

ACTA PROTOZOO- LOGICA

REDACTORUM CONSILIUM

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

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

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

VOLUMEN I

Fasciculi: 31 — 36

W A R S Z A W A 1 9 6 3

NOTICE TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

E. M. CHEISSIN and G. I. POLJANSKY

On the taxonomic system of *Protozoa*

О системе простейших

If one casts a glance at several modern reviews and special papers on taxonomic system of *Protozoa*, one will easily find out that the opinions of various workers in this field of science differ from each other prominently. For the development of protozoology, it would be extremely desirable to draw up some general foundations for the classification of protozoa, if only for the main subdivision of *Protozoa* into some higher taxons, on the basis of widely-spread confrontation of opinions and international collaboration.

The 1st International Conference of Protozoologists in Praha called thanks to the initiative of the Czechoslovak Academy of Sciences and the Society of Protozoologists in August 1961 was the event of paramount importance for the international collaboration of protozoologists from many countries. At this Conference, the Society of Protozoologists suggested to discuss the principal question of taxonomic system of *Protozoa* in order that to draw up some common view-point towards this subject. As material for discussion, our American colleagues proposed the examination of their „Preliminary scheme of classification of *Protozoa*”, the paper being distributed among all the interested members of the Conference. The discussion of the proposed scheme was lively and interesting. The time of discussion was limited to one evening. Naturally, it appeared impossible to discuss all the problems and to draw up a common conclusion during such a short period of time. Therefore, the discussion was decided to be continued in press and later on at the 2nd Conference of Protozoologists, which is though to be in London in 1965.

The present paper is just written in accordance with the plan of realising the above mentioned agreement. The authors setting forth their view-point are, of course, far from assuming it as indisputable and the only possible one. We consider our paper as debatable material for further discussion.

*

Before going on to the direct discussion of the specific material, some general preliminary remarks concerning the main principles of our considerations seem to be useful. These general propositions, even if not original and shared by many zoologists, shall be however exposed here, because they are still not generally accepted.

A perfect system of the animal kingdom, including *Protozoa* should be natural. Under a natural system we believe such a system which reflects phylogenetic relationships among the organisms. Thus, the system must not be conventional or subjective depending on tastes or view-points of either of its authors. Reflecting the process of phylogenetic development which occurs in nature the system itself is nothing else than objectively existing reality which does reflect the extent of likeness as well as of difference between the organisms on the basis of phylogenetic (historical) relationships among them. However, the present-day groups of organisms are quite various. According to Darwin's principle of divergence of characters, both intermediate and ancestral forms die out. Numerous cases of convergence and parallel development make the picture much more complicated. All this creates difficulties for the elaboration of the natural system and accounts for the existence of diversity in opinions on taxonomic problems. But these real difficulties should not be exaggerated and they should not serve as the reason for giving up the elaboration of the actual natural system.

Even at present time a certain number of aspects concerning the system and the phylogeny of *Protozoa* can be considered as completely solved. For example, one can hardly be in doubt as to the phylogenetic relationship between the *Mastigophora* and *Sporozoa*, as well as between *Holotricha-Thigmotricha* and *Peritricha*. There is a great number of examples of this kind. However, a lot of problems of taxonomic system of *Protozoa* demand their further elaboration and study.

On drawing up the system, the whole diversity of characters of the investigated group is necessary to take into consideration as much as possible. Besides, peculiarities of life cycles and even of ecological features must be taken into account. Some groups of *Protozoa* live in strictly limited places or habitats which their evolution might be connected with (the *Ophryoscollecidae* in the paunch of ruminants, *Ctenostomata* in sapropelle, *Tintinnida* in plankton). In his recent paper Corliss 1962 thoroughly examined this question and there is no need for us to stay on it any longer. The expressed necessity of taking into account as many different characters of organisms as possible for the establishment of taxonomic categories does not, however, mean that all these attributes are of equal value for the systematic aims. While establishing and characterizing large taxa, it is sometimes necessary to select only those few characters which are the real attributes determining the belonging to a certain taxon. It follows from it that the differential characters possess a definite phylogenetic significance and sense.

In a series of well-known works by Severtzoff on morphological regularities of evolution, some types of evolutionary changes were postulated. Among them two main types are represented by aromorphoses and idioadaptations. Aromorphosis mean the evolutionary changes leading towards the general increase in morphophysiological differentiation but it does not represent adaptations to any special life conditions. Idioadaptations are, on the contrary, the evolutionary changes connected with adaptation to concrete ecological conditions and not connected with general morphophysiological progress as well as with the increase in complexity of differentiation. On the basis of isolation of higher taxa lay phylogenetic changes of aromorphosis type. This is true for the *Protozoa* as well. For example, the develop-

ment of the ciliature, nuclear dualism and high polyploidy of the macronucleus during the evolution of the *Infusoria* is nothing else but aromorphosis. Thus, taking into account all the possible characters, when drawing up a system, one should not lend them an equal phylogenetical or taxonomical importance.

Finally, when framing the system, it is to remember the real extent and profundity of differences which must characterize each taxon: order, subclass, class etc. It is difficult to propose any objective criteria because in every type and class there is a set of its own features to be dealt with. For an experienced taxonomist who knows the groups very well there is no difficulty in finding these criteria objectively and uniformly.

These preliminary comments determine in a certain extent our attitude to the solution of particular problems on the systematics of *Protozoa*.

Division of the phylum *Protozoa* into subphyla

The classification of *Protozoa*, with special reference to their division into higher taxonomic groups cannot be considered fully established.

Doflein in 1902 broke up the phylum *Protozoa* into two subphyla: *Plasmodroma* and *Ciliophora*, the former including the classes *Rhizopoda*, *Mastigophora* and *Sporozoa*, while the latter combining the classes *Ciliata* and *Suctorina*. The mode of movement, the kind of reproduction and the organization of the nuclear apparatus formed the basis for the separation of these subphyla. This classification was accepted later on by a number of protozoologists (Hartmann 1907, Kudo 1915, Wenyon 1926, Epstein 1930, Jakimov 1931, Pearse 1936, Dogiel 1951, Hall 1953, Grell 1956 and others).

Taking into consideration that one of the principal reasons for the separation of the two subphyla was the organization of the nuclear apparatus, Piekarski 1954 suggested to call the latter subphylum not *Ciliophora* but *Heterocaryota* because most representatives of that subphylum are characterized by the dimorphism of their nuclear apparatus. Later on, Biocca 1956 realized other change designating *Plasmodroma* as *Homocaryota*; he used the same arguments as Piekarski did in case of the *Ciliophora*. Thus, Biocca suggested that the phylum *Protozoa* should be divided into two subphyla: *Homocaryota* and *Heterocaryota* corresponding entirely to the subphyla after Doflein.

We believe that the two subphyla of *Protozoa* reflect completely the natural divergence within the phylum and unite those protozoa which are with each other phylogenetically associated.

The main basis for the separation of the two subphyla is formed by differences in ways of multiplication. Within both subphyla, along with asexual reproduction, sex process occurs, however, in some cases the latter is secondarily excluded from the life cycle while in some other cases it may be primarily absent (many *Sarcodina*). The comparison of the sex processes occurring in both subphyla of *Protozoa* permits to trace their principal features. In all *Plasmodroma* possessing sex process the copulation of gametes usually occurs. This process as well as gametes themselves are various in different species but in all cases one has the right to speak of gametes. As a result of their copulation, zygote is formed. The further development of the zygote va-

ries in different groups. At the same time, in the subphylum *Ciliophora* sex process appears in form of conjugation, a most peculiar sex process having nothing homologous among *Plasmodroma*. In *Gregarina* and *Adeleida* syzygies of different type which may resemble conjugation are indeed nothing else but stages of gametogenesis. The true joining of gamonts insures the copulation of gametes which appears later on. Thus, these processes outwardly resembling conjugation have indeed nothing to do with it.

The second principle difference between the *Plasmodroma* and *Ciliophora* consists in the organization of the nuclear apparatus. The former is characterized in general by monomorphism of nuclei while dimorphism or nuclear dualism, both morphological and functional, is characteristic of the latter one. Differentiation of the nuclear apparatus into macronucleus (Ma) and micronucleus (Mi), the former being a trophical nucleus, the latter — a generative one, is peculiar to all ciliates.¹

Among the *Plasmodroma* several forms can be count which also possess nuclear differentiation at certain developmental stages. Some foraminiferan species can serve as an example (*Rubratella*, *Rotaliella*). Their agamonts develop both vegetative nuclei, destined to later destruction, and generative ones, taking part in the formation of gamonts. However, it must be kept in mind that such a differentiation in nuclei at developmental stages of the rhizopoda is of temporary character while nuclear dualism of ciliates is peculiar to every stages of life cycle and determines that unique, typical only for the ciliates kind of sexual process — the conjugation. At the same time, a nuclear dualism of the rhizopoda which happens at the asexual period of their development is well correlated with the sexual process proceeding in form of typical copulation. Thus, both reproduction and the type of nuclear apparatus combined in one, may serve as that very boundary that permits to divide all the *Protozoa* into two natural groups — subphyla — which represent two main trunks of their phylogenetic tree.

The locomotor organelles that constitute the third attribute considered could not serve themselves as the basis for the separation of subphyla because there is no principal difference in the organization between cilia and flagella especially as concerns their fine structures. Meanwhile, in addition to the mode of sexual process and the peculiarity of nuclear apparatus the type of locomotor organelles may be an important additional sign for separation of the phylum *Protozoa* into two subphyla. All the *Plasmodroma* are capable to move either by means of different forms of pseudopodia or by means of flagella and at last by means of myofibres in absence of flagella or pseudopodia. The representatives of the *Ciliophora* can move only by means of their ciliary apparatus though in some cases myofibres can undoubtedly favour this movement. The body surface of some *Plasmodroma*, the *Opalinina* for example, is covered with relatively short flagella, or cilia as they been called some time ago when the *Opalinina* were ranked among the *Ciliata*. But the organization of nuclear apparatus and the mode of sexual process in the opaliniae differ essentially from those in *Ciliophora*, though their kinetic apparatus resembles each other. Since there is no principal difference between cilia

¹ The only exclusion in this respect may be represented by *Stephanopogon* in which nuclear dimorphism has not been yet found.

and flagella, this character cannot have any determinant value for the separation of phyla.

Some authors suggested that the phylum *Protozoa* should be divided into much more than two subphyla. Thus, in 1926 and in 1933 Calkins proposed four subphyla: *Mastigophora*, *Sarcodina*, *Infusoria* and *Sporozoa*. By this, he set apart phylogenetically close groups such as *Mastigophora*, *Sarcodina* and *Sporozoa* which possess the number of similar features testifying to the community of their origin. Hall 1953 shared the system of Calkins. The basis for the separation into these subphyla was a mode of movement. Only for characteristics of the *Sporozoa*, the formation of infective stages — sporozoites — is taken into account for their separation. Although all these attributes are characteristic of the mentioned groups, the separation of subphyla only on the basis of such a criterium as movement does not allow a natural classification within the phylum and disconnects phylogenetically close forms, while the character of movement does unite the *Mastigophora*, *Sarcodina* and *Sporozoa* in larger extent than differentiates them.

The close relation of the *Mastigophora* and *Sarcodina* seen in the structure of their locomotor organelles permitted for some authors (Grassé 1952, 1953, Corliss 1959, 1962) to combine these protozoa in one subphylum *Rhizoflagellata* or *Mastigamoebaea* opposing it to the subphylum *Sporozoa* and *Cnidosporidia*, and after Grassé, to the subphylum *Actinopoda* as well.

According to Levine 1962, the *Sporozoa* constitute a separate subphylum which he calls *Euspora*. We have nothing against the unity of the *Mastigophora* and *Sarcodina* in one subphylum. But we cannot share the opinion on the isolation of the *Sporozoa* in one separate subphylum. There is much common between the *Sporozoa* and *Mastigophora* which is conditioned by the origin of the former from the latter. First of all, life cycles of the *Sporozoa* and *Mastigophora*, mainly of the order *Phytomonadida*, are characterized by some common features. In the phytomonadids, in the simplest case asexual reproduction is followed by sexual process, vegetative specimens which become sexually differentiated playing the role of gametes. In this case the progamic period is absent. Male and female gametes differ from each other only physiologically (isogamy). In more complex cases the gamete formation is preceded by a progamic period, sometimes gametogenesis occurring equally during the formation of male and female gametes (or gametes with opposite sexuality in case of isogamy), or occurring differently during the formation of macro- and microgametes (in case of oogamy). From one macrogamete only one macrogamete is formed, but from one microgamete numerous microgametes are originating.

In all *Mastigophora* zygote encysts and during the metagametic period meiosis occurs (zygotic reduction) and vegetative forms are formed. All the development stages but zygote are haploid. To speak to the point, the same scheme of life cycles is kept in the *Sporozoa*, but it becomes complicated and a bit modified due to parasitic mode of life. In zygote which always encysts (zygocyst or oocyst) meiosis takes place and during the metagametic period various number of sporozoites is formed. These sporozoites can be compared with vegetative forms originating inside the encysted zygote in the *Masti-*

gophora. In the *Sporozoa*, as well as in the *Mastigophora* all developmental stages with exception of the zygote are haploid.

The presence in the *Sporozoa* of flagella-bearing gametes bring them together with the *Mastigophora*. In the latter the sexual process in their life cycle is of facultative character, and under certain external conditions the *Mastigophora* (for example, *Eudorina*) can multiply by asexual way for a long time. The number of their asexual generations is not fixed. In *Sporozoa* which seem to conserve the alternation of asexual and sexual generations, this process being caused by their parasitic life, the time of asexual reproduction becomes stabilized and the sexual process begins only after some asexual generations took place. This is true for the *Coccidia* (*Eimeriidae*), however, the ability to a long asexual multiplication without formation of gamonts develops sometimes in life cycles of some other *Sporozoa*, as well. In *Plasmodium cathemerium* and *P. knowlesi*, strains that multiplied asexually for a long time were found (Huff and Gambrell 1934, Knowles and Das Gupta 1932).

Thus, life cycles of both the *Sporozoa* and some *Mastigophora* rather resemble each other, though the parasitic life of the former as well as the necessity for the parasite to penetrate into its host result in increasing of metagamic part of the life cycle. The likeness just mentioned may reflect a phylogenetic relationship between the two groups of *Protozoa* and testify to the possible origin of the *Sporozoa* from some group of free-living mastigophorans that had life cycle scheme mentioned above. All present-day free living groups of the green mastigophorans with the alternation of generations but without sexual processes being genotypically fixed may originate from this group. All this permits to consider the *Sporozoa* and *Mastigophora* as closely related groups and the combination them into one group is thought to be quite logical and to reflect their common origin.

As to the *Cnidosporidia*, their position in the system of *Protozoa* is still not quite clear because of poor knowledge of those parts of their life cycle which are of great importance for comprehension of their nature. Saying so, we mean the character of sexual process, the tide of meiosis, peculiarities of the alternation of generations. There is a view-point according to which the *Cnidosporidia* should be excluded at all from the *Protozoa* and be separated into a peculiar group among the lower *Metazoa* (Grell 1956). Grassé 1960 on the basis of thorough investigation of the plasmodium of *Sphaeromyxa sabrazasi* came to conclusion that the myxosporidians lay beyond the limits of the notion of *Protozoa* because in the syncytiated plasmodium there are both somatic nuclei and isolated moving germinal cells. But the absence of differentiated sexual cells in the *Myxosporidiida* does not allow to consider them as multicellular organisms. According to Grassé, the *Myxosporidiida* represent one of the blind ways of evolution.

It is quite possible, however, that the differentiation into vegetative nuclei and generative „cells” in the *Myxosporidiida* may not exclude them from the *Protozoa*. Similar phenomena are also known for some *Rhizopoda*. Among the latter one can see multinuclear forms with differentiation into both generative and vegetative nuclei (*Rubratella*, *Rotaliella*), the development of agametes being realized only at the expense of the cytoplasm with genera-

tive nuclei. Therefore, in our opinion, the *Cnidosporidia* might be kept provisionally within the *Protozoa*.

Though the sexual process of the *Cnidosporidia* is rather peculiar, it resembles the process of autogamy found in the *Sarcodina* or *Mastigophora*. The organization of nuclear apparatus of the *Cnidosporidia* resembles to a greater extent that of the *Sarcodina* and *Mastigophora* than that of the *Ciliata*. Heteromorphy in the structures of nuclear apparatus of spores (sporoblasts) in the *Cnidosporidia* differs very much from the differentiation into Ma and Mi occurring in the *Ciliata*. All this allows to suppose that the *Cnidosporidia* might be included as an independent class into the subphylum *Plasmodroma*.

The presence of ameboid movement in the sporoplasm or planont, the formation of large plasmodia, diploidy of all developmental stages but gametes (Noble 1944) — all these features allow to bring the *Cnidosporidia* together with *Sarcodina*. Therefore the former as a separate class may be placed at the same level next to the latter. Peculiarities of both the sexual process and the structure of spores in the *Cnidosporidia* allowed to some authors (Grassé 1953, Levine 1961, Corliss 1962) to isolate them into a particular subphylum along with some other subphyla. There is nothing surprising in the fact because the *Cnidosporidia* are indeed rather original; besides, the joining the *Cnidosporidia* together with *Sarcodina* into the subphylum *Plasmodroma* has not been yet completely settled.

Thus, in our opinions the unification of the classes *Sarcodina*, *Mastigophora* and *Sporozoa* into one subphylum *Plasmodroma* does reflect most distinctly the natural phylogenetic relationship between all the protozoan groups constituting the subphylum.

It is quite probable that the *Toxoplasmatida* and *Sarcosporidiida* should be included into the same subphylum. These protozoans do not possess any sexual process, they move only ameboidally or by means of myofibres. Their nuclear apparatus is monomorphous and therefore they fully fit the criterion for the *Plasmodroma*. It is likely to follow Biocca 1956 who united those parasitic *Protozoa* into a special class *Toxoplasmatea* within the subphylum *Homocaryota* (which corresponds to the *Plasmodroma*).

The *Toxoplasmatida* and *Sarcosporidiida* (also *Besnoitia*) are indeed so much peculiar that their isolation into one special class cannot give rise to any objection. These protozoans cannot be included into the class *Sporozoa* because they lack one of the main features characteristic of the *Sporozoa* — sexual process followed by formation of the oocyst (zygocyst) and sporogony. The likeness between the *Sarcosporidiida*, *Toxoplasmatida*, *Eimeriidea* and malaria parasites which was revealed on examination of fine structures of the moving developmental stages (sporozoites, trophozoites, merozoites) and which concerns the presence of both penetrant organelles and fibrillar apparatus is probably to be thought as the convergence developed as a result of adaptation to penetrating the host's cells of different tissues (Ludvik 1956, 1960, Cheissini Mosseovich 1960, Garnham et al. 1960, 1961, 1962). The konoid on the anterior end of the trophozoite of toxoplasmae and sarcosporidia, of malaria plasmodium sporozoite and *Eimeria* merozoite as well as the „pair organ” and toxonemata or sarconemata are very likely to have developed independently in all these protozoa.

The *Toxoplasmatida* and *Sarcosporidia* are not to be united with the *Mastigophora* because any traces of the kinetid failed to be found on either developmental stages of the former. The hypothesis of the *Sarcosporidia* belonging to fungi needs some through reasons.

The system of the subphylum *Plasmodroma*

Let us dwell on the examination of the equalranked units which constitute the subphylum *Plasmodroma*. The authors sharing the idea of the existence of such subphylum include commonly three classes in it: *Mastigophora*, *Rhizopoda* (= *Sarcodina*) and *Sporozoa* (Wenyon 1926, Doflein 1929, Dogiel 1951, Kudo 1954). Moreover, the subclass *Cnidosporidia* is included into the *Sporozoa*. Piekarski 1954 along with the three classes, has established one more class *Haemamoeba* which comprises both the *Piroplasmida* and *Theileriida*. Biocca 1956 though he gave to the subphylum *Plasmodroma* the name *Homocaryota*, includes in it, however, essentially the same protozoa as do the abovementioned authors. Along with the classes *Rhizopoda*, *Mastigophora* and *Sporozoa*, Biocca put forward two more classes — *Cnidosporidia* and *Toxoplasmatea*. Besides, the author added a new class — *Ciliatoidea* (opalinae). Thus, after Biocca the subphylum *Plasmodroma* (*Homocaryota*) consists of six classes.

Somewhat different are view-points on the system of *Protozoa* shared by Grassé 1953 and Corliss 1959, 1962. In the manual on zoology edited by Grassé those protozoa which according to Doflein, Wenyon, Dogiel, Piekarski and Biocca were united into one subphylum *Plasmodroma* are divided into three separate subphyla: *Rhizoflagellata*, *Actinopoda* and *Sporozoa*. The first subphylum, according to Grassé, breaks up into two superclasses — *Flagellata* and *Rhizopoda*, the former comprising 11 classes including opalinae, the later consisting only of 3 classes. The subphylum *Actinopoda* contains three classes — *Acantharia*, *Radiolaria* and *Heliozoa*. The subphylum *Sporozoa* is constituted by three classes — *Gregarinomorpha*, *Coccidiomorpha* and *Sarcosporidia*.

Corliss 1959 draw up a similar system of *Protozoa*. However, to his mind, the subphylum *Mastigamoebaea* falls to three superclasses: 1. *Rhizoflagellata* (by its range corresponds to the subphylum *Rhizoflagellata* according to Grassé, with the exception of the opalinae) consisting of two classes — *Flagellata* and *Rhizopoda*; 2. *Actinopoda*; 3. *Paraflagellata* (corresponds to *Opalinina*). Later on, Corliss 1962 simplified this system which had been too complicated with such unnecessary superstructures as superclasses. Corliss divided the subphylum *Mastigamoebaea* into three classes: *Flagellata*, *Paraflagellata* and *Sarcodina*, the latter including the following subclasses — *Actinopoda*, *Rhizopoda*, *Reticulosa* and *Piroplasmata*. The arguments showing the baselessness of the separating the *Mastigophora* and *Sarcodina* in one special subphylum *Mastigamoebaea* equally with the subphylum *Sporozoa* and *Cnidosporidia* were mentioned above. Now we have to dwell on natural classification on the level of classes proceeding from our view-point on the reality of the subphylum *Plasmodroma*.

We agree with most protozoologists considering the *Mastigophora*, *Sarcodina* and *Sporozoa* as classes within the subphylum *Plasmodroma*. However,

the authors' view-points as to the contents of either class differ very much. There is no uniform opinion concerning the inclusion of the opalinae which earlier constituted a special subclass *Protociliata* among the *Infusoria*, into the class *Mastigophora*. Fauré-Fremiet 1950 and Corliss 1955 substantiated very well their view-point on the relationship between the opalinae and mastigophorans. Many authors (Raabe 1948, Jírovec 1953, Grassé 1952, Lwoff et Valentini 1948, Grell 1956) include the opalinae as a separate taxonomic group into the class *Flagellata* (or superclass according to Grassé) placing them as a subordinate unit among the *Zooflagellata*. But Piekarski 1954 separated opalinae into the class *Ciliatoidea*. His opinion was supported by Biocca 1956. Corliss 1962 also separated the opalinae as class under the subphylum *Mastigamoebaea*. Meanwhile, the supposition on the relationship between the opalinae and *Zooflagellata* made by Fauré-Fremiet and others is much more wellgrounded than the separation of them into one independent large taxonomic unit equal or close to the class *Mastigophora*.

Such features as monomorphy of the nucleus and copulation of gametes are rather reliable bases in order that these protozoa are to be included into the subphylum *Plasmodroma*. Besides, the type of fission as well as morphogenesis of the opalinae is quite similar to those found in different representatives of the *Mastigophora*, especially, in many *Hypermastigida*. The so-called symmetrigenic flagellate-type fission (Chatton et Villeneuve 1937) has been found also for the opalinae (Chatton et Brachon 1936). Alike some higher zooflagellates (the *Hypermastigida* in particular), they have an akaryomastigont system. Thus, there is every reason to draw the opalinae together with the *Mastigophora* and to include it into this class. At the same time they possess some peculiar features of organization which does not allow to combine them together with zooflagellates into one systematic group. The opalinae have no centrosomes, no parabasal apparatus, no kinetoplast, they are as a rule amphibian intestine parasites. In case of admitting their placing among the *Flagellata*, they can be established as a subclass along with two other subclasses — *Zoomastigina* and *Phytomastigina*. By this, the phylogenetic relationship is stressed between the opalinae and other representatives of the class *Flagellata* and in the first place with higher zooflagellates.

The division of the *Flagellata* into three subclasses related to each other phylogenetically makes the classification natural. This relationship, however is rather ancient and the three subclasses were separated from each other very long ago. All the *Phytomastigina* are autotrophs (sometimes mixotrophs) while the *Zoomastigina* and *Opalinina* — heterotrophs. It is hardly possible to agree with Grassé to divide all *Phytomonadina* into 10 independent classes being on the same level with the class *Zoomastigina* and subordinated to the superclass *Flagellata*. The raising of some small groups of protozoa to the class range equally with other large units cannot be thought as advisable. Indeed, according to Grassé's system large groups of protozoa as for example the *Radiolaria*, *Coccidia*, or *Gregarina* represent classes but on the other hand such small groups as the *Ebridinida*, *Xanthomonadina* and others are placed on the same taxonomic level. The size of either higher taxonomic unit within the phylum must be more or less equal to each other by its range and

character of distinctions. To our mind, it looks more rationally not to classify all the coloured flagellata into some separate classes but to include them into the subclass *Phytomastigina* as orders.

It is necessary to note that botanists, in contrast to zoologists, assume all the green flagellata as a heterogeneous collection of some independent groups of the flagellates which have nothing in common with each other (Kursanov i Komarnickij 1945). On this ground, botanists raise different representatives of the *Phytomastigina* to a range of type or class (see for example: Gollerbach i V. J. Poljanskij 1951, and others). We shall not go into critical discussion of this point of view, however it is necessary to note that botanists while separating various taxonomic groups choose the features which differ pronouncely from those which constitute the basis for zoological classification of the same groups. That is why the very comparison of the two groups appears beyond our possibility and further, while separating some taxa, we shall follow only those principles which are generally accepted by zoologists for the system of *Protozoa*.

We shall not thoroughly examine the subordinate classifications within each subclass of flagellates, we shall only dwell in short on some data concerning the classification of the subclass *Zoomastigina*.

The separation of the orders *Choanoflagellida* and *Diplomonadida* is not at all doubtful though Hall 1953 included the former into the order *Protomonadida* and the latter into *Polymastigida*. The open question remains the real existence of orders *Protomonadida* and *Polymastigida*. The independence of *Protomonadida* was considered by a number of authors (Wenyon 1926, Doflein und Reichenow 1929, 1953, Jirovec 1953, Hall 1953, and others). According to them the order *Protomonadida* was constituted by flagellates having different morphology and origin. Therefore Honigberg 1961 was right when he separated from this order flagellates with a kinetoplast into a special order *Kinetoplastida*. Grassé 1952, however, raised the *Protomonadida* to superorder range and divided it into five orders. Corliss 1962 broke up the *Protomonadida* into three orders: *Rhizomastigida*, *Retortomonadida* and *Kinetoplastida*. *Kinetoplastida* really differ essentially from all other *Protomonadida* while the remaining representatives of the *Protomonadida* (*Eumonadidae*, *Cercomonadidae*, *Rhizomastigidae*, *Bicocceidae*, *Retortomonadidae*, *Tetramitidae*) rather resemble each other and therefore they can be united in one separate order which may keep the old name — *Protomonadida*. However, it differs very much by its size from the order which previously existed, by absence of the *Trypanosomatidae*, *Bodonidae* and *Choanoflagellida*.

The idea of existence of the order *Polymastigida* was shared by Wenyon 1926, Doflein-Reichenow 1953 and others. Doflein-Reichenow put also into this order the *Hypermastigida* while Wenyon, Jirovec and others thought it to be a separate order. Grassé 1952 put all the *Polymastigida* together with the *Hypermastigida* into the superorder *Metamonadida*, either family which contributed the *Polymastigida* and *Hypermastigida* being raised to ranges of special orders. Corliss 1962 preserved the order *Hypermastigida* but in place of a single order *Polymastigida* two other orders — *Trichomonadida* and *Oxymonadida* were established.

The system of classification which admits the existence of two orders: *Polymastigida* and *Hypermastigida* might be thought to follow the phylogenetic relationship in the most correct way. The parasitic flagellates just mentioned differ from each other by their kinetic apparatus. Presence of one or numerous karyomastigonts is characteristic of the former, each karyomastigont having as much as 4—8 flagella, as a rule. The *Hypermastigida* possess only one nucleus, their mastigont system having numerous flagella. In the *Polymastigida*, each mastigont possesses parabasal apparatus and axostyle, while in the *Hypermastigida*, numerous parabasal apparatus are characteristic of each mastigont. Thus, in the order *Polymastigida* the characters of both *Oxymonadida* and *Trichomonadida* are combined in one. Between the two groups, there are some distinctions concerning, however, some more special attribute subordinated to the main features of the organization of the order *Polymastigida*.

Now let us dwell on the position of sarcodina in the system of *Protozoa* and on the size of this group. As it was mentioned above, they were separated as individual class along with classes *Mastigophora* and *Sporozoa*. There are some different view-points towards the size of the class *Sarcodina* despite the fact whether the group in question was included as a separate class into the subphylum *Plasmodroma* or subphylum *Mastigamoebaea*. According to Doflein, Hartmann, Jírovec, Grell, Dogiel and Kudo the *Radiolaria*, *Heliozoa* and *Rhizopoda* are included into the class *Sarcodina* as subordinated group (order or subclass). These groups are considered by some authors as independent and equal units while others (Kudo 1954, Corliss 1962) opposite the *Rhizopoda* to the other group (*Actinopoda*) which unites the radiolarians and heliozoans. According to the third group of authors who raised the sarcodina to a range of superclass (Grassé 1952, and others) both radiolarians and heliozoans are fully separated from the superclass as the subphylum *Actinopoda*, or the superclass *Sarcodina* is divided into two independent classes: *Rhizopoda* and *Actinopoda*.

Thus, two problems open to discussion arose: 1. does the class *Sarcodina* includes the radiolarians and heliozoans as subordinate unites equal to the *Rhizopoda*, and 2. is it necessary to unite the radiolarians and heliozoans in one group *Actinopoda* and to separate the latter as an independent unit on the level of subclass, class or subphylum thus opposing it to the rest of sarcodina? Moreover the questions to be discussed are the following ones: the problem of separation of the *Acantharia* from *Radiolaria* as an equal taxonomic group and the problem of the reasons for existence of the group of blood parasites — *Piroplasmida* and *Theileriida* as an individual class, subclass or even order.

When grounding above the existence of the subphylum *Plasmodroma* as a natural taxonomic group, we cited some data in favour of separating within the subphylum the class *Sarcodina* phylogenetically related to the class *Mastigophora*. Both classes are rich enough in species number and possess a distinctive set of characters which allows considering those protozoa as quite independent groups contributing the *Plasmodroma*. The *Sarcodina* are defined, first of all, by the ability of making up pseudopodia of different forms which enable the organism to engulf its food and to move. This peculiarity is characteristic of trophozoites while sex cells sometimes possess flagella. The nutrition of all *Sarcodina* is of holozoic type. The reproduction is agamic

(asexual), by means of transversal or multiple division. In some representatives, a sexual process is found which alternate with asexual multiplication. Most of the *Sarcodina* are free living animals with naked bodies or bodies bearing outer or inner skeletons. The characters just mentioned are shown not only by naked amoebae and shelled rhizopoda i.e. the protozoa combined in the group of *Rhizopoda* but also by radiolarians and heliozoans. Indeed, the latter represent the same type of nutrition and movement, possess the inner and outer skeleton and the same type of multiplication as other sarcodina do. Therefore the inclusion of radiolarians and heliozoans into the class *Sarcodina* seems to be rather well grounded. By this, phylogenetic relationship between the naked amebae and rhizopoda, on one hand, and the heliozoans and radiolarians, on the other is stressed. Thus, the type of nutrition and movement (lack of flagella and cilia in trophozoites) is the common feature of organization which permits to unite all these protozoans. Therefore it is hardly true to separate the radiolarians and heliozoans into a special subphylum or superclass equally with the *Sarcodina* because such a separation on the level higher than a class would suggest rather distant phylogenetic relationship between radiolarians, heliozoans and other sarcodina. Meanwhile all these organisms are in close relation with each other.

To our mind, the class *Sarcodina* represents a natural classification unit within the subphylum *Plasmodroma*. Corliss, Kudo, and others believe that all the sarcodina can be divided into two groups: *Actinopoda* and *Rhizopoda*, the former having usually a radial-symmetrical body with dispersing fine pseudopodia (often axopodia), while the latter possess lobopodia, filopodia or reticulopodia as a rule without the radial organization. No doubt, within sarcodina the *Rhizopoda* constitute a real natural group; this cannot be said about the *Actinopoda*. The formation of both lobo-filopodia and reticulopodia (lacking of axopodia) as well as the presence or absence of shell-like skeleton is characteristic of the *Rhizopoda*. According to the mode of pseudopod formation this class naturally falls into three orders: *Lobosida*, *Filosida* and *Granuloreticulosida* (corresponding to subclasses according to Loeblich and Tappan 1961). The orders just mentioned, more or less correspond to the orders *Amoebida*, *Testacea* and *Foraminifera* resp., which are usually met in textbooks on protozoology.

The isolation of the subclass or class *Actinopoda* being equal by its position with the *Rhizopoda* implies that the protozoa united into this group (*Radiolaria*, *Acantharia*, *Heliozoa*) are in close relation with each other and were originated from a common ancestor. It can be proposed and proved by numerous data for the *Radiolaria* and *Acantharia*, while it cannot be said in relation to the *Heliozoa* showing a number of characters which make this group much different from both *Radiolaria* and *Rhizopoda*. The *Heliozoa* differ from *Radiolaria* (and *Acantharia*) by absence of a central capsule and by some peculiarities of multiplication. No flagellous gametes were found in them, a vegetative form usually turns into a sexual one, the gametes appear copulating in pairs. Their sexual process proceeds according to pedogamy (or pair-merogamy). These characters are so peculiar that to combine heliozoans and radiolarians into one group seems absolutely impossible. Such a combination would not have reflected phylogenetic relationships existing between the protozoa in question. The heliozoans differ from *Rhizopoda* by their radial

symmetry, axopodia and sexual process in the same degree as they differ from *Radiolaria*; consequently the combination of the heliozoans and radiolarians into the same subclass would have been artificial. Thus, the maintenance of the group *Actinopoda* becomes useless because it does not reflect natural relationships between its representatives. In this respect, the breaking up of the *Sarcodina* into three equal natural groups of subclasses rank: *Rhizopoda*, *Heliozoa* and *Radiolaria*, seems to be most correct.

A question arises on the taxonomic position of acantharians among the sarcodina. In 1926 Schewiakoff pointed out the great difference of the acantharians from the other radiolarians but he kept the former at subclass rank among the latter. Further on, a number of authors (Trégouboff 1953, Kudo 1954, Hall 1953, Corliss 1962) separated the *Acantharia* into an independent group opposing it to the radiolarians. The reason of this opposition was constituted by the fact that the central capsula of acantharians ($\frac{2}{3}$ of *Acantharia* species possess the capsula), unlike that of the radiolarians is neither chitinoid nor perforated one, but represents a thickened cytoplasmic membrane having the same chemical composition as the cytoplasm. Skeletal elements of the acantharians are formed by radially spreading needles, according to the Müller's law. The skeleton of acantharians is characterized by anisotropy and is composed of celestin (SrSO_4) while that of the radiolarians is made of SiO_2 and isotropy is characteristic of it. Skeletal needles of the acantharians penetrate the central capsule and originate within it, while the skeleton of other radiolarians is of extra-capsular nature. The acantharians possess axopodia which are not found in other radiolarians. Finally, the acantharians are known to have a hydrostatic apparatus functioning by means of myofibrils which pull the extracapsular plasma over the skeletal framework; all this is absent in other radiolarians.

Is the set of characters just mentioned sufficient for the separation of the acantharians from the radiolarians into an independent group, or the acantharians are to be thought radiolarians representing an independent group within the latter? In other words, the question is whether the acantharians and radiolarians originated from certain common ancestors in the process of divergence, or at first some primitive radiolarians with a number of their common characters had appeared, and the divergence occurred later within this group giving raise for acantharians as well as for other groups of radiolarians.

The second supposition is likely more correct. There is a number of facts which allow to include the acantharians as a subordinated group into the subclass *Radiolaria*. The presence of the central capsula is the most essential feature that permits to unite the acantharians with other radiolarians. Though the central capsula is absent in some lower acantharians the latter like other radiolarians possess a well-developed mighty layer of gelatinous cytoplasm or kalymma covered with sarcodictyum and besides their pseudopodia are stretching out of the surface of inner cytoplasm adjoining the kalymma. In other words, general scheme of body organization into different layers in acantharians without the central capsule coincides with that in other radiolarians.

A study of the structure of skeletal elements carried out by Dogiel 1951 on some lower *Spumellariida* confirm the belonging of acantharians to the subclass *Radiolaria*. It was noticed that in the intracapsular plasma of pri-

mitive spumellarians from the group *Sphaerozoa*, especially of *Collosphaera*, there are crystals of celestin (SrSO_4) which is a component of acantharians skeletal elements. In some forms (*Sphaerozoum*), the presence of those crystals is combined with presence of skeletal silica (SiO_2) rods in extracapsular plasma. In the body of *Thalassicola* (spumellarian without the skeleton) the crystals in shape of doubled druses resembling those of celestin have been also found. Thus, the representatives of the lower *Spumellariida* are capable to synthesize both SiO_2 and SrSO_4 . In consequence, it is possible to suppose that the common ancestors possessed that capability which has been kept in the most primitive forms of the present-day radiolarians. The form close to the spumellarians might have served as a common root for all radiolarians.

Further on, a divergence of radiolarians into two directions occurred. One kind of groups (*Nassellariida*, *Phaeodariida*) lost the ability to synthesize SrSO_4 and became exceptionally silicious one while the others (*Acantharia*) lost, on the contrary, the capability to synthesize SiO_2 and became celestinous ones. The presence of numerous large crystals of celestin in the central capsule of *Collosphaera* (*Spumellariida*) may serve as a serious confirmation of a possible origin of *Acantharia* from the primitive *Spumellariida*. Indeed in the acantharians a bundle of skeletal needles appear within the central capsule, i.e. in the precise spot where in *Collosphaera* crystals of celestin are formed. It is rather likely that those crystals were gathered in the center of the capsule and became grow outside its limits which has resulted in the establishment of a skeleton peculiar for acantharians. Thus, the difference of the *Acantharia* from the *Radiolaria* consisting in the skeleton type (intracapsular in the former, extracapsular in the latter) is effaced in case of the lower spumellarians and, as a result, an important phylogenetic relationship between the acantharians and spumellarians is being discovered.

One more similarity between the acantharians and some radiolarians is to be pointed out. The presence of axopodia in the acantharians is one of their peculiar features. Whereas the axopodia develop also in some lower spumellarians as well as in a peculiar radiolarian *Stycolonche* which was separated by Dogiel 1951 into a special order within the *Radiolaria* (*Stycolonchea*). Thus, the features of similarity mentioned above between the acantharians and lower spumellarians are not accidental but reflect historic relationships of those groups of *Protozoa* and testifies to the possibility of combination of the acantharians and other radiolarians into the same subclass.

At the same time, there is no doubt that the acantharians should be opposed to all other groups within the subclass. It is the correct idea which was supported by Schewiakoff 1926. Enriques 1931 isolated acantharians into one special group *Birefringentia* on the basis of anisotropy and birefringence of skeletal needles. This group (to our mind corresponding to a superorder rank) was opposed to the other group *Monorefringentia* possessing isotropic spiculas and monorefringence which includes the nassellarians, spumellarians and phaeodarians established as subordinate groups (orders). The phaeodarians must be stressed to differ from other radiolarians by rather essential characters, such as the presence of a very particular concretion in a special region of the central capsule — phaeodium and the presence of a hollow or tubular skeleton. The spumellarians and nassellarians are known

to have compact needles and no phaeodium. In essence, these differences are not less than those between acantharians and other radiolarians. The most ancient phylogenetic group within radiolarians is represented by primitive *Spumellariida* (*Callosphaeridae*) which initiated both *Birefringentia* (*Acantharia*) and *Monorefringentia*. Among the latter the *Nassellariida* are the most close related with *Spumellariida* (D o g i e l 1951).

The question of the systematic position of the piroplasmae and theilerians among the sarcodina seems rather complicated. Some authors united them with sarcodina (C o r l i s s 1962) or even separated into an individual class *Haemamoeba* (P i e k a r s k i 1954) in the *Plasmodroma*. The relationship between piroplasmae and sarcodina was stressed by R e g e n d a n z u n d R e i c h e n o w 1933 and this view-point was supported in latest investigations made by C h e i s s i n i M u r a t o f f 1959 and P o l j a n s k y i C h e i s s i n 1959 who presented some additional data in favour of such supposition. The authors showed that piroplasmae do not possess a sexual process which is characteristic of *Sporozoa* and that due to this fact they cannot be united with the latters. Absence of the kinetids in piroplasmae and theilerians does not permit their inclusion into the class *Flagellata*. C o r l i s s 1962 placed the piroplasmae (established by him as subclass *Piroplasmata*) in the class *Sarcodina*. C h e s s i n 1963 included the piroplasmae into the class *Sarcodina* but established them as an independent order within the subclass *Rhizopoda*. The reasons to support this view-point are the following: the mode of movement of agamonts (ameboid one by means of lobopodia and filopodia), localization both in red blood cells of the vertebrates and in tissues of the tick, presence of asexual multiplication only (budding, multiple division, cross-division). Peculiarities of their developmental cycle as well as of their mode of life in a vertebrate host and in the tick vector have obligatory led to the isolation of piroplasmae in a special group among the *Sarcodina*. The piroplasmae are most of all close related to the naked amoebae and they are possibly those sarcodina which have changed their mode of life and turned to the parasitic existence in blood. This might be rather the same case as of *Haemosporidia* and *Haemogregarina* within *Sporozoa* that became red cell parasites, however, keeping their phylogenetic relationships with the intestinal *Sporozoa*.

It is difficult to say now whether the theilerians might be considered as sarcodina because the life cycles of the former have been not yet studied enough. According to S e r g e n t e t a l. 1945 the developmental cycle of *Theileria dispar* includes a sexual process realized as isogamic copulation followed by formation of „sporoblasts” and „sporozoites”. However, from the authors’ description it may be hardly concluded whether the authors themselves saw the copulation of gametes or they only assumed its real existence. G o n d e r 1910 found a sexual process in *T. parva*. R e i c h e n o w 1940 while studying the same parasite taken from the tick body failed to show any stages which might be thought to correspond either to gametes or to zygotes. The theilerians unlike the piroplasmae possess a multiple division in cells of reticulo-endothelium system. Besides, the theilerians are not capable to transovarial transmission in ticks. Temporarily theilerians can be kept among sarcodina within the order *Piroplasmata*. However, this is not to be thought as a final decision of the question on the taxonomic

position of these protozoa and further examination of their life cycles is absolutely necessary. Neitz and Jansen 1956 suggested to include the theilerians established as the order *Leucosporidia*, into the order *Coccidiida*. To our mind, such an inclusion seems rather untimely because the sexual process of theilerians (if it is right described) has nothing in common with that of coccidians.

