

Fig. 4. Ohne Uranylacetat-Nachfixierung sind die DNA-haltigen Fibrillen grob verklumpt (→). $\times 66000$.

einen Schutz der Bakterien vor einer möglichen Verdauung durch die Oozyte. Es ist auffallend, dass die runden Formen, ohne diese Hülle, viel mehr in Verbindung stehen mit lysosomalen Abbaustrukturen¹².

Wenn O oder G/O fixiert wird oder wenn die Simultanfixierung ohne wässrige Uranylacetat-Behandlung vorgenommen wird, so ist die grobe Zusammenballung der DNA-haltigen Fibrillen neben anderen strukturellen Veränderungen am augenfälligsten. Diese Resultate zeigen, dass das Uranylacetat auch nach Simultanfixation auf bestimmte Systeme als Fixierungsmittel wirkt.

Weitere Versuche sollen zeigen, ob mittels Modifikationen der hier beschriebenen TF noch bessere Aussagen über die Verteilung der RNA und DNA rickettsienähnlicher Mikroorganismen gemacht werden können.

Summary. The nucleoplasm of rickettsia-like microorganisms living in the oocytes of the soft tick *Ornithodoros moubata* is preserved by TF (triple-fixation) in a fine fibrillary form, resembling the results obtained by the 'standard'-method^{14,15} for DNA-containing plasmas.

H. HECKER

Schweizerisches Tropeninstitut,
Socinstrasse 57, CH-4000 Basel (Schweiz),
30. Januar 1970.

Ultrastruktur der Oozyten von *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea: Argasidae) nach Triple-Fixation^{1,2}

Am Schweizerischen Tropeninstitut wurde im Zusammenhang mit der transovariellen Übertragung der Rückfallfieberspirochaete, *Borrelia duttoni* das Ovar von *Ornithodoros moubata* histologisch bearbeitet^{3,4}. In den letzten Jahren sind zur Untersuchung der Vorgänge während Dotter- und Eihüllensbildung bei Zecken elektronenmikroskopische⁵⁻⁷ und histochemische⁸ Arbeiten durchgeführt worden, beziehungsweise sind noch im Gange^{9,10}.

Nach der Einführung der Triple-Fixation¹¹⁻¹⁴ (TF: Simultanfixierung in einem Gemisch von Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, Nachbehandlung in wässriger Uranylacetatlösung) stellte sich uns die Frage, ob diese Technik zur Abklärung ultrastruktureller Vitellogenesevorgänge geeignet ist. Eventuell treten Unterschiede in der Strukturerhaltung auf gegenüber klassischen Fixierungsmethoden, wie zum Beispiel Osmiumtetroxid-Fixation allein (O) oder Glutaraldehyd, gefolgt von Osmiumtetroxid (G/O). Vielleicht bietet die TF auch die Möglichkeit, die während der Eireifung auftretenden kleinen Vesikel an der Peripherie der Oozyten in verschiedene Typen einzuteilen⁵⁻⁷. Die Arbeitsmethoden wurden in einer früheren Publikation beschrieben¹⁴.

Resultate. Es sei kurz daran erinnert, dass die Oozyten von *O. moubata* mit dem Ovar nur durch einen zellulären Funiculus verbunden sind. Von keinem Follikularepithel umgeben, ragen sie in das Haemocoel hinein. Eine Basallamina umschliesst Ovar und Oozyten und bildet die Begrenzung zur Haemolymph, welche die Zeckenorgane umspült^{5,6}. Sie hat nach TF ein leicht flockiges bis filamentöses Aussehen mittlerer Elektronendichte (Figur 1).

Das Oolemma, die Zellmembran der Oozyte, mit ihren Einstülpungen und mit den, vor der Vitellogenese noch wenig prominenten Microvilli, ist deutlich dreischichtig (Figur 1).

