

Elektronenmikroskopischer Nachweis der subpelliculären Lage des Silberliniensystems bei *Colpidium colpoda* (*Ciliata*, *Tetrahymenidae*)

WILHELM FOISSNER und PETER SIMONSBERGER

Zoologisches Institut der Universität Salzburg, Österreich

Mit 19 Abbildungen

Eingegangen am 28. Januar 1975

Summary

Electronmicroscopical Demonstration of the Subpellicular Location of the Silverline System in *Colpidium colpoda* (*Ciliata*, *Tetrahymenidae*)

1. The subpellicular location of the silverline system is electronmicroscopically demonstrated for the first time by means of ultrathin sectioning of wet silvered *Colpidium colpoda*. Accordingly, the widely accepted theory of PÍTELKA (1961) that Klein's silverline system is formed in tetrahymenid ciliates by deposition of silver at adjacent alveolar membranes should be abandoned. 2. The electronmicroscopical findings confirm the earlier lightmicroscopical observations about the distribution of the silverlines and their connections with the locomotoric and effectoric organelles. 3. It seems from our observations that in *Colpidium colpoda* the primary and the secondary meridians of the silverline system are situated in different layers of the cortex. 4. A five-layered structure of the epiplasma containing the secondary meridians of the silverline system was observed in Champy-fixed specimens. 5. The possibility of a fibrillar nature of the silverline system has increased now very much. However, we were not successful in demonstrating some sort of fibrils on the sites of silver deposition in conventionally prepared *Colpidium colpoda*. 6. The location and nature of the silverlines and the significance of our findings are discussed.

Zusammenfassung

1. Mit Hilfe von Ultradünnschnitten naß versilberter *Colpidium colpoda* wird erstmals die subpelliculäre Lage des Silberliniensystems elektronenmikroskopisch demonstriert. Damit muß die bereits allgemein akzeptierte Theorie von PÍTELKA (1961), daß das Kleinsche Silberliniensystem bei den tetrahymeniden Ciliaten durch Anlagerung von Silber an die Membranstoßpunkte der pelliculären Alveolen gebildet wird, aufgegeben werden. 2. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen über den Verlauf der Silberlinien und ihren Verbindungen zu den lokomotorischen und effektorischen Organellen bestätigen die früheren lichtmikroskopischen Befunde. 3. Die bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, daß bei *Colpidium colpoda* die Silberlinienmeridiane 1. Ordnung und 2. Ordnung in verschiedenen Schichten des Cortex gelegen sind. 4. Das Epiplasma, in dem die Silberlinienmeridiane 2. Ordnung liegen,

weist nach Champy-Fixierung einen fünfschichtigen Aufbau auf. 5. Die fibrilläre Natur des Silberliniensystems hat durch die vorliegenden Untersuchungen sehr an Wahrscheinlichkeit gewonnen. Sie kann aber noch nicht als gesichert gelten, da es bei konventionell präparierten *Colpidium colpoda* bisher nicht gelungen ist, an jenen Stellen, wo sich die Silberanlagerung findet, Fibrillen nachzuweisen. 6. Die Lage und Natur der Silberlinien und die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse werden diskutiert.

1. Einleitung

KLEIN (1942) sah in dem von ihm 1926 entdeckten Silberliniensystem der Ciliaten auf Grund jahrzehntelanger morphologischer und experimenteller Untersuchungen eine fibrilläre, dicht unter der Pellicula liegende Differenzierung des Ektoplasmas. In dieser Hinsicht stimmten zwischen 1930 und 1950 die meisten Forscher mit KLEIN (1929) prinzipiell überein (so z. B. GELEI 1932, 1934, LENNAN 1935, PARUCZ 1939, TAYLOR und GARNJOBST 1939, CHATTON und SÉGUÉLA 1940, TARTAR 1941, RAABE 1949), obwohl meist eine gewisse Unsicherheit in der Deutung der Befunde festzustellen ist, was vor allem auf die Anwendung der in der Folgezeit entwickelten sehr verschiedenen nassen Versilberungsmethoden (CHATTON und LWOFF 1930, GELEI 1934) zurückzuführen ist.

Mit dem Beginn der elektronenmikroskopischen Ära trat ein grundsätzlicher Wandel in der Ansicht über den Aufbau und die Lage des Silberliniensystems ein. ROTH (1957), EHRET und POWERS (1959), PYTORAC (1959), vor allem aber PITEKKA (1961) und DIPELL (1962) stellten die Hypothese auf, daß das KLEINSche Silberliniensystem durch Anlagerung von Silber an die Membranstoßpunkte der pelliculären Alveolen gebildet würde, das Silberliniensystem also in der Pellicula gelegen wäre und keinen fibrillären Aufbau aufwiese. Diese Hypothese, die als einzige Stütze die morphologische Ähnlichkeit der Membranstoßpunkte mit dem Verlauf der Silberlinien hatte, wurde in der Folgezeit von vielen Forschern übernommen und ohne nähere Untersuchungen auf Ciliaten aus den verschiedensten Ordnungen übertragen (so z. B. BRADBURY 1965, GLIDDON 1966, ALLEN 1967, DIDIER 1970, SOLTYSKA 1971, RUFFOLO 1972).

Alle diese Aussagen über die Lage und den Aufbau des Silberliniensystems konnten aber nur hypothetischen Charakter besitzen, was von sämtlichen Autoren und auch in vielen zusammenfassenden Darstellungen (z. B. PITEKKA 1969, TARTAR 1969, ELLIOTT 1973) übersehen worden ist, da sie nicht etwa an Ultradünnschnitten versilberter Ciliaten gewonnen worden waren, sondern an konventionell präpariertem Material. Der Befund von DIPELL (1962), die an Ultradünnschnitten versilberter *Paramecien* festgestellt haben will, daß der Ort der Silberanlagerung genau an den Stoßpunkten der pelliculären Alveolen wäre, wurde bereits einer ausführlichen Kritik unterzogen (FOISSNER und SIMONSBERGER 1975). Keiner der Autoren, die die Hypothese der Stoßpunktanlagerung des Silbers vertreten, hat aber auch nur versucht, die Fakten,

die KLEIN (1932, 1934/35, 1942) für die fibrilläre Natur und die subpelliculäre Lage des Silberliniensystems vorlegte, mit ihren Vorstellungen befriedigend zu erklären. Die Befunde von TAYLOR und GARNJOBST (1939), die an Querschnitten versilberter *Colpoda duodenaria* das Silberliniensystem als eindeutig unterhalb der Pellicula liegend identifizierten, fanden ebenfalls keine Beachtung. Auch eine neuere experimentelle Studie über das Silberliniensystem von *Colpidium* (FOISSNER 1969 a, b), deren Ergebnisse sich nur unter der Annahme eines fibrillären Strukturaspekts des Silberliniensystems deuten ließen, konnte die bereits fixierte Meinung nicht ändern.

Die vorliegende Studie bringt nun erstmals den elektronenmikroskopischen Beweis der subpelliculären Lage des Silberliniensystems bei einem tetrahymeniden Ciliaten.

2. Material und Methoden

Colpidium colpoda ist ein in α -mesosaprobien und polysaprobien Gewässern weit verbreiteter 90–150 μm großer tetrahymenider Ciliat. Das von uns bearbeitete Material stammt aus Pflanzenaufgüssen von einem polysaprobien Gewässer in Salzburg. Die Bestimmung erfolgte nach den von KAHL (1930–1935), FOISSNER (1969 c) und MAC COY (1974) angegebenen Kriterien. Für die licht- und elektronenmikroskopischen Präparationen wurden die Tiere mit einer Pipette von der Oberfläche des Aufgusses abgesaugt, vorsichtig zentrifugiert und ohne sie zu waschen mit dem Fixans übergossen.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen am Silberliniensystem erfolgten vergleichend an trocken (KLEIN 1942, FOISSNER 1967, 1968) und naß (CHATTON und LWOFF 1930, CORLISS 1960) präparierten Tieren. Die nasse Präparation wurde genau nach der von CORLISS (1953) angegebenen Vorschrift durchgeführt.