The *Sporozoa* are the third class within *Plasmodroma*. This class includes the gregarinae and coccidians and seems enough uniform. Its extent after exclusion of piroplasmae (and probably theilerians), sarcosporidians, toxoplasmae and haplosporidians seems to be limited by two natural groups established as two subclasses — *Gregarina* and *Coccidia*. Previously, the *Sporozoa* were divided into two subclasses — *Telosporidia* and *Neosporidia* (Doflein 1909, Calkins 1926, Kudo 1931, Dogiel 1951). But the latter do not belong to the *Sporozoa* (Cheissin 1956) while the size of the former corresponds, in fact, to that of *Sporozoa* proper. At present time, to call this subclass by its old name — *Telosporidia* (Levine 1961) seems hardly advisable. This was possible only in case when the class *Sporozoa* was believed to embrace both *Telosporidia* and *Neosporidia*. At that very time the two terms within *Sporozoa* were opposed to each other. Now, the term *Telosporidia* in respect to gregarinae and coccidians has lost any value. Therefore, it seems rather right that the name *Sporozoa* Leuckart 1879, well-known and habitual in science should be re-established for the protozoa in question.

Levine 1961 united the *Sporozoa* with *Haplosporidia* and separated them into a new subphylum *Euspora*. Such establishment of subphylum seems artificial to a certain degree and absolutely unnecessary. Really, the combination of the *Sporozoa* (or according to Levine — *Telosporidia*) and *Haplosporidia* appears rather formal, because the very presence of „spore” in these protozoa does not testify to their relationships. The origins of the spores in *Sporozoa* and *Haplosporidia* are quite different, these stages being not homologous, therefore the „spore” cannot serve as uniting feature. Besides, the sexual process in *Haplosporidia* is likely to be absent while its presence is quite characteristic of the *Sporozoa*. It is difficult to determine the taxonomic position of *Haplosporidia* though it is quite probable that they are not protozoa at all but certain fungi. In any case they are not representatives of the *Sporozoa*.

Thus only one class *Sporozoa* has been left in in the established subphylum *Euspora* (or according to Levine — *Telosporidia*), and characteristic of this class fully coincides with that of the subphylum *Euspora*. The question arises, is there any sense in separation of a special subphylum *Euspora*? We have mentioned above that the *Sporozoa* represent a natural group of parasitic protozoa phylogenetically related to the *Mastigophora*. Due to the likeness with the latter in peculiarities of their multiplication and nuclear apparatus the *Sporozoa* are united together with the *Mastigophora* and *Sarcodina* in a single subphylum *Plasmodroma*. Keeping all this in mind, we do not think it possible to separate the *Sporozoa* into a special subphylum because this separation would not reflect their natural phylogenetic relationships with other *Protozoa*, in particular with the *Mastigophora*.

The name *Sporozoa* seems to be not a very good one because it makes one think that a stage of the spore represents their most important feature. This term arose first when the oocyst was taken for the spore. In fact, the *Gregarina* like *Haemosporidia* and some *Eimeriidea* possess no spores. However, the change of the name of class seems rather not rational. Formation of the zygocyst or oocyst in the metagamic period of life is characteristic of the *Sporozoa*. In the life cycles of the *Sporozoa*, the alternation of sexual process and sporogony or that of sexual process, sporogony and repeated asexual multiplication by means of schizogony occurs. All the developmental stages but zygote are haploid ones because the meiosis usually appears during the process of sporogony followed by formation of sporozoites. The sexual process is realized by means of formation of iso- and anisogametes and their following copulation. Male gametes as a rule have flagella or flagella-like shapes.

Levine, however, characterized the *Sporozoa* as organisms possessing spore of simple structure with „one to many sporozoites but without polar filaments”. By doing so, the signs of *Sporozoa* are compared with those of the *Cnidosporidia* and opposed to them. As we mentioned above, presence of spore and the structure of the latter is not characteristic of *Sporozoa*. Spores are lacking by almost a half of all *Sporozoa*. Besides, it seems scarcely right to characterize a subphylum (or class) by means of a feature which originated as the secondary protective adaptation. The actual comparison between spores of the *Sporozoa* and *Cnidosporidia* is not absolutely advisable because those structures have nothing in common with each other except their name (Cheissin 1956). Thus, the structure of spores and their real presence may not be thought as the main feature of the *Sporozoa*.

The other character — presence of a „vesicular type of nucleus” (Levine 1961) — cannot either be assumed as a basis for differentiation of major taxonomic categories, because vesicular type of nuclei are met in all groups of *Protozoa* belonging to the *Plasmodroma*, and their distribution is not in connection with taxonomic position. Absence of flagella and cilia (except for flagellated microgametes in some groups) as well as absence of conjugation (Levine 1961) is characteristic not only of *Sporozoa*. At the same time, the presence of flagella in gametes stress the close relation between *Sporozoa* and *Mastigophora*, while the absence of conjugation is peculiar for all *Plasmodroma* including *Sporozoa* which should not be isolated into a special subphylum.

The division of the class *Sporozoa* into subclasses and orders does not provoke any significant differences of opinions. The *Sporozoa* fall naturally into two subclasses: *Gregarina* and *Coccidia* (according to Doflein-Reichenow into two orders). They differ from each other by the mode of the sexual process. In *gregarinae*, the gametogenesis proceeds equally whether the formation of male or female gametes (or gametes of opposite sex in case of isogamy) occurs. A single gamont gives rise to an equal number of gametes of either sex. A multiple division results in formation of a great number of gametes. The gamonts are usually united in syzygies on covering with a shell (gamontocyst stage). The subclass *Gregarina* falls into two orders: *Schizogregarinida* and *Eugregarinida*, the existence of both being out of question.

In the subclass *Coccidia*, gametogenesis proceeds in two different ways on formation of male and female gametes. A female gamonts give rise only to a single macrogamete because in this case the progamic division is omitted. By means of multiple division, one microgamont gives rise to some (2—4) or even many microgametes (to some thousands). A pronounced anisogamy usually takes place.

Some authors who divided the *Sporozoa* into *Telosporidia* and *Neosporidia* distinguished three orders within the subclass *Telosporidia*: *Gregarina*, *Coccidia* and *Hemosporidia* (Hartmann 1923, Hoare 1949, Dogiel 1951). However, Hall 1953 established the latter order as a subclass. But, at present time there are no valid reason to separate the haemosporidians into special order or subclass, and a number of authors (Cheissin 1956, Levine 1961, Corliss 1962) unite them as a subordinate group of *Coccidia*. The developmental cycle of haemosporidians as well as the sexual process is fully correlated with that of other coccidians. Thus, the inclusion of haemosporidians into subclass *Coccidia* (or into this order, according to Dogiel and others) could hardly provoke a discussion at present time.

According to Levine 1961 the subclass *Coccidia* (*Coccidiasina*) includes two orders: *Protococcidiorida* and *Eucoccidiorida*, the latter being divided into three suborders: *Adeleorina*, *Eimeriorina* and *Haemosporidina*. Corliss 1962 separated *Haemosporidia* into a special order equal to the two orders established by Levine. On the other hand, Cheissin 1956 divided subclass *Coccidia* into three following orders: *Protococcidiida*, *Adeleida* and *Coccidiida*, the latter including two suborders: *Eimeriidea* and *Haemosporidiidea*. The separation into a special order of *Protococcidiida* which lack schizogony and possess extracellular developing gamonts is undoubtful.

What is to be done with the rest of coccidia — whether they should be gathered in one and the same order *Eucoccidiorida* or be divided into two orders *Adeleida* and *Coccidiida*? The assumption of the existence of one order makes one believe that the group sharing it must possess equal degrees of relationship and thus three directions of their development. However, the likeness between the *Haemosporidiidea* and *Eimeriidea* is much more expressed (which might reflect their closer phylogenetic relationship) than that between these two groups, on one hand, and the *Adeleida*, on the other hand. The *Adeleida* differ essentially from the two former groups by the fact that their gamonts develop in pairs (in form of syzygy) and only 2—4 microgametes originate. Thus *Adeleida* represent one of evolutionary trends of coccidians providing the adaptation to life in cells of different organs, blood cells included. The other evolutionary direction of the coccidians was realized in an independent development of gamonts and formation of a large number of microgametes, especially, in forms developing intracellularly (*Eimeriidea*). Gamonts of the *Haemosporidiidea* also develop independently but in connection with extracellular development of gametes occurring in the invertebrate host's intestine, the number of microgametes appears not great (6—12). Thorough examination of life cycles and localization inside the host of *Coccidia* belonging to suborders *Eimeriidea* and *Haemosporidiidea* allowed to come up to a rather probable supposition as concerns the possible origin of blood sporozoans from the intestinal ones belonging to the suborder *Eimeriidea* (Dogiel 1951, Dogiel, Poljansky i Cheissin 1962). Not dwelling any longer on this

question, we shall note that this fact testifies to an important phylogenetic relationship of the *Eimeriidea* and *Haemosporidiidea*. Thus, it is possible to assume that within the subclass *Coccidia* the evolutionary development occurred in three directions corresponding to the three orders: *Protococcidiida*, *Adeleida* and *Coccidiida*. Within the latter order, intestinal forms appeared at first, and only then the blood parasites. Such phylogenetic development is being reflected in the scheme suggested where the subclass *Coccidia* is formed by three orders: *Protococcidiida*, *Adeleida* and *Coccidiida*.

The system of *Ciliophora*

Over a hundred years passed since the classical studies made by Claparède et Lachmann 1858, 1861 who laid a basis for the taxonomy of ciliates. Within this period of time the ideas in this field have been changed to a great extent because much was done in respect to thorough investigation of organization and developmental cycles of ciliates. However, in work of Stein 1867 some orders were set up which existence is admitted still up to now (*Holotricha*, *Heterotricha*, *Peritricha*); besides the significance of ciliary apparatus structure and organization of both buccal apparatus and adoral field for establishment of major taxa (subclasses and orders) within ciliates was put forward.

Further extending of our knowledge in the field of morphology of ciliates, with special reference to the structure of ciliary apparatus, the elaboration of the doctrine of infraciliature (Chatton et Lwoff 1930) and life histories, all this resulted in a marked increase of the number of large taxa in comparison with those admitted by older authors. So, due to studies made by Chatton et Lwoff 1935 the independence of the order *Apostomatida* was firmly substantiated. These authors established and thoroughly investigated the order *Thigmotrichida*. They have separate a peculiar group of sessil ciliates *Chonotricha* into an independent taxon, at least by a rank as great as order.

Originally single order *Oligotricha* (Bütschli 1889), when thoroughly examined, falled naturally into three groups of equal rank: *Oligotricha*, *Tintinoida* (Kofoid et Campbell 1929) and *Entodiniomorpha* (Reichenow 1929). A study of sapropell fauna of ciliates (Wetzel 1928, Kahl 1932) allowed to separate (Corliss 1961) from order *Heterotrichida* an independent order *Ctenostomatida* (= *Odontostomatida*), possessing to a certain degree some clear morphological features.

A comparative morphological study constituted the basis for separation of ciliates into two subclasses — *Holotricha* and *Spirotricha* which is shared now by all present protozoologists. Presence or absence of the adoral zone of membranelles serves as a firm basis for the characteristics of those subclasses.

Almost all the enumerated orders of the *Ciliata* represent well outlined natural groups. The case is rather different as concerns order *Astomatida* constituted only by parasitic ciliates which are characterized and united due to common peculiarities: absence of the mouth and, as a result, osmotic kind of nutrition. Puytorac 1954 might be right when he pointed out a combined character of this group which, despite everything, is to be kept in the system. Some *Astomatida* (*Dogielella*) are likely to be in close relation to *Tetrahyme-*

nidae as it was convincingly showed by Lom 1959. The other *Astomatida* are thought to have undoubtful phylogenetic relationships with the *Thigmotrichida*. The largest part of the *Astomatida* parasitizing in the intestine of the annelides, mainly of *Oligochaeta*, represent a rather natural group which is betokened by the structures of their ciliature, skeleton, forms of multiplication etc. Thus it is possible that in future some genera will have to be excluded out of the *Astomatida* and to be joined to other groups by which the order *Astomatida* will gain much in its natural character.

The problem of systematic position and taxonomic rank of three groups of ciliates — *Peritricha*, *Chonotricha* and *Suctorina* — needs special discussion. At present time, phylogenetic relationships between the *Peritricha* and *Thigmotrichida* (a family *Ancistridae*, in particular) can be considered to have been established. This view-point which has been developed for a long time by Fauré-Fremiet 1910 has gained some additional confirmation (Fauré-Fremiet 1962). Electron microscope studies showed that both scopula and stalk of *Peritricha-Sessiliida* is nothing else than modified cilia corresponding to the thigmotactic cilia localized at the interior body part of the *Thigmotrichida*.

The phylogenetic modifications on the way from *Thigmotrichida* to *Peritricha* were rather complicated and connected with the position of the mouth as well as with body axes. The process in question was thoroughly examined by Fauré-Fremiet and therefore we do not think it necessary for us to go here into details. The establishment of relationships undoubtedly existing between the *Thigmotrichida* and *Peritricha* made some authors (Fauré-Fremiet 1950, Corliss 1961, 1962) include the *Peritricha* into the subclass *Holotricha* as order.

In previous system, the taxonomic rank of the *Peritricha* was qualified much higher, their place in the system being of equal value with that of the *Holotricha* and *Spirotricha* (Kudo 1954, Kahl 1935, Doflein-Reichenow 1953, Dogiel 1951) and they were never thought a group within the *Holotricha*. To our mind, the latter viewpoint is the most correct one. On their evolutionary way the *Peritricha* have diverged so much from other groups that the differences between them and rest of *Holotricha* (*Thigmotrichida* including) appeared to overstep the limits of main peculiarities characteristic of the *Holotricha*.

This accounts for the fact why our American colleagues found themselves in a difficult situation when they proposed general characteristics of *Holotricha* in their „Preliminary Scheme of Classification of Protozoa” distributed for discussion among the members of the 1st Conference of Protozoologists in Praha. Indeed, having stated the main features defining the subclass *Holotricha* they had to make a reservation „except in one order (*Peritricha*)”. The question arises what is the value of the whole definition if one rather widely spread and rich in species group does not fit it? There seems from our point of view only one way to be correct: to consider the *Peritricha* as an independent subclass within the *Ciliata*.

This class may obtain rather clear and precise characteristics: presence of a peristomal field limited by a left-turned (but not a right-turned as in case of the *Spirotricha*) double adoral ciliary zone, absence of cilia on the rest of body surface, a pseudo-longitudinal division, presence of a stalk (in *Sessiliida*)

or a posterior girdle of cilia (in *Mobiliida*), in most cases anisogamic conjugation, a peculiar type of nuclear apparatus reconstruction on conjugation (7 Ma-anlagen and 1 Mi); all these features characterize the subclass *Peritricha* clearly and precisely. A possible phylogenetic relationship between the *Peritricha* and *Thigmotrichida* cannot shift their position. Indeed, we do not reckon birds among reptilia although the presence of phylogenetic relationship in this case is absolutely out of question and both the groups have much in common as concerns their organization. While definition of taxonomic rank of any group is made, the extent of divergence reached in the course of evolution should be taken into consideration. From this point of view, all necessary reasons are available to consider the *Peritricha* as an independent subclass because differences between this group and the *Holotricha* are much more pronounced than those between the orders (*Gymnostomatida*, *Trichostomatida*, *Hymenostomatida* etc.) within the subclass *Holotricha*. The very presence of a ciliary girdle in migratory larval forms reminding a bit some *Holotricha* are to be considered as recapitulation of ancestral characters in ontogenesis.

All mentioned above may be in equal degree applied to the *Chonotricha* as well. This group, small but extremely peculiar in respect to its organization, was first considered within the *Peritricha*, the arguments being that both the groups include sessile organisms. However, morphological studies of the *Chonotricha* showed that the latter group has nothing in common with the *Peritricha* as concerns its structure by which fact the *Chonotricha* had to be separated as an independent group (Wallengren 1895). Phylogenetically, the *Chonotricha* are probably to be related with primitive *Holotricha* (*Gymnostomatida*) which is betokened by the structure of their mouth apparatus and by ciliature of migratory larval forms (Guilcher 1948, 1951). At the same time a most peculiar character of *Chonotricha* such as absence of the ciliary apparatus (with exception of the inner part of the peristome), the presence of a particular, complicated cytoplasmic „funnel”, a peculiar form of budding as well as a number of other peculiarities, all these features do not permit to share the view-point represented by Fauré-Fremiet, Corliss and other authors who had established these ciliates as one of orders within the subclass *Holotricha*. Taking into consideration the extent of morphological, developmental and ecological distinctions, the *Chonotricha* are to be placed on the same level with *Holotricha* and *Spirotricha*, i.e. they must be thought as one of the subclasses of *Ciliata*.

The position of the *Suctorina* in the system of the *Ciliata* is considered in different ways. Previous authors (Bütschli 1889, Calkins 1933) opposed this group to all *Ciliata* and divided the class *Infusoria* into two subclasses: *Ciliata* and *Suctorina* or established both *Ciliata* and *Suctorina* as two independent classes within the subphylum *Ciliophora* (Wenyon 1926, Kudo 1954, Jírovec 1953, Piekarski 1954). Studies on developmental cycles of the *Suctorina* as well as on their ciliature, which remaining is of short duration in the course of their ontogenesis, demonstrated the close relation of the *Suctorina* to *Holotricha*. In our opinion the authors of some new systems run to extremes including the *Suctorina* directly into *Holotricha* as one of orders (Fauré-Fremiet 1950, Corliss 1962). We think it absolutely undoubtful that the differences of the *Suctorina* from other *Ciliata* are so deep and

Table 1

Suggested outline of the classification of the phylum *Protozoa*

Subphylum <i>PLASMODROMA</i> (= <i>Homocaryota</i>)	Subclass <i>Zoomastigina</i> Order <i>Choanoflagellida</i> Order <i>Protomonadida</i> Order <i>Kinetoplastida</i> Order <i>Polymastigida</i> Order <i>Hypermastigida</i> Order <i>Diplomonadida</i> Subclass <i>Opalinina</i> Class <i>Sporozoa</i> Subclass <i>Gregarina</i> Order <i>Schizogregarinida</i> Order <i>Eugregarinida</i> Subclass <i>Coccidia</i> Order <i>Protococciidiida</i> Order <i>Adeleida</i> Order <i>Cocciidiida</i>
Class <i>Sarcodina</i> Subclass <i>Rhizopoda</i> Order <i>Lobosida</i> Order <i>Piroplasmata</i> Order <i>Filosida</i> Order <i>Granuloreticulosida</i> Subclass <i>Heliozoa</i> Order <i>Actinophrydiida</i> Order <i>Centrochelidiida</i> Order <i>Desmothoracida</i> Subclass <i>Radiolaria</i> [Superorder <i>Birefringentia</i>] Order <i>Acanthariida</i> [Superorder <i>Monorefringentia</i>] Order <i>Spumellariida</i> Order <i>Nasselariida</i> Order <i>Phaeodariida</i> Order <i>Stycholonchida</i>	Subphylum <i>CILIOPHORA</i> (= <i>Heterocaryota</i>)
Class <i>Cnidosporidia</i> Order <i>Myxosporidiida</i> Order <i>Microsporidiida</i> Order <i>Actinomyxidiida</i>	Class <i>Ciliata</i> (= <i>Infusoria</i>) Subclass <i>Holotricha</i> Order <i>Gymnostomatida</i> Order <i>Trichostomatida</i> Order <i>Hymenostomatida</i> Order <i>Astomatida</i> Order <i>Apostomatida</i> Order <i>Thigmatrichida</i>
Class <i>Toxoplasmeata</i> Order <i>Toxoplasmatida</i>	Subclass <i>Spirotricha</i> Order <i>Heterotrichida</i> Order <i>Oligotrichida</i> Order <i>Tintinnoida</i> Order <i>Entodiniomorphida</i> Order <i>Odontostomatida</i> (= <i>Ctenostomatida</i>) Order <i>Hypotrichida</i>
Class <i>Mastigophora</i> Subclass <i>Phytomastigina</i> Order <i>Chrysomonadida</i> Order <i>Silicoflagellida</i> Order <i>Coccolithophorida</i> Order <i>Cryptomonadida</i> Order <i>Heterochloridida</i> Order <i>Chloromonadida</i> Order <i>Euglenoida</i> Order <i>Phytomonadida</i> Order <i>Dinoflagellida</i>	Subclass <i>Peritricha</i> Order <i>Sessiliida</i> Order <i>Mobiliida</i> Subclass <i>Chonotricha</i> Subclass <i>Suctorina</i>

significant that their inclusion into the *Holotricha* results in their characteristics lacking any certainty and clearness. Absence of the ciliature in adult stages, presence of an absolutely particular mode of nutrition and connected with this development of sucking tentacles of a complex structure, a peculiar form of budding — all this makes us establish the *Suctoria* as a taxon of higher rank — subclass.

The similarity of the ciliature of the migratory larval forms of the *Suctoria* with *Holotricha* cannot serve as good basis for its inclusion into the latter subclass, but can indicate their belonging to the *Ciliophora*. In the organization of migratory larval forms as well as of the *Peritricha* the recapitulation of ancestral features is to be followed which occurs in the process of ontogenesis. Thus, the *Suctoria* phylogenetically related with *Holotricha* (quite probable with *Gymnostomata*) must be established from our viewpoint as an independent subclass within the *Ciliata*.

On the grounds of all said above, we suggest that the class *Ciliata* should be divided into five following subclasses: *Holotricha*, *Spirotricha*, *Peritricha*, *Chonotricha* and *Suctoria*. Two former subclasses on their turns are divided into some orders (see the scheme of classification in the Table 1).

The comparison of our proposals in relation to the system of the *Ciliata* with those set forth in the „Preliminary Scheme of Classification” proposed by the Society of Protozoologists reveals no pronounced basic differences. In the „Preliminary Scheme” only 2 subclasses of *Ciliata* are pointed out, while the other groups are established as orders. We thought to be necessary to hold some groups of the *Ciliata* up to the rank of subclasses and this resulted in establishing of five subclasses within the *Ciliata*.

S u m m a r y

The aim of this paper is to continue the discussion on the problems of systematics of *Protozoa* initiated in the 1st International Conference on Protozoology held in Prague, in August 1961.

Some data are reconsidered and the opinions of authors are developed as concerning the system of the phylum *Protozoa* treated on the level of large taxa.

The view is put forward that all the representatives of the phylum *Protozoa* are naturally grouped into two subphyla: *Plasmodroma* and *Ciliophora*, which essentially differ from each other in the character of their sexual processes and in the structure of their nuclear apparatus.

The view is expressed that within the subphylum *Plasmodroma* 5 classes exist: *Sarcodina*, *Cnidosporidia*, *Toxoplasmatea*, *Mastigophora*, *Sporozoa*. *Piroplasmata*, showing most similitudes to the naked *Rhizopoda*, are included as an order into the first class. The position of *Theileriida* in the system remains still not elucidated. Evidences are discussed in favour of isolation a separate subclass *Radiolaria* (including *Acanthariida*), like the subclass *Heliozoa*, in the class *Sarcodina*. Consequently the existence of a systematic group *Actinopoda* is denied. *Cnidosporidia* are considered as belonging to *Protozoa*, being most related to *Sarcodina*. *Opalinina* are included into the class *Mastigophora* as a subclass since their structure and reproduction processes give

no reason to leave them in *Ciliophora*. The revision of the subclass *Zoomastigina* and its division into 6 orders (cited in the general survey of the system included to this paper) is discussed. The class *Sporozoa* — related phylogenetically to *Mastigophora* — is left within the subphylum *Plasmodroma* and not isolated as a separate subphylum. From the class *Sporozoa*: *Cnidosporidia*, *Haplosporidia*, *Toxoplasmatea*, *Piroplasmida* are excluded.

As to the subphylum *Ciliophora*, the view is expressed that 5 subclasses exist in it, and that groups like *Peritricha*, *Chonotricha* and *Suctorina* cannot be included into the subclass *Holotricha* and should remain in the range of subclasses. The existence of ciliature in the crawling forms of those ciliates coincides with the same character in *Holotricha*, however, it is only the recapitulation of the ancestral features.

РЕЗЮМЕ

Данная статья печатается в порядке обсуждения и представляет собой продолжение дискуссии по вопросам систематики, начало которой было положено на I-ой Международной Конференции по протозоологии, состоявшейся в Праге в августе 1961 г.

В работе приводятся соображения авторов и материалы, касающиеся вопроса системы на уровне крупных таксонов в пределах типа *Protozoa*. По мнению авторов статьи все представители типа *Protozoa* естественно группируются в два подтипа: *Plasmodroma* и *Ciliophora*, между которыми имеются существенные различия в характере полового процесса и в строении ядерного аппарата.

Высказывается мнение, что в пределах подтипа *Plasmodroma* имеется 5 классов: *Sarcodina*, *Cnidosporidia*, *Toxoplasmatea*, *Mastigophora*, *Sporozoa*. В состав первого класса, в качестве отряда включаются *Piroplasmata* имеющие наибольшее сходство с голыми *Rhizopoda*. Положение в системе *Theileriida* остается еще не ясным. Приводятся обоснования для выделения в классе *Sarcodina*, наряду с подклассом *Heliozoa* особого подкласса *Radiolaria*, в состав которого включаются *Acanthariida*. Тем самым не признается существование особой систематической группы *Actinopoda*. В отношении *Cnidosporidia* высказывается мнение о их принадлежности к *Protozoa* и наибольшей близости к *Sarcodina*. В класс *Mastigophora* включаются на уровне подкласса *Opalinina*, строение и размножение которых не позволяет оставлять их среди *Ciliophora*. Проводится ревизия подкласса *Zoomastigina* и обосновывается разделение его на 6 отрядов, указанных в общем систематическом списке, приложенном к статье. Класс *Sporozoa*, имеющий филогенетические связи с *Mastigophora* сохраняется в пределах подтипа *Plasmodroma* и не выделяется в особый подтип. Из состава класса *Sporozoa* исключаются *Cnidosporidia*, *Haplosporidia*, *Toxoplasmatea*, *Piroplasmata*.

В отношении подтипа *Ciliophora* высказывается мнение о наличии 5 подклассов в этом подтипе и о невозможности включения в подкласс *Holotricha* такие группы, как *Peritricha*, *Chonotricha* и *Suctorina*, которые сохраняются в ранге подклассов. Отмечается, что наличие цилиатуры у бродяжек этих инфузорий, сходной с таковой *Holotricha*, отражает лишь рекапитуляцию анцестральных признаков.

REFERENCES

- Biocca E. 1956: Alcune considerazioni sulla sistematica dei protozoi e sulla utilità di creare una nuova classe di protozoi. *Rev. Brasil. Malariol.* 8, 91—102.
- Bütschli O. 1889: *Protozoa*. In Bronn: Klassen und Ordnungen der Thier-Reichs 1, 1098—2035.
- Calkins G. 1933: *The biology of the Protozoa*. London.
- Chatton E. et Brachon S. 1936: Le cinétome de l'*Opalina ranarum*, sa continuité génétique et son importance en égard à l'évolution des appareils ciliaires. *C. R. Acad. Sci.* 202, 713—716.
- Chatton E. et Lwoff A. 1935: Les Ciliés Apostomes. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 77, 1—453.
- Chatton E. et Lwoff A. 1949: Recherches sur les Ciliés Thigmotriches. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 86, 169—253.
- Chatton E. et Villeneuve S. 1937: La division de la bouche et la formation du peristome chez les Peritriches (*Cylochaeta astropectinis* n.sp.). *C. R. Acad. Sci.* 404, 538—546.
- Cheissin E. M. 1956: O sisteme sporovikov (Klass *Sporozoa*). *Zool. Žurn.* 35, 1281—1298.
- Cheissin E. M. 1963: O položenii piroplasm v sisteme prostejših. *Trudy Inst. Eksp. Vet.* 25 (in press).
- Cheissin E. M. i Mosevich T. N. 1960: Nekotorye dannye po elektronnoj mikroskopii merozoitov *Eimeria intestinalis* iz tonkoj kiški krolika. *Citologija* 3, 34—39.
- Cheissin E. M. i Muratoff E. 1959: Cikl razvitija *Piroplasma bigeminum* v kleščah *Boophylus calcaratus*. *Zool. Žurn.* 38, 970—986.
- Claparède E. et Lachmann J. 1858: *Études sur les infusoires et les rhizopodes*. Genève.
- Corliss J. 1955: The opalinid infusorians: flagellates or ciliates? *J. Protozool.* 2, 107—114.
- Corliss J. 1959: Comments on the Systematics and Phylogeny of the *Protozoa*. *Syst. Zool.* 8, 169—190.
- Corliss J. 1962: Taxonomic procedures in classification of *Protozoa*. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 12, 37—67.
- Doflein F. und Reichenow E. 1929, 1953: *Lehrbuch der Protozoenkunde*. Jena.
- Dogiel V. A. 1951: *Obščaja protistologija*. Leningrad.
- Dogiel V. A., Poljansky G. I. i Cheissin E. M. 1962: *Obščaja protozoologija*. Leningrad.
- Enriques P. 1932: Saggio di una classificazione dei Radiolari. *Arch. Zool. Torino*, 16, 978—994.
- Epshtein G. 1930: *Patogennye prostejšie, spirohety i gribki*. Moskva.
- Fauré-Fremiet E. 1910: La fixation chez les Infusoires ciliés. *Bull. Sci. France Belgique* 45, 27—50.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Morphologie comparée et systématique des Ciliés. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 75, 109—122.
- Fauré-Fremiet E. 1962: Étude au microscope électronique des ultrastructure d'*Epistilis anastatica* (Cilié Peritriche). *J. de Microsc.* 1, 287—312.
- Garnham P., Baker J. and Bird R. 1962: Fine structure of cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Brit. Med. J.* 1, 83—84.
- Garnham P., Baker J. and Bird R. 1962: The fine structure of *Lankesterella garnhami*. *J. Protozool.* 9, 107—114.
- Garnham P., Bird R. and Baker J. 1960: Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 54, 274—278.
- Gollerbach M. i Poljanskij V. 1951: *Presnovodnye vodorosli i ih izučenie*. Moskva.
- Gonder R. 1910: Die Entwicklung von *Theileria parva*, dem erregter des Küstenfiebers der Rinder in Afrika. *Arch. Protistenk.* 21, 143.
- Grassé P. (Edit.) 1952, 1953: *Traité de Zoologie*, I (1 et 2). Paris.
- Grassé P. 1960: Les Myxosporidies sont des organismes pluricellulaires. *C. R. Acad. Sci.* 251, 2638—2640.
- Grell K. 1956: *Protozoologie*. Berlin.

- Guilcher J. 1951: Contribution à l'étude des Ciliés Gemmipares, Chonotriches et Tentaculifères. Ann. Sci. Nat., Zool. S. 11, 33—132.
- Hall R. 1953: Protozoology. New York.
- Hartmann M. 1907: Das System der Protozoen. Arch. Protistenk. 10, 1—35.
- Hoare C. 1949: Handbook of Medical Protozoology. London.
- Honigberg B. 1961: A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. Proc. 1st Conf. Protozool. Prague (in press).
- Huff C. and Gambrell E. 1934: Strains of *Plasmodium cathemerium* with and without gametocytes. Am. J. Hyg. 19, 404—415.
- Jírovec O., Wenig K., Fott B., Bartoš E., Weiser J. a Šramek-Hušek R. 1953: Protozoologie. Praha.
- Kahl A. 1931: Urtiere oder Protozoa. In: Die Tierwelt Deutschlands. Jena.
- Knowles R. and Das Gupta B. 1932: A study of monkey malaria and its experimental transmission to man. Ind. Med. Gas. 67, 300—320.
- Kofoed C. and Campbell A. 1929: A conspectus of the marine and fresh-water ciliates belonging to the suborder *Tintinnoidea* with descriptions of new species principally from the Agassiz Expedition to the Eastern Tropical Pacific. Univ. Calif. Publ. Zool. 34, 1—403.
- Kudo R. 1954: Protozoology. Illinois.
- Kursanow S. i Komarnickij N. 1945: Kurs nisših rastenij. Moskva.
- Levine N. 1961: Problems in the systematics of the „Sporozoa”. J. Protozool. 8, 442—452.
- Loeblich A. and Tappan H. 1961: Suprageneric classification of the rhizopodea. J. Paleontol. 35, 245—330.
- Lom J. 1959: A contribution to the knowledge of astomatous Ciliates. Věstn. Českosl. společ. zool. 23, 200—210.
- Ludvik J. 1958: *Toxoplasma gondii* im Elektronoptischen Bilde. Das Medicin. Bild 1, 59—61.
- Ludvik J. 1958: Elektronenoptische Befunde zur morphologie der Sarcosporidien. Zentr. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. 172, 330—350.
- Noble E. 1943: Nuclear cycles in the protozoan parasite *Myxidium gasterostei* n. sp. J. Morphol. 73, 281—292.
- Pearse A. (edit.) 1936: Zoological Names. A list of Phyla, Classes and Orders. Duke University Press.
- Piekarski G. 1954: Lehrbuch der Parasitologie. Berlin.
- Poljansky G. I i Cheissin E. M. 1959: Nekotorye nabljudenija nad razvitiem *Babesiella bovis* v klešče perenosčike. Izv. Karelskogo filiala Akademii Nauk SSSR, 14, 5—13.
- Puytorac P. de 1954: Contribution à l'étude cytologique et taxonomique des infusoires astomes. Ann. Sci. Nat., Zool. S. 16, 85—270.
- Raabe Z. 1958: An attempt of a revision of system of *Protozoa*. Ann. Univ. M. Curie-Sklodowska. Sect. C 3, 259—276.
- Regendanz P. und Reichenow E. 1933: Die Entwicklung von *Babesia canis* in *Dermacentor reticulatus*. Arch. Protistenk. 79, 50—71.
- Reichenow E. 1940: Der Entwicklungsgang des Küstenfiebererregers im Rinde und in der Übertragenden Zecke. Arch. Protistenk. 94, 1—56.
- Schewiakoff W. 1926: Die *Acantharia* des Golfes von Neapel. Fauna a. Flora Golfes Neapel Monogr. 37.
- Sergent E., Donatien A., Parrot J. et Lestoquard F. 1945: Étude sur les piroplasmoses bovines. Alger.
- Stein F. 1867: Der Organismus der Infusionsthier nach eigenen Forschungen in systematischer Reihenfolge bearbeitet. II. Leipzig.
- Tregouboff G. 1953: Classe des Acanthaires. In: Grassé P. (Edit.), Traité de Zoologie, I, fasc. 2.
- Wallengren H. 1895: Studier ofver *Ciliata* infusorier. II. Slagtet *Heliochona* Plate, slagtet *Chilodochona* n.g., slagtet *Hemispeira* Fabre-Domergue. Acta Univ. Lund. 1895, 77.
- Wenyon C. 1926: Protozoology. London.
- Wetzel A. 1928: Der Faulschlamm und seine ziliaten Leitformen. Z. Morphol. Ökol. Tiere 13, 181—328.
- Yakimoff W. 1931: Bolezni domašnih životnyh vyzivaemye prostejšimi. Moskva-Leningrad.

Janina DOBRZAŃSKA-KACZANOWSKA

Comparaison de la morphogenèse des Ciliés:
Chilodonella uncinata (Ehrbg.), *Allosphaerium paraconvexa* sp. n.
et *Heliochona scheuteni* (Stein)

Porównanie morfogenezy orzęsków: *Chilodonella uncinata* (Ehrbg.), *Allosphaerium paraconvexa* sp. n. oraz *Heliochona scheuteni* (Stein)

L'étude présente comprend des recherches comparatives sur la morphogenèse divisionnaire de certains Ciliés de l'ordre *Gymnostomata*: *Chilodonella uncinata* (Ehrbg., 1838) et *Allosphaerium paraconvexa* sp. n. de la famille *Chlamydomontidae* (sous-ordre *Cyrtophorina*), ainsi que d'un Cilié de l'ordre *Chonotricha*, de la famille *Stylochonidae*: *Heliochona scheuteni* (Stein, 1854).

Les phénomènes morphogénétiques chez les Ciliés sont liés à quelques processus biologiques comme: régénération, réorganisation, reproduction, formation de monstres et la métagenèse des formes coloniales. L'idée même de morphogenèse a sa source dans les recherches embryologiques.

„La morphogenèse dans le sens stricte” — comme l'écrit Waddington 1957 — englobe l'organisation des masses de tissus (ou chez les Protozoaires, les parties de cellules) en structure homogène à caractère propre qu'on peut appeler organe anatomique.

Ce phénomène peut être accompagné d'une différenciation de structure, bien que dans ce cas il s'agisse déjà d'un autre processus.

Chez les Métazoaires, l'oeuf fécondé constitue un nouvel individu. Il subit la phase de segmentation et de multiplication des cellules. L'organisation de ces cellules constitue la période de morphogenèse. Donc ces cellules constituent les unités fondamentales qui subissent l'organisation, alors que l'ensemble du processus porte un caractère nettement épigénétique.

Pour les Ciliés, le terme de morphogenèse peut généralement être défini en tant que changements des formes et des structures au cours de l'ontogenèse du Cilié (ou pendant quelques ontogenèses dans des cas particuliers). Dans la morphogenèse divisionnaire des Ciliés, on remarque un trait particulier: pour autant la morphogenèse chez les Métazoaires s'effectue après la période d'individualisation, autant chez les Ciliés au sein d'individu parent s'effectuent des processus composés de la division de l'appareil nucléaire, de la morphogenèse, et ce n'est seulement qu'alors que se séparent les individus-fils. La morphogenèse, en général, s'effec-

tue donc pendant la période précédant l'individualisation des individus-fils. La constriction équatoriale sépare les Ciliés qui étaient dans une grande mesure déjà preformés.

De quelle façon s'effectue la réorganisation de la structure du Cilié différencié — telle est la question qu'on se pose en étudiant le mécanisme de la morphogénèse — comment deux individus-fils peuvent se former en copiant la structure du parent? On sait cependant que la division du Cilié englobe des changements définis de l'appareil nucléaire et ensuite des processus de l'individualisation des individus-fils.

Fauré-Fremiet 1948 affirmait déjà la disparition d'un seul champ morphogénétique en faveur de deux autres, disposés l'un après l'autre et cela est un élément essentiel de l'individualisation des individus-fils. Les connaissances que nous possédons sur les principes de la formation des champs et les unités structurales qui subissent l'organisation ainsi que sur les agents d'activation de ce processus sont minimales. Cependant, une série d'observations prouve que ces processus sont en rapport avec la surface corticale et le système pelliculaire doué d'une grande autonomie. On sait également que la polarisation des champs morphogénétiques est conforme à la polarisation de l'individu parent, avec quelques exceptions cependant dans le groupe *Suctorina*.

En général, la polarisation du Cilié dépend des cinéties alors que le champ morphogénétique a la forme d'un champ „anarchique” des cinétosomes qui subissent la réorganisation au cours de la morphogénèse (Lwoff 1950). L'influence des cinéties sur la polarisation et l'architectonique du Cilié est démontrée par la tendance à prolonger le cours des cinéties dans l'individu-fils, donc à la division percinétienne homothétigénique.

Chez les représentants de la famille *Chlamyodontidae*, comme également dans d'autres familles apparentées, on observe une discontinuité génétique nette des cinéties pendant la bipartition. Les cinéties ne sont donc pas seules à constituer l'élément déterminatif de l'architecture des individus-fils. En effet Fauré-Fremiet 1950 constate chez ces Protozoaires, pendant leur division, un retour au type primitivement cilié, après quoi seulement s'effectuent différents processus de régulation provoquant la formation définitive des cils des formes descendantes. De cette façon, et en conséquence de la reconstruction de tout le modèle, pendant la division, et ensuite du processus de régulation, il existe des perturbations dans la continuation des différentes cinéties.

Les recherches de Guilcher 1951 ont prouvé la véritable parenté des Protozoaires du groupe *Cyrtophorina* et de l'ordre *Chonotricha*. Cependant, il existe une différence essentielle dans la morphogénèse divisionnaire des deux groupes comparés. Chez les *Chonotricha* le bourgeonnement a lieu. Toute la ciliature somatique de bourgeon se forme indépendamment de la ciliature de l'individu parent. Sur la surface corticale nue de l'individu parent se forme, d'une façon tout à fait indépendante, le champ morphogénétique. Ce petit primordium, aussi bien avant qu'après le bourgeonnement, passe par plusieurs phases de développement menant à la formation structurale de l'individu parent. Donc, chez les *Chonotricha* s'accroît le caractère épigénétique du développement.

Les tâches principales de ce travail sont contenues dans les points suivants:

1. Description détaillée de la morphologie et de la morphogenèse des Ciliés étudiés.
2. Observation des rapports réciproques entre les processus nucléaires et corticaux qui constituent l'individualisation des individus-fils. Analyse du mécanisme même de la séparation des individus-fils.
3. Comparaison du type de morphogenèse divisionnaire des Ciliés primitifs (Ciliés du groupe *Cyrtophorina*) et même du bourgeonnement chez les *Chonotricha*.
4. Comparaison de la morphologie des représentants des *Gymnostomata* primitifs et avancés du point de vue évolutionnaire, ainsi que l'analyse des causes et du caractère du changement dans le plan structural des différentes formes. Indication des étapes de l'évolution de la structure des Ciliés, visibles dans les formes actuellement connues.
5. Essai des suggestions concernant la phylogenèse, basé sur la morphologie comparative et la morphogenèse, ainsi que l'indication sur cette base, de certaines conclusions systématiques.

J'ai le plaisir d'exprimer ma reconnaissance à M. le Professeur Zdzisław Raabe pour son patronage et son intérêt dans ce travail. Je remercie vivement M. le Professeur F. Pautsch et les autres chercheurs travaillant à la Station Biologique à Górki Wschodnie. Je suis très reconnaissant à M. Z. Żmudziński et à M. K. Jażdżewski pour leur aide en détermination des espèces amphipodes. J'exprime également ma gratitude à mon mari M. A. Kaczanowski pour son aide constant au cours des recherches.

Documentation et méthodes

La plupart des observations concernant toutes les espèces indiquées, ont été faites *in vivo* à l'aide du contraste-phase négatif et de l'objectif d'immersion $\times 90$.

La documentation est constituée par des photos. Malheureusement certaines phases sont très courtes et les Protozoaires sont pourvus d'une telle grande motilité qu'il n'a point été possible de les photographier dans leur médium. Les *Allospheerium* et *Heliochona* ont été également observés dans le champ noir, ceci afin de suivre le mouvement des cils déplaçant une émulsion. Les préparations ont été fixées par le liquide de Schaudinn et colorées par de l'hématoxyline d'après Heidenhain. Les espèces du genre *Allospheerium* ont été argentées par la méthode humide, selon la modification de Corliss 1953, tandis que celles de *Chilodonella* ne l'ont été que par la méthode sec de Klein 1926, méthode très rapide et sûre, surtout quand il s'agit du genre *Chilodonella*.

La réaction Feulgen d'après Pearse 1957, a été appliquée aux préparations étendues sur du verre. Les résultats de ces recherches ne sont d'ailleurs confirmés ni par des essais de contrôle, ni par d'autres méthodes de coloration sélective et pour cela ils ne sont considérés que comme une simple méthode morphologique — tenant compte des doutes de l'interprétation.

La sécrétion des mucoprotéides par les pedunculus d'*Allospheerium* a été confirmée par la coloration, selon la méthode de Mallory, d'après Baginiński 1952.

Les espèces étudiées provenaient de:

1. *Chilodonella uncinata* — et pour comparaison *Chilodonella labiata* (Stokes, 1891) et *Chilodonella cucullulus* (O. F. M., 1786) — avaient leur origine dans les cultures provenant des réservoirs aquatiques naturels et des bassins de filtration de Varsovie. On cultive facilement les Protozoaires à l'aide de nutriment de Hogué d'après Mac Dougall 1925. Les changements dans l'appareil nucléaire n'ont pas été étudiés dans le genre *Chilodonella*.

