanica* Parker from India — P. A. Lalpotu: *Maupasella perionychis* sp. n. from a New Astomatous Ciliata from the Earthworm *Perionyx sansibaricus* in India — C. C. Narasimhamurti and S. S. Nazeer Ahamed: A New Septate Gregarine *Actinocephalus bradinopygi* sp. n. from the Dragon Fly, *Bradinopyga geminata* Rambur — Z. Baranowski: Kinetics of the Regeneration of Rhythmic Contraction Activity in *Physarum polycephalum* Drops — B. Tołłoczko: Cytochalasin B Induced Inhibition of Food Ingestion in *Dileptus anser* (*Ciliata, Gymnostomata*)

Warunki prenumeraty

Cena prenumeraty krajowej: rocznie zł 200,— półrocznie zł 100,—

Prenumeratę **na kraj** przyjmują Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa—Książka—Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW, w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki **za granicę** przyjmuje RSW „Prasa—Książka—Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

CONTENTS

S. D. Amoji and M. J. Devdhar: <i>Echinospira phalangii</i> gen. n., sp. n. An Actinocephaid Gregarine Found in the Intestine of Phalangid Host, <i>Opalnia</i> sp.	517
A. Czapik: <i>Frontonia pallida</i> sp. n. un nouveau cilié psammophile (<i>Hymenostomata</i> , <i>Peniculina</i>)	527
[A. Czapik: <i>Frontonia pallida</i> sp. n., new psammophilic ciliate (<i>Hymenostomata</i> , <i>Peniculina</i>)]	
Г. А. Штейн: Новые данные о паразитических инфузориях (<i>Peritricha</i> , <i>Urceolariidae</i>) с рыб бассейна Тихого океана	531
[G. A. Stein: New Data on Parasitic Ciliates (<i>Peritricha</i> , <i>Urceolariidae</i>) of Fishes of the Basins of Pacific Ocean]	
А. Л. Юдин: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. I. Подавление генетического взаимовлияния ядер в гетерокарионах	553
[A. L. Yudin: Mechanisms of Destabilization of Hereditary Characters in Amoebae. I. Inhibition of Genetical Interactions of Nuclei in Heterokaryons]	
А. Л. Юдин: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. II. Наследуемые изменения, индуцированные некоторыми антибиотиками	571
[A. L. Yudin: Mechanisms of Destabilization of Hereditary Characters in Amoebae. II. Heritable Variations Induced by Some Antibiotics]	
А. Л. Юдин: Механизмы дестабилизации наследственных признаков у амёб. III. Наследуемые изменения, обусловленные трансплантационной несовместимостью с амёбами других штаммов	581
[A. L. Yudin: Mechanisms of Destabilization of Hereditary Characters in Amoebae. III. Heritable Variations Induced by Transplantation Incompatibility with Amoebae of Other Strains]	
E. Mikołajczyk and B. Diehn: Mechanosensory Responses and Mechanoreception in <i>Euglena gracilis</i>	591
S. A. Burnasheva and G. A. Solovjeva: Cytochemical Localization of Ca ²⁺ -ATPase Activity in Cilia and Basal Bodies of <i>Tetrahymena pyriformis</i>	603
Л. К. Лозина-Лозинский: Адаптивное поведение <i>Paramecium caudatum</i> при фотодинамическом действии красителей	609
[L. K. Lozina-Lozinsky: Adaptive Behaviour of <i>Paramecium caudatum</i> to Action of Photodynamic Dyes]	
Sisinthu Shivaji, D. M. Saxena and M. K. K. Pillai: Effect of Metepa on the Growth of <i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ciliata)	629

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Wrocławska Drukarnia Naukowa

Index 35133