Den grossen Oozytenkern umgeben zwei, von zahlreichen Poren durchsetzte Membranen (Figuren 2 und 3). Die nach O oder G/O gut sichtbaren Diaphragmen der Kernporen⁵ sind nach TF schlecht erkennbar. Das Nukleoplasma wird diffus dargestellt, wobei man stellenweise den Eindruck hat, es enthalte vernetzte, feine Fäden (Figur 2). Heterochromatin lässt sich, wie auch nach G/O, nicht zeigen. Der Nukleolus ist gross und locker gebaut. Er besteht aus Strängen fein granulärer bis filamentöser Substanz. Dazwischen befinden sich Inseln, welche aus gröberen Granula zusammengesetzt sind (Figuren 2 und 4). Oft umfassen die beschriebenen Teile des Nukleolus eine mächtige, zentrale «Vakuole» und enthalten selber auch noch kleinere «Vakuolen». Der Inhalt dieser membranlosen Strukturen ist weniger elektronendurchlässig als das Nukleoplasma (Figur 5).

¹ Die Arbeit wurde vom Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

² Frau S. LATSCHA-STOLLER danke ich für ihre unentbehrliche technische Mitarbeit.

³ A. AESCHLIMANN, Acta trop. 15, 15 (1958).

⁴ O. WAGNER-JEVSEENKO, Acta trop. 15, 118 (1958).

⁵ A. AESCHLIMANN und H. HECKER, Acta trop. 24, 225 (1967).

⁶ A. AESCHLIMANN und H. HECKER, Acarologia 17, 180 (1969).

⁷ H. HECKER und A. AESCHLIMANN, Z. Tropenmed. Parasit. 21, 31, (1970).

⁸ P. A. DIEHL, Bull. Soc. ent. Suisse 42, 117 (1969).

⁹ P. A. DIEHL, in Vorbereitung.

¹⁰ L. JENNI, in Vorbereitung.

¹¹ B. F. TRUMP and R. E. BULGER, Lab. Invest. 15, 368 (1966).

¹² J. G. HIRSCH and M. E. FEDORKO, J. Cell Biol. 38, 615 (1968).

¹³ G. KISTLER, W. SCHERLE und T. HAUSWIRTH, Experientia 26, 331 (1970).

¹⁴ H. HECKER, Experientia 26, im Druck (1970).

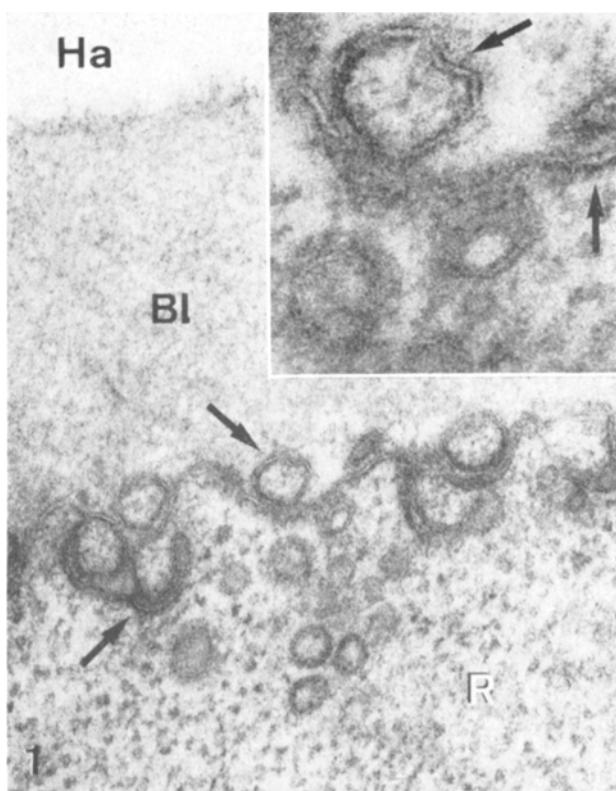


Fig. 1. Oozyte vor der Eireifung. Eine feinflockige bis filamentöse Basallamina (Bl) begrenzt die Oozyte gegen das Haemocoel (Ha). Das Oolemma mit Ein- und Ausstülpungen ist deutlich dreischichtig (→) [s. auch «inset»]. R, inhomogene Ribosomen. $\times 77000$, inset; $\times 170000$.