2. Les Protozoaires du genre *Allospiraerium*; de nombreuses espèces dont on a étudié l'*Allospiraerium paraconvexa* sp.n. se trouvent dans le groupe caractéristique des Protozoaires-commensaux apparaissant dans la courbe de la carapace et entre les pattes des talitrus des plages (*Amphipoda*, *Talitridae*). En Pologne, j'ai étudié les Protozoaires qui vivent sur le *Talitrus saltator* (Montagu, 1808) et *Orchestia cavimana* Heller, 1865. Les *Talitrus saltator* provenaient des algues de la plage du golfe de Puck ainsi que de la plage maritime de la péninsule Hel (département de Gdańsk, côté sud de la Baltique). Les *Orchestia cavimana* existent en masse entre les roches de la digue de l'embouchure d'un bras de la Vistule Martwa Wisła à Górkki Wschodnie près de Gdańsk. Les Protozoaires étaient rincés des talitrus par l'eau provenant du terrain. Ils pouvaient être conservés dans ce milieu, dans de bonnes conditions durant quelques heures.

3. *Heliochona scheuteni* (Stein, 1854) ont été trouvées sur les pattes des *Gammarus zaddachi* (Sexton, 1912), Spooner 1947, dans les eaux riveraines, près de l'embouchure de la Martwa Wisła à Górkki Wschodnie près de Gdańsk. Les gammarides étaient pêchées près de la digue à 1 km de l'embouchure de la Vistule dans la Baltique¹.

Morphologie et morphogénèse du système cortical de *Chilodonella uncinata* (Ehrbg., 1838) Strand, 1926

Historique

L'espèce des eaux douces décrite sous le nom de *Chilodon uncinatus* a été présentée par la suite par de nombreux auteurs comme un élément ordinaire de la faune littorale des lacs et des petits réservoirs aquatiques. Cependant, il y a eu des cas où l'on a trouvé cette espèce sur des animaux aquatiques vivants et morts. Elle a toujours été, avec tout son genre, rattachée à la famille des *Chlamyodontidae*. Les recherches cytologiques les plus importantes sont de: Mac Dougall 1925, 1929, 1931 et 1936, de Seshachar 1950 (recherches sur la biologie et la conjugaison), de Ivanić 1933 et 1938 (recherches sur la morphologie et la morphogénèse des structures superficielles), de Klein 1926, 1928 et 1942, de Chatton et al. 1931, et de Fauré-Fremiet 1950.

Morphologie

Corps ovale, aplati dorsoventralement. Grandeur 40—90 μ . La ciliature se présente sur la surface ventrale isolée morphologiquement en deux systèmes

¹ Il semble que la contagion, aussi bien des talitrus que des gammarides, se fait par le contact direct des hôtes. La vie en groupe des gammarides sur les roches de la côte et la présence de nombreux talitrus dans le même couloir de sable, ainsi que leur copulation de longue durée, enfin le développement de jeunes sur le corps de la femelle (aussi bien chez les gammarides que chez les talitrides), assurent d'assez longs contacts qui maintiennent l'expansion de la contagion.

des cinéties séparés par une zone nue. Dans l'axe médiane de la partie antérieure, du côté ventral, se trouve le cytostome, enveloppé par une nasse comprenant 8 à 12 trichites. Par devant, le cytostome est enveloppé par des cinéties courbées du système droit de ciliature ventrale. Juste avant la cavité orale se trouve la ciliature orale composée de deux cinéties circumorales et d'une cinétie oblique préorale bien plus longue.

Le système droit de la ciliature ventrale est composé de cinq cinéties dont l'extérieure est beaucoup plus courte et apparaît seulement sur l'avant, n'atteignant pas la région équatoriale. Cette cinétie ne prend pas part à la bipartition, alors que pendant la division elle succombe entièrement au proter. Mac Dougal 1936 a conclu que chez *Ch. uncinata* de Concarneau cette cinétie externe est absente. Une courte cinétie transversale, sans cils apparaissant dans la partie antérieure du côté dorsal de cette espèce, provient également du système droit.

Le système gauche des cinéties est nettement dyssymétrique; il se compose de cinq cinéties. Deux d'entre elles, les extrêmes, à savoir celles qui se trouvent le plus à l'intérieur et à l'extérieur, n'existent pas dans la région équatoriale. La cinétie externe ne prend pas part à la division, par contre la petite cinétie intérieure apparaît seulement à l'arrière du corps et joue un rôle essentiel dans les processus de morphogenèse divisionnaire. Le macronucleus sphérique se trouve dans la partie postérieure du corps. C'est un macronucleus hétérogène avec la partie achromatique située au centre. A proximité du macronucleus se trouve un petit micronucleus.

Le Protozoaire se nourrit de plantes et il est aussi saprophage qui mouille la nourriture absorbée par le cytostome, sans avoir formé auparavant de vacuole alimentaire (Dragesco et Fauré-Fremiet 1958, Dragesco 1962, Fauré-Fremiet et al. 1962).

La description de la morphogenèse divisionnaire du système cortical, présentée par Klein 1928, se différencie de la description de la division chez la même espèce d'après Chatton et al. 1931 en ce qui concerne la succession des phénomènes, ainsi qu'interprétation de l'origine de la ciliature orale. Klein considère que toutes les cinéties orales ont leur origine dans le système gauche de ciliature, alors que la cinétie préorale oblique résulte du nouveau „anlage” provenant du système gauche de ciliature ainsi que de toute la cinétie externe, la plus courte de ce système, séparée dans l'opisthe, pendant la division. Chatton et al. 1931, et plus tard Fauré-Fremiet 1950, ont tendance à accepter que seulement deux cinéties proviennent du système gauche dans le voisinage de l'ouverture buccale, tandis que la cinétie orale oblique proviendrait du système droit de ciliature.

En raison de la vitesse de division, la question d'établir la succession des phénomènes dans la morphogenèse est plutôt compliquée. Toutes les incertitudes de ce genre seront par la suite soulignées dans la description de mes propres recherches.

Bipartition

Avant la division, on observe un allongement important du corps et l'augmentation du nombre de corpuscules basales dans les cinéties. À ce moment, le nombre de corpuscules basales dans certaines cinéties est presque doublé (donc autrement que chez *Glaucoma chattoni* — d'après Frankel 1961). L'augmentation du nombre de corpuscules basales n'est pas proportion-

nelle dans toutes les cinéties; elle est beaucoup plus intensive dans le système droit que dans le système gauche. La multiplication des cinétosomes dans la cinétie externe du système droit ne s'effectue pas du tout, et elle est inhibée dans la cinétie interne, ce qui entraîne la raréfaction des cinétosomes dans cette cinétie, dans la région du futur ligne de scission ou bien tout juste devant, ou derrière cette région. Dans le système gauche des cinéties, l'accroissement le plus intensif des cinétosomes et le plus grand allongement vers l'avant sont remarquables dans la cinétie courte interne qui, avant la bipartition même, atteint la région équatoriale.

Les premiers symptômes de l'approchement de la bipartition sont: 1. délimitation de deux petites cinéties parallèles, juste avant la région équatoriale, à l'extérieur du système droit de la ciliature; 2. l'allongement de la cinétie interne du système gauche, un peu avant la région équatoriale; 3. formation à nouveau d'une cinétie antérieure parallèle de compensation, dans la région appartenant à l'opisthe. Cette cinétie se forme encore d'avantage à droite (donc sur la surface nue située entre les deux systèmes) par rapport à la cinétie interne allongée décrite au point 2 (d'après Ch a t t o n et al. 1931, c'est la cinétie 12).

La succession de l'apparition de ces symptômes de la bipartition peut être variable. L'ancienne cinétie allongée, interne, du système gauche (c'est-à-dire la cinétie 12 d'après Ch a t t o n et al. 1931) se fragmente en trois segments: 1. le court segment antérieur de cette cinétie se trouve tout juste avant la région équatoriale et constitue la cinétie de compensation pour le futur proter; 2. le deuxième segment est plus long et grossit fortement. Ce segment présente un autre caractère de mouvement et constitue un des segments de la future ciliature orale de l'opisthe. Néanmoins, ce segment se forme bien au dessous du futur sillon de division; 3. enfin le troisième segment va constituer l'avant-dernière cinétie (comptant depuis le champ médiane entre les systèmes) du futur opisthe (la cinétie 12 devient la 11' d'après Ch a t t o n).

De même la cinétie de compensation du système gauche, formée à nouveau sur la surface nue entre les systèmes, se divise en deux segments; l'antérieur constituera la cinétie la plus interne, circumorale, du futur opisthe, alors que le postérieur restera en tant que cinétie complétant le modèle de la ciliature de l'opisthe (il complète le nombre de cinéties du système gauche, prenant place de la cinétie extrême extérieure de ce système, qui ne se divise pas et n'apparaît pas dans l'opisthe, se maintenant seulement dans le proter).

Enfin le troisième segment oral se différencie en conséquence d'une double interruption de la cinétie suivante du système gauche, comptant à partir du champ nu.

Dans ce stade l'observation in vivo démontre nettement deux segments parallèles de cinéties orales. La troisième cinétie orale, la plus interne, n'est pas aussi épaisse et reste un peu en dehors de la région équatoriale. Deux segments oraux, nettement isolés, se courbent progressivement dans la direction de la surface nue, entre les systèmes. Ce n'est que plus tard que le troisième segment interne est tordu et entraîné par les segments qui se courbent. Ce stade est exactement illustré sur les planches de *Ch. uncinata* présentées par Klei n 1942, mais il n'est pas analysé par l'auteur sous ce point de vue.

Il semble donc que les trois cinéties de ciliature du système gauche forment trois segments de ciliature orale. Cependant, nous ne connaissons pas les

mécanismes de la formation de nouvelles cinéties; on ne peut donc pas exclure l'hypothèse de la formation de deux segments oraux, provenant de la rupture longitudinale d'un segment oral. Cependant, les photos, observations et recherches comparatives inclinent plutôt à rejeter cette possibilité.

En même temps que toutes les cinéties du système gauche s'interrompent (à l'exception de la cinétie externe qui ne prend pas part à la bipartition), se produit un allongement marqué de la cinétie du système droit, accentué surtout dans la région équatoriale, entraînant la pénétration de ces cinéties

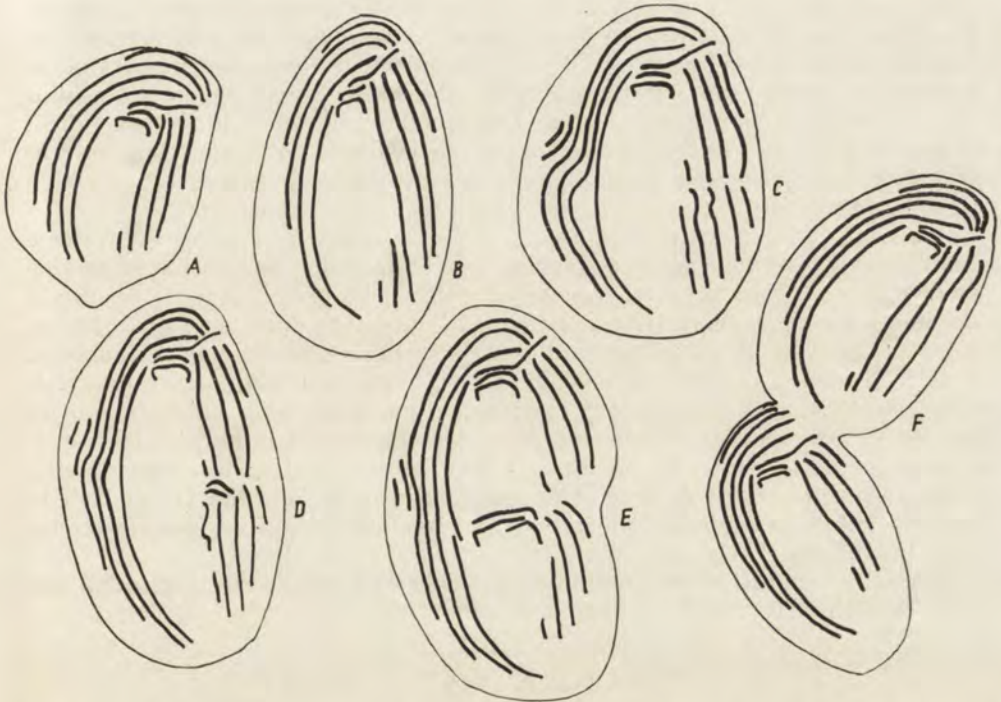


Fig. 1. Bipartition et formation de la ciliature buccale chez *Chilodonella uncinata* Ehrbg. (dessin schématisé d'après les préparations argentées)

vers le champ nu, juste avant l'équateur. La cinétie interne de ce système ne subit pas l'allongement, ni la convexité, et de ce fait s'interrompt facilement.

Cette cinétie, d'après Ch a t t o n et al. 1931, ainsi que F a u r é - F r e m i e t 1950, devait donner naissance à une cinétie oblique orale. En réalité, cette cinétie s'interrompt vers l'arrière du futur sillon de division. J'ai rencontré aussi un cas d'une double rupture, avec pour conséquence, l'isolation de ce secteur, dans le centre. Il semble que ce phénomène peut être expliqué par l'action mécanique liée à la raréfaction des cinétosomes sur cette cinétie et, d'autre part, par une forte augmentation des autres cinéties de ce système.

D'ailleurs, les faits suivants appuient une telle interprétation. À l'endroit de la rupture de cette cinétie (c'est-à-dire près de l'arrière du futur sillon de division) apparaît la région du futur cytostome de l'opisthe; par contre,

tout le segment antérieur, déjà pendant la division du proter et de l'opisthe, est courbé dans la partie antérieure du proter et constitue toujours l'arc le plus long dans le système droit de ciliature. On rencontre des cas où la ciliature orale est complètement formée, alors qu'aucun changement ne soit encore survenu dans le système droit.

Les processus suivants sont liés à la séparation du proter et de l'opisthe. Le sillon de division se forme asymétriquement. Le sillon pénètre depuis le bord gauche du corps, alors que système gauche des cinéties du futur opisthe subit un fort enfouissement vers le côté droit de la partie ventrale. Deux segments oraux parallèles se déplacent simultanément vers la droite et un peu vers l'arrière. Un enroulement se forme autour du cytostome rigide et grossissant. En conséquence de cet enroulement, les segments oraux se trouvent à l'avant du cytostome, alors que le troisième segment, le plus interne, subit également la torsion. Les cinéties allongées du système droit se gonflent par dessus les cinéties orales de l'opisthe entraînant une asymétrie signifiante du système de ciliature des deux individus, par rapport à la ligne de la scission.

Ce n'est que dans cette période que s'interrompent les cinéties du système droit, un peu au dessus de la région équatoriale. Le sillon de division se dessine en partant du bord droit du corps, au début peu profondément, ensuite il „peigne” la cinétie du système droit avant l'ouverture orale du futur opisthe, alors que chez le proter les extrémités des cinéties de ce système se courbent, dans la direction du bord gauche du corps, symétriquement par rapport au sillon de division. Enfin, le pont cytoplasmique joint uniquement la région des extrémités distales du système droit des cinéties du proter à l'apex dissymétrique de l'opisthe. Le processus irrégulier de la division des individus-fils entraîne le glissement de la cinétie orale oblique de l'opisthe (11 ou 10') le long du sillon de division; elle prend une position définitive, comme si elle était la continuation de la cinétie interne du système droit.

Après la séparation des individus, on n'observe pas de réorganisation des cinéties orales du proter.

Morphologie et morphogénèse de l'*Allosphaerium paraconvexa* sp. n.

Historique

La genre *Allosphaerium* a été créé par Kidder and Summers 1935 pour le groupe de cinq espèces de Ciliés rapprochés, qui se présente en tant que commensale sur la carapace et sur les pattes des *Talitrus* de plage (*Amphipoda*, *Talitridae*) du golfe d'eau douce de Woods Hole en USA. Ces auteurs ont également décrit dans leur travail suivant, en 1935, le cours de la division de l'espèce *A. convexa*. Ils ont décrit les espèces suivantes: *A. palustris*, *A. convexa*, *A. caudatum*, *A. sulcatum*, *A. granulosum*. Kidder and Summers 1935, ont analysé la position systématique de ce genre; ils ont cherché les parentés avec le genre *Lophophorina* Penard 1922 et avaient tendance à créer une nouvelle famille *Lophophorinidae*, dans le cadre de l'*Hymenostomata*, ceci en raison de la présence de trois membranelles nettes, interprétées par eux comme correspondant du „tetrahymenium”.

Aussi bien Kudo 1947 que Corliss 1961, incorporent ce genre à la famille *Chlamyodontidae*, bien que sans aucune motivation. Dobrzańska

1961 suggère la parenté de ce genre, d'une part avec les *Chlamyodontidae*, d'autre part avec les *Chonotricha*.

Définition du genre

En conséquence des études, il convient d'indiquer la nouvelle définition de ce genre, ainsi que de corriger la description de la bipartition présentée par Kidder and Summers 1935.

Ciliata-Holotricha applatis dorso-ventralement. La ciliature limitée à un disque ventral évolué sur le côté ventral. L'ouverture orale à la forme de cytostome, et du fossette presque triangulaire („atrium orale" selon Corliss 1960) muni de trois haplocinéties à caractère de membranelles nettement intégrées et travaillant comme un tout. L'absence d'une nasse. Le pôle apical est déplacé sur le bord gauche du corps. Sur le disque ventral apparaît une différenciation des systèmes gauche et droit des cinéties dont quelques unes se recourbent en contournant l'ouverture orale et se terminant antérieurement en face des cinéties gauches. Il n'y a pas de surface nue entre les deux systèmes de cinéties. Il y a deux vacuoles pulsatiles (une exception) à topographie constante. Avant la vacuole pulsatile postérieure, autrement dit sur le bord de la face ventrale, en dehors des extrémités postérieures des cinéties du système gauche, il y a un net pedunculus. La morphogénèse rappelle en général son schème chez *Cyrtophorina*. Macronoyau hétéromère concentrique. Un micronoyau net se trouve devant le macronoyau. Les espèces nombreuses. Commensaux des *Talitridae* terrestres (sensu Gurjanova 1951 = *Talitridae* + *Orchestiidae*.) Trouvées dans les *Talitrus* de la côte atlantique de l'état Massachussets, USA (Kidder and Summers 1935), ainsi que dans les *Talitrus* dans la Baltique polonaise (Dobrzańska 1961). Les différentes espèces se ressemblent beaucoup. La différenciation des diverses espèces est basée sur les dimensions, le profil du corps, les caractéristiques de la pèlicule, le caractère de la granulation et sur le nombre des cinéties.

Allosphaerium paraconvexa sp.n.

La morphologie de cette espèce rappelle nettement la description de *A. convexa* Kidder et Summers, 1935. Malheureusement, la description précise de ces auteurs, malgré tout n'est pas suffisante pour certifier définitivement que l'espèce actuelle de la Baltique est la même que *A. convexa*.

Les Protozoaires trouvés par moi je décris comme une nouvelle espèce, car il sera éventuellement plus simple dans l'avenir d'établir la synonymie de ces deux espèces que de procéder à la révision de l'espèce *A. convexa* en cas de mélange de deux espèces effectivement isolées.

Allosphaerium paraconvexa se trouve en masse aussi bien chez le *Talitrus saltator* (Montagu), que chez l'*Orchestia cavimana* (Heller); il est le composant dominant du parasitofaune des deux hôtes. Chez l'*Orchestia cavimana* ce sont les Protozoaires à 13 cinéties sur la face ventrale qui dominent; par contre chez le *Talitrus* apparaît une population en principe identique, mais où domine la forme à 14 cinéties. Cependant, on rencontre aussi des formes à treize et quinze cinéties. Le manque d'une intervalle nette entre ces formes incline à reconnaître l'existence d'une seule espèce. Il semble que les écarts peuvent être liés aux phénomènes de populations et se tiennent dans les limites

de la variation individuelle. De même le manque ou la présence de la dernière cinétie du système gauche peut être rapporté aux modifications du cours de la division. Pendant la bipartition, la dernière cinétie peut ou non subir la division. Dans ce cas le proter pourrait posséder un nombre différent de cinéties que l'opisthe. Comme type, je décris la forme provenant du *Talitrus saltator*.

Morphologie

Corps aplati dorsoventralement, longueur du corps — 30 μ , largeur 20 μ . La face dorsale est complètement dépourvue de ciliature. Sur le côté ventral on rencontre un disque à 14 cinéties. L'ouverture orale se trouve dans la partie antérieure de côté ventral, un peu déplacée vers le bord gauche du corps. Le champ oral a la forme presque rhomboïde, à largeur plus longue (5 à 7 μ) que la hauteur (4 à 5 μ). Sur le fond de cet atrium oral, il y a un cytotome. Des monocinéties caractéristiques attirant la nourriture se trouvent devant le cytotome.

Ces membranelles sont à tel point intégrées que l'onde métachronique ne les traverse pas, mais elles frappent ensemble, comme une seule structure semblable à l'AZM ou aux cirri. L'intégration est tellement puissante que même quand les Ciliés meurent, ces membranelles ne se rompent pas en différents cils comme cela se passe dans des cas pareils chez d'autres Ciliés. Ces membranelles sont disposées l'une devant l'autre. Les cinéties qui constituent leur base se trouvent sur la voûte de l'atrium oral et sont fortement réfractées en arc. Il semble qu'une d'elle est interrompue et en effet quatre membranelles indépendantes peuvent agir. Les membranelles se meuvent de part et d'autre, rendant impossible l'écoulement d'eau non filtrée provenant de l'atrium oral. Les membranelles ont un profil triangulaire, donc les cils les plus longs se trouvent devant le cytotome, alors que les plus courts — sur le bord de l'atrium oral.

La ciliature est composée de deux systèmes, à savoir: huit cinéties du système droit, plus une rudimentaire rencontrée seulement des fois aux environs de l'apex, à l'extérieur des confins de la face ventrale, ainsi que cinq à sept cinéties du système gauche. Des huit cinéties du système droit, les trois externes (sans compter la cinétie rudimentaire) ont leur début sur le bord un peu concave du corps, à droite de l'ouverture orale, et l'enveloppent de façon arquée, par le devant; plus loin, ensemble avec les autres cinq cinéties qui prennent leur début juste avant l'ouverture orale, elles encerclent le bord de la surface ventrale et atteignent en arc doux le bord gauche de la face ventrale du Cilié. Toutes ces cinéties sont parallèles et se trouvent à des écarts égaux.

Cinq à sept cinéties du système gauche vont plus ou moins parallèlement par rapport au système précédent. Ces cinéties ont également leur début sur le bord inférieur de l'atrium oral. Comptant successivement depuis le centre vers l'extérieur, elles sont de plus en plus courtes et n'atteignent jamais au delà des confins du disque ventral. Les cinétosomes qui se trouvent sur les extrémités postérieures de ces cinéties sont un peu raréfiés, alors que ces extrémités mêmes sont orientées un peu obliquement par rapport à l'axe longitudinale du corps. Ceci donne l'impression comme si le bord inférieur de l'atrium oral soutenait ces cinéties. En général, toutes les cinéties sont très bien visibles dans le contraste-phase *in vivo*; il y a lieu d'admettre qu'elles

se trouvent dans les rainures de pellicule, tel que l'affirme K a n e d a 1959, chez *Chlamyodon pedarius*.

Le mouvement des Protozoaires est conforme aux observations d'une nage sur le fond des *Chlamyodon pedarius*, d'après K a n e d a 1960. Entre les cinéties du système droit et gauche n'existe pas de zone médiane nue. À $\frac{1}{3}$ de la longueur du corps, entre la deuxième et la troisième cinétie du système droit, transparait la vacuole pulsatile antérieure VP₁; dans la partie postérieure, sur le bord gauche du disque ventral, entre les extrémités des cinéties du système gauche se trouve la vacuole pulsatile postérieure VP₂. Les deux vacuoles sont nettement visibles du côté dorsal, mais leurs pores s'ouvrent du côté ventral.

VP₂ se trouve devant le pédoncle caractéristique aux propriétés de glande endoplasmique. Le pedunculus a la forme d'une tige inférieure courte servant à fixer le Protozoaire au fond. Après sa fixation le Cilié, se tourne uniquement autour du pedunculus. Sur les marges du corps apparaissent des inclusions réfractant fortement la lumière, complètement homogènes, à dimensions très diverses. Par contre, sur le terrain de l'endoplasme il n'y a pas de vacuoles nutritives différenciées.

L'appareil nucléaire se compose d'un micronucleus assez grand (2 μ de diamètre) qui se trouve sous l'ouverture orale et devant un grand macronucleus oval (long de 8 à 10 μ). Le macronoyau a une structure hétérogène; la partie achromatique homogène est enveloppée d'une couche de menues granules de chromatine, disposée sous la membrane nucléaire. Dans la zone chromatique on trouve encore de grandes spherules, très nombreuses surtout avant la bipartition. Il semble qu'elles correspondent aux nucléoles (K a n e d a 1960 et 1961, F a u r é - F r é m i e t 1957).

Bipartition

Les premiers symptômes de la bipartition sont les changements qui interviennent dans le macronucleus et la bipartition du micronucleus synchronisée à eux. Plus ou moins deux heures avant la séparation définitive des individus,

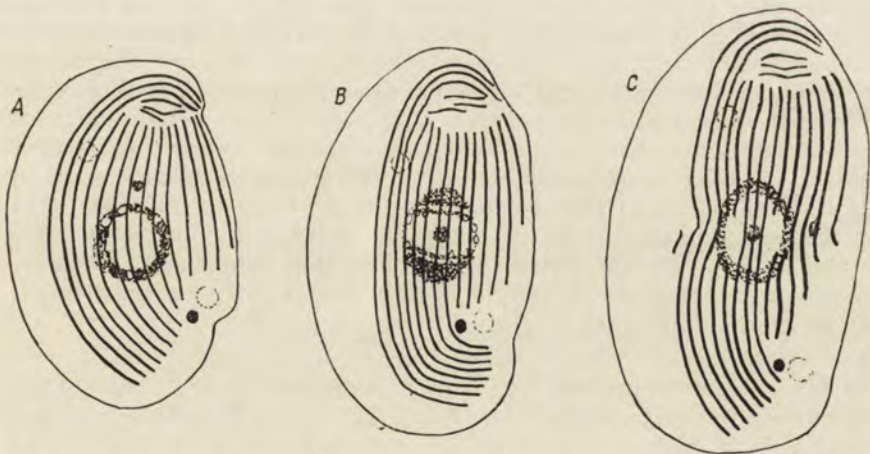


Fig. 2. Bipartition et formation de l'atrium oral avec la ciliature buccale chez *Allo-sphaerium paraconvexa* sp. n. (d'après les observations des Ciliés vivants)

apparaît dans le macronoyau un endosome net (ces données portent un caractère d'orientation, car cette période n'était observée que chez les protozoaires negeant dans l'eau). A partir du moment de la formation de l'endosome, le micronucleus se déplace sur le bord gauche du macronucleus et diminue dans sa région équatoriale. Ensuite, le micronucleus se divise dans la région du futur sillon de bipartition. Des changements essentiels surviennent également dans le macronucleus. L'endosome grandit beaucoup, alors que de nombreuses spherules un peu aplaties, aux dimensions variables, repoussant de menues granules de chromatine, se forment sous la membrane nucléaire. Après un certain temps, les granules de chromatine commencent à se grouper sur deux pôles opposés du macronucleus allongé.

Les spherules ainsi formées sont toujours présentes tout juste sous la membrane nucléaire, mais en plus certaines d'entre elles se trouvent à la zone delimitant les calottes de chromatine que se sont formées de la partie achromatique située centralement avec l'endosome. Simultanément, des deux côtes, à partir de cette limite entre la partie achromatique et les parties chromatiques, se forment les „reorganization bands”. Pendant la période d'environ une heure, ces deux „reorganization bands” passent par tout le secteur contenant la chromatine et disparaissent sur les pôles du macronucleus. Après le passage des „reorganization bands”, la résorption de l'endosome central devient en partie visible. Déjà dans cette période se forment des micronoyaux descendants et on peut observer dans l'infraclivature les premiers changements qui consistent dans l'allongement de l'individu et dans une forte croissance allométrique des trois cinéties externes du système droit, juste avant l'équateur. À leur droite, sur le bord de la face ventrale, dans la région équatoriale peut se former une courte cinétie possédant à peine quelques cinétosomes.

La multiplication locale des cinétosomes des trois cinéties externes est accompagnée, à cet endroit, d'un gonflement ventral de ces cinéties, ce qui, à son tour entraîne une tension et la rupture de la cinétie suivante (la quatrième) de ce système; à l'endroit de cette rupture, se forme un creux. Ce creux correspond à la région du future atrium oral et du cytostome. Presque simultanément (à différence de quelques minutes) les cinéties medianes du système gauche s'interrompent, à savoir: la neuvième, dixième et onzième en comptant du bord droit du corps. Ces cinéties forment successivement, dans la région équatoriale des segments de cinéties de la ciliature orale. Des segments oraux grossissent, perdent leur mouvement metachronique et se changent en membranelles, qui se remuent comme un tout. A partir de ce moment, les changements, aussi bien à l'intérieur qu'à la surface du macronucleus se produisent très rapidement. Donc, à partir de ce moment l'ensemble du processus jusqu'au moment de la séparation des individus descendants, dure à peu près 14—25 min. Cette différence est due uniquement à la durée du processus de séparation des individus, déjà formés, mais encore liés par une jonction cytoplasmique.

La substance chromatique, dans le macronucleus commence à encercler la partie achromatique avec l'endosome rudimentaire; en même temps, le macronucleus s'allonge et perd sa forme régulière. Il semble que pendant cette période la membrane nucléaire du macronucleus se dissout ou s'amollit, alors que dans la zone claire du halo, à côté du macronucleus peut s'effectuer l'échange d'éléments entre le noyau et le plasme. Le fuseau de bipartition

commence à se mettre en évidence dans le centre du macronucleus. En même temps, dans la région équatoriale, toutes les cinéties du système gauche s'interrompent. Donc les cinéties externes de ce système assez courtes détachent seulement quelques cinétosomes, composant la cinétie du futur opisthe. Il est possible que la dernière d'elles prenne obligatoirement part à la bipartition. Le rétrécissement du disque ventral, dans la région équatoriale, entraîne la position oblique des petites cinéties du futur opisthe dirigée vers le sillon de division.

Le sillon qui s'incise à la surface ventrale, partant du bord gauche, entraîne la torsion vers l'avant, des trois segments oraux. De même on observe la rupture de toutes les cinéties, sauf les trois externes du système droit, gonflées

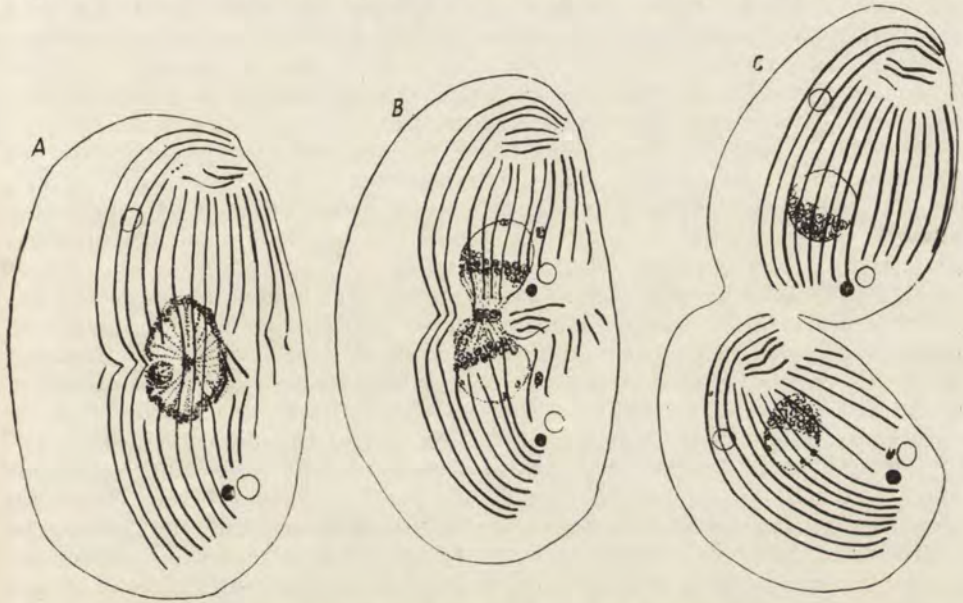


Fig. 3. Bipartition et formation de l'atrium oral et de la ciliature buccale chez *Allosphaerium paraconvexa* sp. n. (suite)

ventralement. En conséquence, les cinéties orales sont repoussées vers le terrain creux, jusqu'en dessous des trois cinéties du système droit. C'est là, la localisation définitive des cinéties orales de l'opisthe. A présent, le sillon divisionnaire à son tour, s'incise fortement en partant du bord droit, et de façon plus dorsale. De cette façon, la partie correspondant à l'opisthe, est fortement tordue et disposée angulairement par rapport au proter. En même temps s'accroît de plus en plus le repoussement des extrémités proximales du système gauche de ciliature et de l'ouverture orale de l'opisthe en les amenant en dessous des trois cinéties externes du système droit. Une courbure du macronoyau se rétrécissant, correspond également à la position réciproque en angle, du proter et de l'opisthe. La substance chromatique est divisée, alors que les parties achromatiques du macronucleus sont poussées vers les pôles opposées du macronucleus en état de bipartition. A cette période, apparaît déjà nettement la membrane nucléaire des macronoyaux descendants.

Un corps résiduel, en forme de petite sphérule, se colorant fortement et densifiée, à profil irrégulier peut apparaître sur la constriction équatoriale, joignant encore les macronoyaux descendants. Le sort de ce corps résiduel, décrit d'ailleurs chez l'*Allospiraerium* par Kidder and Summers 1935 n'est pas clair. Le corps résiduel peut être résorbé dans le cytoplasme, ou être divisé entre les macronucleus descendants; il peut enfin être éjecté, au moment de la séparation des individus descendants, en tant que grumeau se trouvant dans le pont cytoplasmique en rupture. Il me semble avoir eu réellement la possibilité d'observer toutes les variantes présentées ici.

La structure des macronoyaux, en principe est ségmentaire et réciproquement symétrique. Dans la dernière phase de la bipartition des individus-descendants, le sillon s'incisant du bord droit entraîne également la rotation vers la droite du macronucleus de l'opisthe. Ce retournement de 90°, est accompagné également par le regroupement de la substance chromatique, autant du macronoyau de l'opisthe, que du proter. De cette façon se reconstruit la structure normale interdivisionnaire du macronucleus.

Pendant la période de la bipartition des macronoyaux descendants, on remarque respectivement la formation à nouveau de VP₁ de l'opisthe et VP₂ du proter. L'activité de deux vacuoles parents, c'est-à-dire de VP₁ du proter et de VP₂ de l'opisthe, ne subit pas, pendant la bipartition, de perturbation ni de réorganisation visible.

De même, on n'observe pas, ni pendant, ni après la bipartition de réorganisation des cinéties orales du proter ou de réorganisation du pédoncle de l'opisthe. Par contre, le pédoncle du proter renaît, dans la phase relativement débutante de la bipartition. Le pédoncle a immédiatement un grand diamètre, caractéristique pour un individu complètement formé; il se forme dans le cytoplasme, d'une masse densifiée, mais n'est lié à d'aucunes cinéties.

Pendant la bipartition des individus descendants, intervient également le déplacement du micronucleus, vers les parties antérieures du corps. En même temps que les trois cinéties externes du système droit de l'opisthe se courbent au dessus de l'ouverture orale, la petite cinétie externe détachée est également emportée et déplacée sur le bord du disque ventral (pour autant que cette cinétie apparaît pendant la bipartition). La dernière jonction du proter et de l'opisthe est le rétrécissement entre le bord gauche de la surface ventrale, situé dans la partie distale du proter d'une part et la partie proximale de l'opisthe, d'autre part.

Les processus post-divisionnaires, soit: la reconstruction de la structure du macronucleus, le déplacement du micronucleus à sa place appropriée et la résorption de la "queue", représentant le reste de la jonction cytoplasmique dure environ une demie heure. Dans cette période, les individus s'allongent un peu, alors que chez l'opisthe l'ouverture orale se retrécit et s'enfonce d'avantage.

Morphologie et morphogenèse chez *Heliochona scheuteni* (Stein, 1854) Wallengren, 1895

Historique

L'espèce décrite par Stein 1854, en tant que *Spirochona scheuteni*, a été trouvée sur les Gammarides, dans les eaux saumâtres dans les environs d'Amsterdam. Plate 1888 a créé un nouveau genre *Heliochona* pour la nouvelle

espèce *H. sessilis*, trouvée sur les Gammarides des eaux saumâtres des environs de Wismar Bucht et des côtes de la Mer du Nord. Bütschli 1887—1889 établit la synonymie entre le genre *Heliochona* Plate et *Stylochona* Kent. L'unification de ces deux genres n'est pas reconnue par les chercheurs suivants à cause de la grande différence de la structure des pédoncles. Bütschli classe son genre *Heliochona* dans le cadre des *Peritricha*. Wallengren 1895 décrit de nouveau les deux espèces *Heliochona*, aussi bien l'espèce de Stein que celle de Plate qu'il a retrouvé sur les côtes du Sud de la Suède, sur le *Gammarus locusta*; il se déclare pour la séparation des espèces. L'auteur présente également la description du développement de deux espèces. Wallengren constate la particularité du groupe *Chonotricha*. L'avis de Wallengren est soutenu par Kahl 1935 qui classe le genre *Heliochona* et les autres genres parentes dans l'ordre *Chonotricha*. *Heliochona scheuteni* a été retrouvée par Guilcher 1951, sur les branchies des *Amphithæ rubricata* (Montagu, 1808). Guilcher constate le caractère somatique de la ciliature de la collerette et démontre la parenté de tous les *Chonotricha* avec les *Cyrtophorina*. Dernièrement Corliss 1961, classe les *Chonotricha* dans le cadre des *Holotricha* en tant qu'ordre à part, avec trois familles isolées par Mohr 1948: *Stylochonidae*, *Spirochonidae* et *Chilodochonidae*. Les deux auteurs ont incorporé le *Heliochona* dans la famille *Stylochonidae*.

Morphologie

L'individu adulte, par son aspect rappelle une cruche avec le bord fortement développé. Ce bord constitue une collerette en éventail renforcée par des tiges rigides disposées en rayon sur son côté intérieur. Ces tiges sont plantées profondément dans l'endoplasme, alors que leurs extrémités ressortent de deux à sept microns du bord extérieur de la collerette. La collerette, est fermée par une poche convexe non renforcée par les tiges, d'un côté qui conventionnellement est défini comme ventral.

Au fond de l'entonnoir, formé par la collerette et la poche, se trouve le cytostome. Toute la ciliature somatique se limite au côté intérieur de la collerette et de la poche. Sur le côté intérieur de la collerette se trouvent sept cinéties parallèles à son bord. Les trois cinéties externes sont bien plus longues et enveloppent le cytostome. Sur la paroi intérieure de la poche se trouvent sept à quinze courtes cinéties parallèles, se dirigeant obliquement vers le cytostome (et non dans la direction contraire, comme il en résulterait du dessin présenté par Guilcher 1951).

Sur le devant, entre la poche et les bords extérieurs de la collerette, cette dernière est dilatée en deux lobes avec des tiges plus prononcées. Le nombre de cinéties se trouvant sur la poche ainsi que le degré de développement des lobes de collerette dépendent du degré d'avancement du développement de l'individu. Juste derrière la collerette, on rencontre un rétrécissement net en forme de goulot. Dans le goulot on aperçoit nettement le cytostome et le cytopharynx transparent. Tout de suite après le goulot, se trouve la vacuole pulsatile à fonctionnement faible et très irrégulier. Sur le bord gauche du corps dans la région du goulot, du côté ventral, on rencontre l'endroit caractéristique pour la formation du bourgeon. Le creux caractéristique apparaît à cet endroit tout au début du développement de l'individu fixé. Dans la nomen-

clature des anciens auteurs, cet endroit a été appelé „vagina” (Eismond 1895), et puis — „marsupium” (Mohr 1948).

Au delà du goulot, le corps en forme de bouteille, s'élargit. Dans cet élargissement, est situé l'appareil nucléaire. L'appareil nucléaire est composé de trois micronoyaux (je ne puis affirmer si ce nombre est constant et caractéristique pour cette espèce), ainsi que d'un grand macronoyau hétéromère. Dans le macronucleus, pendant la phase interdivisionnaire, la partie chromatique apparaît avant la partie achromatique, alors que le noyau en entier s'allonge le long de l'axe morphologique de l'individu. Pendant la période de la bipartition, le macronucleus est polarisé perpendiculairement par rapport à cet axe. Les micronucleus d'habitude se trouvent dans les environs de macronucleus, du côté de la formation du bourgeon.

Tout le corps en forme de bouteille s'appuie sur la partie accrochante nettement différenciée, à caractère de disque, fixant l'animal au fond. Ce disque est délicatement strié et muni d'une glande endoplasmique nette. Sa structure est conforme à la description faite par Wallengren 1895, comme aussi, tel qu'il résulte des analyses de Fauré-Fremiet et al. 1956, à l'organe adhésif chez *Chilodochona*.

Tout le corps du Protozoaire est recouvert de stries péliculaires, délicats, allant de la base jusqu'au goulot. Aussi bien leur aspect, que le sens même des changements morphogénétiques chez *Chonotricha*, démontre qu'ils ne sont pas analogues aux cinéties, tel que le suggère Guilcher 1951.

Les dimensions des individus fixés s'élèvent à: longueur (y compris la collerette) 80—90 μ , largeur max. mesurée à la hauteur du macronucleus 20—30 μ , largeur de la collerette développée et pleinement formée env. 30 μ .

Repartition et localisation

Heliochona scheuteni apparaît en masse sur le *Gammarus (G.) zaddachi* Sexton, 1912, sensu Spooner, 1947, uniquement sur les branchies.

Bourgeonnement

Les processus nucléaires ainsi que corticaux sont chez cette espèce en conformité de principe avec les observations de Wallengren 1895, Guilcher 1951, Tuffrau 1953 et d'autres.