2.1. Elektronenmikroskopische Präparationen

a) Fixierung nach PALADE (1952) bei pH 7,5 auf 15 Minuten. Nach Auswaschen des Osmiumtetroxides in der PufferstammLösung wurde über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und nach 30 Minuten langem Aufenthalt in Propylenoxid in Epon 812 eingebettet.

b) Fixierung nach CHAMPY (7 Teile 1%ige wäßrige Chromsäurelösung, 7 Teile 3%ige wäßrige Kaliumbichromatlösung, 4 Teile 2%ige wäßrige Osmiumsäurelösung) auf 3 Minuten. Dieses Fixans wurde in zweimal gewechseltem Da-Fano-Gemisch (1 g Kobaltnitrat, 10 ml Formol, 1 g Natriumchlorid, 90 ml destilliertes Wasser) 15 Minuten lang ausgewaschen. Über die aufsteigende Alkoholreihe und Propylenoxid wurde wieder in Epon 812 eingebettet.

c) Bis in 50%igen Alkohol geführte, naß versilberte *Colpidium colpoda* wurden mitsamt der Gelatineschicht mit einer Rasierklinge vom Objektträger abgelöst und erst dann in der aufsteigenden Alkoholreihe weitergeführt. Ein Ablösen der Gelatineschicht vom Objektträger gelingt nämlich nicht mehr, wenn die Präparate gleich bis in 100%igen Alkohol geführt werden. Über Propylenoxid (30 Minuten) wurden dann die Tiere mitsamt der Gelatineschicht in Epon 812 eingebettet.

Die Dünnschnitte wurden mit Hilfe von Diamantmessern an einem Reichert OMU-2 hergestellt und auf kohleverstärkten pioloformbefilmten Objektträgern (75 mesh) aufgebracht. Die Kontrastierung erfolgte je 15 Minuten mit äthanolischer (50%) Uranylacetatlösung und Bleicitrat nach REYNOLDS (1963). Für die elektronenmikroskopische Untersuchung stand uns das EM-300 der Firma Philips zur Verfügung.

3. Ergebnisse

3.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

3.1.1. Das Silberliniensystem von *Colpidium colpoda* nach trockener Präparation (FOISSNER 1968)

Da bereits mehrere ausführliche licht- und rasterelektronenmikroskopische Studien über das Silberliniensystem trocken präparierter *Colpidium colpoda* vorliegen (KLEIN 1929, 1942, FOISSNER 1969 c, FOISSNER und SIMONSBERGER 1975), sei hier nur eine ganz kurze, durch Abbildungen ergänzte Darstellung gegeben. Je nach ihrer Verbindung mit bestimmten Organellen werden Silberlinienmeridiane 1. Ordnung (Abb. 2, M_1) und Silberlinienmeridiane 2. Ordnung (Abb. 2, M_2) unterschieden. In den Meridianen 1. Ordnung finden sich in regelmäßigen meridionalen Reihen die Basalkörper der Cilien (Abb. 1 und 5, *Bk*). Den meist stark verzweigten, in der Ein- oder Mehrzahl vorhandenen Meridianen 2. Ordnung (Abb. 1), die jeweils zwischen zwei Basalkörperreihen verlaufen (Abb. 2 und 5), sind die Schleuderorganellen angeschlossen (Abb. 2—4, Pfeile). Die Anzahl und der Verzweigungsgrad der Meridiane 2. Ordnung sind vor allem davon abhängig, inwieweit gerade eine Regeneration der Schleuderorganellen stattfindet (KLEIN 1942). Das Silberliniensystem von *C. colpoda* bietet dadurch ein sehr bewegtes, dynamisches Erscheinungsbild (Abb. 1—5).

Abb. 1—5. Lichtmikroskopisches Erscheinungsbild des Silberliniensystems von *Colpidium colpoda* nach trockener (FOISSNER 1967, 1968) und nach nasser Präparation (CORLISS 1953)

Abb. 1. Das Silberliniensystem der Ventralseite. Die Cilienreihen biegen sich rechtwinkelig um den Oralapparat herum und vereinigen sich oberhalb desselben mit den dorsalen Cilienmeridianen, wodurch im Silberliniensystem eine komplizierte Polnaht entsteht. Das Kontinuum des Silberliniensystems, das alle lokomotorischen und effektorischen Organellen einschließt, ist an dieser Abbildung besonders klar ersichtlich. Trockene Präparation (1200 : 1)

Abb. 2. Stärker vergrößerter Teil des Silberliniensystems der Ventralseite. In den Silberlinienmeridianen 1. Ordnung (M_1) liegen in regelmäßigen Abständen die stark argyrophilen Basalkörper der Cilien. In den Silberlinienmeridianen 2. Ordnung (M_2), die streckenweise gabelförmig aufgeteilt sind, liegen unregelmäßig angeordnet einige Relationskörper von Schleuderorganellen (Pfeile). Trockene Präparation (5000 : 1)

Abb. 3. Stärker vergrößerter Teil des Silberliniensystems der Lateralseite. In den Meridianen 2. Ordnung liegen viele stark argyrophile Relationskörper von Schleuderorganellen (Pfeile). Nasse Präparation (4500 : 1)

Abb. 4. Diese besonders feine Imprägnation des Silberliniensystems läßt erkennen, daß die Schleuderorganellen und die Basalkörper jeweils von einer ringförmigen Silberlinie (KLEIN'S Zirkularfibrille) umgeben werden (Pfeile). Nasse Präparation (5100 : 1)

Abb. 5. Stärker vergrößerter Teil des Silberliniensystems der Ventralseite. Da die Schleuderorganellen ausgestoßen worden sind, finden sich in den Meridianen 2. Ordnung keine Relationskörper mehr. Die die Basalkörper (*Bk*) verbindenden, ebenfalls vielfach aufgezweigten Silberlinienmeridiane 1. Ordnung, sind hier besonders deutlich erkennbar. Nasse Präparation (4500 : 1)