Die Mitochondrien sind nach TF gut erhalten. Ihre Matrix ist dichter als nach O und weniger dicht als nach G/O^{5,6}. Sie enthält viele, dunkel kontrastierte Grana mitochondriales.

Das Endoplasmatische-Retikulum (ER) besteht nach O oder G/O aus einzelnen, im Cytoplasma verteilten Vakuolen^{5,6}. Ihre Membranen sind nur stellenweise von Ribosomen besetzt. Nach TF findet man neben diesen Vakuolen (Figur 6) oft auch längere, zusammenhängende Strukturen des ER mit Verzweigungen (Figur 3).

Viele freie Ribosomen und Polysomen liegen dicht im Cytoplasma junger Oozyten. Nach O oder G/O sind es scharf begrenzte, rundliche und elektronendichte Partikel^{5,6}. Die Ribosomen haben nach TF polymorphe Formen mit heterogener Struktur und nicht klar definierten Umrissen (Figur 1).

Golgizonen, Annulate Lamellae^{15,16} und Lysosomen erscheinen gleich wie nach klassischen Fixationen^{5,6,16}. In so fixierten Oozyten kommen immer zahlreiche Microtubuli vor. Diese fehlen nach TF vollständig.

Nach einer Blutmahlzeit und der gleichzeitigen Begattung durch ein Männchen setzen in den Zeckenweibchen die Eireifungsvorgänge ein (Dotter- und Eihüllensbildung). In diesem Zusammenhang sind wir an der Peripherie der Oozyten auf viele membrangebundene Vesikel gestossen, deren ultrastrukturale Zuordnung zu bestimmten Bläschenotypen schwierig ist^{5,6}.

Nach TF erkennt man ganz peripher «coated vesicles», zum Teil in Kontakt mit dem Oolemma (Figur 6). Dieser Typ wird in tieferen Zonen der Oozyte nie angetroffen.

¹⁵ R. G. KESSEL, J. ultrastruct. Res. Suppl. 10, 82 (1968).

¹⁶ A. AESCHLIMANN und H. HECKER, Acta trop., im Druck (1970).

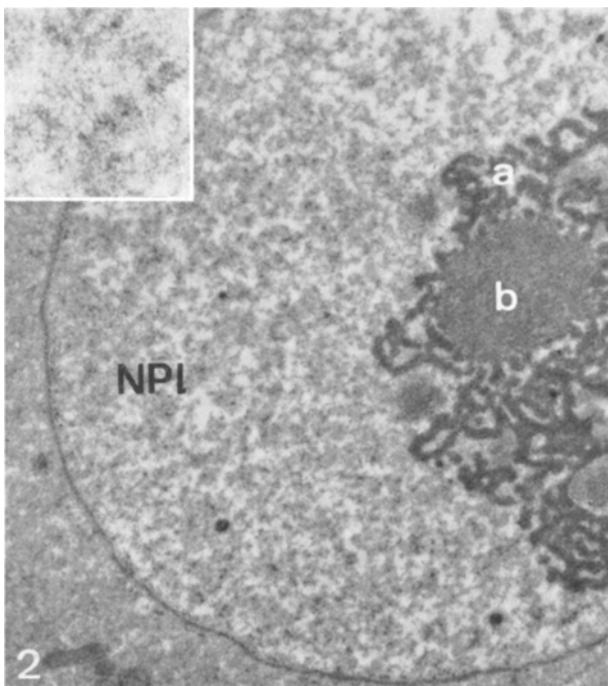


Fig. 2. Oozytentkern mit flockigem Nukleoplasma (NPI). Dieses scheint aus vernetzten Fibrillen zu bestehen (inset). Der Nukleolus ist aus feingranulären bis filamentösen Strängen (a) und aus größer granulierten Inseln (b) zusammengesetzt. $\times 6800$; inset: $\times 44000$.