Chez l'individu fixé, le champ morphogénétique apparaît très tôt sous forme d'une platte concavité. Ce stade est généralement accompagné par une structure segmentaire du macronoyau hétéromère, caractéristique pour la période d'interphase. Le champ morphogénétique peut cependant se former plus tôt, précisément chez le bourgeon fixé qui n'a pas encore de sa collerette, ni du macronoyau segmenté. Sur le champ morphogénétique apparaissent à leur tour les cinéties parallèles. Ces courtes cinéties se forment tout à fait indépendamment de la ciliature somatique de la collerette. Il semble que la formation de cinéties n'est pas précédée de l'apparition du champ anarchique des cinétosomes. Donc, les cinéties se formeraient en ligne et non par voie de réorganisation du champ anarchique. Au début, les cinéties qui se forment sont parallèles à la ciliature de l'individu-parent, c'est-à-dire perpendiculaires à son axe morphologique. En conséquence, le nouveau champ morphogénétique se forme, indépendamment de la vieille ciliature somatique de l'individu-parent — parallèlement à cette ciliature spécialisée, toutes fois la polarisation et la séquence des cinéties restent pareilles. Le champ morphogéni-

que du bourgeon s'affaisse encore d'avantage dans le „marsupium”. Un petit cylindre de cytoplasme gonflé, particulièrement prononcé du côté du pôle apical du bourgeon se forme derrière cet affaissement. Ce développement inégal entraîne la formation rapide de la partie apicale du bourgeon et son éruption disproportionnée. En conséquence le champ morphogénétique, parallèle au début, prend une position de plus en plus oblique et enfin perpendiculaire par rapport à la ciliature du parent. De même, le sillon de division, se présentant au début sous forme d'entaille parallèle, commençant du côté apicale du bourgeon, prend une position de plus en plus perpendiculaire par rapport à la ciliature somatique de l'individu-parent (soit donc parallèle à l'axe longi-

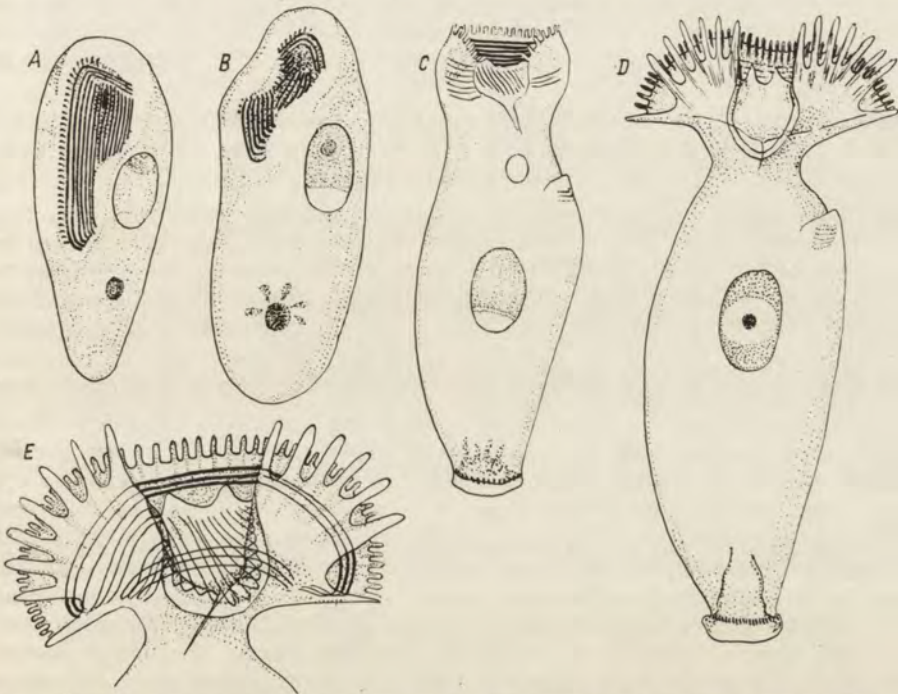


Fig 4. Bourgeonnement et transformation du bourgeon en forme sédentaire chez *Hebochona scheuteni* (Stein, 1854); structure anatomique de la collerette de cette espèce (d'après les observations des individus vivants)

nale de cet individu). De cette façon le sillon de division, se courbant vers la base, est perpendiculaire au fuseau de division du macronucleus.

Ainsi donc, le découpage du bourgeon peut être interprété en tant qu'effet d'interférence de quelques facteurs: du découpage parallèle du champ morphogénétique du bourgeon, de l'organisation nettement plus rapide du pôle antérieur du bourgeon, par rapport à ses parties suivantes et enfin de la polarisation du fuseau de division du macronucleus.

À partir du moment de la pénétration profonde du sillon découpant le bourgeon, un nouveau enfoncement se forme dans le goulot de l'individu-parent. La formation du nouveau bourgeon peut commencer immédiatement après qu'à eu lieu la bipartition de l'appareil nucléaire. La rapidité de bourge-

onnement est donc liée à deux processus qui ne sont pas pleinement synchronisés, à savoir à la formation sur le goulot de l'individu-parent d'un nouveau „marsupium” du champ morphogénétique, ainsi qu'à la terminaison du précédent cycle de division de l'appareil nucléaire; par contre, elle n'est pas liée au rythme de la séparation du bourgeon en entier ou l'apparition d'une interphase définie dans l'appareil nucléaire après sa bipartition.

Ainsi donc les jeunes bourgeons poussent les vieux vers la base de l'individu-parent. Ces bourgeons diffèrent entre eux par le nombre de cinéties, la grandeur et le degré de leur séparation de l'individu-parent; par contre le macronucleus se trouve au même stade chez tous. Dans ma documentation, le nombre maximal de bourgeons est de trois. Cela signifie, que le cycle de réorganisation du macronucleus peut s'effectuer dans l'individu-parent trois fois plus vite que la séparation complète du bourgeon et la réorganisation de son macronucleus.

Dans l'individu fixé, capable déjà de bourgeonner, la collerette continue à se développer. C'est seulement dans la période de formation du troisième bourgeon, qu'a lieu la formation complète de collerette.

La localisation constante du champ morphogénétique dans l'individu fixé, peut être expliquée par plusieurs facteurs: c'est l'endroit où se rencontrent les influences de la partie corticale active de l'individu-parent (autrement dit les influences de la ciliature somatique de collerette), où se trouve à proximité l'appareil nucléaire, où il n'y a pas, dans le cytoplasme d'excès de substances de réserve, et enfin où l'on rencontre la surface corticale nue, sur laquelle le processus de la reproduction de tout le modèle de ciliature peut être activé.

Lentement, le bourgeon qui se détache, passe son cycle nucléaire. Avant sa séparation complète de l'individu-parent, se forme, autour de sa surface ventrale ciliée, une bande („streap-band”) de minuscules trichites. Ces trichites constituent un primordium des futures tiges soutenant la collerette. Aussi bien le disque adhésif que la glande endoplasmique se forment à nouveau par la voie compliquée décrite en détail par Wallengren 1895. Sur le bourgeon les cinéties se forment successivement: d'abord le système droit de la ciliature ventrale et ensuite le système gauche. Dans le bourgeon complètement séparé, nous rencontrons déjà le système droit complet se composant de sept cinéties; ensuite apparaît la fente du cytostome et enfin on remarque cinq à neuf cinéties du système gauche de ciliature somatique.

Transformation du bourgeon en individu fixé

On peut observer des mouvements ondulaires des cils dès le début de la séparation des cinéties, sur le champ morphogénétique. Le bourgeon séparé a sur sa surface ventrale une ciliature fonctionnant tout à fait normalement. La vitesse du travail des cils, dans la collerette de l'individu fixé et dans le bourgeon, est à peu près uniforme. Cependant, en comparaison à d'autres Ciliés, ce mouvement est assez faible et lent. Il semble qu'un rôle important dans le déplacement du bourgeon au nouvel endroit est joué par le courant de l'eau, créé par le mouvement des extrémités branchiales du *Gammarus*.

Le bourgeon présente des tendances nettement thigmotactiques. Le bourgeon qui se sépare se glisse sur l'individu-parent et se fixe aussitôt sur une lamelle branchiale voisine, à l'aide de son disque. Il n'est pas exclu, que la surface ventrale creuse joue au début le rôle de ventouse fixant le Protozoai-

re au substrat (on observe ce phénomène chez beaucoup de *Cyrtophorina*). Cette fixation rapide du bourgeon à la branchie, entraîne une disposition topographique caractéristique des individus: les vieux individus sont posés le plus près de l'extrémité, dans des coins des lamelles branchiales, alors que les descendants suivants se trouvent à l'extérieur. Les descendants des descendants, c'est-à-dire les bourgeons secondaires, seront donc à leur tour placés sur les lamelles de deuxième ordre. En conséquence, les individus les plus jeunes apparaîtront d'une façon assez permanente sur les parties extérieures des branchies.

Le bourgeon qui se fixe, passe lentement par les stades de formation des différentes parties du macronucleus, chromatique dans la partie antérieure, achromatique dans la partie postérieure. Au moment de la séparation de segments, apparaît entre eux une bande („reorganization band”) qui se déplace ensuite à travers toute la partie chromatique jusqu'au pôle du macronucleus. Les changements du macronucleus sont accompagnés de changements corticaux, bien que la synchronisation précise des processus fait défaut. Les changements superficiels consistent en une transformation puissante de la forme par suite d'une disproportion de l'accroissement de la partie nue du bourgeon. On observe un développement particulièrement intense dans la zone entre le disque adhésif et la surface ventrale concave et ciliée. De cette façon, le disque ventral est déplacé vers le pôle antérieur du corps et retourné de 90 degrés vers la gauche. La transformation suivante consiste dans l'affaissement dans le corps de la fente du cytostome et l'empilement, sous forme de collerette et de poches, de la zone corticale sur laquelle se trouvent les systèmes droit et gauche des cinéties de la ciliature ventrale. De petites trichites forment l'encerclement de la collerette. En se formant de cette façon elle possède encore des trichites homogènes et 7 cinéties parallèles du système droit. La poche plate, du côté intérieur, possède à peine 5 à 9 cinéties du système gauche. Déjà à ce stade, on peut observer sur le goulot un retrécissement, le champ morphogénétique du futur bourgeon. En même temps, le macronucleus et l'appareil adhésif complètement formé, sont déplacés légèrement vers la base.

L'endosome chromatique commence à se former sur la partie achromatique du macronucleus. La formation de l'endosome s'effectue pendant le passage de la „reorganization band” à travers la partie chromatique. C'est dans cette même période qu'a lieu l'accroissement ultérieur de l'individu ainsi que l'accroissement et la différenciation des lobes de la collerette. Le cytostome s'approfondit alors que le nombre de cinéties du système gauche augmente sur la poche. Ces changements sont déjà accompagnés par la formation du bourgeon descendant.

Après un bourgeonnement multiple, j'ai observé, conformément aux données de bien des auteurs la dégénération des individus fixés. Les individus dégénérents ne reconstituent pas leur forme après la bipartition. La collerette de tels individus est maximale ment développée mais fanée. De même se dégenère le macronoyau.

De même, j'ai observé plusieurs fois la conjugaison. Malgré le manque d'observations détaillées, il semble que la conjugaison de *H. scheuteni* s'effectue analogiquement à celle du *Spirochona gemmipara* (Ej smont 1895, Swarczewski 1935, Tuffrau 1953).

Une liaison nette a lieu entre la conjugaison et l'étape de développement de l'individu. Je n'ai jamais observé la conjugaison d'individus à la collerette complètement formée. Les individus conjugant, sont des individus fixés, mais encore tout à fait jeunes. Se pose la question, si la conjugaison s'effectue chez les individus qui ne bourgeonnent pas. En tous les cas, les observations sur la dégénération et la conjugaison montrent qu'ont lieu là des processus de vieillissement, semblables à ceux observés par Rudzinska 1959, chez *Tokophrya infusionum*, ou encore par Kazubski 1963 chez *Thigmocoma acuminata*.

La comparaison et les propriétés des macronoyaux hétéromères de différents Ciliés

Les macronoyaux de la plupart de Ciliés portent un caractère d'hyperploïdes aux génomes multiples. La division de ces macronoyaux consiste précisément dans la ségrégation des génomes après les phases préalables de la synthèse de la substance chromatique et de production du RNA (Piekariski 1941, Grell 1953, Fauré-Fremiet 1950, Elliot 1962). La ségrégation de génomes c.à.d. la bipartition du macronoyau n'est généralement accompagnée d'aucune figure mitotique étant donné que le macronoyau est presque complètement dépourvu de structures protéiques fibrillaires qui puissent donner naissance au fuseau (Fauré-Fremiet 1953). Par conséquent, aussi bien pendant le temps interdivisional qu'en cours de la division le noyau est d'une structure homogène. Fauré-Fremiet 1957 a donné à ces noyaux le nom de macronoyaux homéomères. Cependant nous rencontrons chez certains Ciliés du groupe *Cyrtophorina-Chonotricha* un autre type de macronoyau. Ces macronoyaux passent par des phases morphologiques très nettes de division et possèdent, dans la période entre les divisions une structure hétérogène. De tels macronoyaux hyperpoliploïdaux (Seshachar 1950) de structure hétérogène ont été appelés par Fauré-Fremiet 1957 macronoyaux hétéromères. Les macronoyaux de ce type se composent d'une partie typique chromatique (orthocaryomère) et d'une zone presque complètement achromatique dans laquelle prédominent les protides (paracaryomère). Les deux parties sont enveloppées par une membrane nucléaire commune (Kameda 1961). Fauré-Fremiet 1957 a affirmé que la disposition de ces deux parties composantes pouvait être différente: segmentaire au cas où le paracaryomère se présente avant ou après l'orthocaryomère, ou concentrique, quand le paracaryomère se trouve entouré de l'orthocaryomère juste en dessous de la membrane nucléaire.

Malgré les différences mentionnées, les étapes morphologiques de bipartition des espèces examinées, on note en principe une nette analogie (Planche V 19—24, Fig. 5). Ainsi, dans la période interdivisionnaire soit au commencement du cycle, soit à la fin apparaît l'endosome sphérique sur le terrain du paracaryomère chromatique sur lequel le DNA se trouve dispersé. L'endosome contient beaucoup de substances chromatiques bien que de caractère quelque peu différent à celles de l'orthocaryomère. Le rôle de l'endosome demeure inconnu. Fauré-Fremiet est d'avis qu'il s'agirait en l'occurrence d'une sorte de réserve du DNA. La période de la formation de l'endosome varie d'une espèce à l'autre et demande par exemple un temps relativement très longue chez

Chilodonella uncinata — d'après Mac Dougall 1925, assez longue chez *Dysteria monostyla* — d'après Fauré-Fremiet 1957, et une période relativement courte chez l'*Allosphaerium*, *Heliochona scheuteni* et le *Spirochona gemmipara* — d'après Guilcher 1951 et Tuffrau 1953.

En dehors de la formation de l'endosome, dans la période interdivisionnaire nous pouvons observer l'apparition sur le terrain de l'orthocaryomère, puis sur celui du paracaryomère, des sphérules assez nombreuses, nettement dessinées et de dimensions différentes. Elles correspondent vraisemblablement à des nucléoles qui renferment le RNA (Fauré-Fremiet 1957, Kaneda 1959, 1960). Nous ne disposons malheureusement pas de données permettant d'affirmer si ces sphères contiennent uniquement du RNA, ou si le RNA constitue seulement leur zone externe.

Chez tous les types de macronoyaux hétéromères avant la bipartition s'opère une division segmentaire de l'orthocaryomère et du paracaryomère le long de l'axe longitudinale du macronucleus. A la limite des segments apparaît ensuite une „reorganization band” qui se déplacera à travers toute la zone de l'orthocaryomère, vers l'axe du nucleus. Aussi bien les analyses morphologiques que cytochimiques démontrent qu'il s'agit d'un passage localisé de „l'onde d'endomitose”. Les phénomènes observés chez les Ciliés Hypotriches (Sonneborn 1947, Fauré-Fremiet et al. 1957, Gall 1959, Roth 1957, Prescott and Kimball 1961, Kluss 1962) permettent de faire un rapprochement avec les phénomènes nucléaires dans le macronucleus hétéromère chez les Ciliés Holotriches. Le déplacement de la „reorganization band” à travers l'orthocaryomère s'effectue toujours du centre du macronucleus vers le pôle. Dans le cas de l'*Allosphaerium* nous sommes en présence de deux „reorganization bands” qui passent dans deux directions, à travers les deux segments polaires de l'orthocaryomère.

Il semble toutefois que le rythme de déplacement de la „reorganization band” reste en corrélation avec le rythme de la morphogenèse corticale. Il semble aussi que les transformations ultérieures du macronucleus et sa division ne sont possibles qu'à un stade avancé de la morphogenèse corticale. Les conclusions de ce genre concordent avec les résultats des expériences (De Terra 1960) sur les *Stentor* sans noyaux en période interdivisionnaire; on y a implanté des noyaux du stade de la prédivision, provenant d'autres individus. Ces macronoyaux ne se divisaient pas et ne précipitaient pas les changements superficiels des individus, auxquels ils étaient implantés. Les macronoyaux en question „attendaient” cette étape de la morphogenèse corticale qui leur correspond, avant de subir la constriction et la division.

Déjà pendant le déplacement de la „reorganization band” à travers l'orthocaryomère, on observe une incohérence de l'endosome, puis sa lente résorption, du moins dans la zone externe. La résorption de l'endosome se déroule parallèlement avec l'encerclement du paracaryomère par l'orthocaryomère et la dissolution de la membrane nucléaire. Simultanément avec la dissolution d'une partie au moins de l'endosome apparaît sur le terrain du paracaryomère la chromatine disposée sous forme de filaments radiales. D'après Kaneda 1961 ce sont des structures provenant de la despiralisation des granules de chromatine qui étaient préalablement enroulés de façon hélicoïdale. Il semble que sur le frame formé de la structure protéique du paracaryomère, ces filaments ultrafins, sont groupés en rayons nettement perceptibles au microscope.

L'allongement du macronucleus dans une direction perpendiculaire à la future constriction divisionnaire implique que les filaments radiaux de la chromatine et des substances fibrillaires du paracaryomère forment un fuseau divisionnaire visible. Il semble toutefois, indépendamment du fait à quoi correspondent les filaments et les rayons respectifs du fuseau, que les propriétés des protéines qui se trouvent dans le paracaryomère jouent un rôle essentiel dans

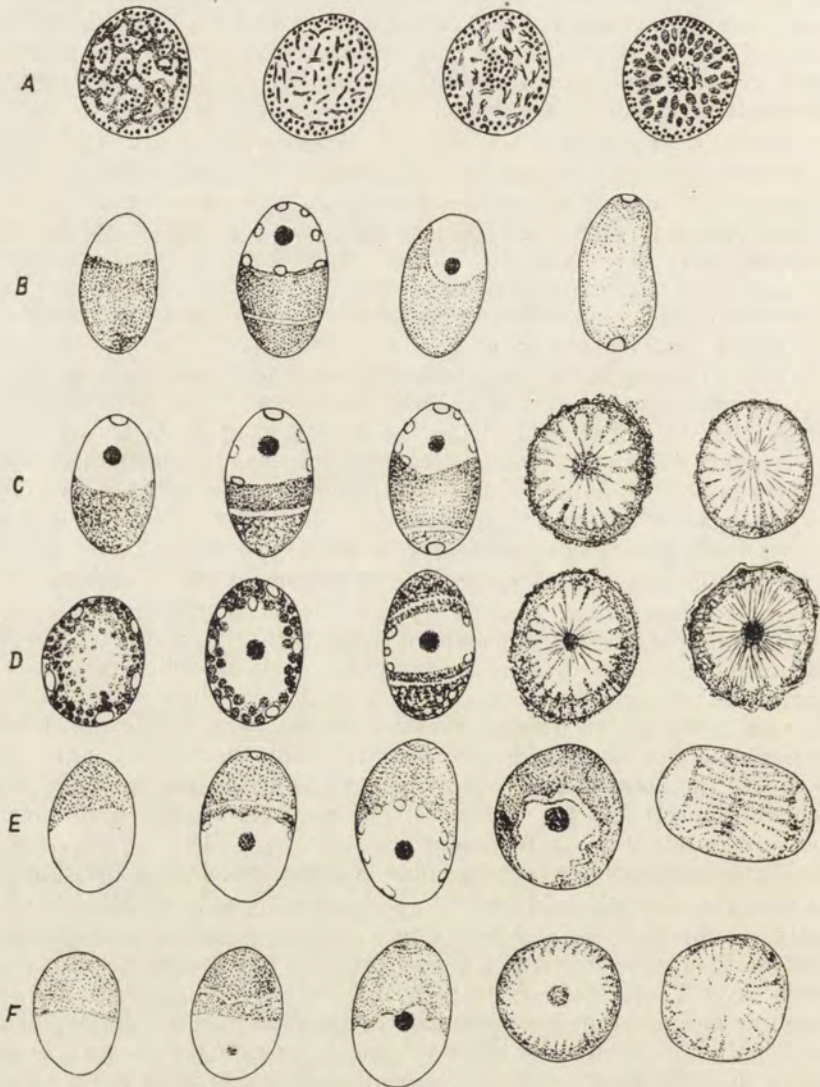
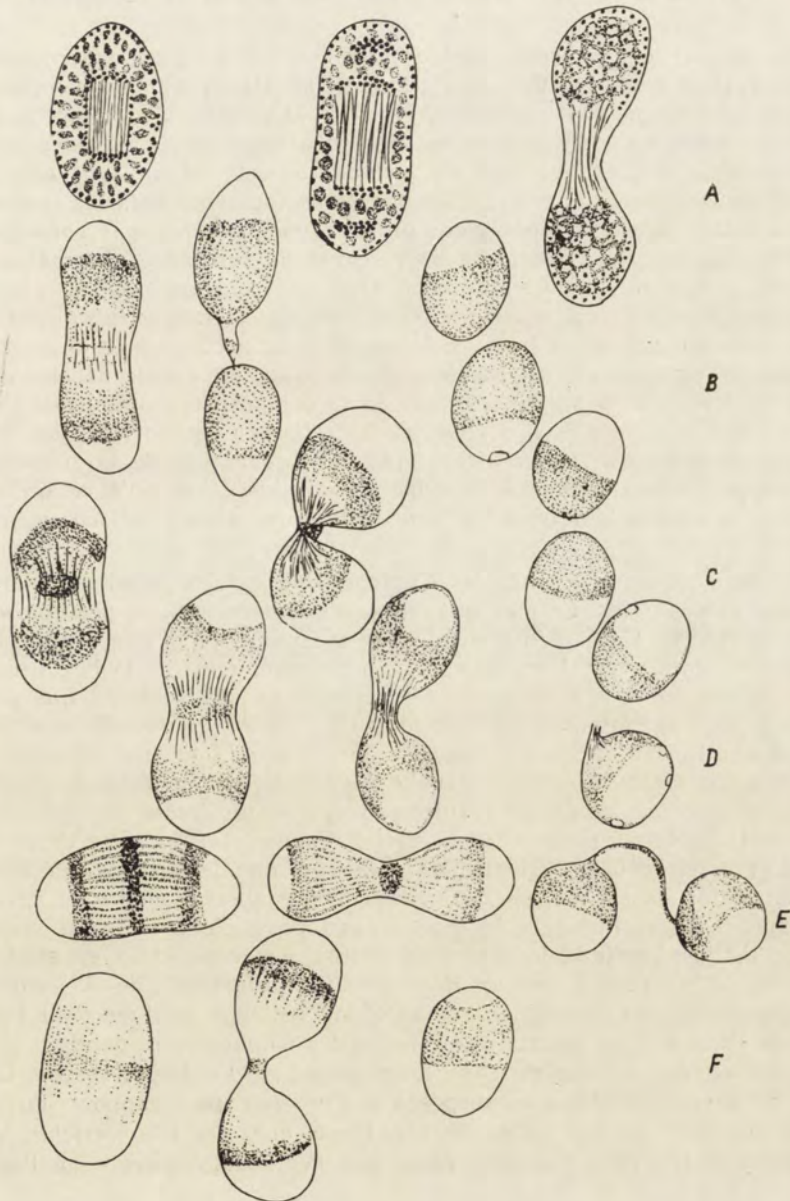


Fig. 5. Comparaison du cycle macronucléaire chez les différents Ciliés: A. *Nassula ornata* d'après Reikov 1962, B. *Dysteria monostyla* d'après Fauré-Fremiet 1957, C. *Chlamydonon pedarius* d'après Kaneda 1960, 1961. D. *Allosphaerium paraconvexa* orig.

la manifestation de la structure filamenteuse de la chromatine, et puis dans le processus de sa ségrégation.

C'est une période de transformations rapides et brusques dans les macro-noyaux que restent d'ailleurs en corrélation avec les transformations qui s'opèrent dans la zone corticale et déjà sont liées essentiellement avec l'étape de séparation en individus-fils. Le macronucleus atteint à ce stade une longueur maximale. On observe à la limite du noyau et du cytoplasme un net



halo. Il s'agit probablement d'une zone d'échange de substances entre le nucleus et du cytoplasme. Le macronucleus allongé pendant l'incision du sillon de division se rétrécit au milieu. Le resserrement du fuseau divisionnaire provoque un repoussement de la chromatine et son concentration aux pôles. En se concentrant vers le pôle du fuseau elle repousse les substances du paracaryomère et la masse achromatique toujours plus en dehors du fuseau. Les substances du paracaryomère prennent une position complètement polaire. En même temps se reforme la membrane nucléaire des macronoyaux descendants.

Dans le cas de nombreux espèces aux confins de deux macronoyaux en formation, il se constitue un corps résiduel („Restkörper”). La composition et le sort de ce corps ne sont pas encore élucidés. Il est possible, comme le suggère K a n e d a 1960, qu'il s'y présentent des substances de l'endosome résorbées par le cytoplasme, et qui sont de grande importance en tant que facteur activant des processus enzymatiques dans le cytoplasme chez les espèces chez lesquels la conjugaison n'intervient que rarement, et qui par conséquent ne disposent pas dans le cytoplasme de réserves de substance chromatique provenant de la dissolution du macronoyau chez l'ex-conjugant. D'après les observations sur le sort du corps résiduel chez l'*Allosphaerium paraconvexa* il semble qu'il reste étroitement lié avec la rapidité du processus de la division des individus descendants. Il est même possible, que son avenir dépend des conditions extérieures du milieu, par ex. de la composition ionique de l'eau qui peut agir sur la vitesse de la formation de la fissure équatoriale, soit du degré de l'aplatissement du Protozoaire pendant l'observation de la scission. C'est un argument d'autant plus à prendre en considération qu'à ce qu'il paraît la conjugaison aussi bien chez l'*Allosphaerium* que chez l'*Heliochona* n'est pas trop rare.

Le fuseau de scission chez les *Cyrtophorina* est en principe polarisé parallèlement aux cinéties. Le macronoyau garde cependant une position ventrale dans le corps du Cilié. Ainsi sur le fuseau opère d'avantage la fissure qui s'enfonce du côté ventral en pénétrant, par conséquent, de la bordure gauche vers celle de droite du corps. Les macronoyaux descendants qui prennent naissance sont symétriques par rapport à la plane équatoriale, mais la constriction qui les maintient est incurvée en arc par la fissure qui s'incrute.

Le repoussement du système gauche des cinéties avant celui de droite dans l'opisthe et la courbure qui en résulte provoquent un détour partiel du macronoyau de l'opisthe au moment de sa division complète. En outre de ce mouvement du macronoyau de l'opisthe, un regroupement de la substance intervient dans son intérieur. Ainsi, en définitive, même chez l'opisthe se révèle une topographie d'éléments dans le macronoyau parallèle à celle du protère.

Chez l'*Allosphaerium*, la transformation du macronucleus en stade interdivisionnaire, s'effectue par un déplacement progressif de la chromatine accompagné par une production rapide de nucléoles, aussi bien dans le protère, que dans l'opisthe. Le macronucleus, chez les *Chonotricha*, pendant l'interdivision, est allongé le long de l'axe longitudinal de l'individu sessile. Les segments du macronucleus sont disposés à l'inverse par rapport au macronucleus segmentaire des *Cyrtophorina*. Donc, chez les *Chonotricha*, le paracaryomère se trouve à l'arrière, alors que l'orthocaryomère — à l'avant du corps.

Pendant la formation du fuseau de bipartition, l'axe longitudinal du macronucleus s'allonge le long de l'axe de polarisation primaire du corps, change, en prenant donc une position transversale par rapport à l'axe morphologique du corps. Assez longtemps, entre les macronoyaux descendants se maintient une liaison en forme de bande sombre. Ce rétrécissement est courbé par le sillon séparant le bourgeon qui s'incise par le devant. Dans ce cas, ce sillon s'incisant entraîne aussi un demi-detour du bourgeon, ce qui fait que le paracaryomère se trouve sur le bord gauche, tandis que l'orthocaryomère — sur le bord droit du bourgeon. Le regroupement suivant se passe de façon analogue à celui de *Spirochona gemmipara*, tel que le décrit Tuffrau 1953.

En comparant les cycles des macronoyaux hétéromères et du macronoyau homéomère chez *Nassula ornata*, étudié par Raikov 1962, on peut remarquer plusieurs convergences. Raikov a prouvé chez cette espèce l'apparition, pendant la bipartition, de zones distinctes ainsi que d'un filament net. Ainsi donc, chez *Nassulidae* apparaissent déjà certaines tendances à l'hétéromérie du macronucleus.

Il est intéressant de souligner qu'il n'y a pas de lacune nette entre la structure segmentaire du macronucleus chez les *Cyrtophorina* et les *Chonotricha*, lorsqu'on prend en considération l'existence de propriétés intermédiaires dans le macronucleus de l'*Allospiraerium*.

Il semble que la morphologie et les stades de bipartition du macronucleus ne sont pas des adaptations. La ressemblance de structure du macronucleus chez des espèces différentes, constitue un argument essentiel, prouvant leur parenté, et peut être la base des conclusions phylogénétiques.

On peut en conclure que les macronoyaux des *Nassulidae*, *Dysteriidae*, *Chlamyodontidae*, d'*Allospiraerium* et des *Chonotricha*, présentent une ligne phylogénétique menant aux macronoyaux hétéromères, qui possèdent une quantité de matériel de plus en plus capable de former un fuseau de division, à une séparation précise de la chromatine et de la partie achromatique et enfin à un cours polarisé et localisé de l'endomitose.

Il existe une ressemblance importante de la ségrégation même des génomes chez différentes espèces. Il y en a donc une ressemblance fondamentale des mécanismes de la bipartition, quoique pendant la période interdivisionnaire, le macronucleus, chez différents Ciliés, se présente sous différentes formes. Les différentes formes du macronucleus hétéromère, pendant l'interdivision, par exemple sa forme concentrique ou segmentale, ou une persistance plus ou moins prolongée de l'endosome dans le paracaryomère sont comme „une fixation des étapes passées” d'une seule ligne des changements dans les macronoyaux. Ainsi donc, les arguments principaux de phylogenèse ne proviennent pas des recherches sur la morphologie même mais des études sur les cycles des changements.

La dépendance entre la bipartition de l'appareil nucléaire des Ciliés et les types différents de morphogénèse (surtout les mécanismes de régénération) a été étudiée par de nombreux auteurs (voir Balamuth 1940, Tartar 1941, Fauré-Fremiet 1948, Weisz 1954). Il est connu, sans doute, que le matériel du noyau renferme l'information concernant le type de morphogénèse et de différenciation à l'intérieur de l'organisme (Sonneborn 1961). C'est actuellement une vérité connue. Par contre, on ne sait presque rien sur

la différenciation de l'appareil nucléaire, pendant son développement et sur les mécanismes d'induction. Jusqu'à présent, on ne sait pas quels éléments, et de quelle façon, activent le champ morphogénétique en déclenchant le cours des changements. Sans doute le cytoplasme joue un rôle de transmetteur d'informations du noyau à la zone corticale, bien que, certains processus autonomes, s'effectuant dans le cytoplasme, réagissent aussi sur les changements superficiels. D'autre part nous savons que la séparation des individus-fils déjà formés, donc la formation du sillon de bipartition nécessite des conditions extérieures déterminées. Sûrement, toute une série de facteurs influe le cours des changements morphogénétiques. Tartar 1941 parle des stimulants humorales, Z e u t h e n 1961 des peptides de bipartition, et H a n s o n 1962 indique l'existence d'un „stability system” dans le cytoplasme adhérent au péristome, qui répond du maintien et du développement du péristome chez *Paramecium*. D'autre part, nous savons beaucoup sur le rythme autonome et précis des changements morphogénétiques à partir du moment de leur initiation (D e T e r r a 1960, P r e s c o t t and K i m b a l l 1962).

Le cycle composé des changements dans le macronucleus chez les Ciliés étudiés, donne une chance particulière qui permet de faire quelques remarques concernant la corrélation des processus nucléaires et superficiels.

1. En général, on peut constater une formation très intense des sphérules (probablement des nucléoles) pendant la période interdivisionnaire.

2. La reconstruction de tout le modèle de la ciliature, sans aucune trace de continuation génétique des cinéties chez les *Chonotricha*, témoigne du rôle décisif de l'appareil nucléaire dans la transmission du type de morphogénèse.

3. Le passage de la bande de réorganisation, correspondant à l'onde de synthèse du DNA, et la division du micronucleus qui s'effectue parallèlement, n'est pas coordonné au stade défini de développement de l'individu (chez les *Chonotricha*). Cette synthèse est quand même indispensable pour la continuation des changements morphogénétiques, liés à la formation du bourgeon, ce qui veut dire que le bourgeon ne se séparera pas avant la division du macronucleus, et que la division du macronucleus ne se fait qu'après la terminaison du cycle d'endomitose.

4. C'est seulement l'avancement respectif des changements sur la surface, qui rend possible la formation d'un fuseau de bipartition dans le macronucleus et la dislocation des micronucleus descendants dans les individus-fils.

5. Le temps de réorganisation dans le macronucleus descendant après la bipartition, n'est pas constant et dépend du degré d'avancement des changements dans la zone superficielle par ex. il se passe plus lentement dans le bourgeon, que chez l'individu parent (*Chonotricha*).

Particularités architectoniques de différents groupes des *Holotricha* inférieurs

Le type primitif du Cilié est représenté par une structure à symétrie radiale avec des cinéties disposées en méridiens réguliers. Ces cinéties se rencontrent au deux pôles: l'antérieur (apical) et le postérieur (distal). La cavité buccale d'un tel Cilié primitif se trouve sur le pôle apical. Pendant la bipartition, le sillon fend transversalement toutes les cinéties méridiennes, et la cavité buccale de l'opisthe se forme sur la cicatrice qui reste après jonction cytoplasmique liant le proter à l'opisthe. Les changements précé-

dant la bipartition comprennent en principe le complètement des éléments principaux de la structure de surface, alors que la bipartition se limite à les diviser entre les individus-fils. C'est un tel modèle de structure que représentent les *Holotricha* inférieurs du groupe de *Rhabdophorina*.

La position apicale de la cavité buccale rend difficile le prélèvement de la nourriture pendant la nage, alors qu'elle facilite, dans les milieux épais, le bouchage de l'ouverture orale. En conséquence, dans bien des groupes, parmi les *Holotricha* inférieurs on observe une translocation latérale de la cavité buccale. Ce déplacement latéral de la cavité buccale et la spécialisation de l'appareil buccal pour le meilleur filtrage et la meilleure absorption de la nourriture sont différemment développés chez les divers Ciliés.

Chez les *Cyrtophorina*, on observe un déplacement caractéristique vers le côté du corps, de tout le pôle apical primitif, avec la cavité buccale, soit une tendance à maintenir le pôle apical et la structure symétrique du Cilié, ne déplaçant vers l'arrière, entre les cinéties, que la cavité buccale même. Ces deux variantes de déplacement de la cavité buccale sur le côté du corps, créent deux rangs morphologiques particuliers, qui reflètent fort probablement les rapports phylogénétiques des formes examinées. Le déplacement même de la cavité buccale sur le côté du corps, est une propriété qui porte un caractère d'adaptation, et ne peut pas, en tant que telle, qu'avec réserve être traitée comme base d'analyses phylogénétiques; or, la ressemblance des mécanismes de réalisation de cette adaptation et la différence du degré de son accentuation, ont déjà une valeur phylogénétique.

Donc déjà chez les *Prorodontidae* on rencontre des formes dyssymétriques à l'apex déplacé sur le côté du corps. Ces Ciliés ont la forme de poire, avec la partie antérieure tordue vers le côté. Des cinéties méridiennes sont de longueurs différentes; certaines d'entre elles heurtent l'arc au-dessus de l'ouverture buccale. *Platyophrya* peut-être considérée comme représentant de ces formes.

Un élément suivant de cette série morphologique, est constitué par le déplacement de l'ouverture buccale, de la position latérale, vers le côté concave du corps. À ce moment le cyostome prend la forme d'une fente et la position transversale. De cette façon est marquée la tendance à différencier la face ventrale du corps. Les cinéties racourcies méridiennes donnent le début au système gauche. Ces cinéties apparaissent au-delà de la fente buccale, alors que de leurs extrémités proximales se distinguent les segments des cnétosomes refoulés. Ces petites cinéties soutiennent la cavité buccale et y font affluer la nourriture. Ce genre de structure apparaît précisément chez les *Nassulidae* contemporains, et le rang des cirri, soutenant la cavité buccale se forme, récapitulant probablement la phylogénèse. La formation de tels cirri peut aussi être induite à d'autres cinéties. De cette façon, le nombre de cirri peut devenir très important, p. ex. chez *Nassulopsis* (Fauré-Fremiet 1959); il peut également y en avoir beaucoup moins, comme c'est le cas de *Nassula tricirrata* (Gelei 1932).

L'étape suivante de transformation de la structure, présentent les formes, dont le côté ventral est définitivement formé et qui possèdent un aplatissement dorsoventrale accentué. Cet aplatissement et la dyssymétrie nette de la longueur des cinéties sont liés au passage du mouvement rotatif au mouvement rampant sur le substrat. Dans le centre de la cavité de la partie ven-

trale, se trouve le cytostome, delimité à l'avant par trois cinétiés orales, empêchant l'écoulement de l'eau. Cette ciliature, malgré la disposition de l'ouverture buccale sur l'avant et non sur l'arrière du corps, a le même origine que les „cirri" chez les *Nassulidae*. Le rampement sur le fond est également lié à la perte de la ciliature somatique du côté dorsal du corps, mais d'autre part, intervient la spécialisation de la ciliature ventrale, et, en conséquence, l'isolation du disque ventral intégré, un peu concave. Un tel modèle de structure est représenté par *Dysteriidae* et *Chlamyodontidae* contemporains.

Guilcher 1951 indique l'apparition dans le cadre des *Dysteriidae* d'une tendance à la vie demi-sédentaire. Chez ces formes, la glande adhésive endoplasmique est fortement développée. Guilcher, et ensuite Fauré-Fr-

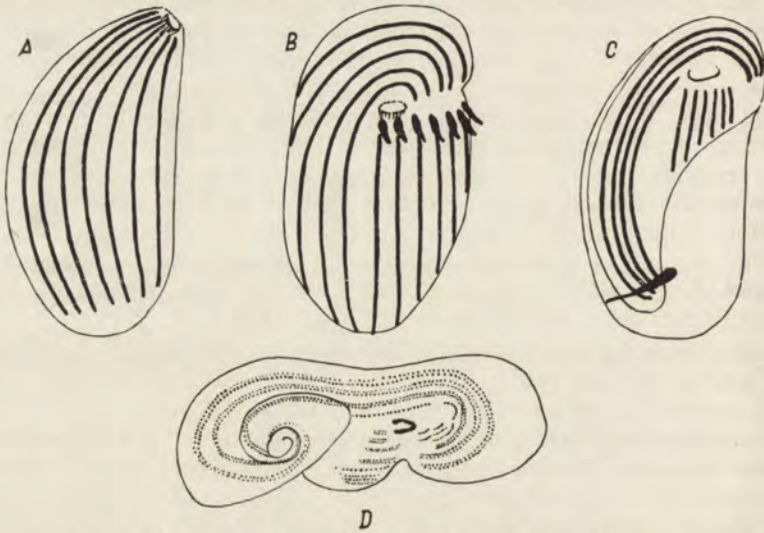


Fig. 6 Comparaison du plan de structure chez les différents *Gymnostomata*: A. *Platyophrya* sp., B. *Nassula* sp., C. *Trochilioides* sp., D. Disque ventrale de *Spirochona gemmipara* d'après Guilcher 1951.

miet et al. 1957, ont démontré l'homologie de cette structure et l'appareil adhésif chez les *Chonotricha*. La tendance à la vie demi-sédentaire est également accentuée chez le genre *Allospheerium*, de même chez les *Chilonella* parasites, où nous rencontrons le disque ventral en ventouse.

Chez les formes à thigmotactisme bien marqué, la partie dorsale du corps subit un fort développement. Ce développement, la convexité de cette partie et l'évolution de l'appareil adhésif conduit, au cours du développement ontogénétique, à la formation d'une structure caractéristique pour les *Chonotricha* sédentaires. La ciliature du disque ventral joue ici seulement le rôle amenant la nourriture au cytostome, par contre elle perd ses fonctions locomotrices. De petits restes de cinétiés orales, homologues à celles des *Chlamyodontidae* et des *Dysteriidae*, ont tendance à disparaître.

De cette façon on peut tracer la ligne de changements morphologiques: *Rhabdophorina*, *Nassulidae*, *Chlamyodontidae*, *Dysteriidae*, *Chonotricha*.

Parmi des formes asymétriques des *Rhabdophorina* on rencontre également des espèces, chez lesquelles le déplacement de la cavité buccale est plus

accentué que celui de l'apex. Dans le cadre des *Cyrtophorina*, il existe des formes dont la dyssymétrie des cinéties méridiennes est relativement, faiblement accentuée, par contre leur cavité buccale est nettement déplacée vers l'arrière. Chez ces formes, le pôle apical constitue le point de rencontre des cinéties. La cavité buccale peut être renforcée par une ciliature, qui s'est formée indépendamment des cinéties méridiennes.

Ce type de structure est rencontré chez *Clathrostomatidae*, ainsi que chez *Paranassulidae* d'après Fauré-Fremiet 1962 et *Microthoracidae* d'après Prella 1962. La présence d'une nasse de trichites, la dyssymétrie concernant la longueur des cinéties, le léger déplacement latéral de l'apex, sont des traits de structure, rapprochant ces Ciliés des *Nassulidae*; par contre, la tendance à former une ciliature orale autonome est un trait permettant de chercher leur liaison avec *Hymenostomata* (Corliss 1958, 1961, Prella 1962, et Fauré-Fremiet 1961).

Il semble que nous disposons d'un assez grand nombre d'arguments pour prouver, que les séries morphologiques tracées ici, reflètent en effet la parenté et le degré de spécialisation des formes examinées. Certains traits de morphogenèse comme p. ex. l'origine des cinéties orales provenant toujours du système gauche des cinéties méridiennes, l'accroissement allométrique des cinéties du système droit précédant la bipartition, ainsi que leur courbure avant la cavité orale, justifient sans doute une discussion supposant la parenté entre les *Nassulidae*, *Dysteriidae*, *Chlamyodontidae* et *Chonotricha*.

Deux éléments caractéristiques pour la bipartition de ces Ciliés, ont une influence sur la formation définitive de la forme et de la topographie de leurs organelles: la formation relativement précoce dans la morphogenèse du creux rigide du cytotome, ainsi que le cours caractéristique du sillon de bipartition dans la dernière phase de séparation des individus-fils. Donc la séparation des individus-fils, au moins pour ce qui concerne *Chilodonella*, *Allo-sphaerium* et *Chlamydonon* (ce dernier d'après Kaneda 1960), a les propriétés communes suivantes.

1. Pendant l'accroissement allométrique dans la région équatoriale, de quelques cinéties de système droit, la cinétie successive du côté droit se rompt, et à cet endroit se forme un creux centrifuge, correspondant au cytotome.

2. Les cinéties orales, qui ont leur origine dans le système gauche de la ciliature ventrale, au moment de l'incisement du sillon du bord gauche du corps, sont enfoncées au dessous des cinéties du système droit qui sont fortement gonflées mais restent encore continues et accroissent allométriquement.

3. Le cours du sillon de division, s'incisant à partir du bord droit du corps est plutôt dorsal. La rupture des cinéties du système droit est précédée par l'incisement de ce sillon; en conséquence, les ségments distaux des cinéties du futur proter, autant que les ségments proximaux de l'opisthe sont fortement courbés en direction du bord opposé du corps, symétriquement par rapport au sillon. Le segment de la nouvelle cinétie peut également être déplacé ensemble avec les cinéties du système droit et delinéé pendant l'incisement du sillon. De cette façon, cette courte cinétie peut en effet apparaître définitivement du côté dorsal en position transversale par rapport à la polarisation générale du corps.