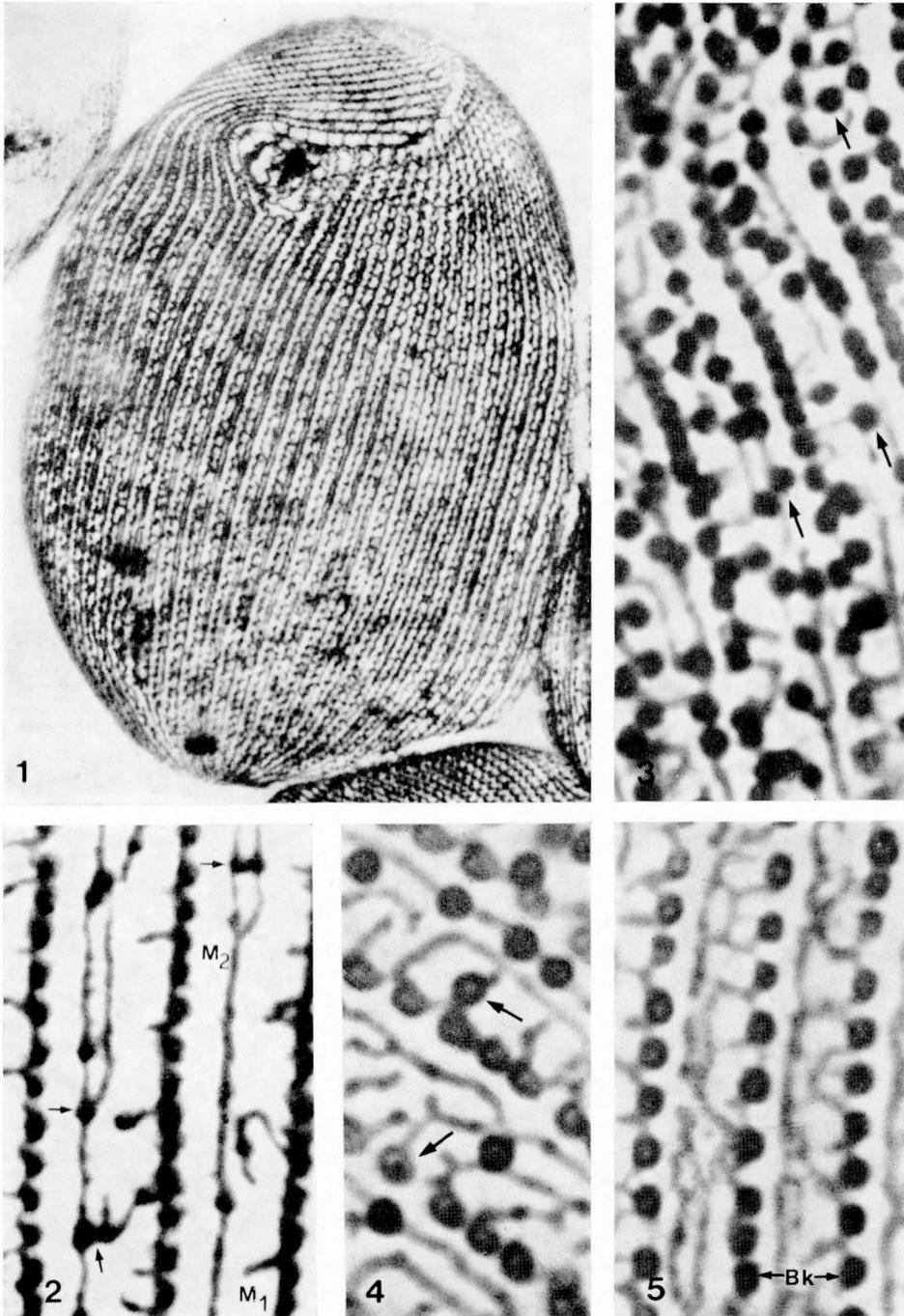


Abb. 1—5

3.1.2. Das Silberliniensystem von *Colpidium colpoda* nach nasser Präparation (CORLISS 1953)

Es kann heute als gesichert gelten, daß mit der von CHATTON und LWOFF (1930) entwickelten nassen Präparationsmethode, die durch ein chemisches Fixans die Erhaltung des Silberliniensystems erreicht (siehe S. 66), in vielen Fällen genau dieselben Strukturen imprägniert werden wie mit den trockenen Präparationsmethoden, die die Erhaltung des Silberliniensystems durch einfaches Eintrocknen der Ciliaten bewirken. Wir fanden in den imprägnierten Strukturen bei *C. colpoda* jedenfalls keine prinzipiellen Unterschiede (vgl. Abb. 1 und 2 mit Abb. 3—5), sondern nur qualitative, indem nämlich bei nasser Präparation die Silberlinien häufig mehr oder weniger stark körnig zerfallen oder überhaupt nicht imprägniert sind (vgl. KLEIN 1942). Genau dieselben Zerfallserscheinungen lassen sich jedoch auch bei trocken präparierten Silberliniensystemen nachweisen (KLEIN 1942, FOISSNER 1968 b).

Offensichtlich in Unkenntnis dieser Tatsachen kommen CHEISSIN und MOSEVICH (1962) dann zu dem Schluß, daß die häufig netzförmig aufgeteilten Meridiane 2. Ordnung (siehe Abb. 5) durch die von ihnen festgestellten Protrichocysten gebildet würden. Dies ist natürlich ein auf sehr schlecht ausgefallene nasse Präparation zurückgehender Irrtum (vgl. die Abb. 1 und 2 von CHEISSIN und MOSEVICH mit den Abb. 3—5 in dieser Arbeit. Die Abb. 3—5 beweisen wohl unzweifelhaft, daß die einzelnen Schleuderorganellen durch Silberlinien verbunden werden, und nicht die Schleuderorganellen selbst dieses Netzwerk bilden. Diese Tatsache konnte bei allen *Colpidium*-Arten übereinstimmend festgestellt werden (KLEIN 1942, PITELKA 1961, FOISSNER 1969 c).

3.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.2.1. Terminologie

Für die exakte Festlegung der Lage des Silberliniensystems und um Mißverständnissen vorzubeugen, erscheint es uns sehr wichtig, die äußere Region

Abb. 6—19. Querschnitte von nach Methode a bis c präparierter *Colpidium colpoda* im Elektronenmikroskop

Abb. 6. Der periphere Teil der Zelle nach Osmiumsäurefixierung (Methode a). Unterhalb der pelliculären Alveolen (A) liegt das Epiplasma, das in der Nähe der Basalkörper immer dünner wird. Rechts der Basalkörper entspringt ein Bündel von Mikrotubuli (Pfeile). Die Mitochondrien liegen dem Epiplasma dicht an (18 700 : 1)

Abb. 7. Stärker vergrößerter Teil des Cortex. Die Membranstoßpunkte der pelliculären Alveolen (Pfeile) und das Epiplasma (E), das einen fibro-granulären Strukturaspekt aufweist, sind deutlich zu erkennen. Der linke Membranstoßpunkt liegt hinter einem Basalkörper. Zwischen innerer Alveolenmembran und Epiplasma findet sich ein längsverlaufendes Bündel von Mikrotubuli (Mt). Methode a (56 100 : 1)

Abb. 8. Das Epiplasma zeigt nach Champy-Fixierung einen fünfschichtigen Aufbau. Die mittlere Schicht enthält parallel angeordnete fibrilläre Strukturen (Pfeile). Methode b (136 000 : 1)

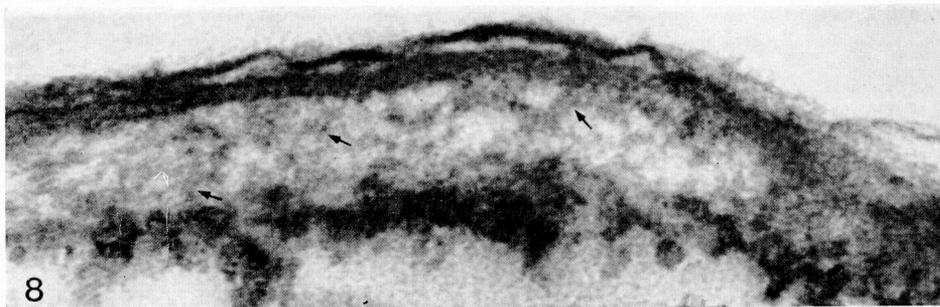
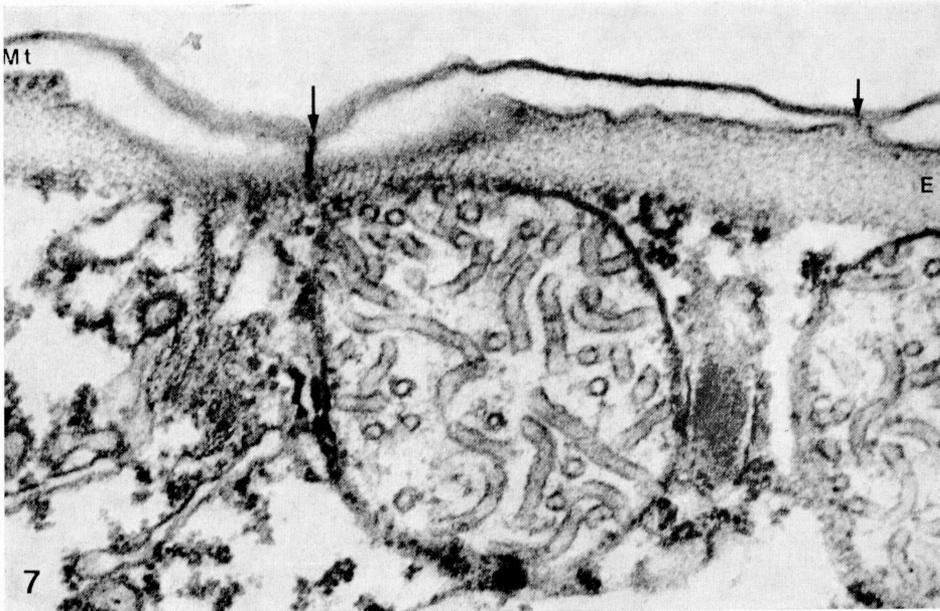
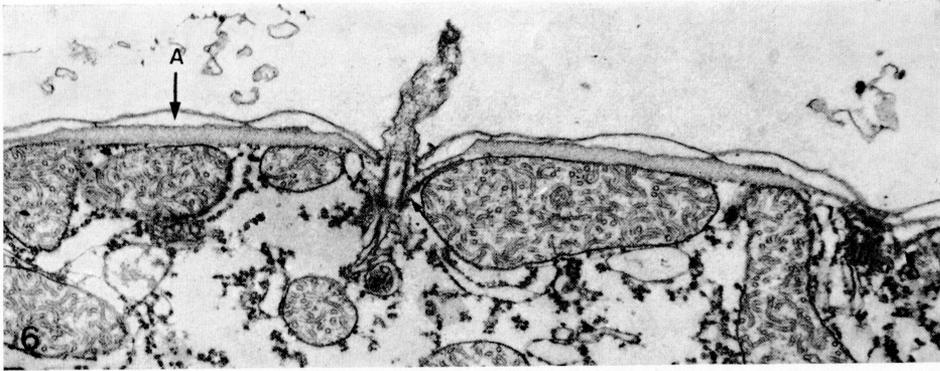