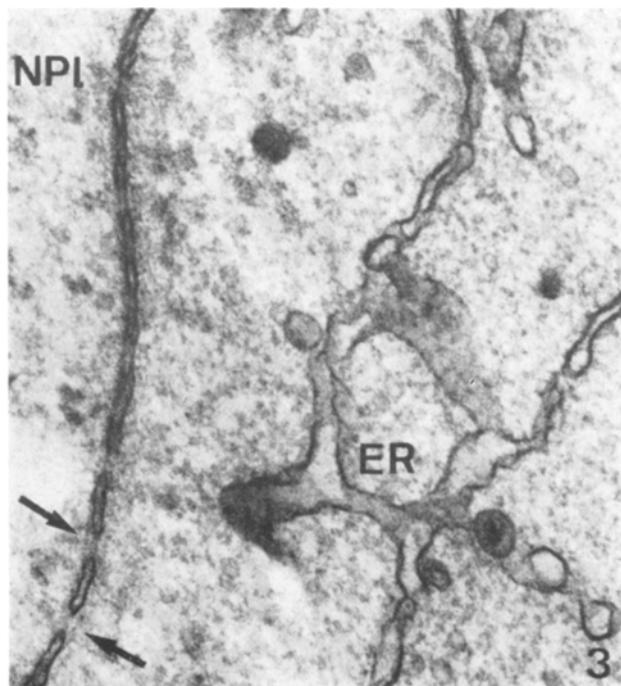


Fig. 3. Kernmembranen mit Poren (→). NPI, Nukleoplasma; ER, zusammenhängendes und verzweigtes Endoplasmatisches Retikulum. $\times 52000$.

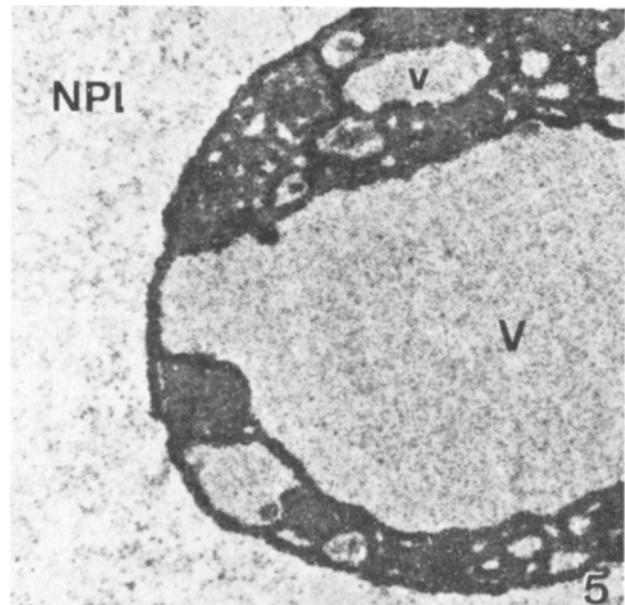
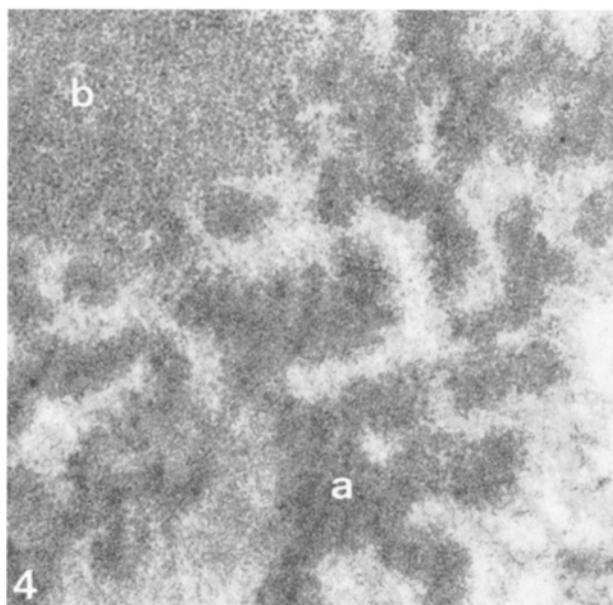


Fig. 4. Teil eines Nukleolus. a, feingranuläre bis filamentöse Stränge; b, gröber granulierte Inseln. $\times 34000$.