4. Les segments buccaux pénètrent sur le terrain creux du cytotome et de cette façon se forme la topographie définitive de la région buccale.

5. Le cours du sillon détermine en plus (du moins tout de suite après la division) la forme des parties découpées. *Chilodonella caudata* (Stokes, 1835), *Chilodonella capucina* (Penard, 1922) ou *Chilodonella labiata* (Stokes, 1891) possèdent des appendices caractéristiques, qui sont restés après la jonction cytoplasmique, liant le proter à l'opisthe. Ces appendices, ou bien maintiennent leur profil à l'arrière du corps, ou bien se présentent sous forme d'un pli qui se penche au-dessus du bord gauche, avant la cavité buccale. Un appendice en forme de queue est visible, par exemple sur la photo chez *Ch. uncinata*, après la division (Pl. I 1).

L'influence du cours du sillon de division peut également être observée dans le profil du corps chez *Ch. ciprini* (Moroff, 1902). La cytodierèse intervient là plus rapidement et il est possible que la tension superficielle soit plus grande; c'est pourquoi les restes de la jonction cytoplasmique, aussi bien chez le proter que chez l'opisthe sont resorbés plus rapidement et plus nettement. Finalement le nouvel individu à la forme cardioïde, à l'asymétrie du système droit des cinéties relativement faiblement accentuée, avec une entaille caractéristique dans la partie inférieure du disque ventral.

On observe les mêmes phénomènes d'influence du cours du sillon sur le profil du corps, chez l'*Allosphaerium*.

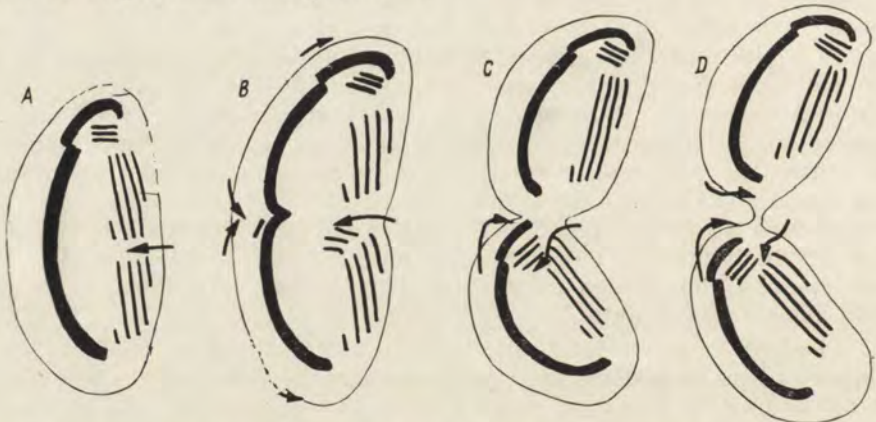


Fig. 7. Séparation des individus-fils et les stades d'incisement du sillon divisionnaire chez *Chilodonella* et *Allosphaerium* (schématisé)

Dans les autres séries morphologiques, dans le cadre des *Cyrtophorina*, on rencontre une tendance au déplacement de la cavité buccale même sans causer la dyssymétrie des cinéties somatiques du corps. Dans ce cas le cytostome prend naissance dans le champ buccal, („oral field" selon Frankel 1960), qui est lié aux cinéties méridiennes définies. La ciliature de la cavité buccale prend naissance au cours de la morphogénèse précisément dans le champ buccal qui est un peu plus rigide que le reste de la pellicule. Dans ces cas le sillon de division s'incise symétriquement dans la région équatoriale du corps en partant de tous les côtés avec une vitesse uniforme. Néanmoins la rigidité de l'appareil buccal qui se forme peut avoir une influence sur le résultat définitif de la cytodierèse à pareil cours. Ainsi, peut être marquée en partie l'asymétrie du pôle antérieur, en tant que soutenu avant cavité buccale, soit aussi l'extension de l'apex en forme d'une suture, auquel se joint une

partie des cinéties méridiennes. Ce genre de cours du sillon de division et de formation de la suture avant le peristome peut être observé le mieux chez tous les *Hymenostomata* à position subapicale de la cavité buccale (Fig. 8).

Ainsi donc, en conclusion, non seulement le mécanisme de la formation de différentes organelles, mais aussi le mécanisme de la séparation des individus-fils au cours de la division est une propriété importante ayant une influence sur la forme définitive des Ciliés ce qui indique l'évolution des mécanismes même de développement.

Comparaison du type de morphogenèse de division des Ciliés étudiés

La morphogenèse de division des Ciliés consiste dans la formation au sein de l'individu parent, de deux champs morphogénétiques, du proter et de l'opisthe, se trouvant l'un derrière l'autre et continuant la polarisation de l'individu-parent.

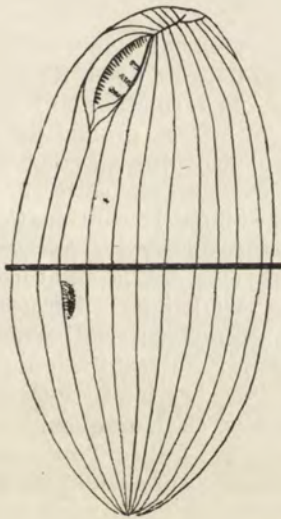


Fig. 8. Division percinétales et la suture préorale chez *Tetrahymena* sp. (schématisé)

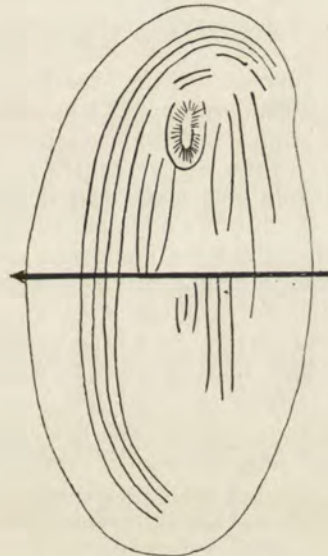


Fig. 9. Division percinétales, présentant pourtant un type régulateur, chez *Chilodonella crassa* (schématisé)

La morphogenèse de division des *Holotricha* primitifs consiste, en principe dans la duplication le long de l'axe hétéropolaire du Cilié des unités structurales de la surface, et ensuite après avoir dépassé un certain seuil de grandeur, dans la division de l'individu en deux individus-fils. Donc, de cette façon, s'effectue la continuation des différentes cinéties, aussi bien dans le proter que dans l'opisthe. La réorganisation principale consiste dans l'addition des éléments et ensuite dans la division de l'ensemble en deux parties. Il reste encore à examiner si les unités structurales entraînant la polarisation sont

les desmes et les cinétosomes, les alvéoles subpélliculaires, ou bien d'autres unités superficielles plus composés, soumises à la réorganisation et à la multiplication pendant la morphogénèse.

Les exemples cités de la morphogénèse de division, chez les *Cyrtophorina* (du genre *Chilodonella*) démontrent que la polarisation des individus-fils n'est pas basée dans ce cas sur la polarisation et le cours des différentes cinéties. L'individu-parent se réorganise pendant la morphogénèse de division, pour tourner en deux individus-fils possédant le même modèle de la ciliature, qui consiste pourtant de segments de cinéties ne correspondant pas l'un à l'autre (Fig. 9).

Donc, il ne peut être question ici de désignation de polarisation du Cilié par les cinéties. Il semble de même, qu'il n'y a aucun sens de chercher le rôle de polarisant dans des autres unités structurelles de la surface. Chez les *Cyrtophorina* ce mécanisme de morphogénèse est très bien exprimé consistant à reproduire dans les individus-fils le modèle du tout, bien qu'avec du matériel, provenant de l'individu-parent. Ce passage à un nouveau type de morphogénèse est lié intimement à la formation et à l'intégration du disque ventral, dont la polarisation et le modèle sont reconstitués au cours de la morphogénèse.

Chez les Ciliés, on observe une sorte de „reglementation” de la densité des cinéties, par rapport à la surface du corps (Mugard 1948, Raabe 1959). Il semble qu'une première cinétie régle et inhibe la formation trop approchée de la suivante. Si par contre surface corticale nue assez grande est présente et si le rôle polarisant des cinéties n'est pas très accentué au cours de la bipartition, tout le modèle de ciliature peut être reproduit sur cette surface nue, uniquement comme l'héritage génétique et non comme la continuation somatique. On constate précisément de telles tendances chez les *Suctorina* fixés, complètement déciliés, ainsi que chez le *Chonotricha*, où la ciliature se présente sous forme de disque ventral, fortement spécialisé en collerette de l'individu fixé. L'intégration de ce disque ventral, la surface relativement petite qu'elle, occupe sur l'individu-parent, sont des propriétés architectoniques, rendant possible ce type de morphogénèse de division chez les *Chonotricha*.

Ainsi donc, chez les *Chonotricha* et les *Suctorina*, c'est uniquement un processus typique de bourgeonnement qui a lieu, c'est-à-dire l'individu-parent développe le champ morphogénétique du bourgeon, sur lequel sa structure et ses propriétés morphogénétiques vont se reproduire (Kormos und Kormos 1958).

Chez l'*Heliochona*, le disque ventral impose la polarisation de la partie adhérente du cytoplasme et détermine l'axe avant-arrière du champ morphogénétique du bourgeon. Cet axe est par conséquent perpendiculaire à l'axe morphologique de l'individu parent. Ainsi donc, le nouveau champ morphogénétique, formé progressivement d'après le modèle de ciliature de l'individu-parent, ne se forme pas dans la continuation du disque ventral de l'individu-parent, par suite de réformation en deux disques descendants. Le nouveau modèle se forme à côté et immédiatement il copie le disque existant, et se maintient, de l'individu parent. C'est donc un exemple de métamérie latérale et non linéaire. La formation du modèle complet ne finit pas au moment de la séparation du bourgeon, mais continue même sous forme mûre au point de pouvoir bourgeonner à son tour.

Ce cas de métamérie latérale chez *Chonotricha* est illustré particulièrement bien par le phénomène de pedogenèse chez *Heliochona* — interprété comme bourgeonnement prématuré (Fig. 11). Un bourgeon que j'ai rencontré dans l'état de contagion naturelle possédait un seul macronoyau (le nombre de micronoyaux n'est pas connu), mais déjà champs morphogénétiques se développaient parallèlement. Le degré d'avancement du développement de la ciliature du champ droit indique qu'il s'agit là du correspondant du disque de l'individu parent dans ce bourgeonnement particulier. Dans les deux champs nous rencon-

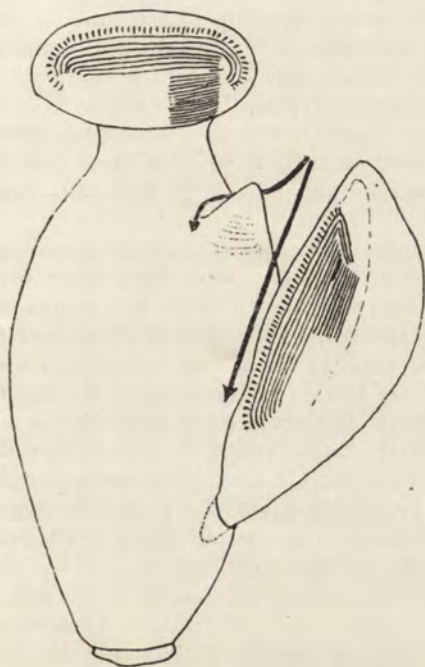


Fig. 10. Bourgeonnement et la formation à nouveau du disque ventral chez *Heliochona scheuteni* (schématisé)

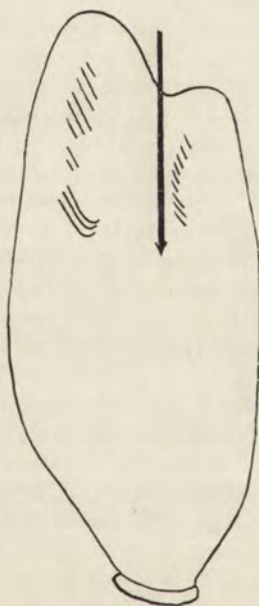


Fig. 11. Bourgeonnement du bourgeon (un cas de la pedogenèse) chez *H. scheuteni* (schématisé)

trons une tendance de torsion et de raccourcissement de la surface portant la ciliature somatique. De même, le sillon de division qui sépare les deux individus se dessine nettement. Il semble donc que l'intégration du disque ventral et son rôle de polarisation au cours de la morphogénèse divisionnaire ainsi que la perte de polarisation des cinéties, sont des traits communs au *Cyrtophorina* et au *Chonotricha*. Cependant, on ne peut s'imaginer aucunes formes possédant un type de morphogénèse intermédiaire entre la bipartition et le bourgeonnement.

Aussi bien la morphologie, que le type de transformations des *Chonotricha* nous autorisent à incorporer ce groupe aux *Cyrtophorina*, même en tant

que famille d'un rang égal aux *Nassulidae*, ou aux *Clasthrostomatidae*, bien que le mécanisme de bipartition ait un caractère tout à fait autre. Ce changement a le caractère d'aromorphose, et il vaut la peine de le souligner dans les essais de classification phylogénétique.

Discussion sur la parenté et sur les rapports phylogénétiques des *Holotricha* inférieurs

Il semble que les ressemblances présentées dans la morphologie, la morphogénèse de bipartition et le cycle des changements dans le macronucleus chez *Chilodonella*, *Allosphaerium* et *Heliochona* indiquent la parenté de ces genres. Ce sont des traits, caractéristiques dans une grande mesure aux Ciliés de l'ordre *Gymnostomata*, sous-ordre des *Hypostomata* (dans la classification d'après Corliss 1961, *Hypostomata* = *Cyrtophorina*).

Les ressemblances dans la morphologie, l'architecture, la morphogénèse de division et dans la structure de l'appareil nucléaire ne possèdent pas de caractère de propriétés convergentes et peuvent constituer la base des conclusions systématiques.

Il existe sans doute une parenté nette entre le genre *Allosphaerium* et les représentants de la famille des *Chlamyodontidae*. On peut remarquer tout particulièrement la ressemblance dans la morphologie et dans les stades de la morphogénèse de division des espèces spécifiques du genre *Chilodonella* présents, en commun avec des différentes espèces du genre *Allosphaerium*, sur les *Talitrus*. Cette ressemblance, p. ex. de *Chilodonella hyalina* Kidder et Summers, 1935 et de l'*Allosphaerium paraconvexa* sp. n., est bien visible au moment de la dissolution de la nasse des trichites, avant la bipartition du Cilié. Dans ce stade l'architecture de la cavité buccale de *Chilodonella* rappelle de façon illusoire la cavité buccale de l'*Allosphaerium*. De même, le degré de réduction de la ciliature somatique du corps, ainsi que le degré d'intégration du disque ventral sont semblables pour les deux genres.

D'autre part l'existence du pédoncle chez toutes les espèces du genre *Allosphaerium* permet de penser à une liaison plus étroite avec la famille *Dysteriidae*. L'architecture, la structure du disque ventral et la nasse des trichites à peine visible rapprochent l'*Allosphaerium* de l'espèce *Trochilioides striata* Buddenbrock, 1920.

En analysant de plus près cette question, on peut néanmoins affirmer que les différences existantes entre les *Chlamyodontidae* et les *Dysteriidae* sont minimales alors que le genre *Allosphaerium* constitue sans doute le „missing-link” entre ces groupes. Ainsi donc, si les recherches sur la morphogénèse de division, la structure de l'atrium oral et l'ultrastructure de pédoncle des *Dysteriidae* n'indiquent pas de différences essentielles, il conviendrait de réunir les familles des *Chlamyodontidae* et des *Dysteriidae* et situer le genre *Allosphaerium* dans le cadre de cette nouvelle famille. L'existence d'une sous-famille à part pour le genre *Allosphaerium* ne pourra être examinée qu'après la redescription du genre *Lophophorina* Penard 1922, et l'examen d'un plus grand nombre de Ciliés de différents *Amphipoda*.

Les recherches comparatives démontrent également une parenté intime des espèces du genre *Allosphaerium* avec les *Chonotricha*. Ces ressemblances (Dobrzanska 1961) sont les suivantes: défaut de trichites dans la nasse, différenciation du disque ventral, ressemblance de la collerette de *Spirochona*

gemmipara (d'après le dessin de Guilcher 1951 la concentration énigmatique des cinétosomes devant le cytostome rappelle les cinétiés buccales de l'atrium oral de l'*Allosphaerium*) et enfin la vie commensale sur les crustacés (principalement sur *Amphipoda*).

Ces propriétés prises en commun, témoignent en conséquence de la proche parenté des groupes *Dysteriidae*, *Chlamyodontidae* et *Chonotricha*. En tenant compte du rôle de l'*Allosphaerium*, en tant qu'élément intermédiaire, on peut examiner la question de l'incorporation des *Chonotricha* à l'ordre *Gymnostomata*.

Avec la dégradation proposée des *Chonotricha* au sous-ordre et peut être même au rang de famille il y a lieu de définir autrement tout l'ordre des *Gymnostomata*. Le manque de connaissance suffisante des *Prostomata* et *Pleurostomata* (des *Rhabdophorina* en général — Corliss 1961) rend impossible l'essai de formuler une nouvelle définition.

Dans le cadre des *Gymnostomata*, il y aurait lieu de distinguer le sous-ordre *Hypostomata* (ou *Cyrtophorina*) avec cinq familles séparées.

Il faut éventuellement séparer le sous-ordre *Chonotricha* (le rang du sous-ordre est proposé en raison du caractère aromorphotique de la morphogenèse).

Sous-ordre des *Hypostomata*

Formes à asymétrie plus ou moins marquée du corps, consistant dans l'accroissement allométrique des cinéties méridiennes. Tendance au déplacement de la cavité buccale vers le côté du corps, ensemble avec le pôle apical. Cytostome soit déplacé entre les cinéties méridiennes (*Clasthrostomatidae*, *Paranassulidae* et *Microthoracidae*), soit le déplacement de la cavité buccale indépendante du système de cinéties somatiques (*Nassulidae*, *Dysteriidae*, *Chlamyodontidae*). Le cytostome apparaît dans le creux de la surface corticale — l'atrium oral; il est généralement renforcé par une nasse cyrtophorienne — Fauré-Fremiet 1961 (il y a des exceptions).

1. *Clasthrostomatidae* Kahl, 1926 (?)
2. *Paranassulidae* Fauré-Fremiet, 1962
3. *Microthoracidae* Prella, 1962

Il n'y a pas pour le moment de définition alternatif pour ses familles.

4. *Nassulidae* de Fromentel, 1874

Dyssymétrie relativement faible. Formes, nageant par mouvement rotatif. Ciliature complète. Vacuoles colorées sont caractéristiques. Formes plantivores. Les cinéties méridiennes, situées en dessous de la cavité buccale forment une ciliature spécialisée sous forme de dits cirri, provenant toujours des cinéties du système gauche. Cytostome renforcé par une nasse, alors que l'atrium oral a la forme d'une fente. Débuts de l'hétéromérie du macronucleus. Division percinétale typique.

5. *Dysteriidae* + *Chlamyodontidae* (avec le genre *Allosphaerium*)

Formes aplaties dorsoventralement. Réduction de la ciliature dorsale. Différentiation du disque ventral avec la ciliature somatique spécialisée. Cytostome renforcé par une nasse (exceptions). L'atrium oral renforcé par un nombre plus ou moins grand de segments intégrés de cinétiés préoraux pro-

venant des cinéties somatiques du système gauche. Dyssymétrie nette du corps. Au cours de la bipartition, les processus de régulation liés à la reproduction du modèle de la ciliature. Tendances thigmotactiques fortement marquées. Formes plantivores, mais aussi saprophages, commensales et parasites. Macronucleus hétéromère. Présence fréquente de pédoncle endoplasmique.

Sous-ordre *Chonotricha* (ou famille *Spirochonidae* sensu lato Stein 1854)

Formes sédentaires à hypertrophie nette du côté dorsal. Le disque ventral isolé existe seulement dans la collerette. Le cytotome nu (sans nasse, ni segments buccaux spécialisés des cinéties somatiques). Le disque ventral se ferme à nouveau au cours du bourgeonnement, sur la face corticale nue. Par leur structure les bourgeons se rapprochent de l'*Allospheerium*. Seul les formes commensales, vivant sur les crustacés, fixées au substrate par un pédoncle endoplasmique caractéristique. Transformation du bourgeon en forme adulte par accroissement allométrique. Macronucleus hétéromère.

Les considérations présentées ici démontrent la grande importance du sous-ordre *Cyrtophorina* (= *Hypostomata*) pour comprendre le rapport phylogénétique entre eux et *Hymenostomata* d'une part, et *Chonotricha* d'autre part. Ces recherches confirment en même temps la thèse de Corliss 1962 sur la nécessité d'introduire les critères taxonomiques de l'examen des différentes formes de morphogenèse chez les Ciliés.

Résumé

La morphogenèse divisionnaire de trois représentants des groupes apparentés de *Holotricha*, à savoir des ordres *Gymnostomata* et *Chonotricha*, est décrite en détail.

L'analyse de division des Ciliés englobe le cours de la bipartition de l'appareil nucléaire, les phénomènes liés à la formation de deux champs morphogénétiques et, enfin, le mécanisme de la séparation même de deux individus-fils. Prenant en considération les changements dans la zone corticale de *Ch. uncinata* on constate que le modèle structural des Ciliés appartenant à ce genre n'est pas déterminé, durant la bipartition, par une continuation du cours des cinéties du proter et de l'opisthe au cours de leur développement, mais il évolue en copiant ce modèle général de la ciliature qui est particulier pour l'espèce.

Il semble donc probable, que chez les *Gymnostomata* primitifs la morphogenèse divisionnaire est basée sur une addition des éléments de structure en partant de l'architectonique de l'individu-parent, tandis que chez les *Cyrtophorina* (*Hypostomata*), dont l'évolution est plus avancée, la morphogenèse est basée sur le principe de reorganisation, ce qui aboutit — en conséquence des phénomènes de régulation — à la formation de deux champs morphogénétiques reproduisant, tous les deux, la structure paternelle. La formation d'un disque ventral intégré qui se reproduit comme un tout au cours de la division, constitue une tendance très importante de l'évolution du groupe *Gymnostomata*.

L'évolution de la division, à partir de la „continuation du modèle de structure”, ce qui est typique pour les *Rhabdophorina* et les *Cyrtophorina* primitifs, à une „reorganisation de tout”, nous fait également comprendre le cours du bourgeonnement chez les *Chonotricha*. Le bourgeonnement (étudié chez *He-*

liochona scheuteni) consiste dans la reproduction du disque ventral sur la surface corticale nue, sans aucune relation avec le disque ventral modifié de l'individu-parent, qui ne subit aucune reorganisation pendant la bipartition. Ce deuxième disque ventral qui se forme dans le bourgeon est polarisé parallèlement au disque ventral de l'individu-parent. Néanmoins, les deux disques ne sont pas disposés l'un suivant l'autre, mais l'un à côté de l'autre. Dans le bourgeonnement des *Chonotricha* persiste donc le modèle d'une symétrie métamérique des individus, et la bipartition n'y est ni transcinétale ni homothétigénique.

À la suite du travail présent les traits caractéristiques des macronoyaux hétéromères des *Cyrtophorina* et des *Chonotricha* ont été pris en considération, ainsi que la corrélation entre le cycle macronucléaire et les changements à la surface du corps des Ciliés; les éléments d'hétéromérisation sont indiqués, ainsi que les ressemblances de la division de macronucleus chez *Nassulidae*.

En conséquence de l'étude de l'architecture, de la division et du cycle des macronoyaux hétéromères chez les Ciliés en question, des nouvelles suggestions taxonomiques sont énoncées concernant les *Chonotricha*, une nouvelle définition du genre *Allosphaerium* est formulée, et une nouvelle espèce *A. paraconvexa* sp. n. est décrite. On propose de dégrader les *Chonotricha* au rang d'un sous-ordre appartenant aux *Gymnostomata*, et d'unir les familles *Chlamyodontidae* et *Dysteriidae* en classant dans ce cadre le genre *Allosphaerium* Kidder et Summers 1935.

STRESZCZENIE

Autorka podaje szczegółowy opis morfogenezy podziałowej u trzech przedstawicieli spokrewnionych grup *Holotricha* z rzędów *Gymnostomata* i *Chonotricha*.

Analiza podziału orzęska obejmuje proces podwojenia aparatu jądrowego, przemiany związane z tworzeniem dwóch pól morfogenetycznych w obrębie organizmu rodzicielskiego i wreszcie sam mechanizm rozdziału dwóch osobników potomnych. Rozpatrując przemiany w strefie powierzchniowej u *Ch. uncinata* autorka stwierdza, że plan budowy orzęsków z tego rodzaju nie jest wyznaczany w czasie podziału przez kontynuację przebiegu poszczególnych kinet w tworzącym się proterze i opistorze, ale przez odtworzenie ogólnego wzoru orzęsienia charakterystycznego dla poszczególnych gatunków.

Tak więc wydaje się, że u prymitywniejszych *Gymnostomata* proces morfogenezy podziałowej polega na dobudowie elementów strukturalnych w oparciu o architekturę osobnika macierzystego, natomiast u bardziej zaawansowanych ewolucyjnie *Cyrtophorina* (*Hypostomata*) na reorganizacji prowadzącej poprzez procesy regulacyjne do powstania dwóch pól morfogenetycznych, z których każde odtwarza strukturę rodzicielską. Proces tworzenia zintegrowanej tarczy wentralnej, odtwarzającej się jako całość w czasie podziału jest jedną z najważniejszych tendencji w ewolucji grupy *Gymnostomata*.

Przejście od modelu podziału opartego na „kontynuacji planu budowy” charakterystycznego dla *Rhabdophorina* i prymitywniejszych *Cyrtophorina*, do „reorganizacji całości” jest jednocześnie kluczem do zrozumienia pączkowania u *Chonotricha*. Pączkowanie (analizowane u *Heliochona scheuteni*) polega na odtwarzaniu tarczy wentralnej na nagiej powierzchni kortikalnej całkowicie niezależnie od za-

chowującej się i nie podlegającej reorganizacji w czasie podziału zmodyfikowanej tarczy wentralnej osobnika rodzicielskiego. Ta tworząca się w pączku tarcza wentralna jest spolaryzowana równolegle do tarczy wentralnej osobnika rodzicielskiego. Obie tarcze wentralne ułożone nie są jednak jedną za drugą, ale jedna obok drugiej. W pączkowaniu u *Chonotricha* jest więc zachowany typ symetrii metamerycznej osobników względem siebie, natomiast podział nie jest transkinealny i homotetigeniczny.

Autorka następnie rozważa cechy makronukleusów heteromerycznych u *Cyrtophorina* i *Chonotricha*, korelację przemian w Ma w stosunku do przemian na powierzchni ciała orzęsków i wskazuje na elementy heteromerii w Ma u *Nassulidae*, oraz na podobieństwa podziału Ma.

Na podstawie architektoniki, analizy podziału badanych orzęsków, oraz cyklu Ma heteromerycznych, wysuwane są nowe propozycje systematyczne w stosunku do *Chonotricha*, podana jest nowa definicja rodzaju *Allosphaerium*, oraz opis nowego gatunku *A. paraconvexa* sp. n. Proponowane jest zdegradowanie *Chonotricha* do rangi podrzędu w obrębie *Gymnostomata*, połączenie rodzin *Chlamyodontidae* i *Dysteriidae* i umieszczenie w obrębie tej rodziny rodzaju *Allosphaerium* Kidder et Summers, 1935.

BIBLIOGRAPHIE

- Balamuth W. 1940: Regeneration in protozoa: A problem of morphogenesis. *Quart. Rev. Biol.* 15, 290—337.
- Bütschli O. 1887—1889: *Protozoa*. III. *Infusoria* und System der *Radiolaria*. In: Bronn H. G., *Klassen und Ordnung des Thier-Reichs* 1, 1098—2035.
- Chatton E., Lwoff A., Lwoff M. et Monod J. L. 1931: Sur la topographie, la structure et la continuité génétique du système ciliaire de l'infusoire *Chilodon uncinatus*. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 56, 367—374.
- Corliss J. O. 1958: The phylogenetic significance of *Pseudomicrothorax* in the evolution of holotrichous ciliates. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 8, 367—388.
- Corliss J. O. 1959: An illustrated key to the higher groups of the ciliated protozoa, with definition of terms. *J. Protozool.* 6, 265—281.
- Corliss J. O. 1961: *The ciliated Protozoa: characterization, classification, and guide to the literature*. Pergamon Press.
- Corliss J. O. 1962: Taxonomic procedures in classification of *Protozoa*. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 12, 47—67.
- De Terra N. 1960: A study of nucleo-cytoplasmic interactions during cell division in *Stentor coeruleus*. *Exp. Cell Res.* 21, 41—48.
- Dobrzańska J. 1961: Recherches sur *Allosphaerium* Kidder et Summers 1935. *Proc. 1st Int. Conf. Protozool.* (in press).
- Eismond J. 1895: *Studia nad pierwotniakami okolic Warszawy*. *Pam. Fizyogr.* 13, 97—227.
- Elliott A. M., Kennedy J. R. and Il Jin Bak 1962: Ma events in synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 12, 515—531.
- Fauré-Fremiet E. 1948: Les mécanismes de la morphogenèse chez les Ciliés. *Folia Biotheor.* 3, 25—58.
- Fauré-Fremiet E. 1950: Mécanismes de la morphogenèse chez quelques Ciliés gymnostomes hypostomiens. *Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp.* 39, 1—14.
- Fauré-Fremiet E. 1953: L'hypothèse de la sénescence et les cycles de réorganisation nucléaire chez les Ciliés. *Rev. suisse Zool.* 60, 426—438.
- Fauré-Fremiet E. 1957: Le macronucleus hétéromère de quelques Ciliés. *J. Protozool.* 4, 7—17.
- Fauré-Fremiet E. 1959: La famille des *Nassulidae* (*Ciliata*, *Gymnostomatida*) et le genre *Nassulopsis* n. gen. *C. R. Acad. Sci.* 249, 1429—1433.
- Fauré-Fremiet E. 1961: Les Ciliés *Cyrtophorina* et leur diversification morphologique. *C. R. Ac. Sci.* 252, 3912—3916.
- Fauré-Fremiet E. 1962: Le genre *Paranassula* Kahl (*Ciliata*, *Cyrtophorina*). *Cah. Biol. Mar.* 3, 61—77.

- Fauré-Fremiet E. 1962: Le cytoplasme stomo-pharyngien des Cilies Cyrtophores C. R. Acad. Sci. 253, 357—362.
- Fauré-Fremiet E., Rouiller C. et Gauchery M., 1956: Structure et origine du pédoncule chez *Chilodochona*. J. Protozool. 3, 188—193.
- Frankel J. 1960: Morphogenesis in *Glaucoma chattoni*. J. Protozool. 7, 362—376.
- Guilcher Y. 1951: Contribution à l'étude des Ciliés gemmipares, chonotriches et tentaculifères. Ann. Sci. nat., Zool. (s. 11) 13, 33—132.
- Hanson E. D. 1962: Morphogenesis and regeneration of oral structures in *Paramecium aurelia*: An analysis of intracellular development. J. Exp. Zool. 150, 45—69.
- Ivanić M. 1933: Neue Beiträge zur Kenntnis der mit den Reorganisationprozessen des Kernapparates verbundenen Vermehrungsruhestadien von *Chilodon uncinatus* Ehrbg., nebst einem neuen Beiträge zur Kenntnis der promitotischen Teilung des Grosskernes bei Infusorien. Arch. Protistenk. 79, 170—199.
- Ivanić M. 1938: Über die mit der Chromosomenbildung verbundene promitotische Grosskernteilung bei den Vermehrungsruhestadien von *Chilodon uncinatus*. Arch. Protistenk. 91, 61—68.
- Kahl A. 1935: Wimpertiere oder *Ciliata* (Infusoria). In: Die Tierwelt Deutschlands, Jena, 18—30, 1—886.
- Kaneda M. 1959: The morphology and morphogenesis of the cortical structures during binary fission of *Chlamydon pedarius*. J. Sci. Hiroshima Univ. (B 1), 18, 265—277.
- Kaneda M. 1960: Phase contrast microscopy of cytoplasmic organelles in the gymnostome ciliate *Chlamydon pedarius*. J. Protozool. 7, 306—313.
- Kaneda M. 1960: The structure and reorganization of the macronucleus during binary fission of *Chlamydon pedarius*. Jap. J. Zool. 12, 477—491.
- Kaneda M. 1961: On the division of macronucleus in the living gymnostome ciliate, *Chlamydon pedarius* with special reference to the behaviors of chromonemata, nucleoli and endosome. Cytol. 26, 89—104.
- Kaneda M. 1961: Fine structure of the macronucleus of the gymnostome ciliate, *Chlamydon pedarius*. Jap. J. Genetics 36, 223—234.
- Kazubski S. L. 1963: Studies in the parasitic ciliate *Thigmocoma acuminata* Kazubski. 1958 (*Thigmatricha-Thigmocomidae*). Acta Protozool. 1, 237—278.
- Kidder G. W. and Summers F. M. 1935: Taxonomic and cytological studies on the ciliates associated with the amphipod family *Orchestiidae* from the Woods Hole district. I. The stomatous holotrichous ectocommensals. Biol. Bull. 68, 51—68.
- Kimball R. F. and Prescott D. M. 1962: Desoxyribonucleic acid synthesis and distribution during growth and amitosis of the macronucleus of *Euplotes*. J. Protozool. 9, 88—92.
- Klein B. M. 1926: Über eine neue Eigentümlichkeit der Pellikula von *Chilodon uncinatus* Ehrbg. Zool. Anz. 67, 160—162.
- Klein B. M. 1928: Die Silberliniensysteme der Ciliaten. Weitere Resultate. Arch. Protistenk. 62, 177—260.
- Klein B. M. 1943: Differenzierungsstufen des Silberlinien- oder neuroformativen Systeme. Arch. Protistenk. 96, 1—31.
- Kluss B. C. 1962: Electron microscopy of the macronucleus of *Euplotes eurystomus*. J. Cell Biol. 13, 463—465.
- Kormos J. und Kormos K. 1958: Die Zellteilungstypen der Protozoen. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 8, 127—148.
- Kudo R. R. 1954: Protozoology (4th ed.). Springfield.
- Lwoff A. 1950: Problems of morphogenesis in ciliates. New York.
- MacDougall M. S. 1925: Cytological observations on gymnostomatous ciliates, with a description of the maturation phenomena in diploid and tetraploid forms of *Chilodon uncinatus*. Quart. J. Micr. Sci. 69, 361—384.
- MacDougall M. S. 1929: Modifications of *Chilodon uncinatus* produced by use of ultraviolet radiation. J. Exp. Zool. 54, 95—109.
- MacDougall M. S. 1931: Another mutation of *Chilodon uncinatus* produced by use of ultraviolet radiation, with a description of its maturation processes. J. Exp. Zool. 58, 229—236.

- MacDougall M. S. 1936: Étude cytologique de trois espèces du genre *Chilodonella* Strand. Morphologie, conjugaison, réorganisation. Bull. Biol. France Belgique, 70, 308—331.
- Mohr J. L. 1948: *Trichochona lecythoides*, a new genus and species of marine chonotrichous ciliate from California, with a consideration of the composition of the order *Chonotricha* Wallengren, 1895. Occ. Pap. Allan Hancock Fdn. 5, 1—21.
- Mugard H. 1948: Régulation du nombre des cinéties au cours du cycle de croissance et de division chez un Cilié: *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet. Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp. 37, 204—213.
- Piekarski G. 1941: Endomitose beim Grosskern der Ziliaten? Versuch einer Synthese. Biol. Zbl. 61, 416—426.
- Plate L. 1888: *Heliochona sessilis* mihi, eine neue Vorticelline in studien über Protozoen. Zool. Jahrb. 3, 135—200.
- Prelle A. 1962: Position systématique du Cilié Holotriche *Leptopharynx costatus* Mermod, 1914. C. R. Acad. Sci. 254, 4071—4073.
- Prescott D. M. and Kimball R. F. 1961: Relation between RNA, DNA and protein syntheses in the replicating nucleus of *Euplotes*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 47, 686—694.
- Raabe Z. 1959: Recherches sur les Ciliés thigmotriches (*Thigmotricha* Ch. Lw.). VI. Sur les genres „*Ancistruma*”, „*Ancistrina*” et les genres voisins. Acta Parasitol. Pol. 7, 215—247.
- Raikov I. B. 1962: Der Kernapparat von *Nassula ornata* Ehrbg. (*Ciliata*, *Holotricha*). Zur Frage über den Chromosomenaufbau des Makronucleus. Arch. Protistenk. 105, 463—488.
- Rudzinska M. A. 1961: The use of a protozoan for studies on aging. I. Differences between young and old organisms of *Tokophrya infusionum* as revealed by light and electron microscopy. J. Gerontol. 16, 213—224.
- Seshachar B. R. 1950: The nucleus and nucleic acids of *Chilodonella uncinatus* Ehrbg. J. Exp. Zool. 114, 517—543.
- Sonneborn T. M. 1947: Recent advances in the genetics of *Paramecium* and *Euplotes*. Adv. Genet. 1, 263—358.
- Sonneborn T. M. 1960: The gene and cell differentiation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 46, 149—165.
- Swarzewsky B. 1928: Beobachtungen über *Spirochona elegans* n.sp. Arch. Protistenk. 61, 185—222.
- Tartar V. 1941: Intracellular patterns: Facts and principles concerning patterns exhibited in the morphogenesis and regeneration of ciliate protozoa. Growth 3 (Suppl.), 21—40.
- Tuffrau M. 1953: Les processus cytologiques de la conjugaison chez *Spirochona gemmipara* Stein. Bull. Biol. France Belgique, 87, 314—322.
- Waddington C. H. 1957: Principles of embryology. London.
- Wallengren H. 1895: Studier öfver ciliata infusorier. II. Lunds Universitets Ars-skrift 30, 1—77.
- Weisz P. B. 1954: Morphogenesis in protozoa. Quart. Rev. Biol. 29, 207—229.
- Zeuthen E. 1961: Cell division and protein synthesis. In: Biological Structure and Function, vol. II. London — New York. 537—548.

EXPLICATION DES PLANCHES I—V

Morphogenèse de *Chilodonella uncinata*

- 1: Proter juste après la division avec la partie caudale non resorbée.
- 2: Individu adulte avec une cinétie interne allongée du système gauche et avec une petite cinétie formée à nouveau vers la zone équatoriale.
3. Début de la division des cinéties; formation à nouveau d'une cinétie à l'extérieur du système droit.
- 4: Différentiation des segments oraux des cinéties somatiques dans la région du futur sillon divisionnaire.
- 5: Enroulement du troisième segment oral interne.
- 6: Déplacement de la ciliature orale formée chez l'opisthe.

Allospiraerium paraconvexa sp. n.

- 7: Photographie prise in vivo au contraste-phase; on voit la forme caractéristique d'atrium oral, le pédoncle, les structures granulaires sur des bords et les deux vacuoles pulsatiles transparent.
- 8: Photographie prise in vivo au contraste-phase, d'un individu plus aplatis; trois cinéties orales sombres sont visibles dans l'atrium oral.
- 9: L'argyronème. Technique de Chatton et al. d'après Corliss 1953.
- 10: Photographie de l'appareil nucléaire prise in vivo (section optique); on voit le paracaryomère central et de la chromatine macronucléaire répartie sur des marges.

Étapes de division d'*Allospiraerium paraconvexa* sp. n.

- 11: Photographie (contraste-phase, in vivo) de la croissance allométrique des trois cinéties externes du système droit dans la région équatoriale; on voit une petite cinétie externe formée à nouveau à l'endroit où va se produire le sillon divisionnaire.
- 12: Recourbement vers le centre de deux cinéties orales de futur opisthe, à la région équatoriale, photographié in vivo au contraste-phase; le macronoyau allongé et irrégulier, deux micronoyaux sont présents près de ses pôles.
- 13: Préparation de l'argyronème d'après Klein; l'endroit où va se former l'atrium oral de l'opisthe est bien visible; sur le bord on aperçoit nettement trois cinéties orales recourbées appartenant à l'opisthe futur.
- 14: Photographie d'un stade avancé de la bipartition, prise in vivo au contraste-phase; on voit quatre vacuoles pulsatiles et le pédoncle du proter futur au cours de sa formation à nouveau; les cinéties orales n'ont pas pénétré encore sur le terrain isolé d'atrium oral qui va succomber à l'opisthe.

Heliochona scheuteni, photographiée in vivo au contraste-phase

- 15: La collerette entièrement développée appartenant à un individu fixé; les lobes différenciés portent des grosses épines; les cinéties obliques du système gauche sont visibles à travers de la poche ventrale; au dessous du goulot on voit une vacuole pulsatile et deux cinéties du champ morphogénétique.
- 16: Bourgeonnement; au champ morphogénétique concave les sept cinéties sont orientées perpendiculairement par rapport à l'axe morphologique de l'individu adulte.
- 17: Un bourgeon avec des petits primordia des trichites dans sa partie supérieure.
- 18: Un cas de pedogenèse; deux champs morphogénétiques sont disposés l'un à côté de l'autre et le sillon de bipartition apparaît, il n'y a pourtant qu'un seul macronoyau.

Cycle macronucléaire durant la division d'*Allospheerium paraconvexa* sp. n. (in vivo, contraste-phase)

19: Formation de l'endosome; les sphérules (peut-être les nucléoles) sont visibles aux marges de macronoyau.

20: Croissement de l'endosome et l'augmentation du nombre de sphérules marginales.

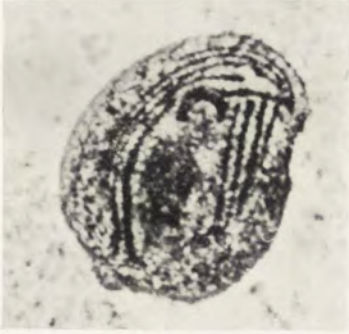
21: La repartition bipolaire de la chromatine; le paracaryomère avec son endosome déjà moins net est situé au centre; les sphérules sur des marges persistent, mais elles diminuent.

22: L'encerclement du paracaryomère par l'orthocaryomère; macronucleus irrégulier; halo net entre le cytoplasme et le noyau.

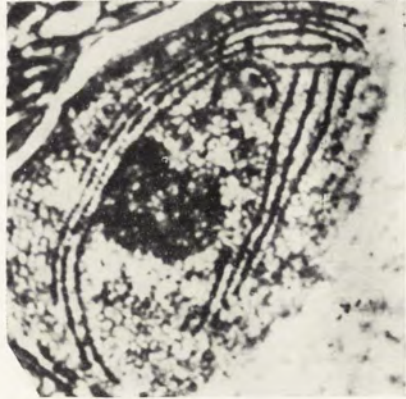
23: Séparation des macronoyaux descendants; les vacuoles pulsatiles déjà au nombre de quatre; le stade correspond à ceci présenté par la photographie 14.

24: Structure segmentée manifestée par les deux macronoyaux descendants, symétriques; dans le macronucleus de l'opisthe (en bas) la chromatine commence à se déplacer sous la membrane nucléaire. Le corps résiduel n'existe pas.