Abb. 6—8

von *C. colpoda* terminologisch genau zu erfassen. In Übereinstimmung mit ROTH (1957), PITELKA (1961, 1969) und ALLEN (1967) definieren wir als Pellicula nur jene oberhalb des Epiplasmas (FAURÉ-FREMIET 1962) gelegene, aus „unit-membranes“ gebildete Zone (äußere Zellmembran, äußere und innere Alveolenmembran). Als subpelliculär bezeichnen wir alle unterhalb der inneren Alveolenmembran gelegenen Strukturen, die nicht dem Cytoplasma zugerechnet werden können (z. B. Basalkörper, Kinetodesmata, Mikrotubuli). Diese Unterscheidung erscheint uns besonders für den engeren Verwandtschaftskreis von *Colpidium* den natürlichen Gegebenheiten am ehesten zu entsprechen, da so zwei Zonen geschaffen werden, von denen die eine mikrotubulifrei und die andere mikrotubulihaltig ist. Rechnet man so wie CHEISSIN und MOSEVICH (1962) auch das Epiplasma noch zur Pellicula, so wäre eine Unterscheidung in zwei Zonen kaum mehr sinnvoll, da beide Schichten dann tubuläre Strukturen miteinschließen würden (siehe unten).

Diese im Falle der tetrahymeniden Ciliaten natürlich erscheinende Grenzlinie dürfte aber nicht allgemein anwendbar sein. Zum Beispiel finden sich bei *Conchophthirus curtus* die obersten Mikrotubuli unterhalb des Epiplasmas, weswegen ANTIPA (1971) das Epiplasma auch noch zur Pellicula rechnet. Als Cortex bezeichnen wir schließlich die Pellicula und alle nicht dem Cytoplasma zurechenbaren subpelliculären Differenzierungen.

3.2.2. Untersuchung von nach Methode a präparierten *C. colpoda*

Die Organisation des Cortex von *C. colpoda* entspricht weitgehend der anderer tetrahymenider Ciliaten (vgl. PITELKA 1961, 1969, CHEISSIN und MOSEVICH 1962, ALLEN 1967). Da außerdem eine ausführliche Studie über die Feinstruktur dieses Ciliaten in Vorbereitung ist, sei hier nur soviel berichtet, als zum Verständnis der vorliegenden Arbeit nötig ist.

Die Pellicula besteht aus der äußeren Zellmembran, die kontinuierlich die ganze Zelle überzieht und den membranbegrenzten Alveolen (Abb. 6, A). An den Stoßpunkten von zwei Alveolen (Abb. 7, Pfeile) sollte sich nach der bisherigen Auffassung das Silber anlagern und so das lichtmikroskopisch sichtbare Silberliniensystem bilden (PITELKA 1961). Die Größe und Form der Alveolen ist sehr vom Fixierungszustand des Objekts abhängig (vgl. PITELKA 1961, BARDELE 1968, MILLECCHIA und RUDZINSKA 1970).

Abb. 9—11. Querschnitte von naß versilberten *Colpidium colpoda* (Methode c). Die Silberlinienmeridiane 2. Ordnung (M_2) liegen im Epiplasma, die Silberlinienmeridiane 1. Ordnung (M_1) liegen unterhalb des Epiplasmas. Je nach dem Aufteilungsgrad der Meridiane 2. Ordnung finden sich eine (Abb. 9) oder mehrere (Abb. 10, 11) quergeschnittene Silberlinien zwischen je zwei Basalkörperreihen. Bei dem in Abb. 11 ganz rechts befindlichen Meridian 2. Ordnung wurde das Silber durch das Schneiden herausgebrochen. Das entstandene Loch erscheint von einer zarten Membran begrenzt. Die Pfeile weisen auf präparationsbedingte Ablösungen der Pelliculamembranen (43 000 : 1, 44 400 : 1, 43 600 : 1)

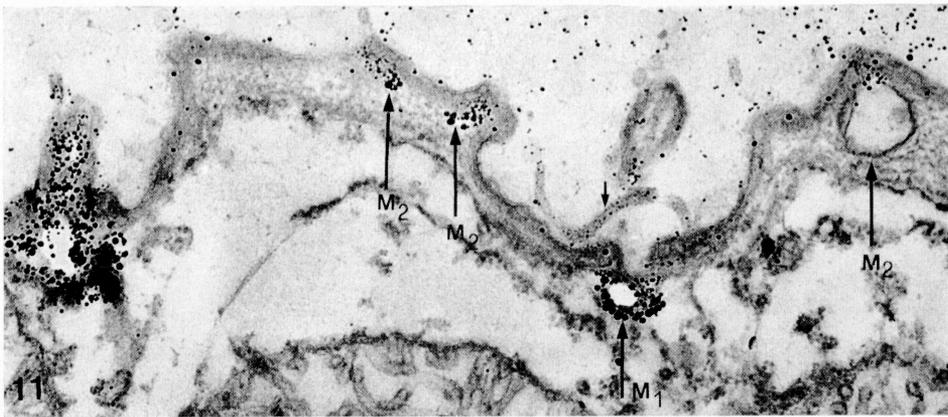
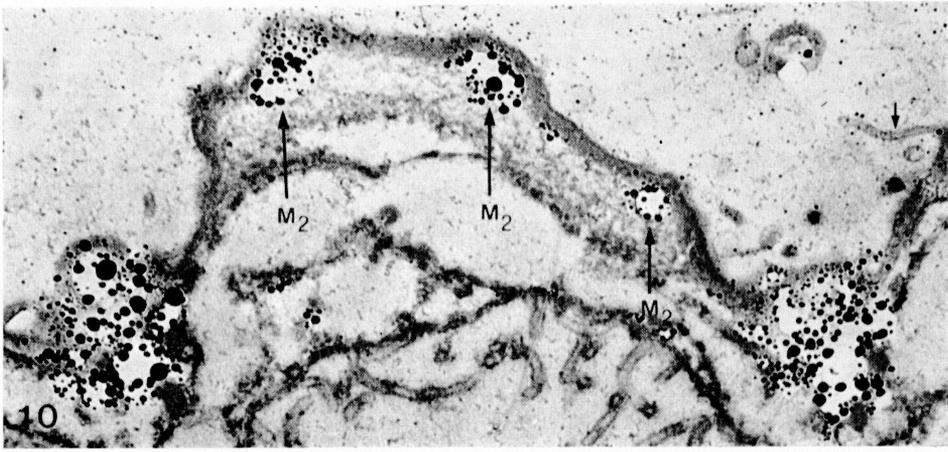
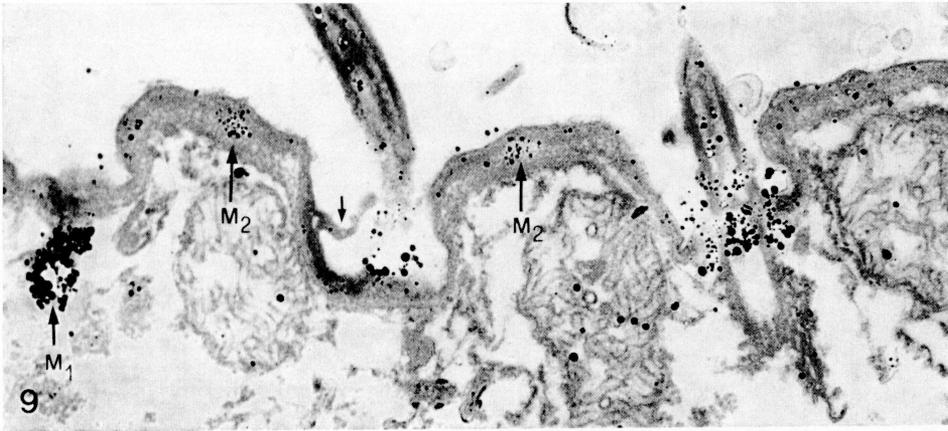


Abb. 9—11

Die erste auffällige, an die innere Alveolenmembrane anschließende subpelliculäre Differenzierung ist das sogenannte Epiplasma (FAURÉ-FREMIET 1962) (Abb. 7, E). Diese in der Mitte zwischen zwei Cilienreihen etwa 2000 Å dicke Schicht wird in der Nähe der Basalkörper immer dünner (Abb. 6 und 7) und durchsetzt dann die Basalkörper, in denen es die sogenannte Terminalplatte bildet (vgl. PITELKA 1969, ANTIPA 1971). Der Strukturaspekt des gegen das Cytoplasma vermutlich nicht durch eine Membran abgegrenzten Epiplasmas erscheint nach Osmiumsäurefixierung stets fibro-granulär (Abb. 7). An der Grenze von innerer Alveolenmembran und Epiplasma findet sich ein längsverlaufendes Bündel von Mikrotubuli (Abb. 7, Mt), weswegen wir hier auch die Grenze zwischen Pellicula und Subpellicula gesetzt haben (vgl. S. 72). Auch die Anordnung der übrigen subpelliculären Mikrotubuli entspricht weitgehend der von *Tetrahymena pyriformis* bekannten (ALLEN 1967).

Ein sehr charakteristisches Merkmal des Cortex von *C. colpoda* sind die in großer Anzahl vorhandenen membranbegrenzten trichocystenähnlichen Schleuderorganellen (Abb. 16 und 17), die bereits von CHEISSIN und MOSEVICH (1962) beschrieben worden sind. Im Gegensatz zu den Trichocysten anderer Ciliaten (vgl. HAUSMANN 1973) fehlt ihnen aber eine Spitze, weswegen uns eine Zuordnung zu den Trichocysten s. str. problematisch erscheint. Protrichocysten, wie sie von CHEISSIN und MOSEVICH (1962) beschrieben worden sind, konnten wir an unserem Stamm von *C. colpoda* bisher nicht finden, so daß wir vermuten, daß unser *C. colpoda* und das von CHEISSIN und MOSEVICH (1962) verschiedene Arten sein könnten. Die in unseren lichtmikroskopischen Abbildungen sichtbaren kornartigen Kumulierungen argyrophiler Substanz müssen demnach Relationskörper dieser trichocystenähnlichen Schleuderorganellen sein.

3.2.3. Untersuchung von nach Methode b präparierten *C. colpoda*

Nach Champy-Fixierung ist der Erhaltungszustand des Cortex mit Ausnahme des Epiplasmas durchwegs etwas schlechter als nach reiner Osmiumsäurefixierung. Die Pelliculamembranen sind verworfen und teilweise unkenntlich geworden. Die Alveolen sind flach und sehr unregelmäßig, wodurch die Membranstoßpunkte undeutlich werden (Abb. 8). Im Epiplasma lassen sich aber nun deutlich fünf Zonen unterscheiden (Abb. 8). Direkt an die innere Alveolenmembran anschließend, finden sich zwei je ca. 60 Å dicke, dunkel kontrastierte Lagen, die durch einen ca. 60 Å breiten, heller kontrastierten Zwischenraum getrennt werden. Anschließend an diese membranähnliche Struktur liegt eine ca. 1500 Å breite Schicht mit einem fibro-granulären Strukturaspekt. Häufig findet man hier sehr kleine, parallel angeordnete fibrilläre Strukturen (Abb. 8, Pfeile). Daran anschließend liegt eine nur undeutlich gegen das Cytoplasma abgegrenzte, dunkel kontrastierte Schicht von ca. 300 Å.

CHEISSIN und MOSEVICH (1962) konnten im Epiplasma ihres *Colpidium*

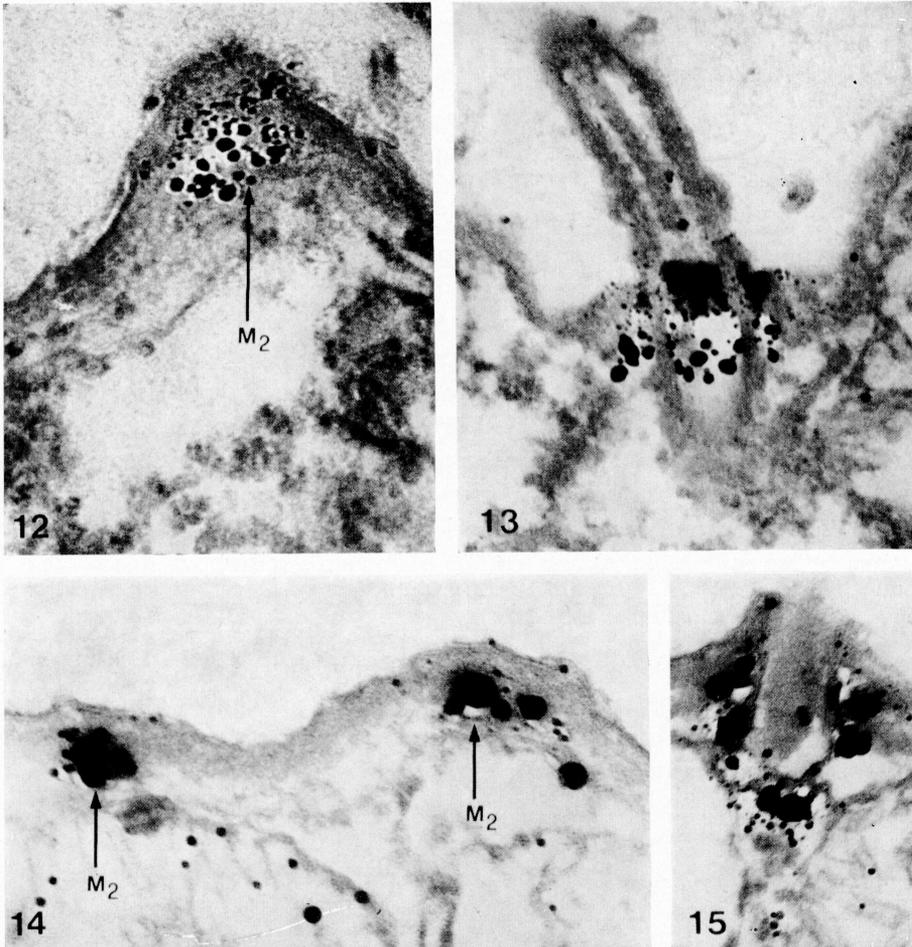


Abb. 12 und 14. Die subpelliculäre Lage der Silberlinienmeridiane 2. Ordnung (M_2) ist hier besonders klar ersichtlich. Nähere Erklärungen im Text (94 000 : 1)

Abb. 13. Bei den Basalkörpern erfolgt die Silberanlagerung besonders im oberen und mittleren Teil und kreisförmig um sie herum (68 600 : 1)

Abb. 15. Bei den Schleuderorganellen findet sich im Moment des Ausstoßes eine besonders intensive, kreisförmige Silberanlagerung in der Höhe des Epiplasmas (62 600 : 1)

colpoda sogar klar definierte fibrilläre Differenzierungen nachweisen, die unserer Ansicht nach mit den Silberlinien identisch sein könnten. Leider haben die Autoren keine Querschnittsbilder veröffentlicht, so daß die genaue Lagebeziehung im Vergleich zur vorliegenden Studie nicht sicher feststellbar ist.