1



2



3



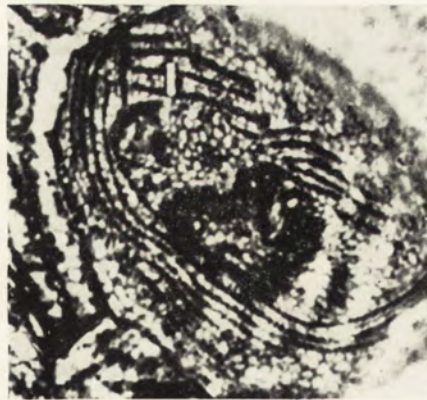
4



5



6



J. Dobrzańska-Kaczanowska

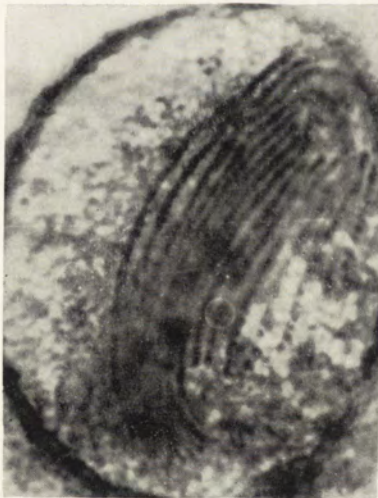
auctor phot.



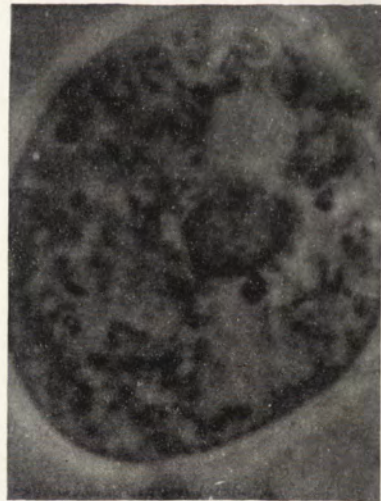
7



8



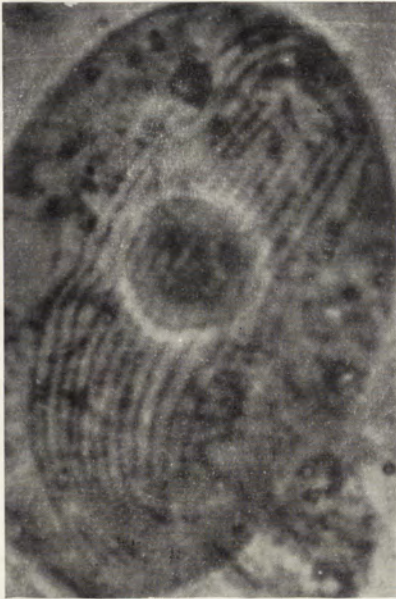
9



10

J. Dobrzańska-Kaczanowska

auctor phot.



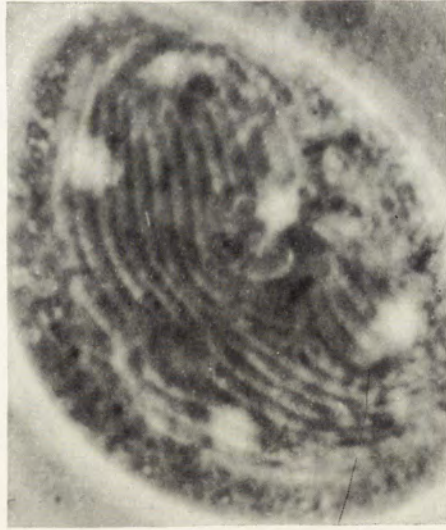
11



12



13



14

J. Dobrzańska-Kaczanowska

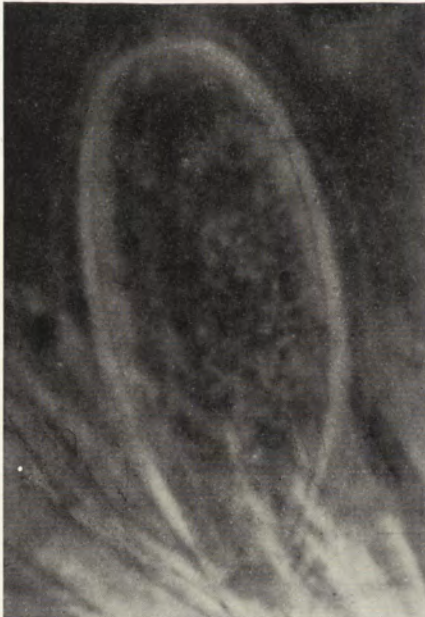
auctor phot.



15



16



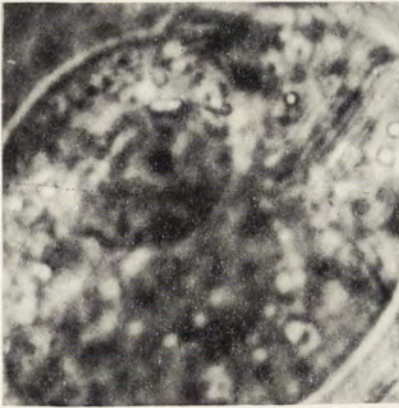
17



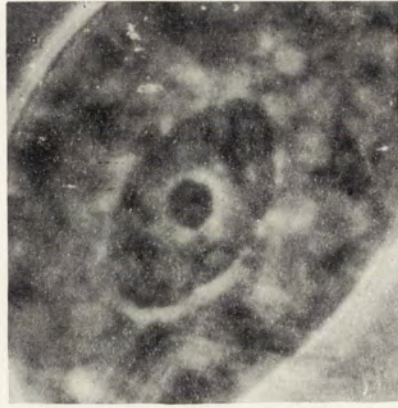
18

J. Dobrzańska-Kaczanowska

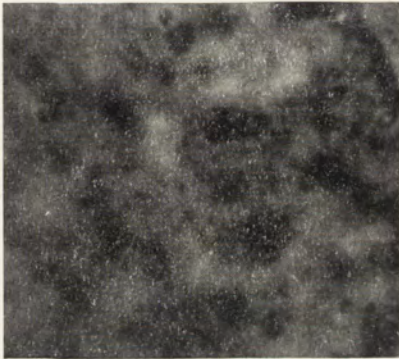
auctor phot.



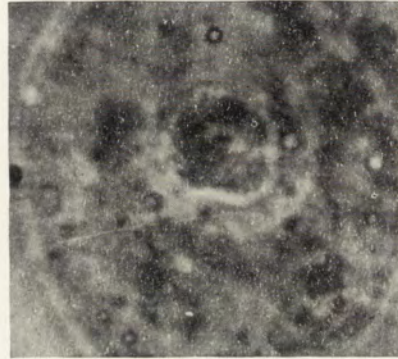
19



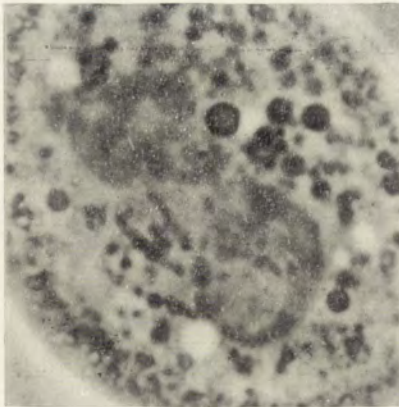
20



21



22



23



24

J. Dobrzańska-Kaczanowska

auctor phot.

Andrzej KACZANOWSKI

Morphology and morphogenesis of the sucker
in *Hysterozineta paludinarum* Diesing (*Ciliata*, *Thigmotricha*)
as observed in living material

Badania przyżyciowe nad morfologią i morfogenezą przyssawki
u *Hysterozineta paludinarum* Diesing (*Ciliata*, *Thigmotricha*)

Hysterozineta paludinarum (Stein, 1861) a parasitic ciliate occurring in the posterior intestine segment of the snail *Bithynia tentaculata*, was the object of a detailed morphological and morphogenetical study of Raabe 1949. This author paid special attention to the structure and morphogenesis of the sucker. Later on the sucker was also investigated by Puytorac 1957 and by Kaczanowski 1961. The last study is to be supplemented now by some details and by discussion of the skeletal structures of the sucker in *H. paludinarum*.

The snails supplying the material for study originated from the littoral of the Żarnowiec lake in North Poland (Pomorze).

All observations were carried out on living material using the phase contrast optics. For comparison the preparations of Prof. Zdzisław Raabe were studied; I wish to express my vivid thanks to him for giving this material at my disposal.

Functional morphology of the sucker

Ciliates of the *Hysterozinetidae* family are conspicuously flattened. One of their body surfaces bears a sucker, forming the thigmotactic area. Raabe considers the flattening of the *Hysterozinetidae* body as lateral and for that reason he defines the body surface with the sucker as the left — and the opposite — as the right side. According to this view the margins of the body would be defined as follows: the ventral border is that with the peristome extending along it, and the opposite margin is the dorsal (Fig. 1).

The sucker of *Hysterozinetidae* is an area of pellicle devoid of cilia. It has the shape of the letter V with arms oriented backwards. The pellicle between the arms is slightly concave producing a shallow groove, which receives the rows of cilia (medial kineties) running subsequently backwards across the middle of the left body side. Their number usually amounts 12. The last of those kineties (beginning from the side of the ventral margin towards the dorsal) reaches the most anterior position. Any next of the medial kineties

is slightly shorter than the preceding one. In this way a small asymmetric fan is formed. Most frequently the left area — lying on the side of the dorsal margin — is longer and more extensive than the right one. This asymmetry is insignificant when compared with that in the sucker of *H. cheissini* (Raabe, 1949) and is associated with the general asymmetry of the body and of the ciliary system (Raabe 1949, Kaczanowski 1961, Puytorac 1957).

The mechanical properties of the naked pellicle area of the sucker are different from those of the remaining pellicle being not stretchable and rather rigid. On the other hand it shows a certain elasticity since the ends

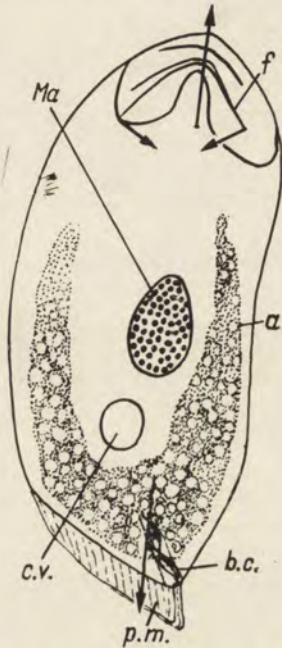


Fig. 1. General view of *H. padinarum* from the left side
f — fibers of the sucker, *Ma* — macronucleus, *a* — area of the food vacuoles, *cv* — contractile vacuole, *pm* — peristomal membrane, *bc* — buccal cavity

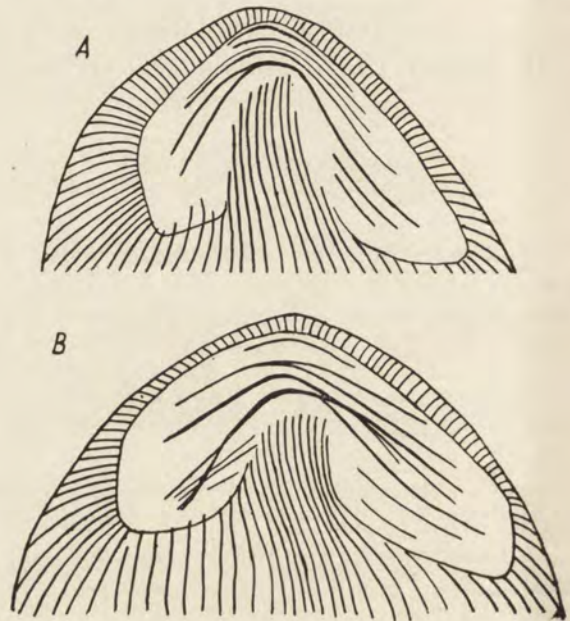


Fig. 2. Two forms of the sucker (A and B)

of the sucker may approach to one another. This sort of curving occurs in the sucker when some forces (e.g. strong water current) tend to detach the ciliate from the substrate to which it is clinging. Simultaneously water is driven out from the pellicle groove which separates the arms of the sucker, by the ciliary movements in this place. This process was observed by Raabe 1949. In this way clinging of the sucker to the substrate is strengthened passively and the force necessary to overcome it — increases.

Below the sucker surface, fibers of supporting character are running. They form 3—6 parabolic arcs (Fig. 2). The last one (from the anterior end backwards) touches the terminal segment of the medial kineties with its flexure.

In the right part of the sucker it fuses with the preceding arc or crosses it which produces the impression of bifurcation of the arc. In the Fig. 2B also the left arm of the 3rd arc is sometimes split into 2 — 3 fibers. Usually the left arms of the fibrillar arcs — except the most anterior — are somewhat longer and bend less abruptly towards the right arms. Besides the principal fibrillar arcs, 2 or 3 short fibers are usually present on the left arm of the sucker. They are much thinner than the remaining fibers. So the disposition of the sucker fibers in *H. paludinarum* show the asymmetry in relation to the longitudinal axis of the ciliate body. The observation in phase contrast optics revealed that the structure of some of those fibers is not homogenous. They consist of numerous tiny fibers. This structure becomes evident in the ciliate body squashed with a coverslip. In the Fig. 3 it is shown that it concerns before all two first arcs fused together and also the 4th arc. The arms of those arcs are split into numerous elements by the action of mechanical pressure.

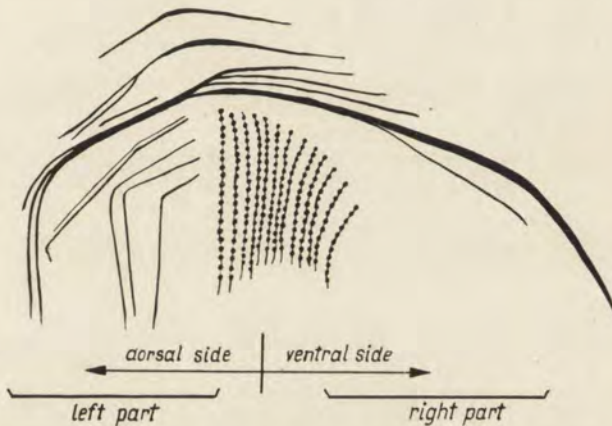


Fig. 3. Splitting of fibers of the sucker as a result of mechanical pressure

All above facts indicate that the fibers of *HysteroGINetidae* are of a skeletal character and the term myonemes — given by former authors — is not justified. Puytorac 1957 describing the structure of the sucker in *Ptychostomum chattoni* — another ciliate of the *HysteroGINetidae* family — assumes that the fibers of this ciliate are of the nature of skeletal fibrillar elements and that their structure is similar to that of cytoskeletal fibrils in *Astomata*. However, in his opinion it is difficult to ascertain whether those fibers — which fail to show any connection with the kinetics in the course of morphogenesis of the sucker — are contractile or not. Puytorac suggests the necessity of using the electron microscope for solving this question.

Yet the system of skeletal fibrils in *H. paludinarum* differs from that in *Ptychostomum chattoni*. The parabolic fibrillar arcs in *HysteroGINeta* run along the middle of the sucker surface which is deprived of cilia. On the other hand, the reduction of the sucker length is not occurring. This fact seems to be a sufficient evidence to exclude the possibility of the myonemal — contractile — character of the fibrils. The approaching of the ends of the sucker arms to one another is surely connected with the forces acting in these ends

in a direction perpendicular to the course of fibrillar arcs (Fig. 1). These are tension forces associated with great differences in rigidity and in the ability of stretching of the sucker pellicle and of that surrounding the sucker areas. As mentioned above such forces appear when the ciliate is subjected to the action of external forces stretching its body along the antero-posterior axis.

Morphogenesis of sucker and of the fibrillar system

The morphogenesis of the sucker was studied by Raabe 1949, Puytorac 1957, Kaczanowski 1959. Formation of the sucker in *Hysteroecinetidae* is closely connected with the mechanism of cytokinesis of the ciliate. The division in *Hysteroecinetidae* is preceded by formation of a dense-meshed argentophilic network in the middle of the left body side. Simultaneously 12 central kineties bend towards one another. They become interrupted soon after. The division furrow forms an arc, its apex being oriented forwards. The furrow proceeds from the middle towards the margins reaching sooner the ventral than the dorsal margin (Raabe 1949, Puytorac 1959). The interrupted kineties lying on the sides of the central ones, shift backwards clearing in this way the lateral areas of the sucker located just behind the division furrow (Raabe 1949). Those kineties fail to bend towards the middle line of the left body side, or their bent is much less marked than that of the medial kineties, which are also somewhat pushed backwards. They still remain much crowded and bend slightly in the direction of the dorsal margin. In the fully formed sucker the kineties reaching the right area of the sucker remain stretched whereas those reaching the left are slightly inclined towards the body apex. It seems that the ends of the medial kineties are initially strongly connected with the apical body region of the opisthe, whereas the kineties lying on their both sides may be gradually pushed by the small meshes of the argyronem which accrue backwards from the division furrow. Subsequently the medial kineties which closely approach to one another with their ends and are pressed laterally by the growing sucker areas are subjected to a certain pressure from forward and — as result they are all slightly bending in the same direction, as is shown in the Fig. 3.

Formation of cytoskeletal fibers

In the morphogenesis of the sucker several fibers arise independently from one another in its area. They fail to pass from one area to another. In the Fig. 4, 4 fibers are seen in the right and 5 in the left area. Later on fibres formed in different areas fuse together producing arcs. This process does not concern the most anterior fiber which remains single from the beginning. It arises in the right area and then grows towards the left one. In the left area of the sucker 5 fibers run parallel to the longitudinal kineties which subsequently shift backwards.

On the right area, lying on the side of the ventral margin, fibers run transversally to the kineties. They arise exclusively on the naked sucker pellicle. They fail to show any connection with the kineties. The asymmetry of the fibrillar system before formation of continuous arcs is much more marked initially than at a later stage but it never disappears completely.

The observation of cytodieresis and morphogenesis of the sucker in *HysteroGINETIDAE* reveals an asymmetric disposition of cortical properties on both sides of the medial body line. This is expressed in the different course of the division furrow towards the ventral and towards the dorsal body margin. The asymmetry is also marked in the structure of the sucker, in the pattern of the fibrillar system and of the apical ciliature of the opisthe body during division as well as in the fully formed individual after division. This definitive form of the ciliate seems to be a fixed stage of the dynamic state arising already in the course of division.

Probably the cytoskeletal sucker fibers in *HysteroGINETIDAE* are of a similar character as the cytoskeletal fibers of *Astomata* built up of paracollagen (Puytorac 1961).

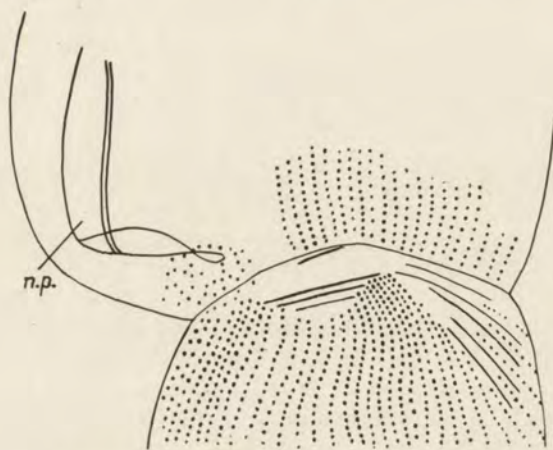


Fig. 4. Diagram of a dividing individual. In the opisthe the formation of sucker areas and fibers, and in the proter of a new peristome, are seen; np — the new peristome

The electron microscope study of Puytorac 1959, 1961 provided also evidence that the cytoskeletal fibers of *Astomata* present strengthened kinetodesms.

When following the course of sucker fibers in different species of *HysteroGINETIDAE*, a concept may be put forward of a phylogenetic line expressed in a sequence of forms: *H. eiseniae*, *H. cheissini*, *H. paludinarum*.

In *H. eiseniae* on both sucker areas numerous oblique parallel fibers occur. Only the first fibers are forming arcs which pass from one sucker arm upon the other. In *H. cheissini* numerous arcs — most frequently 13 (Rabe 1949), and in *H. paludinarum* only 3—5 are present. In the last case the arcs are much thicker than in the other forms. If the ciliates just discussed above really represent a single phylogenetic series, the tendency to fuse their fibers into arcs associated with their thickening and reduction of number would be characteristic for this evolutive trend. May be that the total supply of the skeletal material in different species of *HysteroGINETIDAE* is similar.

The shape of the sucker arcs may be looked upon as the function of the sucker shape, since a strict correlation is observed between the formation of the shape of the sucker and the development of the fibrillar arcs. On the other hand, in some arcs splitting of arms occurs which may be much increased by mechanical pressure.

*

The following suppositions may be put forward:

1. The arising fibers are closely associated with the pellicle of the sucker in the period of formation of its shape.
2. The factors acting in the orientation of fibers involve simultaneously their fusion into thick fibers and the condensation of the skeletal material along some lines which are probably traced by the cortical structures (system of meshes of the argentophilic network on the surface of the sucker). This process would correspond to the orientation, linking together and condensation of skeletal fibers along some lines in *Astomata* (Puytorac 1959, 1961).

The assumption of the suggested theory would require a study of the ultrastructure and of the physico-chemical properties in *Astomata* and in *Hystero-cinetidae*.

The systems of sucker fibers in other *Hystero-cinetidae* are structures in which numerous fibers are running on different levels and in various directions (*Pt. chattoni*, *Pt. lumbriculi*, *Elliptothigma limnodrili*, *Pt. campelomae*). In *Pt. chattoni*, *Pt. lumbriculi* and in *Elliptothigma limnodrili* the majority of fibers run transversally or obliquely to the groove lying between the internal margins of the sucker areas (Puytorac 1959, 1961). Those fibers constitute six principal systems; in each of them they are running parallel to one another. Yet the fibers of different systems run on different levels and in various direction. The fibrillar system is here a structure supporting the groove between the arms of the sucker (Puytorac 1957). In *Pt. campelomae* the majority of fibers are running within the sucker areas, but some cross fibers are also found (Kozloff 1960).

As it seems, in those species, at least the majority of the skeletal fibers fail to show any close connection neither with the ciliary system — as they do in *Astomata* — nor with the pellicle of the sucker as it occurs in *Hystero-cineta*. This supposition is confirmed by the results of Puytorac on morphogenesis of the sucker in *Pt. chattoni*: only the fibers belonging to the first most superficial level arise in connection with kineties, whereas the fibers of the other five levels fail to show such a connection since the initial stage of their formation.

It should be pointed out that the sucker fibers in *Pt. chattoni* are much more numerous, thinner and shorter than the sucker arcs in *Hystero-cineta*.

The results presented in this study may support the theory that in the cases of a stronger connection of the fibers with the surface system, factors are acting which orientate the fibers and involve their fusion and condensation. As a result, instead of numerous systems built up of small and short fibers, structures arise consisting of several long and thick elements.

Summary

The course of the skeletal fibers in the sucker of the ciliate *HysteroGINETA paludinarum* Diesing is described. Their character and role are analysed. Observations concerning their morphogenesis are discussed. The author is inclined to the view that the character of the skeletal fibers in *H. paludinarum* is similar to that in *Astomata* of the family *Hoplitophryidae*. The different course of skeletal fibers in *HysteroGINETA* sucker seems to be due to the different course of the kineties in the anterior body part in *Astomata*. An attempt is made to analyse the organizing role of kineties.

STRESZCZENIE

Autor opisuje przebieg włókien szkieletalnych w przyssawce wymoczka *HysteroGINETA paludinarum* Diesing, analizuje następnie ich rolę i charakter, oraz podaje obserwacje dotyczące ich morfogenezy. Autor skłania się do poglądu, że włókna szkieletalne *H. paludinarum* mają podobny charakter, jak włókna szkieletalne *Astomata* z rodziny *Hoplitophryida* i przypuszcza, że odmienny przebieg włókien szkieletalnych przyssawki *HysteroGINETA* w porównaniu do *Astomata* wiąże się z odmiennym przebiegiem kinet przedniej okolicy ciała. Autor stara się więc wskazać na organizacyjną rolę kinet.

REFERENCES

- Kaczanowski A. 1961: Studies on *Protoptychostomum simplex* (André, 1915). Acta Parasitol. Pol. 9, 257—272.
- Kozloff E. N. 1960: Morphological studies on holotrichous ciliates of the family *HysteroGINETA*idae. I. *HysteroGINETA eiseniae* Beers and *Ptychostomum campelomae* sp. nov. J. Protozool. 7, 41—50.
- Puytorac P. de 1957: *Elliptothigma limnodrili* Meier. Intérêt de ce Cilié dans une recherche des parentés phylétiques de certains Infusoires astomes. C. R. Acad. Sci. 244, 1079—1082.
- Puytorac P. de 1957: L'architecture de la ventouse chez l'Infusoire *Ptychostomum chattoni* Rossolimo. Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp. 46, 231—246.
- Puytorac P. de 1959: Le cytosquelette et les systèmes fibrillaires du Cilié *Metaradiophrya gigas* de Puytorac, d'après microscope électronique. Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp. 48, 49—62.
- Puytorac P. de 1961: Complément à l'étude de l'ultrastructure des Ciliés du genre *Metaradiophrya* Heid., 1935. Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp. 50, 35—58.
- Raabe Z. 1949: Studies on the Family *HysteroGINETA*idae Diesing. Ann. Mus. Zool. Pol. 14, 21—68.

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

V. F. MASHANSKY, L. N. SERAVIN, L. N. VINNICHENKO

Ultrastructure of the ciliate *Loxodes rostrum* (O. F. M.) in relation to the mode of its water transport

Ультратонкое строение инфузорий *Loxodes rostrum* (O.F.M.)
в связи с особенностями водообмена

A number of special structures in the cytoplasm of the fresh water ciliate *Loxodes rostrum* has been reported in the light microscopy. In the cytoplasm of this ciliate, below its dorsal surface the so called Müller bodies are present; their function is not fully elucidated. Numerous pigment granules of an unknown origin and structure are found in cytoplasm. Excretory granules scattered at random over the cytoplasm have not been investigated either.

In the light microscope observation, the cytoplasm of *Loxodes rostrum* looks much vacuolized and contains meshes of different size — from very big to scarcely visible under the highest magnification of microscope (Schewiakoff 1896, Penard 1917, Kahl 1931, Kudo 1954).

The presence of contractile vacuoles is characteristic for the majority of fresh water ciliates. The vacuoles promote the continuous water exchange between the organism and the medium (Kitching 1956, Prosser 1952). There are no contractile vacuoles in *Loxodes rostrum* (Penard 1917, Kahl 1931 and others). This fact involves the question of existence of other organelles participating in the process of water transport in this ciliate or perhaps of some differentiation in the cytoplasm structure which might be associated with this function.

All these peculiarities of the structure of *L. rostrum* were the reason for choosing just this species as the subject of investigation.

Material and methods

The ciliates *L. magnus* and *L. rostrum* developing in great number in a mixed culture of aquarium type were used for study. The material was provided from a pond in the park of the biology institute in Peterhoff near Leningrad. Since no perceptible difference was found in the cytoplasm structure of both species, all the informations presented below concern *L. rostrum*.

Ciliates were fixed in 2% solution of osmium tetroxide in the medium of Losina-Losinsky 1929, for 15—20 min. Subsequently the material was transferred to 2% agar-agar (Mashansky i Beznosikov 1961), and

without previous washing, dehydrated in rising concentrations of alcohol and supplementary contrasted in 1% solution of phospho-wolframic acid or uranyl acetate and embedded in metacrylate. Ultrathin sections were studied under the electron microscope JEM 5-G at 80 kv. The direct electron optics magnification amounted 8000 \times and 20000 \times , followed by the subsequent light optics magnification.

Results

Body surface

In contrast to the electron microscopic results on *Paramecium caudatum*, *P. aurelia*, *Tokophrya*, *Tetrahymena pyriformis*, *Colpidium colpoda* and others (Metz and oth. 1953, Pitelka 1956, Grimstone 1961, Cheissin and Mosevich 1962), in *L. rostrum* the pellicle is formed by one cytoplasmic membrane adhering directly to the subpellicular endoplasm layer (Pl. I 1, II 2).

As shown by the light microscope study, in *Loxodes* only the inferior body side, facing the substrate (morphologically — the right border) bears cilia, while the superior side (morphologically — left border) is fully deprived of them. This finding is confirmed by the electron micrographs. Cilia are located in furrows between the longitudinal ridges of a height 1 — 2 μ , the interstices between the cilia being 0.2 — 0.5 μ and those between the ridges 1 — 1.5 μ . The ridges are absent on the superior surface of the body which is deprived of cilia. On the cross sections of this surface some flattened protuberances are seen producing a slightly wavy line.

Pigment granules

In cytoplasm, close to the cytoplasmic membrane numerous spherical grains 0.1 μ in diameter are located. Their localization and dimensions indicate that they correspond to the pigment granules reported by Penard 1917 after light microscope examination. Those homogenous electron-dense grains are coated by capsules formed by a double membrane (Pl. I 1, II 2). In sections of the superficial layer of the ciliate body, places may be found where the envelope of the capsule coating the pigment grain pass continuously into the cytoplasmic membrane and the cavity of the capsule is communicating with the external medium (Pl. III 4). Besides, the pigment granules are located outside the ciliate body. Capsules opening outside with no grains (Pl. III 4) are also found sometimes. Considering the fact that the dimensions of a grain and those of the capsule coating it are very similar, the supposition that the sectioning omitted the grain must be decidedly excluded. The presence of empty or open capsules and occurrence of grains outside the ciliate body allow to postulate that those grains are excreted to the surrounding medium.

The vesicular structure

The structure of *L. rostrum* cytoplasm proved to be very peculiar. The body contains numerous transparent areas — vesicles filled presumably by a liquid (Pl. III 2, III 5, IV 7, V 10, VI 12). The dimensions of those vesicles fluctuate from some structures visible distinctly under the light microscope of several microns in diameter — to vacuoles of several hundred Ångströms.

The number and dimensions of vesicles of the inferior body surface are much different from those of the superior. In the inferior part, usually numerous vesicles of different size are present, their diameter not exceeding 1.0—1.5 μ . In the superior body part, very large vesicles of irregular form are mostly found. Sometimes they exceed some ten μ in diameter and are well visible under the light microscope. Those bulky vesicles nearly adhere to the cytoplasmic membrane being separated from it only by a thin cytoplasm layer.

Between the vesicles, bridges or stripes of cytoplasm of different width and length are formed which surround and sometimes cross the vesicles (Pl. III 5). In all cases, the bridges are separated from the vesicles by a membrane. In this way; the whole cytoplasm of *L. rostrum* is practically concentrated in the bridges which are separated from the cavity of the vesicles by membranes.

The membranous structure of cytoplasm

A remarkable fact is the high degree of accumulation of membranous structures in the cytoplasm of *L. rostrum*. The endoplasmic reticulum is especially well developed. It consists of numerous tubules, vesicles and cisterns. Tubules are of a rather constant diameter (300—400 Å) and contain sometimes a homogenous substance of a higher density than that of the surrounding cytoplasm.

More or less compact layers of cytoplasm arise in those regions of *L. rostrum* body where several cytoplasmic bridges meet together (Pl. II 3, III 5). Tubules of the endoplasmic reticulum run in those places in various directions, so that in sections they have circular, oval or double profiles. Their membranes are smooth or — in some places — rough which indicates the presence of Palade's grains (Pl. II 3). Tubules often terminate as small cisterns. Their walls are either smooth or covered with Palade's grains. The internal cavity of cisterns contains accumulations of a homogenous or tiny granulated material, sometimes a more compact body is present in the centre (Pl. I 1, II 5). Dimensions of those bodies vary from a small grain 200—300 Å in diameter to spherical inclusions of 0.1 μ in diameter with the character of pigment granules. Those inclusions may be observed as well in the profound layers of cytoplasm as in the superficial zone and also below the cytoplasmic membrane where — as shown above — a great accumulation of them occurs. The micrographs suggest that formation of the pigment granules occurs in the endoplasmic reticulum.

Besides the tubules of the endoplasmic reticulum which are more or less scattered at random, in some places of cytoplasm rows of regularly oriented tubules are observed (Pl. IV 6). Such rows of tubules are mostly — but not exclusively — found in the narrow cytoplasmic bridges connecting the more compact portions of cytoplasm (Pl. IV 6). Considering the possible carrying (canalicular) role of the endoplasmic reticulum elements (Porter and Vamada 1960) it may be assumed that the transport between the regions of cytoplasm occurs through those canals.

Often in cytoplasm rather big vesicles occur, 0.2—0.3 μ in diameter, coated by smooth membranes (Pl. II 3, IV 7, 8). Those vesicles sometimes communicate with the canals of the endoplasmic reticulum. The internal cavity of the vesicles is filled with a transparent material and never contains any inclu-

sions. In some places the vesicles are located in the direct vicinity of the wall of the big vacuoles or they communicate with their cavity (Pl. IV 7). In the posterior part of the animal's body, near the surface, such vacuoles are arranged in chains at the base of the ridges or in the ridges themselves (Pl. IV 7, 8). Sometimes the neighbour vesicles communicate with each other, producing rather long and broad canals parallel to the body surface. Those rows nearly reach the cytoplasmic membrane. The chains of vesicles may terminate in an extension in the shape of ampulla (Pl. IV 7, 8). Ranges of vesicles lie also along the body surface immediately under the cytoplasmic membrane producing its protuberances and open often into the external medium (Pl. IV 7, 8). The last case is never observed in the anterior and medial part of *L. rostrum* body. In the vesicles open to the outside, the internal cavity collapses, the cytoplasmic membrane, partly disrupted, disappears together with the underlying envelope of the vesicle, and the internal surface of the vesicle membrane becomes everted to the external medium. This membrane assumes the role of the cytoplasmic envelope replacing the opened vesicle.

In contrast to the capsules opened to the external medium and containing the pigment granules, the just described vesicles are of a bigger size, contain no compact inclusions and are located exclusively in the posterior end of the animal's body.

Golgi complex

The Golgi apparatus has been reported only in a few ciliates (Grimstone 1941). In *Paramecium caudatum*, *P. aurelia*, *Tetrahymena pyriformis* and in some other ciliates it was not detected. In the material under study — in the cytoplasm of *L. rostrum*, structures corresponding to the Golgi apparatus were visualized. They consist of a system of paired parallel, closed, smooth membranes. Near them, vesicles and dense granules are located (Pl. V 11, VI 12). The elements of Golgi apparatus (dictyosomes) are distributed as isolated agglomerations. In each dictyosome the number of membrane pairs fluctuates from 5 to 10—12.

Müller bodies

The presence of peculiar organellae — the Müller bodies is a particular character of the genus *Loxodes* representatives. Under the light microscope those structures look like spherical vacuoles with a spherule-body suspended inside on a thin pedicel (Penard 1917). The spherule-body consists of several small clods, which are in part mineralized.

In the micrographs it may be seen that the main component of the spherule are the oval-shaped clods (Pl. IV 9). The spherule contains also single mitochondria (Pl. V 11) and the elements of Golgi apparatus (Pl. VI 12). Each clod is coated with a double membrane and contains a homogenous material. In some clods, inside the homogenous substance concentric membranes are found which sometimes fill up the whole internal cavity of the clod (Pl. V 10). Between those membranes, dense grains — presumably containing mineral material — may be scattered. (Pl. V 11). This supposition — which is against the light microscope observations of Faure-Fremiet 1957 — is based on the fact of their high mechanical compactness and their disruption in the ultrathin sections. In the case, when the grains are very numerous, the clods are completely opaque and the concentric membranes fail to be revealed. The

electron-dense fragments of this kind are often located in the pedicel of the spherules (Pl. IV 9).

There are 10—15 clods in a spherule of a fully formed Müller body. Nevertheless in cytoplasm some structures occur composed of 2 or 3 clods corresponding to the clods of the spherules but they are not encapsuled in a vacuole. One or more of those clods may contain concentric membranes or show a complete mineralization (Pl. VI 12). In such places, closely to those fully or partly mineralized clods, membranous elements of the Golgi apparatus are present. They probably participate in formation of clods in the Müller bodies. It may be assumed that the picture of those places corresponds to the regions where formation of Müller bodies occurs.

The connection of fully formed Müller body spherules with the surrounding cytoplasm consists not only of one pedicel — as assumed by Penard 1917 but of several bridges of various thickness and length (Pl. V 11). Probably the thickest of those bridges is seen in the light microscope as the pedicel of the spherule. Usually in this pedicel the mineralized clods are observed.

The dense clods are found not only in the central part and in the pedicel of the spherule but also in the cytoplasm closely to the Müller body or at a certain distance from it as well. In cytoplasm, besides the fully mineralized ones, numerous clods occur in which concentric membranous structures are revealed with some content of mineral grains (Pl. VI 13, 14). In our opinion, the size, distribution and composition of fully or partly mineralized clods in cytoplasm suggest their identity with the excretory granules studied in the light microscope (Penard 1917, Fauré-Fremiet 1957).

The clods free from mineral grains, containing only the concentric membranes were sometimes observed as well as such ones in which the membranous structures were partly or entirely disrupted (Pl. VI 14).

Discussion

The facts presented above imply some suppositions as to the role of the Müller bodies. The electron microscope study revealed their much more complex structure than it was stated as a result of the light microscope examination. The spherules of Müller bodies contain mitochondria and the Golgi complex besides the clods of different degree of mineralization.

As it is known, the function of equilibrium organ is ascribed to the Müller body (Penard 1917, Kudo 1954). Taking into account that: 1. the spherule is strongly bound by means of many cytoplasmic bridges to the wall of the enclosing vacuole, 2. that sometimes the vacuole is absent, 3. that the cytoplasmic zone surrounding the spherule is deprived of any fibrillar structures which might enable the propagation of stimuli, it should be assumed that the concept of Müller body playing the role of an organ of equilibrium is not supported by the electron microscope study.

The presence of mineralized clods in the Müller bodies, their close connection with the elements of the Golgi complex indicate that the Müller bodies are able to accumulate some mineral substances from the medium. On the ground of the above results, the process of formation of the clods may be supposed to develop in the following way. It initiates with formation of concentric membranes in the homogenous substrate found only in the Müller bodies and never occurring in cytoplasm. In the interstices between the mem-

brane systems, accumulation of mineral substances takes place, possibly in complexes with proteins. The fact of revealing the Golgi complex closely to those mineralized or being mineralized clods, allows to assume its participation in the formation of mineral structures.

The numerous analogous structures revealed in the cytoplasm of *L. rostrum* are presumably clods which left the Müller body through its pedicel. In cytoplasm all successive stages of demineralization were followed: from the fully mineralized clods to those deprived — thoroughly or partly — of mineral material, or even without internal membranous structures. The latter fact proves that the changes in the structure of clods tend towards demineralization. The dissolution of the clod material might be associated with the specificity of water transport in *L. rostrum*. The absence of contractile vacuoles and the contribution of a great number of non-contractile vacuoles to the osmo-regulation of the animal involve probably the requirement of a great quantity of mineral substances formed on definite steps of the water transport. Those substances may be provided by the mineral inclusions of clods, collected in the Müller bodies and passing to the cytoplasm in the course of the demineralization of clods.

The possibility of excretion of the entire clods with their material into the medium is less plausible, although shifting of partly mineralized clods closely to the surface of the body was often observed. The excretory function of animal is evidently performed by means of expulsion outside the pigment granules.

The electron microscope study of the ciliate *L. rostrum* permits to reveal some peculiarities of the cytoplasm structure of this animal. Before all the fact is striking that the strong vacuolization — revealed already under the light microscope — concerns also the submicroscopic level. The presence of numerous vesicles of different size brings about the reduction of the ciliate cytoplasm to more or less narrow streaks and bridges.

Another characteristic feature of *L. rostrum* is the high structural differentiation of its cytoplasm. Its bulk mass consists of systems of tubules, and vesicles formed by smooth membranes. An impression is produced as if nearly the whole cytoplasm of *L. rostrum* was spongy, being a specific „nephridial plasm” (Gelei 1939, Fauré-Fremiet et Rouiller 1959, Schneider 1961), which in other ciliates is limited only to the contractile vacuoles — specific organellae of water transport in the fresh water protozoa. The communication between the small vesicles formed by the smooth membranes associated with the tubules of the endoplasmic reticulum, and the big cisterns and vacuoles was often observed. Therefore a reason seems to exist for the assumption that the water transport from cytoplasm occurs through canals and the big non-pulsating vacuoles. Water moves backwards through the big vacuoles connected by canals. In the posterior body end it gets outside through the submicroscopic vesicles continuously opening to the external medium. In this way the uniform system of water transport exists in the ciliate body, initiating in the tubules and cisterns of the endoplasmic reticulum and terminating in the small vesicles of the posterior body end.

Evidently the complex of numerous vacuoles and membranes giving a peculiar structure to the *L. rostrum* cytoplasm, is a system regulating the water transport, functionally little specialized and then topographically dispersed.

Our preliminary observations on the ultrastructure of some other proto-

zoan organisms without contractile vacuoles (*Pelomyxa palustris*, *Bursaria truncatella*) revealed a similar structure of cytoplasm. Very likely this similitude is connected with the peculiarity of the water transport and is characteristic not only for *Loxodes*.

Summary

The fine structure of cytoplasm of a fresh-water ciliate *L. rostrum* with no contractile vacuole was studied. A number of large and small non-pulsating vacuoles were seen. Membranous structures distributed as bridges between the vesicles were observed in cytoplasm. In the posterior end of the ciliate body, vesicles with a transparent content approximate the pellicle and open to the external medium.

The role of membranous structures is suggested as a dispersed „nephridial plasm”, responsible for the transport of water into the vacuoles.

The structure of Müller body (Golgi apparatus, mitochondria, mineral clods) is described. Stages of mineralization and demineralization of the Müller bodies clods were followed, their role in the water transport in the ciliate being discussed.

РЕЗЮМЕ

Исследовалось ультратонкое строение цитоплазмы пресноводной инфузории *L. rostrum*, не имеющей сократительной вакуоли. Обнаружено наличие большого количества крупных и мелких неппульсирующих вакуолей и насыщенной мембранными структурами цитоплазмы, располагающейся в виде перекладин между вакуолями. В заднем конце тела инфузории вакуоли с прозрачным содержимым подходят к пелликуле и открываются во внешнюю среду.

Высказывается предположение о роли мембранных структур как своеобразной распространенной нефридиальной плазмы, обеспечивающей транспорт воды в вакуоли.

Описаны структуры, входящие в состав Мюллеровского тельца (аппарат Гольджи, митохондрии, минеральные глыбки). Прослежены различные стадии минерализации и деминерализации глыбок мюллеровского тельца, обсуждается возможная их роль в связи с особенностями водообмена.