3.2.4. Untersuchung von nach Methode c präparierten *C. colpoda*

Durch die Versilberungsprozedur, wahrscheinlich vor allem durch die Gelatineeinbettung, werden die Pelliculamembranen meist schwer geschädigt und

teilweise sogar abgetragen (Abb. 9—11, Pfeile). Auch die Zonierung des Epiplasmas tritt nicht mehr so deutlich hervor. Ansonsten gleicht der Erhaltungszustand der Objekte den nach Methode b behandelten Ciliaten.

Wie die Abb. 9—12 und 14 eindeutig beweisen, liegen die Silberlinienmeridiane 2. Ordnung in der Mitte oder etwas oberhalb der Mitte des Epiplasmas. Offensichtlich je nach der Intensität der Silberanlagerung und der Güte der Präparation (vgl. Abb. 1—5) sind die die Silberlinien aufbauenden, sehr verschieden groß erscheinenden Silberpartikel auf sehr engem Raum dicht gepackt (Abb. 14) oder auf weiterem Raum zerstreut liegend (Abb. 10 und 12). Eine mehr oder weniger kreisförmige Anordnung der Silberpartikel war bei allen quergeschnittenen Silberlinien klar erkennbar. Den lichtmikroskopischen Befunden entsprechend (vgl. S. 68), finden sich je nach dem Aufteilungsgrad der Meridiane 2. Ordnung auch im Elektronenmikroskop ein (Abb. 9) bis mehrere (Abb. 10 und 11) quergeschnittene Silberlinienmeridiane zwischen je zwei Basalkörperreihen. Ein Teil der die Silberlinien aufbauenden Silberpartikel bricht beim Schneiden häufig heraus. Manchmal wird überhaupt das ganze Silber mitgeschleift, und zurück bleibt ein kreisrundes Loch, das von einer zarten Membran begrenzt zu sein scheint (Abb. 11, Pfeil).

Bei den Schleuderorganellen findet sich die Silberanlagerung vom oberen Ende bis tief in das Cytoplasma hinein (Abb. 18), mit einer deutlichen Verdickung in der Höhe des Epiplasmas (Abb. 15). Die bisherigen Untersuchungen deuten auf eine kreisförmige Anlagerung des Silbers hin, was in Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden (siehe Abb. 4) steht (vgl. KLEIN 1942).

Die Meridiane 1. Ordnung liegen etwas tiefer als die Meridiane 2. Ordnung, und zwar unterhalb des bei den Basalkörpern sehr dünn gewordenen Epiplasmas (Abb. 9 und 11, M_1). Die genaue Lage ist schwierig feststellbar, da der Abstand zwischen zwei hintereinanderliegenden Basalkörpern sehr gering ist und es durch die starke Argyrophilie dieser Organellen oft zu einer verschmierten Anlagerung des Silbers kommt (Abb. 10). Auch scheint eine geringe Variabilität in der Lage vorhanden zu sein (vgl. Abb. 9 mit Abb. 11). Bei den Basalkörpern erfolgt die Silberanlagerung kreisförmig um sie herum und in ihrem Inneren (Abb. 9 und 13). Besonders der obere und mittlere Teil, einschließlich des Axonemas und der Terminalplatte, erscheinen stark argyrophil. Das untere Drittel der Basalkörper war meist ohne Silberanlagerung.

Abb. 16 und 18. Schleuderorganellen kurz vor dem Ausstoß. Die Silberanlagerung findet sich vom oberen Ende bis tief in das Cytoplasma hinein (Abb. 18). Abb. 16: Methode a (76 000 : 1), Abb. 18: Methode c (62 600 : 1)

Abb. 17 und 19. Im Ausstoß begriffene Schleuderorganellen. Ein Teil der argyrophilen Substanz tritt vermutlich mit aus (Abb. 19). Abb. 17: Methode a (102 000 : 1), Abb. 19: Methode c (54 200 : 1)

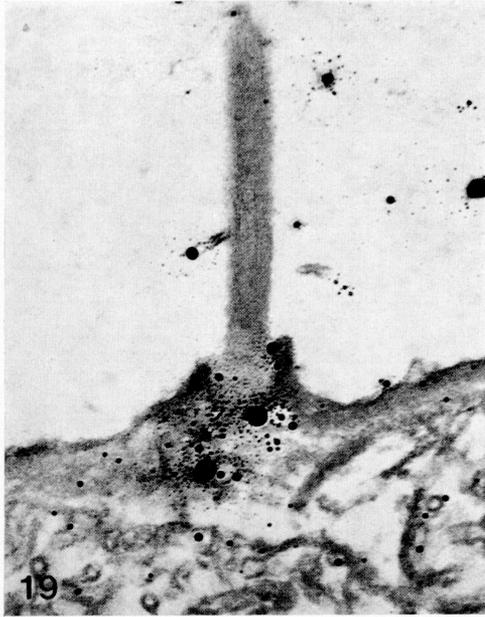
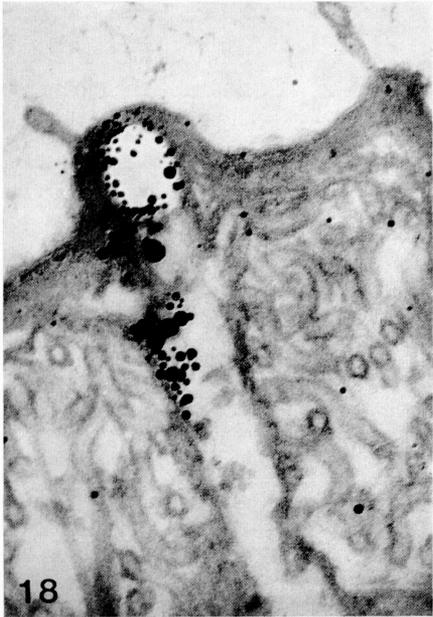
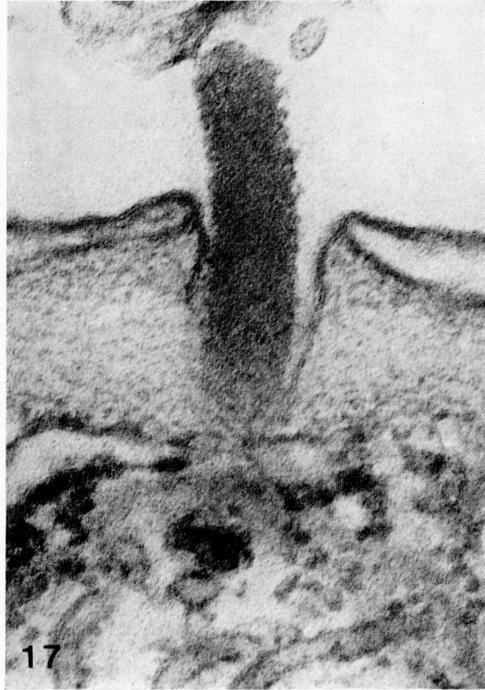


Abb. 16—19

4. Diskussion

4.1. Lage und Natur der Silberlinien

Die Abb. 9—15 beweisen eindeutig die subpelliculäre Lage des Silberliniensystems. Diese Feststellung kann auch auf trocken versilberte *C. colpoda* ausgedehnt werden, da die lichtmikroskopischen Untersuchungen bei diesem Ciliaten überzeugend für eine Gleichheit der dargestellten Strukturen bei beiden Methoden sprechen (vgl. Abb. 1 und 2 mit Abb. 3—5). Somit muß zumindest für die tetrahymeniden Ciliaten die bereits allgemein akzeptierte Theorie von PITELKA (1961), daß die Silberlinien durch Anlagerung von Silber an die Membranstoßpunkte der pelliculären Alveolen entstehen, aufgegeben werden. Inwieweit diese Verhältnisse auf Ciliaten aus anderen Gruppen übertragen werden dürfen, können nur weitere Untersuchungen klären. Jedenfalls zeigen aber die vorliegenden Ergebnisse ganz eindeutig, daß es nicht mehr länger zulässig sein kann, aus der rein morphologischen Ähnlichkeit der Anordnung der Membranstoßpunkte der pelliculären Alveolen mit dem Verlauf der Silberlinien, auf ihre Identität mit dem KLEINSchen Silberliniensystem zu schließen, wie dies bisher geschehen ist (PITELKA 1961, 1969, SOLTYSKA 1970 u. a.). Alle jene Aussagen über das Silberliniensystem bedürfen daher einer neuerlichen Analyse, und zwar an Ultradünnschnitten versilberter Tiere, unter genauer Angabe der verwendeten Silbermethode und der lichtmikroskopischen Demonstration der imprägnierten Strukturen!

Es war ein für uns überraschendes Ergebnis, daß die Meridiane 1. Ordnung und die Meridiane 2. Ordnung nicht in derselben Schicht des Cortex verlaufen (siehe S. 76), wie dies aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen hervorzugehen schien (KLEIN 1942). Unsere Befunde über die Lage der Meridiane 1. Ordnung und über den Ort der Silberanlagerung bei Basalkörpern und Schleuderorganellen bedürfen allerdings noch einer eingehenderen Analyse. ZAGON (1970) konnte an mit Protargol versilberten *Carchesium polypinum* jedenfalls eine starke Argyrophilie des Axonemas und der peripheren Tubuli des Basalkörpers nachweisen. Bei CHATTON-LWOFF (1930) versilberten *C. colpoda* sind die Tubuli des Basalkörpers dagegen argyrophob (Abb. 9 und 13). Dies zeigt eindringlich die Abhängigkeit der Argyrophilie der Strukturelemente des Cortex der Ciliaten von der verwendeten Silbermethode!

Als strukturelle Grundlage der Silberlinien wurden von KLEIN (1942) kolloidale Untereinheiten angenommen, die sich zu Fibrillen formen können. Jene Forscher, die die Stoßpunktanlagerungstheorie vertreten, sehen im Silberliniensystem natürlich keine fibrilläre Struktur (siehe z. B. PITELKA 1969). Die vorliegenden Ergebnisse sprechen aber wohl eindeutig für die Richtigkeit der KLEINSchen Ansicht, wenn auch der endgültige morphologische Beweis für die fibrilläre Natur des Silberliniensystems noch nicht erbracht werden konnte, da es uns bisher nicht gelungen ist, an jenen Stellen, wo sich die Silberanlagerung findet, in konventionell präpariertem Material Fibrillen nachzuweisen.

Durch die Silberanlagerung werden die vermutlich aus sehr feinen Einzel-fibrillen aufgebauten Silberlinien in ihrer Struktur offenbar soweit zerstört, daß ein fibrillärer Strukturaspekt elektronenmikroskopisch nicht mehr nachweisbar ist. Experimentelle Befunde lichtmikroskopischer Art (KLEIN 1934/35, FOISSNER 1969 a, b) zeigen aber ganz klar die fibrilläre Natur dieses Organells.

Wie wenig die Nichtdarstellbarkeit des Silberliniensystems, das sich in vieler Hinsicht als sehr labil und dynamisch erwiesen hat, bei konventionell präparierten Ciliaten eigentlich aussagt, beweist wohl die Erforschungsgeschichte der ebenfalls mit Silber gut darstellbaren Neurofibrillen. So glauben auch wir, daß sich viele der elektronenmikroskopisch beschriebenen filamentösen und fibrillären Strukturen des Cortex der Ciliaten (siehe zusammenfassende Darstellung bei PITELKA 1969) als mit dem KLEINSchen Silberliniensystem identisch erweisen werden. Ein mikrotubuli-ähnlicher Aufbau des Silberliniensystems von *C. colpoda* kann wohl ausgeschlossen werden, da Colchizin keinerlei Wirkung auf die Silberlinien hat (FOISSNER, unveröffentlicht).

4.2. Folgerungen und Probleme

Nachdem nunmehr der Beweis erbracht worden ist, daß es sich bei den KLEINSchen Silberlinien um klar definierte corticale Strukturen handelt, werden eine ganze Reihe alter und neuer Fragen einer genauen Analyse unterzogen werden müssen, wenn wir dem morphologischen und funktionellen Verständnis des Cortex der Ciliaten näherkommen wollen. Vor allem das alte Problem der erregungsleitenden und formbildenden Funktion des Silberliniensystems (KLEIN 1942, FOISSNER 1969 a, b) wird durch die jetzt auch elektronenmikroskopisch belegte enge Beziehung zwischen Silberliniensystem und lokomotorischen und effektorischen Organellen neu aufgeworfen. Noch immer ist nämlich das Silberliniensystem die einzige, universell verbreitete Struktur im Cortex der Ciliaten, die in morphologischer Hinsicht derartige Funktionen überhaupt ausführen könnte, da unter allen fibrillären und tubulären Strukturen offensichtlich nur das Silberliniensystem ein Kontinuum bildet.

Eine hochinteressante Erscheinung ist die bei vielen Ciliaten vorhandene, mehr oder weniger weitgehende morphologische Kongruenz der Membranstoßpunkte der pelliculären Alveolen mit dem Verlauf der Silberlinien (vgl. S. 72). Eine solche Kongruenz findet sich aber nicht nur zwischen diesen Differenzierungen, sondern wahrscheinlich auch zwischen Silberliniensystem und gewissen Pelliculaoberflächenstrukturen, wie sie mit der Opalblau-Technik (BRESSLAU 1921) nachweisbar sind (vgl. FOISSNER 1972). Diese morphologische Kongruenz macht auch verständlich, wieso JACOBSON (1931) für das Silberliniensystem eine Stützfunktion vorschlagen konnte. Die spezielle Lagerung der Silberlinien im Epiplasma und ihre Überdeckung durch gewisse Pelliculaoberflächenstrukturen erklärt offensichtlich auch, warum das Silberliniensystem lichtmikroskopisch am

lebenden Tier bisher nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. FOISSNER und SIMONSBERGER 1975).

Zum Abschluß sei auch noch auf die Möglichkeit einer engeren Beziehung zwischen Epiplasma und Silberlinien hingewiesen. Unter der Annahme, daß zumindest bei *Colpidium* der Baustoff der Silberlinien aus dem Epiplasma stammt, könnte die bereits früher aufgeworfene Frage (FOISSNER 1970), warum man z. B. bei der Neubildung von Silberlinien anlässlich der Morphogenese keinerlei aus dem Cytoplasma kommende argyrophile Substanz feststellen kann, befriedigend erklärt werden.

Danksagung

Für ihre unermüdliche, zuverlässige Mitarbeit danken wir Fräulein ERIKA KRETZ.

Mit dankenswerter Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt 1838 und N 39), der Jubiläumstiftung der Österreichischen Nationalbank und der Gesellschaft zur Förderung der Universität für Bodenkultur.

Literatur

- ALLEN, R. D., 1967: Fine structure, reconstruction and possible functions of components of the cortex of *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. **14**, 553—565.
- ANTIPA, G. A., 1971: Structural differentiation in the somatic cortex of a ciliated protozoan, *Conchophthirus curtus* Engelmann 1862. Protistologica **7**, 471—501.
- BARDELE, C. F., 1968: *Acineta tuberosa*. I. Der Feinbau des adulten Suktors. Arch. Protistenk. **110**, 403—421.
- BRADBURY, P. C., 1965: The infraciliature and argyrome of *Opisthonecta henneguyi* Fauré-Fremiet. J. Protozool. **12**, 345—363.
- BRESSLAU, E., 1921: Die Gelatinierbarkeit des Protoplasmas als Grundlage eines Verfahrens zur Schnellanfertigung gefärbter Dauerpräparate von Infusorien. Arch. Protistenk. **43**, 467—480.
- CHATTON, É., and A. LWOFF, 1930: Imprégnation, par diffusion argentine, de l'infraciliature des ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. C. R. Soc. Biol. (Paris) **104**, 834—836.
- and J. SÉGUÉLA, 1940: La continuité génétique des formations ciliaires chez les ciliés hypotriches. Le cinétome et l'argyrome au cours de la division. Bull. biol. France Belg. **74**, 349—442.
- CHEISSIN, E. M., and T. N. MOSEVICH, 1962: An electron microscope study of *Colpidium colpoda* (Ciliata, Holotricha). Arch. Protistenk. **106**, 181—200.
- CORLISS, J. O., 1953: Silver impregnation of ciliate protozoa by the Chatton-Lwoff technic. Stain Technol. **28**, 97—100.
- COY MAC, J. W., 1974: Updating the Tetrahymenids. I. General considerations and application to the genus *Colpidium*. Acta Protozool. **13**, 161—176.
- DIDIER, P., 1970: Contribution à l'étude comparée des ultrastructures corticales et buccales des ciliés hyménostomes péniculiens. Ann. Stat. Biol. Besse **5**, 1—274.
- DIPPELL, R. V., 1962: The site of silver impregnation in *Paramecium aurelia*. J. Protozool. **9**, (Suppl.) 24.
- EHRET, C. F., and E. L. POWERS, 1959: The cell surface of *Paramecium*. Int. Rev. Cytol. **8**, 97—133.