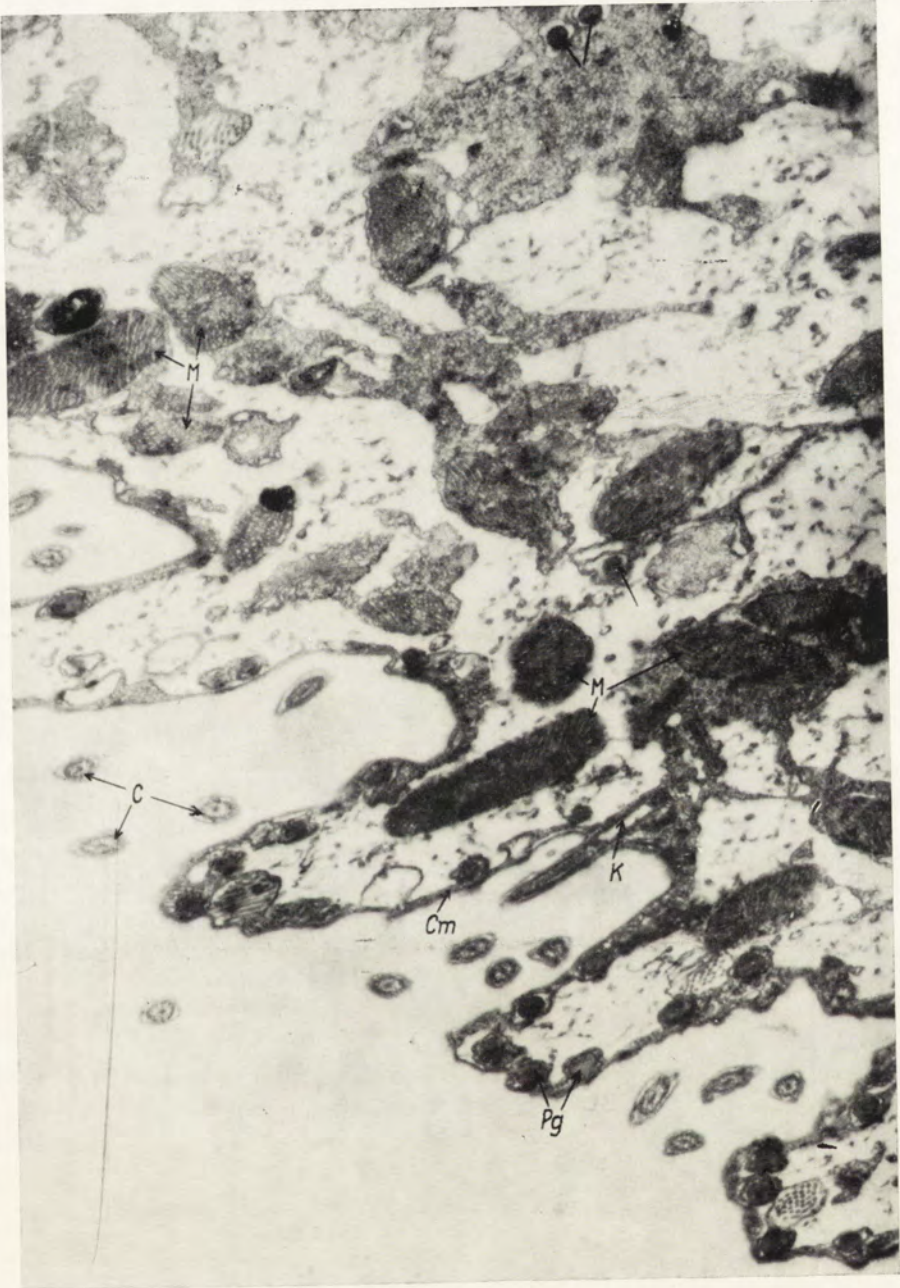
REFERENCES

- Cheissin E. M. and Mosevich T. N. 1962: An electron microscope study of *Colpidium colpoda* (Ciliata, Holotricha). Arch. Protistenk. 106, 181—200.
- Fauré-Fremiet E. 1957: Concrétions minerales intracytoplasmiques chez les Ciliés. J. Protozool. 4, 96—109.
- Fauré-Fremiet E. et Rouiller C. H. 1959: Le cortex de la vacuole contractile et son ultrastructure chez les Ciliés. J. Protozool. 6, 29—37.
- Gelei J. 1939: Neuere Beiträge zum Bau und zu Funktion des Exkretions-systems von *Paramecium*. Arch. Protistenk. 92, 384—400.
- Grimstone A. V. 1961: Fine structure and morphogenesis in Protozoa. Biol. Rev. 36, 79—150.
- Kahl A. 1931: Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). Die Tierwelt Deutschlands 18, 212—215.
- Kitching J. A. 1956: Contractile vacuoles of Protozoa. Protoplasmatologia III D 3a, 1—45.
- Kudo R. R. 1954: Protozoology (Fourth edition). Springfield.
- Losina-Losinsky L. K. 1929: K fiziologii pitaniija infuzorij. Izv. Naučn. Inst. Lesgafta 15, 91—136.

- Mashansky V. F. 1961: Vlijanje temperatury na ultrastruktury mitohondrij u infuzorij. Citologija 3, 584—589.
- Mashansky V. F. i Beznosikov B. O. 1961: K metodike prigotovlenija ultratonskih srezov iz vzvesej kletok. Citologija 3, 117—119.
- Metz C. B., Pitelka D. R. and Westfall J. A. 1953: The fibrillar systems of ciliates as revealed by the electron microscope I. *Paramecium*. Biol. Bull. 104, 408—425.
- Pappas G. D. and Brandt P. W. 1959: Mitochondria. I. Fine structure of the complex patterns in the mitochondria of *Pelomyxa carolinensis* Wilson (*Chaos chaos* L.). J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 85—90.
- Penard E. 1917: Le genre *Loxodes*. Revue Suisse de Zool. 25, 453—489.
- Pitelka D. 1956: An electron microscope study of cortical structures of *Opalina obrigonoidea*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 423—432.
- Porter K. R. and Vamada E. 1960: Studies on the endoplasmic reticulum. J. Biophys. Biochem. Cytol. 8, 181—205.
- Prosser C. L. 1952: Comparative animal physiology. Philadelphia and London.
- Schewiakoff W. G. 1896: Organizacija i sistematika *Aspirotricha* (*Holotricha* auctorum). Zap. Imp. Akad. Nauk (S. 8) 4, 1—395.
- Schneider L. 1961: Elektronmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. Protoplasma 53, 530—574.

EXPLANATION OF PLATES I—VI

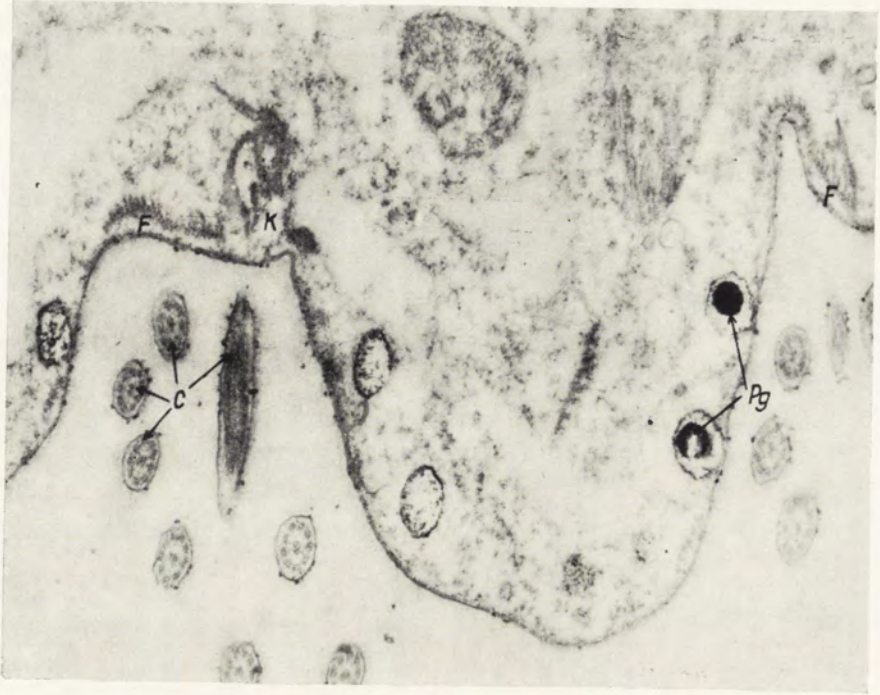
- 1: Cross section of the surface layer of *L. rostrum* body. Lower side. Cross and oblique sections of cilia are seen (C), cytoplasm ridges covered with cytoplasm membrane (CM). In the depressions between ridges — basal bodies (K). Under the cytoplasm membrane — pigment granules (PG). Similar structures are seen in cytoplasm (arrows). M. — mitochondria. Regular distribution of tubules ($\times 18000$).
- 2: Superficial layer of the lower side of *L. rostrum* body. Relation of basal bodies to the bundle of cross sectioned fibrils — F. Other lettering as in Pl. I1 ($\times 36000$).
- 3: Area of cytoplasm in which some cytoplasmic bridges are joining one another. High concentration of membranous structures. Er — canals of endoplasmic reticulum, Cy — cisterns, B — granules inside the cistern ($\times 55000$).
- 4: Surface area of the *L. rostrum* body. Evacuation of pigment granules to the external medium — arrow ($\times 18000$).
- 5: Cytoplasm region in the lower side of the anterior part of the ciliate body. V — large vacuole, Ct — cytoplasmic cross bridges. Other lettering as previously ($\times 10000$).
- 6: Portion of a cytoplasmic cross bridges with a parallel distribution of the endoplasmic reticulum canals ($\times 60000$).
- 7—8: Surface portion of the posterior part of the ciliate body. Cisterns are lying under the cytoplasmic membrane, arrow points to cisterns opening to the external medium. Amp. — ampulla ($\times 20000$).
- 9: Spherule of the Müller body. Db — clods with homogenous content. P — pedicel of spherule. Dense clods are lying at the base of the spherule pedicel ($\times 55000$).
- 10: Spherule of the Müller body. Clods with homogenous content and concentric membranes — Mb ($\times 55000$).
- 11: Spherule of Müller body. One clod is completely mineralized, the other contains membranes and mineral granules. Cg — Golgi complex ($\times 55000$).
- 12: Spherules of Müller body devoid of surrounding vacuole in the course of formation ($\times 55000$).
- 13: Accumulation of clods of different degree of mineralization in cytoplasm. Clods containing mineral granules and clods devoid of granules but with concentric membranes ($\times 45000$).
- 14: Accumulation of clods of different degree of mineralization in cytoplasmic bridges. Some clods contain neither mineral granules nor internal membranes — arrows ($\times 30000$).



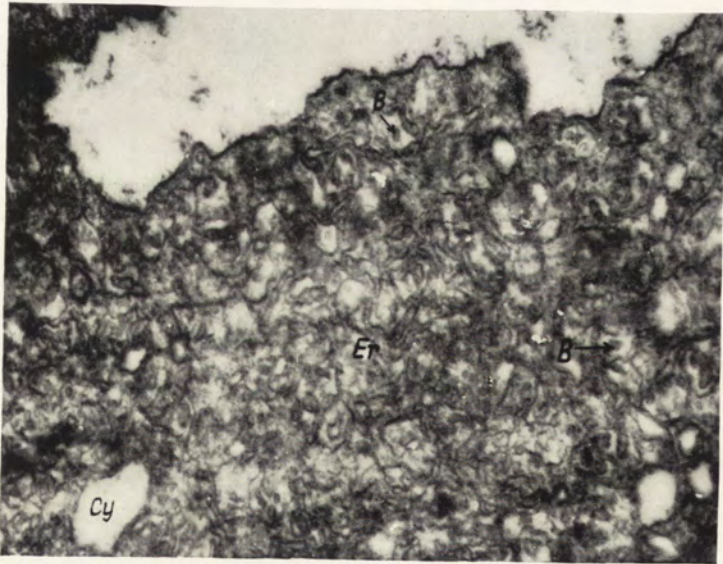
1

V. F. Mashansky et al.

auctores phot.



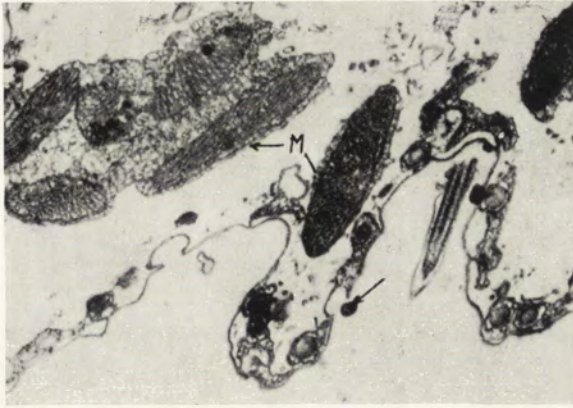
2



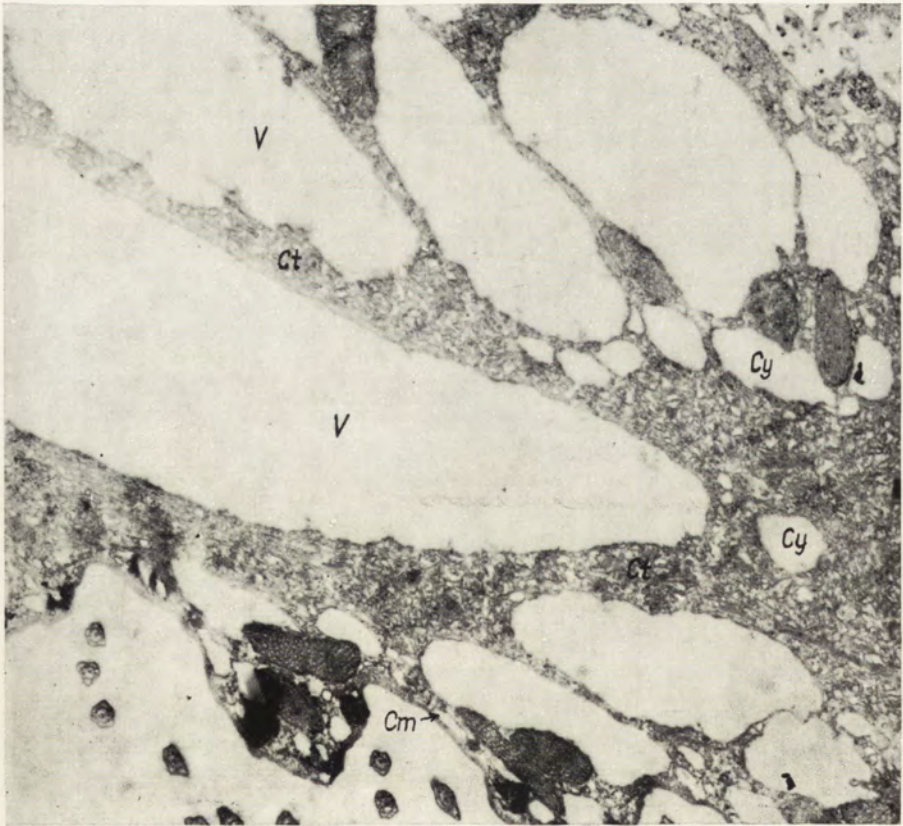
3

V. F. Mashansky et al.

auctores phot.



4



5

V. F. Mashansky et al.

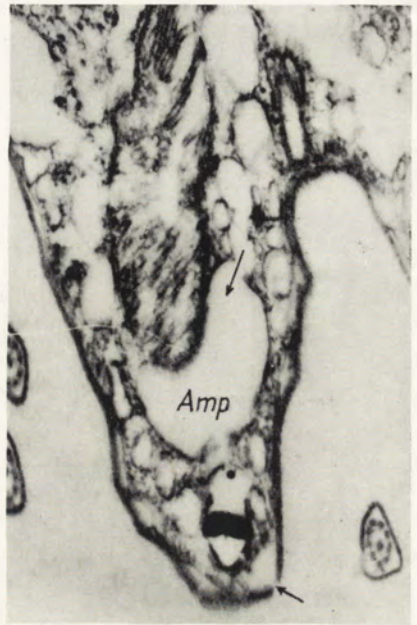
auctores phot.



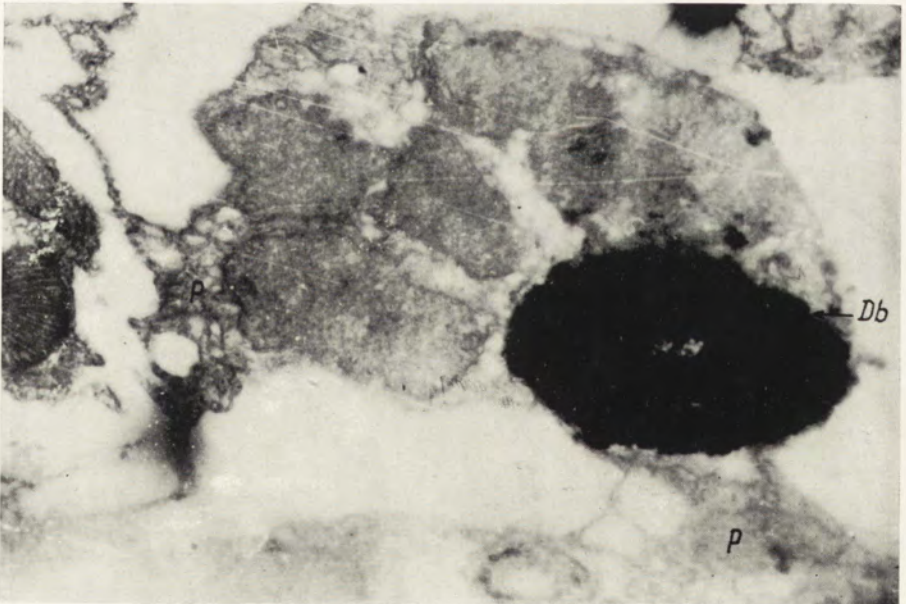
6



8



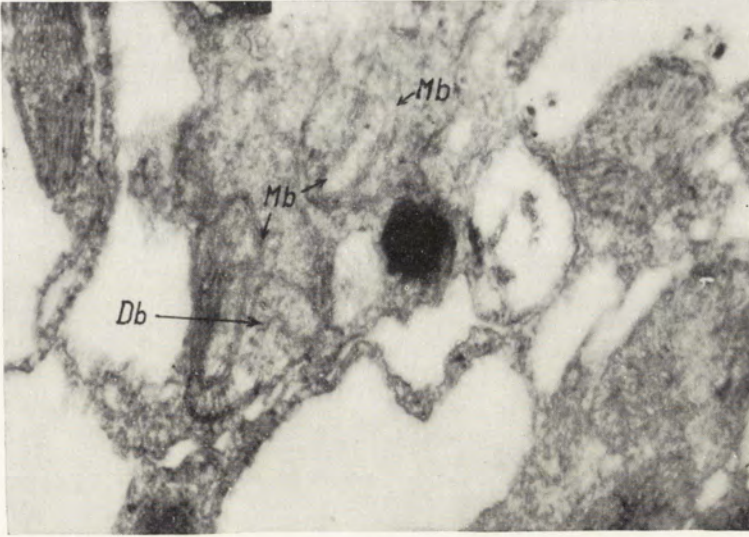
7



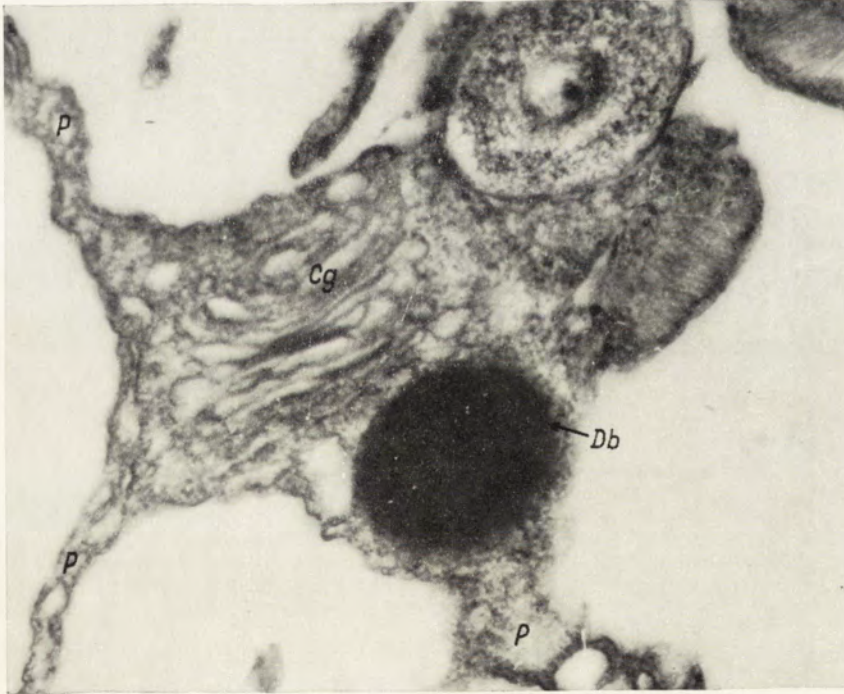
9

V. F. Mashansky et al.

auctores phot.



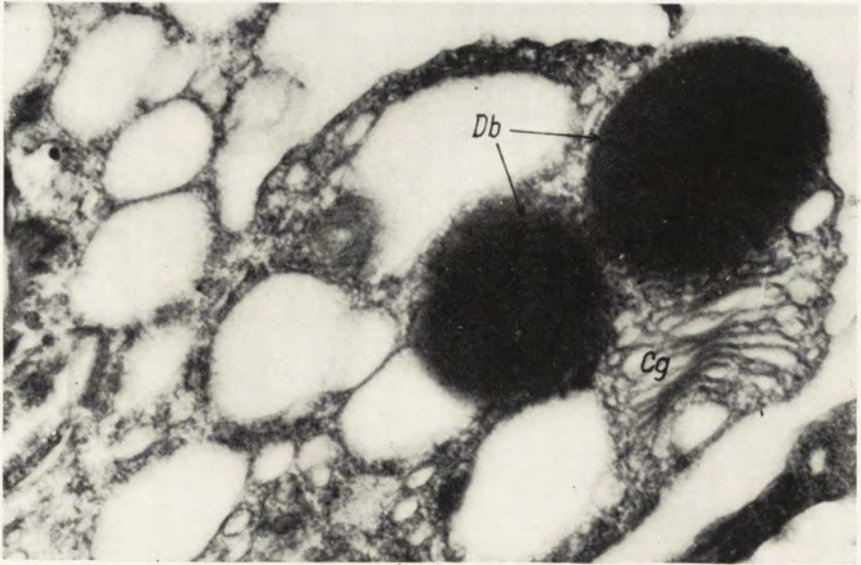
10



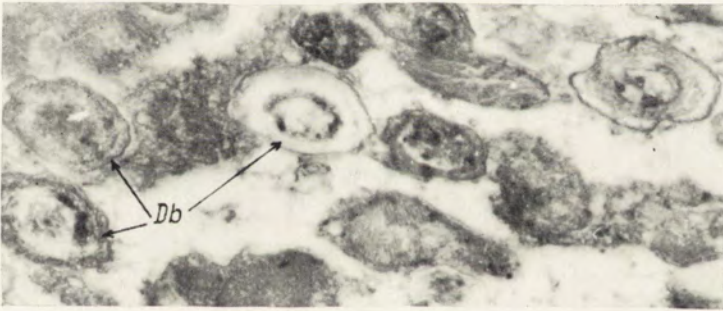
11

V. F. Mashansky et al.

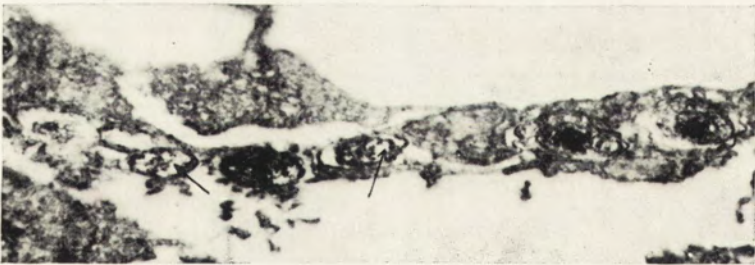
auctores phot.



12



13



14

V. F. Mashansky et al.

auctores phot.

Department of General Biology, M. Nencki Institute of Experimental Biology,
Polish Academy of Sciences, Warszawa 22, Pasteura 3
Department of Biochemistry, Medical Academy, Łódź, Narutowicza 68

B. SKOCZYLAŚ, H. PANUSZ, M. GROSS

Isolation of macronuclei from *Paramecium caudatum*. The role of calcium ions

Izolowanie makronukleusów *Paramecium caudatum*
Rola jonów wapniowych

The progress in the research on the localisation of biochemical functions in the subcellular structures caused that the isolation of cell nuclei and different cytoplasmic particles became a routine method in many biochemical laboratories (Daunce 1955, Allfrey 1959, Mirsky and Osawa 1961, Roodyn 1959 and 1962).

One looks in such experiments for either chemical composition or localisation of enzymatic activities in the isolated particles. Data, received in that way, are compared with the informations obtained by means of cytochemical methods.

In most of the recent works on the composition and structure of the chromatin, isolation of nuclei anticipated usually the isolation of chromosomes, DNP or other constituents of the nuclei (Vincent 1957, Pogo and oth. 1962, Skoczylas, Panusz and Gross 1963). Using such a procedure one expects to avoid an exchange of the original components — especially proteins — on others of cytoplasmic origin, and also to protect them against the activity of autolytic enzymes localised in the cytoplasm.

A great variety of material, deriving from different levels of the organisation of living matter, was used for the isolation of nuclei (Roodyn 1959). In the available literature, however, we could not find so far data on the biochemical preparation of nuclei from protozoa.

In this paper a method of isolation of macronuclei from *Paramecium caudatum* grown in mass cultures, is described. The factors, deciding about the choice of material, were following:

1. Paramecia grow considerably easy in mass cultures.
2. Interesting data on their genetic properties and their physiology are available (Sonneborn 1950, Wichterman 1953, Beale 1954).
3. The biochemical role of the macronucleus is unknown.
4. An extraordinary large size of the macronucleus. This makes the control of the degree of purification easy and gives some hope that an application of micromanipulation techniques might be possible in future.

The preparations were done with the aim to determine, to isolate and to examine more precisely the DNA's, the RNA's, the proteins occurring in nucleoprotein complexes, the DN-ases and the RN-ases of the isolated nuclei.

Methods used as control of the isolation procedure

The yield of homogenisation, the resulted degree of purification and the final yield of the preparations were estimated by means of microscopic examinations. Nuclei, stained with methyl green (Natl. Anilin Div., Allied Chem. Dye Corp., N. Y., USA, purified with chloroform) were counted according to Borzani 1960. For our purpose 50 μ l of suspension of cells or nuclei were mixed with 5 μ l of 1% aqueous solution of methyl green and spread between two 22 \times 22 mm cover glasses. The amount of cells or nuclei in 30 individual microscopic fields (magnification \times 84 or \times 105) was counted and the mean value (usually 10—20) was multiplied by the ratio: total surface/surface of one microscopic field. As final result the mean value from three glasses was given.

The yield of the homogenisation (Y_h) was defined as 100% when the total amount of free nuclei (N_f) after homogenisation was equal to the total amount of nuclei (N) before homogenisation (both free and those present in damaged and undamaged cells).

The yield of the preparation (Y_p), either final or after a given step of purification was, like Y_h , calculated by comparison of N_f , counted at a given stage of preparation, with N before homogenisation.

To calculate the degree of purification after homogenisation — P_h (or the degree of purification of final preparation of nuclei — P_f) we have used following equation:

$$P_h = \frac{N_c + N_{dc}}{N_f}$$

where: N_c — amount of nuclei comprised in undamaged cells,
 N_{dc} — amount of nuclei comprised in damaged cells,
 N_f — amount of free nuclei.

Furthermore, the progress of purification was followed by means of the phase-contrast microscope, of Janus green staining (removal of mitochondria), of measurements of glucose 6-phosphatase (removal of ribosomes), DN-ase and RN-ase (removal of lysosomes) activities.

Glucose 6-phosphatase activity was estimated according to Swanson 1955, DN-ase activity — according to Schneider and Hogeboom 1952, RN-ase activity — according to Frish-Niggemeyer and Reddi 1957.

All these activities were estimated either in nuclei, suspended in concentrated sucrose solutions, or in nuclei washed three times in 0.3 M sucrose. This procedure was expected to restore inside of the nuclei osmotic pressure equal to that in the surrounding medium and thus to enable the substrate to enter the intranuclear space during incubation.

Successive steps of the isolation procedure

Material and the culture

Isolation of macronuclei was carried out in *Paramecium caudatum* strain, isolated in Warszawa and subsequently grown in mass culture according to Sonneborn 1950 using instead of lettuce — a Brussels sprouts infusion

inoculated with *Aerobacter aerogenes* (Clone K-7 *Aerobacter* from NCTC — London collection).¹

This medium enabled us to reach concentration ranges of 300—400 cells/ml, similar to those received by Preer and Preer 1960 in their cultures of *Paramecium aurelia*, grown on lettuce extracts. It is usually assumed that *P. aurelia* have a higher rate of reproduction than *P. caudatum*.

Our cultures were grown at room temperature in carefully sterilised 8 l round bottom flasks closed with cotton wool stopcocks in volumes not exceeding 4 l per flask. They were fed three times a week by dilution with an equal volume of fresh medium.

Condensation of cultures

50 l of culture were centrifuged at room temperature in an Alfa—Laval continuous flow milk centrifuge at less than 200 G, as suggested by Preer and Preer 1960, not later than 3 days after the last feeding. The sediment was removed from the rotor in less than 45 min., the rotor being washed with fresh medium, and the concentrated suspensions of paramecia were combined and diluted to 1.2 l. Cell suspensions before and after centrifugation were filtered through a nylon gauze (diameter of meshes 120—160 μ) in order to remove the bulk of the detritus and other impurities, present in the culture medium. Average losses caused by this procedure were estimated on ca 10%.

Condensed suspensions of paramecia were stored at 10—14° in 1.5 l. Fernbachs flasks no longer than two days. A distinct decrease in the final yield of nuclei was observed if condensed paramecia were stored too long, in particular if they have not been fed for more than three days before condensation.

Killing of paramecia

Condensed cultures, containing 15—40·10³ cells/ml, were cooled down to 2—4° and adjusted to 0.3 M with concentrated sucrose and to 0.0006 M with concentrated calcium chloride solutions (CaCl₂·6H₂O, anal. grade, and pure saccharose or commercial recrystallised cane shugar, containing less than 0.4 μ Mol Ca²⁺/Mol, were used). In such a medium all cells were dead after 20—30 min.

In order to separate the dead cells from the solution and from most of the impurities we tried initially free sedimentation in a cylinder of a proper size. After 60 min. 10% of cells still remained in suspension and prolonged sedimentation led to some autolytic changes. We decided therefore to centrifuge the suspensions for 10 min. at 800 G, 20 min. after addition of sucrose and CaCl₂. The turbid supernates were discarded. The sedimented cells, part of them broken during centrifugation, were resuspended in 0.3 M sucrose, containing 0.0006 M CaCl₂, adjusted to a concentration of 1·10⁵ nuclei/ml and used for homogenisation.

Medium and technique of homogenisation

Both the applied medium and the mode of homogenisation turned out to be the main factors deciding about the final yield and the purity of nuclei. A proper procedure should disrupt all the cell membranes, leaving the nuclear membranes untouched. For each kind of cells some initial tests should be done

¹ We wish to express our sincere thanks to Dr. Meizel and Dr. Kałużewski, State Institute of Hygiene, for providing us with bacteria strains.

first to find out the most suitable kind of homogeniser and the optimal medium.

The most suitable medium for our purpose, turned out to be 0.3 M sucrose containing 0.0006 M calcium chloride. In lower concentrations of sucrose a progressing lysis of cells could be observed. Most nuclei were losing their staining ability towards methyl green, probably due to nucleolytic enzymes liberated in these circumstances. Similar observation were made by Stanier and Philpot 1955. In higher concentrations of sucrose large clumps of cells and detritus were formed and the passage of the material through the slit of the homogeniser was getting difficult.

The most important, however, was found the proper concentration of calcium ions. Calcium chloride was introduced as a component of media used for isolation of liver nuclei by Schneider and Petermann 1950 with the aim to tighten the mitochondrial membranes and thus to avoid the liberation of proteolytic and nucleolytic enzymes (Dounce 1955). According to Allfrey 1959 low concentrations of bivalent cations prevent swelling and gelification of thymus nuclei. Lack of electrolytes causes swelling and breaking of nuclei. A halo of soluble nucleohistone is formed. This effect is reversed by addition of salts, especially of bivalent cations. An excess of these ions, however, causes clumping and agglutination of cells and cell fragments. Chauveau et al. 1956 have observed that the yield of liver nuclei rises in presence of calcium chloride. 0.0018 M calcium chloride, used in earlier works (Hogeboom et al. 1952, Allfrey 1954, 1955) was changed later into 0.0033 (Allfrey et al. 1957, Osawa et al. 1957). According to these authors higher concentration of calcium prevents the formation of nuclear gel. In some methods lower concentrations of bivalent cations were used. Stanier and Philpot 1955 isolated liver nuclei using 0.001 M CaCl_2 in 0.25 M sucrose and 40% glycerol. This concentration was called to prevent granulation of nuclei and to retain the morphology of the nucleoli. Naora et al. 1961 isolated thymus nuclei in 0.25 M sucrose and 0.003 M CaCl_2 but in the case of liver and kidney nuclei he used 0.001 M CaCl_2 . Sporn et al. 1962 isolated brain nuclei in 0.3 M sucrose containing 0.0001 M magnesium chloride.

In order to establish the proper composition of the homogenisation medium for paramecia we examined the influence of the concentration of calcium ions on the yield of the homogenisation and the degree of purification of nuclei. Paramecia were killed in 0.3 M sucrose solutions containing varying concentrations of CaCl_2 in the range between 0 and 30 mM. Nuclei (N_f , N_c and N_{dc}) were stained with methyl green and counted before and after homogenisation. The results are listed in Table 1.

It is clearly visible that calcium concentrations proposed in the literature were too high for the isolation of nuclei from paramecia. The best yield and the optimal degree of purification was obtained at 0.0006 M concentration of CaCl_2 . At lower concentrations not only cells but also nuclei themselves got broken and the yield dropped abruptly. Homogenates containing 0—0.0003 M CaCl_2 did not contain any whole or damaged cells and the percentage of recovered nuclei was very low. At concentrations higher than 0.0006 M the yield of free nuclei dropped gradually, too, this time probably as a result of rising mechanical resistance of cell membranes. With rising CaCl_2 concentration rised the percentage of undamaged cells. In 15 mM solut-

Table 1

The influence of the concentration of calcium ions on the yield of homogenisation (Y_h) and the degree of purification after homogenisation (P_h). (For explanation of symbols — see the text)

No.	Ca ²⁺ mM	N · 10 ³ before homoge- nisation	After homogenisation		Y _h	P _h
			(N _c - N _{dc}) · 10 ³	N ₁ · 10 ³		
1	0	65	—	1	1.5	0
2	0	120	2.5	0.5	0.4	0.2
3	0.15	81	—	37	46.0	0
4	0.3	125	—	70	56.0	0
5	0.6	73	1.0	70	96.0	70
6	„	73	0.2	69	5.	346
7	„	865	1400	8200	95.0	5.85
8	„	13460	1	9850	73.0	9850
9	„	119	—	117	98.0	0
10	„	136	14	131	96.0	9.4
11	1.5	77	5	57	74.0	11.4
12	„	77	3	61	79.2	20.4
13	„	77	3	57	74.0	19.0
14	„	80	—	69	77.5	0
15	3.0	76	2.5	64	84.2	25.6
16	„	76	1	64	84.2	64.0
17	„	76	1	59	77.5	59.0
18	„	9400	1300	7550	80.3	5.8
19	„	99	19	95	96.0	5.0
20	6.0	136	42	98	72.0	2.3
21	„	97	46	56	57.7	1.2
22	„	97	32	58	60.0	1.8
23	15.0	103	83	13	12.6	1.16
24	30.0	123	116	15	12.2	0.13

ion only about 10% of nuclei got liberated during homogenisation. Our results suggest also that at the proper concentrations of calcium ions the membranes of the macronuclei of paramecia have a much higher degree of mechanical resistance than the cell membranes. It seems to be necessary to start every work on a method of isolation of nuclei from a new material with a thorough study on the influence of concentration of calcium ions on the behaviour of cell and nuclear membranes during homogenisation.

We have compared the usefulness of following types of homogenisers:
1. Waring blender on a very low speed — 30 V instead of 110 or 65 V instead

of 220 (e.g. Allfrey 1954). 2. Pressure homogeniser of Emanuel and Chaikoff 1956. 3. Suction through a stainless steel syringe needle connected through a separation funnel with the vacuum.

Even the most gentle homogenisation in the waring blender caused a destruction of large amounts of nuclei and had to be abandoned. About 50% of nuclei were damaged when cell suspensions were pressed through a 10 μ slit of the pressure homogeniser. The use of the 25 μ slit gave only 25% losses but a considerable amount of undamaged cells was found in the homogenate. The slit got often stopped by clumps of broken cells and made the homogenisation difficult.

Syringe needles were used for a complete homogenisation of *P. aurelia* by Sonneborn 1950. Vincent 1952 introduced the syringe needle for isolation of cell nuclei from starfish oocytes (No. 18-gauge hypodermic needle). From a number of different needles checked in our work the „Famed” No 12 and the „Luer” No 22 M occurred to be the most suitable. The numbers of the „Famed” needles (made in Poland) are identical with the numbers of „Record” needles. A sixfold passage of cells, suspended in 0.3 M sucrose + 0.0006 M CaCl_2 , through any one of these needles led to a recovery of 90% of free nuclei with a negligible contamination of unbroken cells. A tenfold passage of the suspension through a „Famed” No 18 needle caused a complete homogenisation of both cells and nuclei.

Small volumes of suspensions — up to 10 ml — were homogenised by means of a 20 ml „Luer” syringe. Large volumes were sucked through the needle into a separation funnel, connected with the vacuum pump.

Fractionation of homogenates

Immediately after homogenisation the concentration of sucrose was increased up to 1.6 M by means of 2.4 M solution and CaCl_2 concentration was increased up to 0.003 M. This increase of Ca ions concentration seemed to cause a better dispersion of nuclei and to prevent clumping. Further fractionation of nuclei was done by means of gradient centrifugation in concentrated sucrose solutions in concentration ranges varying from 1.6 M till 2.4 M.

According to Chauveau 1952, Chauveau et al. 1956, Zbarsky i Georgiev 1959b, Wilczok and Chorąży 1960 and others, fractionation of homogenates by density gradient centrifugation in concentrated sucrose solution is characterised by high yields of highly purified nuclei of unchanged structure. Nuclei, obtained by means of these methods, form an excellent material for studies on their nucleic acids and proteins (Pogo et al. 1962, Zbarsky and Georgiev 1959a, Georgiev et al. 1960).

Fractionation in 0,3 M sucrose at very low centrifugal forces, which we tried first, gave, even after manyfold centrifugation, a very bad separation of nuclei from other cytoplasmic particles and a very low yield. After several experiments with sucrose solutions of different density, we selected a following technique of separation:

12 fractionation columns were prepared in 100 ml centrifuge tubes from several layers of sucrose solutions of gradually dropping concentrations. The difference between two neighbour layers amounted 0.05 M. The columns were prepared at least 12 hours in advance and left in the cold room in order to soften the layer borders. Usually the top layer contained 1.65 M and the

Table 2

The diagram of the procedure used for the isolation of nuclei from *Paramecium caudatum* (all steps were done in the cold room at 0—3°)

Killing	Condensed culture, about $1 \cdot 10^7$ cells in 400—1000 ml; 2.4 M sucrose up to 0.3 M concentration; 1 M CaCl_2 up to 0.0006 M concentration		
Condensation	<p>after 20 min. centrifuged for 10 min. at 800 G</p>		
Homogenisation	Supernate — discarded	Sediment + 0.3 M sucrose cont. 0.0006 M CaCl_2 till 100 ml. Homogenised 6 times by suction through a syringe needle „Famed” No 12; 2.4 M sucrose up to 1.6 M; 1 M CaCl_2 up to 0.003 M.	
Adjustment of concentration		1.6 M sucrose cont. 0.003 M CaCl_2 up to 400 ml; 35 ml samples put on top of 12 density gradient columns (1.65—1.9 M sucrose, cont. 0.003 M CaCl_2 , in 100 ml centrifuge tubes). Centrifuged 15 min at 1300 G	
Dilution			
First density gradient centrifugation			
Second density gradient centrifugation	Lower layers — sucrose concentration 1.75—1.9 M; 1 M sucrose cont. 0.003 M CaCl_2 down to about 1.65 M. Put on top of 4 or 6 columns. Sucrose concentr. 1.7—2.2 M CaCl_2 concentr. 0.003 M. Centrifuged 20 min. at 1400 G	Upper layers — sucrose concentration 1.6—1.7 M — discarded	
Third density gradient centrifugation	Upper layers (1.65—1.85 M) — discarded	Middle layers (1.9—2.15 M); 1.6 M sucrose cont. 0.003 M CaCl_2 down to about 1.85 M. Put on top of 1 or 2 columns. Sucrose concentr. 1.9—2.1 M CaCl_2 concentr. 0.003 M. Centrifuged 20 min. at 1400 G	Bottom layer (2.2 M) — discarded
Collecting of purified nuclei	Lower layers (2.05—2.1 M). Contain purified nuclei. Combined in one centrifuge tube. Centrifuged 20 min. at 4000 G. Supernate — discarded. Sediment contains purified nuclei.	Upper layers — sucrose concentr. 1.85—2.0 M — discarded	

bottom layer — 1.9 M sucrose. About 35 ml samples of the homogenate, adjusted to 1.6 M concentration with 2.4 M sucrose, were put on top of the prepared columns and centrifuged in a horizontal 6×100 ml centrifuge (Schulmeister, Germany) for 15 — 25 min. at 1300 — 1400 G. The most important for a successful fractionation were: a very slow rate of acceleration of the rotor at the beginning of centrifugation (at least 10 min. till the full speed is reached) and the horizontal position of the testtubes during centrifugation. Furthermore — the initial suspension shall be possibly diluted. All these precautions were necessary if clumping of nuclei and other cell fragments at the concentration borders had to be avoided. Multilayer columns instead of a continuously changing density gradient made the estimation of molarity at different levels easy. The 1.75 — 1.9 M layers from the 12 columns were combined, diluted with 1 M sucrose down to 1.65 M and put on top of 4 or 6 columns prepared in a similar way in the concentration ranges from 1.7 till 2.2 M sucrose. They were centrifuged for 20 min. at 1400 G, the middle layers (1.9 — 2.15 M) collected, diluted down to about 1.85 M put on top of one or two columns, containing 1.9 — 2.1 M sucrose layers. They were centrifuged for 20 min. at 1400 G, the upper layers (1.85 — 2.0 M) were discarded and from the rest the nuclei were condensed by centrifugation for 20 min. at 4000 G. Collected from the bottom of the tube, they formed a highly purified concentrated suspension (Pl. I).

Table 3

Data illustrating the effect of homogenisation and the final results of four different preparations of nuclei (explanation of symbols in the text)

Ppn	[Ca ²⁺] mM	N · 10 ³ Before homoge- sation	After homogenisation				After third centrifugation			
			(N _c + N _{dc}) · 10 ³	N _f · 10 ³	Y _n	% im- purities	(N _c + N _{dc}) · 10	N _f · 10 ³	Y _p	P _f
11	3.0	9 400	1300	7550	80.3	17.0	572	480	5.1	0.84
12	0.6	8 650	1400	8200	94.9	17.0	—	3925	45.4	∞
13	0.6	13 460	1	9850	73.2	0	—	2785	20.7	∞
14	0.6	11 370	890	8390	73.8	10.6	—	3515	30.9	∞

$$* \% \text{ impurities} = \frac{N_c + N_{dc}}{N_f} \cdot 100$$

In the final preparations no traces of the activities of glucose 6-phosphatase, DN-ase and RN-ase were found. They have been shown, however, in the homogenates of whole cells in sucrose media and their stepwise disappearance could be followed in course of purification. From the available results, however, one cannot conclude whether the lack of enzymatic activities is due to a complete removal of the enzymes or some of them remain in (or entered) the nuclei in an inactive form.