- ELLIOTT, A. M., and J. R. KENNEDY, 1973: Morphology of *Tetrabymena*. In: The biology of *Tetrabymena* (A. M. ELLIOTT, ed.). Stroudsburg, Pa.: Dowden, Hutchinson, and Ross.
- FAURE-FREMIET, E., 1962: Le genre *Paranassula* Kahl (*Ciliata*, *Cyrtophorina*). Cahiers Biol. Mar. 3, 61—77.
- FOISSNER, W., 1967: Wimpertiere im Silberpräparat. Ein verbessertes „trockenes“ Verfahren zur Darstellung des Silberliniensystems. Mikrokosmos 4, 122—126.
- 1968 a: Die Ausstoßung und Regeneration der Schleuderorganellen bei Ciliaten, beobachtet am Silberlinien- oder neuroformativen System. Mitteilungsblatt Mikrograph. Ges. Wien 3, 30—40.
- 1968 b: Schäden am Silberliniensystem der Wimpertiere. Das „neuroformative“ System reagiert empfindlich. Mikrokosmos 12, 364—370.
- 1969 a: Reaktionen des Silberliniensystems der Ciliaten auf mechanische Insulte. I. Teil. Protoplasma 68, 23—45.
- 1969 b: Reaktionen des Silberliniensystems der Ciliaten auf mechanische Insulte. II. Teil. Protoplasma 68, 433—456.
- 1969 c: Eine neue Art aus der Gattung *Colpidium* (STEIN 1860): *Colpidium kleini* sp. n. (*Hymenostomatida*, *Tetrabymenidae*). Acta Protozool. 7, 17—23.
- 1970: Corticale Morphogenese bei *Colpidium kleini* (*Ciliata*, *Holotricha*). Acta Protozool. 8, 129—142.
- 1972: Das Silberliniensystem von *Placus luciae* (KAHL 1926) (*Ciliata*, *Enchelyidae*). Arch. Protistenk. 114, 83—95.
- und P. SIMONSBERGER, 1975: Vergleichende licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an trocken präparierten Silberliniensystemen von Ciliaten (*Protozoa*). Mikroskopie (im Druck).
- GELEI, J. VON, 1932: Die reizleitenden Elemente der Ciliaten in naß hergestellten Silber- bzw. Goldpräparaten. Arch. Protistenk. 77, 152—174.
- 1934: Eine mikrotechnische Studie über die Färbung der subpelliculären Elemente der Ciliaten. Z. wiss. Mikrosk. mikrosk. Tech. 51, 103—178.
- GLIDDON, R., 1966: Ciliary organelles and associated fibre systems in *Euplotes eurystomus* (*Ciliata*, *Hypotricha*). I. Fine structure. J. Cell Sci. 1, 439—448.
- HAUSMANN, K., 1973: Spindeltrichocysten und Mucocysten in schrägbeschatteten und negativ-Suspensionspräparaten. Ann. Stat. Biol. Besse 7, 331—347.
- JACOBSON, J., 1931: Fibrilläre Differenzierungen bei Ciliaten. Arch. Protistenk. 75, 31—100.
- KAHL, A., 1930—1935: Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata. In: Die Tierwelt Deutschlands (F. DAHL, Hgb.). Jena: Fischer.
- KLEIN, B. M., 1926: Über eine neue Eigentümlichkeit der Pellicula von *Chilodon uncinatus* Ehrbg. Zool. Anz. 67, 1—2.
- 1929: Weitere Beiträge zur Kenntnis des Silberliniensystems der Ciliaten. Arch. Protistenk. 65, 183—258.
- 1932: Das Ciliensystem in seiner Bedeutung für Lokomotion, Koordination und Formbildung mit besonderer Berücksichtigung der Ciliaten. Erg. Biol. 8, 75—171.
- 1934—1935: Reaktionen des Silberliniensystems auf Schädlichkeiten. I. und II. Bollettino del Laboratorio di Zoologia Agraria e Bachicoltura del R. Istituto Superiore Agrario di Milano 4 und 6, 1—36 und 1—46.
- 1942: Das Silberlinien- oder neuroformative System der Ciliaten. Eine zusammenfassende Darstellung unter Berücksichtigung eines homologen und eines analogen Zwischensystems bei den Metazoen. Ann. Naturhist. Mus. Wien 53, 156—336.
- LENNAN MAC, R. F., 1935: Dedifferentiation and redifferentiation in *Ichthyophthirius*. I. Neuromotor system. Arch. Protistenk. 86, 191—210.
- MILLECCHIA, L. L., and M. A. RUDZINSKA, 1970: The ultrastructure of brood pouch formation in *Tokophrya infusionum*. J. Protozool. 17, 574—583.

- PALADE, G. E., 1952: A study of fixation for electron microscopy. *J. exp. Med.* **95**, 285—298.
- PARDUCZ, B., 1939: Körperbau und einige Lebenserscheinungen von *Uronema marinum* DUJ. *Arch. Protistenk.* **92**, 284—314.
- PITELKA, D. R., 1961: Fine structure of the silverline and fibrillar systems of three tetrahymenid ciliates. *J. Protozool.* **8**, 75—89.
- 1969: Fibrillar systems in protozoa. In: *Research in protozoology* (TZE-TUAN CHEN, ed.), Vol. III, pp. 279—388. Pergamon Press.
- PUYTORAC, P. DE, 1959: Nouvelles observations sur l'argyrome des ciliés astomes, par l'emploi du microscope électronique. *C. R. Ass. Anat.* **46**, 675—679.
- RAABE, Z., 1949: Studies on the family *Hysteroecinetidae* Diesing. *Ann. Mus. Zool. Polon.* **14**, 21—68.
- REYNOLDS, E., 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208—212.
- ROTH, L. E., 1957: An electron microscope study of the cytology of the protozoan *Euplotes patella*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 985—1000.
- RUFFOLO JR., J. J., 1972: Fine structure of cell development in *Euplotes*. Abstract Ph. D. Thesis, University of Iowa, Iowa City.
- SOLTYSKA, M. S., 1971: Morphology and fine structure of *Chilodonella cucullulus* (O.F.M.). Cortex and cytopharyngeal apparatus. *Acta Protozool.* **9**, 49—82.
- TARTAR, V., 1941: Intracellular patterns: Facts and principles concerning patterns exhibited in the morphogenesis and regeneration of ciliate protozoa. *Third Growth Symposium* **5**, 21—40.
- 1969: Morphogenesis in protozoa. In: *Research in protozoology* (TZE-TUAN CHEN, ed.), Vol. II. Pergamon Press.
- TAYLOR, C. V., and L. GARNJOBST, 1939: Reorganization of the "silverline system" in the reproductive cysts of *Colpoda duodenaria*. *Arch. Protistenk.* **92**, 73—90.
- ZAGON, I. S., 1970: *Carchesium polypinum*: Cytostructure after protargol silver desposition. *Trans. amer. microsc. Soc.* **89**, 450—468.

Adresse der Autoren: WILHELM FOISSNER, Naturkundliche Station der Stadt Linz, Roseggerstraße 22, A-4020 Linz, Österreich. Dr. PETER SIMONSBERGER, Zoologisches Institut der Universität Salzburg, Akademiestraße 26, A-5020 Salzburg, Österreich.