The final isolation procedure is shown in form of a diagram (Table 2) and some results of its application are listed in Table 3.

Summary

A method of isolation of macronuclei from mass cultures of *Paramecium caudatum*, based on homogenisation in diluted sucrose media and gradient centrifugation in concentrated sucrose solutions, is described.

The influence of the calcium chloride concentration on the yield of the homogenisation and on the degree of purification of nuclei was studied and was found to decide about the success of the procedure.

It was shown that the best results are obtained in a homogenisation medium containing 0.3 M sucrose and 0.0006 M CaCl_2 . In these circumstances the yield of the homogenisation amounted 95%, the final yield of the preparation — more than 30% and an almost complete purification of nuclei was achieved. The degree of purification was controlled microscopically and enzymatically.

STRESZCZENIE

Opisano metodę izolowania makronukleusów z masowych kultur *Paramecium caudatum*, opartą na homogenizacji w rozcieńczonych roztworach sacharozy i frakcjonowanym wirowaniu w gradiencie stężonych roztworów sacharozy.

Zbadano wpływ stężenia chlorku wapnia na wydajność homogenizacji i na stopień oczyszczania jąder. Stwierdzono, że stężenie chlorku wapnia jest czynnikiem decydującym o powodzeniu całej preparatyki.

Wykazano, że najlepsze rezultaty otrzymuje się homogenizując komórki w roztworze 0.3 M sacharozy i 0.0006 M CaCl_2 . W tych warunkach wydajność homogenizacji osiąga około 95%, końcowa wydajność preparatyki — więcej niż 30%, a otrzymane jądra są prawie całkiem czyste. Stopień oczyszczenia badano mikroskopowo i enzymatycznie.

REFERENCES

- Allfrey V. G. 1954: Aminoacid incorporation by isolated thymus nuclei. I. The role of desoxyribonucleic acid in protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 40, 881—885.
- Allfrey V. G. 1955: Protein synthesis in isolated cell nuclei. Nature 176, 1042—1049.
- Allfrey V. G. 1959: The isolation of subcellular components. In: The Cell. New York — London. 1, 193—290.
- Allfrey V. G., Mirsky A. E. and Osawa S. 1957: Protein synthesis in isolated cell nuclei. J. Gen. Physiol. 40, 451—490.
- Beale G. H. 1954: The genetics of *Paramecium aurelia*. London.
- Borzani W. 1960: A simple technic for direct counting of microorganisms. Stain Technol. 35, 49—50.
- Chauveau J. 1952: Nouvelle méthode d'isolement des noyaux cellulaires. C. R. Acad. Sci. 235, 902—904.
- Chauveau J., Mouléy Y. and Rouller Ch. 1956: Isolation of pure and unaltered liver nuclei; morphology and biochemical composition. Exp. Cell Res. 11, 317—321.
- Dounce A. L. 1955: The isolation and composition of cell nuclei and nucleoli. In: Chargaff E. and Davidson J. N., The Nucleic Acids. New York, 2, 93—155.
- Emanuel C. F. and Chaikoff I. L. 1957: An hydraulic homogenizer for the controlled release of cellular components from various tissues. Biochim. Biophys. Acta 24, 254—261.

- Frisch-Niggemeyer W. and Reddi K. K. 1957: Studies on ribonuclease in Tobacco leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 26, 40—46.
- Georgiev G. P., Mantieva V. L. and Zbarsky I. B. 1960: RNA fractions in cell nuclei isolated by phenol and by sucrose-glycophosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 373—374.
- Hogeboom G. H., Schneider W. C. and Striebich M. J. 1952: On the isolation and biochemical properties of liver cell nuclei. *J. Biol. Chem.* 196, 111—120.
- Naora H., Naora H., Mirsky A. E. and Allfrey V. G. 1961: Magnesium and calcium in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiol.* 44, 713—742.
- Mirsky A. E. and Osawa S. 1961: The interphase nucleus. In: Brachet J. and Mirsky A. E. *The Cell*. New York—London, 2, 677—771.
- Osawa S., Allfrey V. and Mirsky A. E. 1957: Mononucleotides of cell nucleus. *J. Gen. Physiol.* 40, 491—513.
- Pogo A. O., Pogo B. G. T., Litau V. C., Allfrey V. G., Mirsky A. E. and Hamilton M. G. 1962: The purification and properties of ribosomes from the thymus nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 55, 849—864.
- Preer J. R. and Preer L. B. 1959: Gel diffusion studies on the antigens of isolated cellular components of *Paramecium*. *J. Protozool.* 6, 88—100.
- Roodyn D. B. 1959: A survey of metabolic studies on isolated mammalian nuclei. *Internatl. Rev. Cytol.* 7, 279—344.
- Roodyn D. B. 1962: A comparative account of methods for the isolation of nuclei. *Bioch. J.* 84, 3p—4p.
- Schneider W. C. and Hogeboom G. H. 1952: Intracellular distribution of enzymes. X. Deoxyribonuclease and ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 198, 155—164.
- Schneider R. M. and Petermann M. L. 1950: Nuclei from normal and leukemic mouse spleen. I. The isolation of nuclei in neutral medium. *Cancer Res.* 10, 751—754.
- Skoczylas B., Panusz H. and Gross M. 1963: The structure and function of genes. I. On the reproducibility of the composition of DNP-complexes isolated from purified thymus nuclei. *Acta Biochim. Pol.* (in press).
- Sonneborn T. M. 1950: Methods in general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. Exptl. Zool.* 113, 87—147.
- Sporn M., Wanko T. and Dingman W. 1962: The isolation of cell nuclei from rat brain. *J. Cell. Biol.* 15, 109—
- Stanier J. E. and Philipot J. St. L. 1955: A medium for liver nuclei. *Bioch. J.* 60, xli.
- Swanson M. A. 1955: Glucose-6-phosphatase from liver. In: Colowik S. P. and Kaplan N. O., *Methods in Enzymology*. New York, 2, 541—543.
- Vincent W. S. 1952: The isolation and chemical properties of the starfish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 38, 139—145.
- Vincent W. S. 1957: Heterogeneity of nuclear ribonucleic acid. *Science* 126, 306—307.
- Wichterman R. 1953: *The Biology of Paramecium*. New York—Toronto.
- Wilczek T. and Chorąży K. 1960: Isolation of liver nuclei. *Nature* 188, 516—517.
- Zbarsky I. B. and Georgiev G. P. 1959a: Cytological characteristics of protein and nucleoprotein fractions of cell nuclei. *Biochim. Biophys. Acta* 32, 301—302.
- Zbarsky I. B. i Georgiev G. P. 1959b: Novye dannye po frankcionirovaniju kletocnyh jader pečeni krysy i himičeskomu sostavu jadernyh struktur. *Biochimija* 24, 192—199.

EXPLANATION OF THE PLATE I

Two photomicrographs of the isolated and purified macronuclei of *Paramecium caudatum*.



1



2

B. Skoczylas et al.

auctores phot.

Department of Biology, Military Medical Academy, Łódź, Żeligowskiego 7/9

Julia ROSTKOWSKA

Effect of chemical agents on the survival
of *Balantidium coli* (Malmsten)

Wpływ czynników chemicznych na przeżywalność
Balantidium coli (Malmsten)

The aim of the present study is to examine the susceptibility of *Balantidium coli* to the chemical agents which may act upon the population of parasite in situ as result of feeding of the host or as a secondary effect of drugs applied.

The literature treating with the behaviour of free-living ciliates in presence of inorganic and organic chemical compounds is very extensive. Its nearly full report is found in the monographs of Kalmus 1931 and of Wichterman 1953. Less extensive are the informations concerning the action of poisons on parasitic ciliates. They are reported in the monograph of Bishop 1959. The susceptibility of *Balantidium coli* to drugs has also been rarely experimented: Jameson 1928 studied the activity of ethyl alcohol, emetine, isoemetine, dimethoxyemetine and other compounds in vitro. Those compounds exert a slight or no toxic effect on *B. coli*, whereas arsenic trioxide and quinine proved to be very toxic. Corbet 1927, Burrows and Jahnnes 1952, Hoekenga 1953 studied the toxic effect of acids, poisons and antibiotics (aureomycin and terramycin) upon *B. coli*.

I wish to express my thanks to Prof. Dr. Z. Raabe for his valuable suggestions in the course of this study.

Material and methods

Experiments were carried out on *Balantidium coli* (Malmsten) Stein grown in 1956 on the content of the pig colon. Some authors (recently Lamy et Roux 1950, Lom 1956, Wenrich 1958 and 1959) found no difference in the structure of *B. coli* occurring in man and that, so called *B. suis* auct., from pig and consider both forms as one species. Hegner 1926, Young 1939, Tsuchiya and Kenamore 1945, claim that the infection of man occurs from pig by the ciliate cysts or even trophozoits.

The material was grown on the medium of Pavlova containing the following buffer composition: NaCl 8.5 g, Na₂HPO₄ 0.5938 g, KH₂PO₄ 0.4539 g, distilled water 1000 ml¹ at pH 6.8 in temperature 37°. The culture was inoculated at two days intervals. For experiments ciliates 48 hrs after inoculation

¹ The nutrient contains also 1% of horse serum and rice starch.

were used invariably, in order to avoid the differences of resistibility depending on the stage of development.

Such a possibility was signalized by the study of Gorbunova 1937, Kovalenok 1945, Karelina 1948 concerning the different degree of susceptibility of *Paramecium caudatum* to phytoncides of onion, Na_2SO_4 , MgSO_4 and quinine in different stages of the life cycle. According to results of Lom 1956 the highest number of conjugating *B. coli* occurs 18 and 24 hrs after inoculation into a fresh substrate. It may be assumed that 48 hrs after inoculation nearly all individuals of *B. coli* are of the same age and the number of dividing specimens is insignificant.

It was essential for experiments to have the material as pure as possible with no remnants of food and of the liquid culture medium. The attempt to purify it by means of the Nelson 1940 method or that of Krascheninikov 1959 failed to give satisfactory results since even after 4—5 hrs the majority of individuals were found adhering to cotton wool fibers or to starch grains. Balantidia after having passed the filter became little motile. This method being satisfactory for removing the intestine content before a subsequent inoculation of a fresh nutrient, proved to be inapplicable for experimental material. It fails to remove the liquid medium; besides, the ciliates kept for a too long time without their medium modify their behaviour.

The following method of cleaning was applied in the present study. With a pipette the ciliates were transferred from the tube into a watch glass of 1.5 ml capacity, rinsed 4 times in 0.85% NaCl + 6.67 mM phosphate buffer at pH 6.8 in 37°. After rinsing ciliates were transferred again to small tubes and placed in the same solution at the same temperature. By the transfer from one glass to another, balantidia became completely free from the starch grains and from the liquid nutrient, and failed to show any disturbances. Rinsing lasted for about 15 min.

The susceptibility of *B. coli* to chemical compounds was determined applying the following procedure: on a slide heated to 37°, 0.1 ml of solution of the studied compound in the 0.85% NaCl and 6.67 mM phosphate buffer at pH 6.8 was placed. To a drop containing the substance under study 0.02 ml of rinsed and densified balantidia kept in the same primary solution was added. The number of experimented balantidia fluctuated from 67 to 92. The slide was placed in a moist chamber which was a stage of the type Z.M.A. 76, heated to 37° and placed on a microscope stage.

After 10 min. the damaged ciliates were counted. Living balantidia were killed by addition of a small drop of 0.001% HgCl_2 and the total number of all the ciliates was stated. Each concentration was experimented 3 times and the mean was evaluated. Individuals which became spherical, stop their swimming and ciliary movement, show the broken pellicle and an outflow of hyaline drops of cytoplasm — were considered as damaged.

Subsequently the LD_{50} solution (killing 50% of ciliates) was calculated after the formula:

$$C_{50} = \bar{c} + \frac{1}{b} (50 - \bar{N})$$

in which:

$$b = \frac{N(c - \bar{c})}{(c - \bar{c})^2},$$

\bar{N} — number of impaired individuals, c — concentration of the substance (\bar{N} and \bar{c} — mean values).

As determination theoretical of the range of the toxic effect of the compounds the limits LD_0 — LD_{100} were accepted. LD_0 of the compound under study was calculated by the aid of the equation:

$$c_{0\min.} = \bar{c} - \frac{1}{b} \cdot \bar{N}$$

and LD_{100} — by the aid of the formula:

$$c_{0\max.} \approx 2c_{N\max.} - c_{0\min.}$$

in which $c_{N\max.}$ is the logarithm of the concentration producing the highest percentage of mortality (dead individuals) in the experiment. In the results presented and discussed, the mean of 4 successive concentrations most proximate to the lethal for 50% of individuals are given as well as the theoretical range of their toxic effect calculated after the above formula.

In evaluation of mortality, the time of 10 min. for all the agents (except some experiments on the osmotic pressure, pH, and bile) was fixed, since the time of persistence of the protozoacidal substances in the alimentary tract is unknown.

The role of osmotic pressure

In the literature no informations are found concerning the effect of osmotic pressure upon *B. coli* or other ciliates parasites of the alimentary tract. As a medium suitable for *B. coli* the physiological solution for host — of a concentration of 0,85% NaCl may be accepted. In this concentration balantidia live and reproduce freely showing no disturbances of any kind.

Table 1
Effect of NaCl solutions on % of killed *Balantidium coli*

NaCl mM	50	280	310	350	410	450	470	480	520
10'	0	0	0	0	0	33	48	82	88
30'	0	5	12	57	86	100	100	100	100
60'	0	47	76	82	100	100	100	100	100

For the determination of resistibility of *B. coli* against fluctuations of the osmotic pressure, the survival of ciliates in different concentrations of NaCl was tried. The results are visualized in the Table 1. It shows that 50% of individuals die after 10 min in the concentration of 470 mM, after 30 min. in concentration 350 mM and after 60 min. in concentration 280 mM. The 100% mortality occurred after 30 min. in 450 mM, after 60 min. — in 410 mM. As the concentration lethal for 50%, the range from 280 mM to 470 mM of NaCl applied for 10—60 min. may be stated. This corresponds to 13—22 atmospheres of osmotic pressure as calculated in respect to distilled water. This range

Table 2
Toxic action of salts, carbohydrates and aminoacid on *Balantidium coli* (in mM)

Substance		LD ₅₀	LD ₀ —LD ₁₀₀	Osmotic pressure in Atm.		
				LD ₅₀ soln.	physiol. soln.	total
cations changing	NH ₄ Cl	292.0	184.6 — 554.5	12.7	8	20.7
	NaCl	463.7	407.1 — 664.0	22.6	8	22.6
	KCl	390.8	291.2 — 696.0	17.4	8	25.4
	CaCl ₂	421.9	312.3 — 525.0	27.1	8	35.1
	MgCl ₂	575.4	279.0 — 1756.0	39.7	8	47.7
	HgCl ₂	0.015	0.007—0.1227	0.00091	8	8.0
anions changing	Na ₂ SO ₄	280.3	244.0 — 368.5	17.8	8	25.8
	Na ₂ CO ₃	51.2	36.7 — 98.1	3.4	8	11.4
	NaNO ₃	381.5	277.8 — 729.5	17.4	8	25.4
	NaJ	256.4	154.2 — 1312.0	13.1	8	21.1
	Na ₂ HPO ₄	351.8	171.8 — 1453.0	22.1	8	20.1
	NaCN	21.2	14.6 — 61.5	1.1	8	9.1
Carbohydrates and aminoacids	Glucose	353.9	284.6 — 561.8	9.2	8	17.2
	Saccharose	445.5	405.3 — 577.2	11.4	8	19.4
	Glycine	667.9	499.7 — 1280.0	16.5	8	24.5

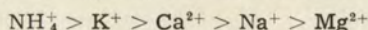
of concentrations proves a high resistability of *B. coli* to the changes of osmotic pressure. This fact is important for protection of the ciliate life and presents an indication in laboratory experiments.

The action of the Ringer solution of a composition: NaCl — 0.85 g, KCl — 0.25 g, CaCl₂ — 0.3 g, distilled water — 1000 ml was also experimented. This solution — even in a double or triple concentration — proved to be not toxic for *B. coli*.

This range of resistability is much more extensive than that stated by many authors for the free-living protozoa.

The toxicity of 6 chlorides: NH₄Cl, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂ was also investigated.² Other chlorides could not be applied on account of their low solubility in the phosphate buffer.

In the Table 2, the means of LD₅₀ and of LD₀—LD₁₀₀ concentrations are presented. The most toxic is the NH₄⁺ ion and the least toxic — Mg²⁺. The sequence of toxicity may be represented as follows:



In the solutions of tested chlorides the slackening of the balantidia movement is observed, especially in the solution of KCl which even in non-toxic

² A very powerful toxic effect of HgCl₂ was stated. The results are comprised in the Table 2. They are not discussed in this chapter because the action of this ion is not related to the osmotic effects.

concentrations is blocking the progressive movement. In a concentration lethal for about 40% of protozoa the cell is immobile although the movement of cilia is observed. Then the body becomes spherical, the ciliary movement ceases and — as the final stage — the disruption occurs. Grębecki i Kuźnicki 1955a stated the acceleration of *P. caudatum* movement in solutions of $MgCl_2$ and $CaCl_2$. In *B. coli* this phenomenon was not observed. It might be inhibited by the high content of Na^+ in the medium of *B. coli*.

In order to ascertain whether the death of balantidia is evoked by the toxic action of cation applied in the experiment or by the osmotic pressure, the pressure of the studied solutions was calculated, as related to distilled water, provided that the van't Hoff's coefficient amounts for the binary ele-

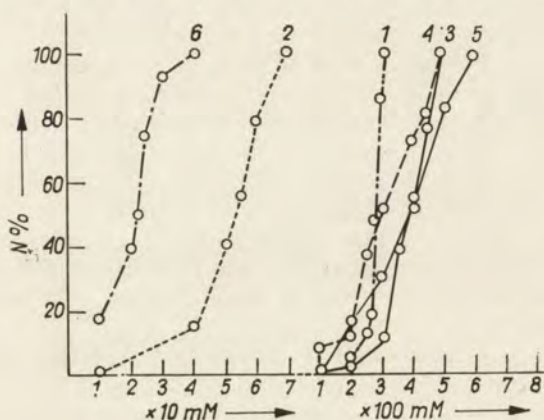


Fig. 1. Percentage of Balantidia killed in different concentration of some sodium salts; 1 — Na_2SO_4 , 2 — Na_2CO_3 , 3 — $NaNO_3$, 4 — NaJ , 5 — Na_2HPO_4 , 6 — $NaCN$. Exposure of 10 min.

ctrolytes — 1.85 and for the dissociating into 3 ions — 2.6 in 37° . Table 2 shows the osmotic pressure of the studied chlorides for LD_{50} concentration, the osmotic pressure of the physiological solution and the general osmotic pressure of solutions (the insignificant influence of the buffer was disregarded). The large span of the osmotic pressure of the studied chlorides indicates that the cell under experiment is not behaving as a simple osmotic model but its susceptibility is also influenced by the chemical nature of cation.

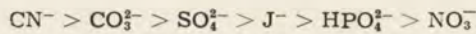
For determining the toxicity of anions six sodium salts were experimented: Na_2SO_4 , $NaNO_3$, Na_2CO_3 , NaJ , Na_2HPO_4 , $NaCN$. In all cases the same cation was used to eliminate the influence of different cations. The Na^+ was the most convenient on account of its low toxicity and high solubility of its salts. Some other sodium salts frequently applied in therapy, or often met by balantidia in their life conditions had to be postponed by reason of their low solubility in the phosphate buffer.

Table 2 shows LD_{50} of the studied salts and ranges of their toxic concentrations.

Balantidia proved to be most susceptible to the CN ion although its lethal concentration is amazingly high. The diagram (Fig. 1) shows that the ranges

of the toxic concentration of sulphate, nitrate, iodide and sodium phosphate are quite proximate. The most extensive range is that of sodium carbonate.

The toxicity of experimented anions may be arranged in the following sequence:



This sequence is in agreement with the results obtained by Grębecki i Kuźnicki 1955a for *Paramecium caudatum* except for the ion J^- which in the experiments of the above authors proved to be the least toxic. No influence of the valence of anion upon its toxicity was observed.

In the solutions of salts studied, below the LD_{50} , slowing of movement was found only in sodium sulphate. The behaviour of balantidia in sodium cyanide is rather interesting. Breaking of pellicle and outflow of cytoplasm accompanied by a slow movement of cilia was observed.

Since the LD_{50} of the experimented salts is high, it might be concluded that the ciliates die from a high osmotic pressure. Calculations analogical to the former were executed. The results shown in the Table 2 indicate that the theoretically calculated pressure of the studied solutions is not the only cause of toxicity.

The survival of balantidia in solutions of glucose, saccharose and glycine was studied. Table 2 indicates that in this case LD_{50} corresponds to the different values of osmotic pressure. Besides, the pressure in LD_{50} concentrations of those carbohydrates is lower than in the analogous solutions of NaCl whereas that in glycine is higher.

The osmotic pressure calculated theoretically in relation to distilled water fails to correspond to the actual pressure related to the cell content; yet it should be fully comparable for solutions of different substances. The differences of theoretical osmotic pressure stated for solutions of a similar toxicity commonly are accounted for by the different permeability of the cell membrane for given ions and molecules. The higher the permeability the weaker is the osmotic action of the substance (provided it is not toxic itself). According to the results of the Table 2, glycine would penetrate most easily inside the cell, the penetration of NaCl would be slightly lower, while that of carbohydrates — the lowest. Such a sequence is in full agreement with the classical cytophysiological findings.

Effect of pH

Most frequently the range of pH suitable for growing of the protozoa culture is studied. So does Wichterman 1948, Jírovec 1930, Nelson 1940 in *B. coli*, *B. entozoon* and *Nyctotherus cordiformis* cultures. The results are the optimal values of pH at which the highest growth of population is attained. Nelson 1935 and Lom 1956 stated the best development of the culture in pH 7—8. The studies concerning the survival of *B. coli* in solutions of different pH were not as yet reported as to the author's knowledge.

Many authors discuss the range of resistibility to pH in free-living protozoa. Recently Grębecki i Kuźnicki 1956 accepted the pH value 4.68—9.16 as the range of survival (LD_{50} after 24 hrs) for *P. caudatum*. Similar results are obtained by Dryl 1961 stating for the acid medium pH 4.65—4.75 and for the alkaline pH 9.05—9.15. The toxic value of pH for *B. coli* was de-

terminated in buffers with sodium citrate (0.1 M) 20 ml, CaCl_2 (0.1 M) 15 ml, NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 (0.1 M) together 10 ml, distilled water 955 ml. For keeping the suitable osmotic pressure, the buffer was added with NaCl (0.85%). The pH value was determined with a potentiometer (acc. 0.01) in 37° .

Table 3
Effect of pH on survival of *Balantidium coli*

pH of buffer (acid range)	% of disrupted <i>B. coli</i>			pH of buffer (alkaline range)	% of disrupted <i>B. coli</i>		
	10'	30'	60'		10'	30'	60'
3.7	45	65	100	9.9	0	0	0
4.3	0	38	95	10.4	4	4	4
4.5	0	15	82	11.2	6	19	43
4.8	0	10	48	11.6	45	53	64
5.1	0	2	27	11.9	55	89	100
5.7	0	0	0	12.1	100	100	100

Table 3 represents the results indicating that the range of survival of *B. coli* is comprised in the limits from pH 3.7 up to 11.62 in the period of 10–60 min. As the criterion of the limit pH value the mortality of 50% of ciliates was accepted (LD_{50}). The results are represented in the Fig. 2.

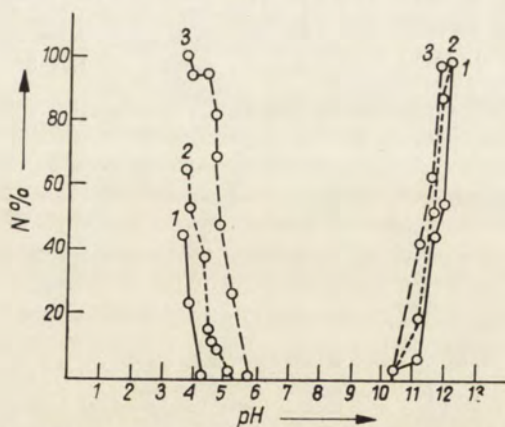


Fig. 2. Range of the toxic effect of low and high pH values;
1 — percent of individuals killed in 19 min., 2 — in 30 min., 3 — in 60 min. Experiments in buffer solutions

The body shape of *B. coli* in the low pH becomes more spherical, the pelticle bursts, the outflow of cytoplasm occurs and the movement ceases.

In the media of a high pH the slowing down of movement was the first symptom of intoxication, the change of the body shape followed and finally

the cell disrupted. Ciliates which survived over 60 min., kept subsequently in a moist chamber at 37°, survived 12 hrs and showed no symptoms of intoxication. The extensive range of tolerable pH is in some way connected with the natural life conditions of balantidia. Living in a slightly alkaline medium in colon, this ciliate is rather resistant to a high pH. This large range of pH values may be of importance in therapy, if the resistibility of *B. coli* against toxic compounds may change with the pH of the medium.

No informations in the literature had been found concerning the effects of organic acids upon *B. coli* or other parasitic protozoa. In the present study the action of formic, acetic, oxalic, citric, lactic, ascorbic and desoxycholic acids upon *B. coli* was experimented. The pH values in LD₅₀ of the studied acids are not in the mortality limits except for the ascorbic acid which at pH 3.8 kills about 23% of the protozoa within 10 min. Results are shown in the Table 4.

Table 4
Toxic action of organic acids on *Balantidium coli*
(in mM)

Substance	pH value	LD ₅₀	LD ₅₀ — LD ₁₀₀
Formic acid	5.61	3.6	2.7—9.3
Acetic acid	6.67	0.5	0.1—6.9
Oxalic acid	6.63	1.7	1.1—3.6
Lactic acid	6.37	3.1	2.4—6.7
Citric acid	5.98	0.7	0.5—1197.0
Ascorbic acid	3.82	4.5	1.9—34.3
Desoxycholic acid	4.92	2.7	2.4—3.3

The mortality of balantidia seems to depend not only on the ion H⁺ but also on the anion of the acid. A large span exists as to the toxic concentration of the acids used in experiments. No significant differences are found in the toxic concentrations of the oxalic, lactic and formic acids. The range of the toxic effect of acids is shown in the Fig. 3. The diagram indicates that the toxic concentrations of oxalic, lactic and formic acids fluctuate in similar limits and the curve is very abrupt which proves the rapid increase of their toxic effects. The widest range of the toxic action is shown by the curve of the citric and ascorbic acids.

Grębecki i Kuźnicki 1956 stated that *P. caudatum* dies in the same concentrations of H ions without respect to the chemical nature of anions. The results in the case of *B. coli* and *P. caudatum* then are different. *Balantidium coli* is much more resistant to the action of experimented acids than the free-living protozoa, probably because the acids belong to the compounds occurring in the natural medium of *B. coli*. The resistibility of *B. coli* to ascorbic acid (which proved to be the least toxic) is striking. The most

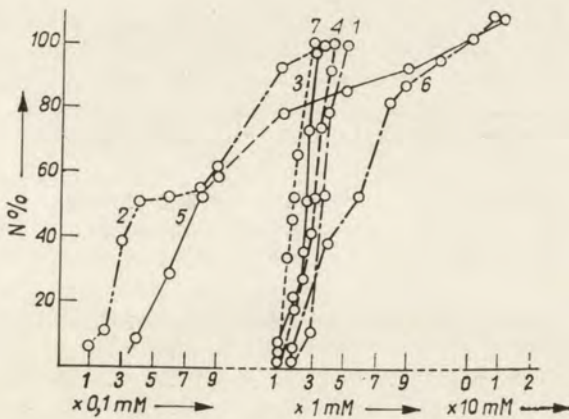


Fig. 3. Percentage of Balantidia killed in 10 min. in different concentrations of some organic acids;

- 1 — formic acid, 2 — acetic acid, 3 — oxalic acid,
4 — lactic acid, 5 — citric acid, 6 — ascorbic acid,
7 — desoxycholic acid

toxic of all was found the acetic acid. The first symptoms of intoxication with organic acids in *B. coli* is bursting of the pellicle and outflow of cytoplasm; the movement is inhibited just after several minutes. Only after application of lactic acid the inhibition of movement preceded the changes in the pellicle and in cytoplasm.

Effect of some drugs

The action of penicillin, streptomycin and aureomycin upon *B. coli* was tested. Chloromycetin and terramycin as insoluble in the phosphate buffer had to be postponed. Penicillin and streptomycin proved to be little toxic for *B. coli* and their LD_{50} are similar for both antibiotics (Table 5). Aureomycin is more toxic as related to the toxic concentration LD_{50} and to its range of lethal concentrations.

Penicillin and aureomycin involve the changes of the body shape — which becomes spherical — and then the disruption of the cell occurs. In the medium with streptomycin the first symptom of intoxication is the slowing of movement. All antibiotics studied involve a rapid and complete dissolution of the pellicle.

Some protozoacidal drugs were also applied: atebtrin, chinisol, phenol, neosalvarsan, sulphathiazole, potassium permanganate, ethanol (Table 5). The toxic concentrations of chinisol and neosalvarsan are similar. Balantidium proved to be more susceptible to phenol and potassium permanganate. Amazing is the resistibility of balantidia to ethanol. The toxicity of sulphathiazole is lower than that of other compounds. Balantidia are only slightly susceptible to the toxic action of atebtrin which is often applied as a protozoacidal drug. Results visualized in the Table 5 may serve as orientation data in establishing the lethal doses of drugs for *Balantidium*.

Table 5
Toxic effect of antibiotics and protozoacidal drugs on *Balantidium coli* (in mM)

Substance	LD ₅₀	LD ₀ — LD ₁₀₀
Penicillin	127.2	35.5—1861.0
Streptomycin	151.7	67.0—2388.0
Aureomycin	2.7	1.3—19.5
Atebrin	8.4	1.3—300.8
Chinosol	2.6	1.3—9.7
Neosalvarsan	2.7	1.1—23.4
Sulphathiazole	69.1	38.6—437.4
Phenol	0.6	0.2—3.3
KMnO ₄	3.0	0.4—1.6
Ethanol	3067.0	1777.0—11410.0*

* In experiment ca 4500.0 mM.

Fig. 4 shows the ranges of the toxic action of drugs. The first signal of intoxication was the slackened swimming except for sulphathiazole which causes the acceleration of movement in *B. coli*. Atebrin evokes a gradual staining of cytoplasm already in living balantidia.

The experiments indicate a high resistibility of *B. coli* to poisons in the medium. In lower concentrations even single dead specimen were not detected.

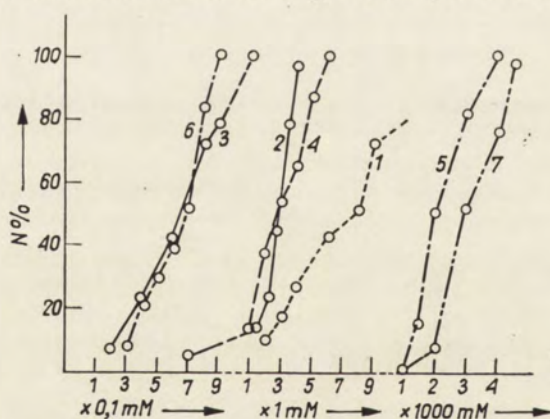


Fig. 4. Percentage of *Balantidia* killed in 10 min in different concentrations of some drugs; 1 — atebrin, 2 — chinosol, 3 — phenol, 4 — neosalvarsan, 5 — sulfathiazole, 6 — potassium permanganate, 7 — ethyl alcohol

In consequence, curves of the compounds studied are abrupt which speaks in favour of a rapid rise of toxic action of the compound. A selection of less resistant individuals was not stated, i.e. the differences in resistibility are in *B. coli* insignificant.

Effect of the surface-active compounds and of bile on the toxicity of drugs

In pharmacology a number of surface-active substances are applied for emulgation of medicines or for a direct therapeutic purpose. Therefore the influence of superficially acting compounds upon toxicity of the protozoacidal drugs was experimented applying Tween 80 and saponin. Saponin in concentration 0.2% kills 54.24% of protozoa within 10 min.; Tween 80 in concentration 1—5% is not toxic.

For experiments 0.1% saponin and 1% Tween solutions, not noxious for balantidia, were applied to test their effect on the action of atebtrin, chinisol, and phenol. The results comprised in the Table 6, support the assumption that the effect of drugs depends on the superficially active substances in the medium since the LD₅₀ dose of atebtrin increased 10 times in the presence of Tween, and nearly 6 times in the saponin containing medium. The chinisol LD₅₀ dose increased about 10 times in presence of Tween and in the saponin containing medium no deviation in the LD₅₀ was found. The phenol action with Tween and saponin showed no essential alterations.

Table 6

Effect of surface-active compounds and of bile on toxicity of poisons (LD₅₀ in mM)

Toxic compound	Compound alone	Compound + saponin 0.1%	Compound + Tween 1%	Compound + bile 1:100
Chinisol	2.9	2.6	24.2	—
Phenol	0.60	0.62	0.58	—
Atebrin	8.4	48.0	78.0	364.0
NaCl	463.7	—	—	203.9
Na ₂ CO ₃	51.2	—	—	11.5
Formic acid	3.6	—	—	0.4

Bile sampled from a pig immediately after slaughter, diluted with 0.85% sodium chloride, was used. Non-diluted bile kills all balantidia after a few minutes. In the solution 1:10, 39.34% of protozoa die after 10 min., 50% after 26 min. and 69% after 60 min. Later on, the mortality fails to increase. The toxic solutions of bile involves a quick dissolution of the pellicle and disruption of cytoplasm which makes the count of dead protozoa difficult.

In subsequent experiments 1:100 concentration of bile not killing protozoa was used. The influence of bile upon the toxicity of the following compounds was experimented: atebtrin, sodium chloride, sodium carbonate and formic acid.

It follows from the results shown in the Table 6 that the LD₅₀ dose of atebtrin increased nearly 50 times in presence of bile. The lethal dose of NaCl, Na₂CO₃ and of formic acid was diminished by the action of bile: in the case of NaCl down to 50%, of sodium carbonate to 20% and of formic acid to 10% of its initial value. This fact may be of importance for chemotherapy because the bile inflicting the pellicle of *B. coli* intensifies the action of poisons.

Summary

A method of cleaning the culture of *Balantidium coli* from food remnants and liquid medium of the nutrient was worked out.

The survival of *B. coli* in different concentrations of NaCl proves its high resistibility to the changes of the osmotic pressure. Similar results were concluded from the study of the toxic effect of some other metal chlorides and sodium salts, carbohydrates and aminoacids.

The range of survival of *B. coli* in buffer solutions is comprised in the pH limits 3.7—11.62 for the exposure of 10—60 min. In the case of organic acids the mortality of *Balantidium* depends presumably also on the anion.

The action of some drugs upon *B. coli* was experimented. The results may serve as orientation in determining the doses of drugs lethal for balantidia.

The agents superficially active Tween 80, saponin and bile alter the susceptibility of *Balantidium coli* to some chemicals.

STRESZCZENIE

Opracowano metodę oczyszczania balantidiów z resztek pokarmu i płynnego środowiska pożywki.

Przeżywalność *B. coli* w różnych stężeniach NaCl świadczy o jego znacznej odporności na zmiany ciśnienia osmotycznego. Podobne wyniki przyniosło zbadanie efektu toksycznego niektórych innych chlorków metali, soli sodowych, cukrów i aminokwasów.

Zakres przeżywalności ponad 50% *B. coli* w roztworach buforowych mieści się w granicach pH 3.7—11.62 dla okresu 10—60 min. W przypadku kwasów organicznych śmiertelność balantidiów zależy prawdopodobnie również i od anionu.

Zbadano oddziaływanie niektórych leków na *B. coli*. Uzyskane wyniki mogą posłużyć jako dane orientacyjne przy ustalaniu śmiertelnych dla balantidium dawek leków.

Substancje powierzchniowo czynne, jak Tween 80, saponina, a także żółć, zmieniają wrażliwość pierwotniaków na niektóre badane związki chemiczne.

REFERENCES

- Burrows R. B. and Jahnes W. G. 1952: The effect of aureomycin on Balantidiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1.
- Bishop A. 1959: Drug Resistance in Protozoa. Biol. Rev. 34.
- Corbet A. S. and Jameson A. P. 1927: The toxicity of phenylarsinic acids for *Balantidium coli* Malm. in cultures in relation to their chemical constitution. Biochem. J. 21.
- Dryl S. 1961: The velocity of forward movement of *Paramecium caudatum* in relation to pH of medium. Bull. Acad. Pol. Sci. S. Sci. Biol. 9, 71—74.
- Gorbunova P. G. 1937: Ontogeneza kletki i voprosy mehaniki razvitiya. Soobščenie 6. Čuvstvitelnost *Paramecium caudatum* k hininu na raznyh etapah jego ontogenii. Biol. Žurn. 6.
- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1955a: Stosunek *Paramecium caudatum* do chemizmu środowiska i ochronny wpływ skupienia wobec substancji nieorganicznych. Folia Biol. 3.
- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1955b: Badania nad reakcjami ochronnymi wy-moczków pojedynczych i skupionych w roztworach niektórych substancji organicznych. Folia Biol. 3.

- Grębecki A. i Kuźnicki L. 1956: Studia nad odpornością *Paramecium caudatum* wobec niektórych ekologicznie ważnych zmian chemizmu środowiska. Folia Biol. 4.
- Hegner R. W. 1926: Animal infections with the trophozoites of intestinal protozoa and their bearing on the functions of cyst. Am. J. Hyg. 6.
- Hoekenga M. T. 1953: Terramycin treatment of Balantidiasis in Honduras. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2.
- Jameson A. P. 1928: The action of certain drugs and chemicals on *Balantidium coli* Malm. in cultures. Parasitol. 20.
- Jírovec O. 1930: Neues *Balantidium* aus dem Darmtraktus von *Amblystoma tigrinum*. Z. Parasitenk. 3, 17—21.
- Kalmus H. 1931: *Paramecium*, das Pantoffeltierchen. Jena.
- Karelinina V. 1948: Otnošenje *Paramecium caudatum* k jadám na raznyh etapah jeho ontogenii. Dokl. Akad. Nauk SSSR 61.
- Kovalenok A. 1945: Čuvstvitelnost *Paramecium caudatum* z toksičeskim agentam na raznyh etapah jeho ontogenii. Dokl. Akad. Nauk SSSR 48.
- Krascheninnikow S. 1959: Study on the infraciliature patterns in *Balantidium* sp. and *B. wenrichi*. J. Protozool. 6.
- Lamy L. et Roux H. 1950: Remarques morphologiques, biologiques et spécifiques sur les *Balantidium* de culture. Bull. Soc. Path. Exp. 43.
- Lom J. 1956: Experiments with the cultivation of our three species of the genus *Nyctotherus* and of *Balantidium entozoon* and *B. coli*. Acta Soc. Zool. Bohemoslov. 20.
- Nelson E. C. 1935: Cultivation and cross-infection experiments with Balantidia from pigs. Am. J. Hyg. 22.
- Nelson E. C. 1940: An intestinal content cultivation medium. I. *Balantidium coli*. Am. J. Trop. Med. 20.
- Tsuchiya H. and Kenamore B. 1945: Report on a case of Balantidiasis. Am. J. Trop. Med. 25.
- Wichterman R. 1948: The hydrogen ion concentration in the cultivation and growth of eight species of *Paramecium*. Biol. Bull. 95.
- Wichterman R. 1953: The Biology of *Paramecium*. New York — Toronto.
- Wenrich D. H. 1958: Some problems of taxonomy in the ciliate genus *Balantidium*. J. Protozool. 5 (suppl).
- Wenrich D. H. 1959: Some nuclear developmental processes in Balantidia (*Ciliata*) J. Protozool. 6. (suppl).
- Young M. D. 1939: Balantidiosis. J. Am. Med. Assoc. 113.

Fasciculi praeparati:

Z. Raabe: The remarks on principles and the outline of *Protozoa* system [Uwagi o podstawach i zarys systemu *Protozoa*] — Z. Raabe: The taxonomic position and the rank of *Peritricha* [Stanowisko systematyczne i ranga *Peritricha*] — A. W. Jankowski: Morphology and evolution of *Ciliophora*. IV. Saprozoobionts of the family *Loxcephalidae* fam. nov., their taxonomy and evolutionary history [Морфология и эволюция *Ciliophora*. IV. Сапрозообионты из семейства *Loxcephalidae* fam. nov., систематика и эволюционная история] — K. Golińska and M. Doroszewski: The cell shape of *Dileptus* in the course of division and regeneration [Kształt komórki *Dileptus* w trakcie podziału i regeneracji] — A. Grębecki: Rôle des ions K^+ et Ca^{2+} dans l'excitabilité électrotonique de la cellule protozoaire. I. Stimulation chimique [Znaczenie jonów K^+ i Ca^{2+} w pobudliwości elektrotonecznej komórki pierwotniaczej. I. Bodźce chemiczne] — J. Rostkowska: Effect of chemical agents on the motor responses in *Balantidium coli* (Malmsten) [Wpływ czynników chemicznych na reakcje ruchowe *Balantidium coli* (Malmsten)] — J. Rostkowska: Effect of chemical agents on some vital functions of *Balantidium coli* (Malmsten) [Wpływ czynników chemicznych na niektóre czynności życiowe *Balantidium coli* (Malmsten)] — M. V. Крылов: Extraerythrocytal development stages of *Piroplasma bigeminum* [Внеэритроцитарные формы развития *Piroplasma bigeminum*] — J. Moraczewski: *Testacea* du seston des rivières Wkra et Narew [*Testacea* sestonu Wkry i Narwi]

SUBSCRIPTION

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

Place your order with your bookseller or directly with:

R U C H

Warszawa, Wilcza 46, Poland

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

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

Państwowe Wydawnictwo Naukowe
(PWN — Polish Scientific Publishers)
Warszawa

Fasciculi:

31. E. M. Cheissin and G. I. Poljansky: On the taxonomic system of Protozoa [О системе простейших] 327
32. J. Dobrzańska-Kaczanowska: Comparaison de la morphogenèse des Ciliés: *Chilodonella uncinata* (Ehrbg.), *Allospiraerium paraconvexa* sp. n. et *Heliochona scheuteni* (Stein) [Porównanie morfogenezy orzęsków: *Chilodonella uncinata* (Ehrbg.), *Allospiraerium paraconvexa* sp. n. oraz *Heliochona scheuteni* (Stein)] 353
33. A. Kaczanowski: Morphology and morphogenesis of the sucker in *Hysterozineta paludinarum* Diesing (*Ciliata*, *Thigmotricha*) as observed in living material [Badania przyżyciowe nad morfologią i morfogenezą przyssawki u *Hysterozineta paludinarum* Diesing (*Ciliata*, *Thigmotricha*)] 395
34. V. F. Mashansky, L. N. Seravin and L. N. Vinnichenko: Ultrastructure of the ciliate *Loxodes rostrum* (O. F. M.) in relation to the mode of its water transport [Ультратонкое строение инфузорий *Loxodes rostrum* (O.F.M.) в связи с особенностями водообмена] 403
35. B. Skoczyła, H. Panusz and M. Gross: Isolation of macronuclei from *Paramecium caudatum*. The role of calcium ions [Izolowanie makronukleusów *Paramecium caudatum*. Rola jonów wapniowych] 411
36. J. Rostkowska: Effect of chemical agents on the survival of *Balantidium coli* (Malmsten) [Wpływ czynników chemicznych na przeżywalność *Balantidium coli* (Malmsten)] 421