Fig. 5. Die Elemente des Nukleolus umfassen oft eine grosse, zentrale «Vakuole» (V) und kleinere, periphere «Vakuolen» (v). Der Inhalt dieser membranlosen Strukturen ist elektronendichter als das Nukleoplasma (NPI). $\times 9700$.

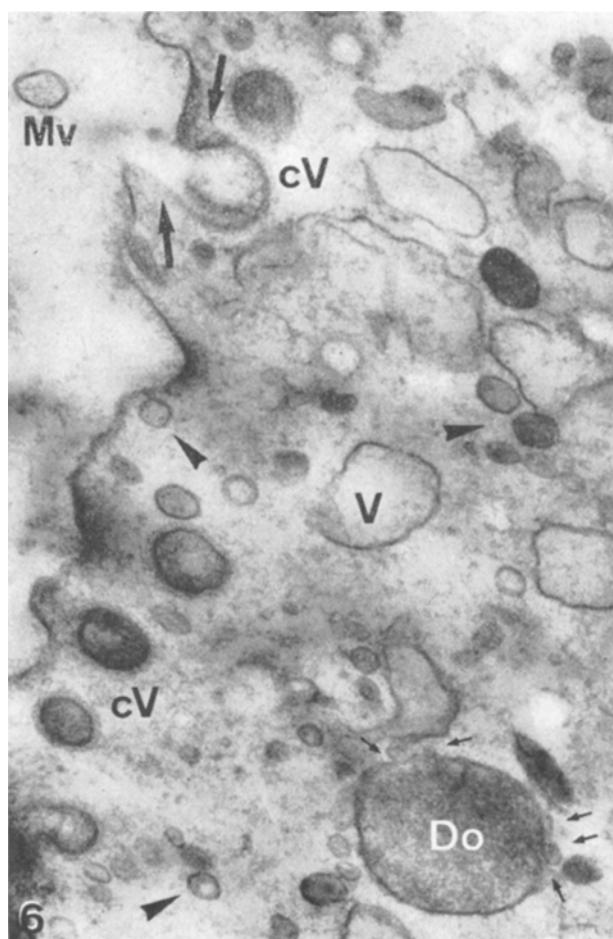


Fig. 6. Oozyte während der Eireifung. Ganz peripher coated vesicles (cV), teils in Verbindung mit dem Oolemma (→). Kleinere und kleinste Bläschen (►), oft in enger Beziehung (→) zu Dottervorstufen (Do). $\times 55000$.

Fig. 7. Eihüllensbildung (Schrägschnitt). Auf das Oolemma (O) folgt eine helle Zone (I), darauf eine flockige, dichte Schicht (II) und zu äusserst eine feingranuläre, kondensierte Lage (III). Übergänge zwischen I und II (►), zwischen II und III (→) sind sichtbar. Microvillireste (Mv), in Kanälchen, noch in allen Zonen der Eihüllenanlage erkennbar. Der Inhalt der Kanälchen gleicht demjenigen der Zone I (►). $\times 55000$.

Neben den «coated vesicles» und auch weiter innen kommen kleinere und kleinste Bläschen ohne coat mit verschieden dichtem Inhalt vor. Diese stehen oft in enger Beziehung zu Dottervorstufen (Figur 6). Von den beschriebenen Vesikeln lassen sich die Vakuolen des ER gut unterscheiden, indem sie durch ihre Grösse, unregelmässige Formen und geringe Dichte auffallen (Figur 6).

Während der Bildung der Eihülle können in ihr verschiedene Zonen festgestellt werden. Direkt auf das Oolemma folgt eine helle, praktisch leere Stelle (Figur 7, I), darauf eine elektronendichte, grobflockige Lage (II) und aussen, unter der Basallamina, eine feinkörnige, elektronendurchlässige Schicht (III). Zwischen I und II, II und III werden Übergänge beobachtet. In allen Zonen sind noch einzelne vom Oolemma ausgehende Microvilli erhalten geblieben (Figur 7). Erst das reife Ei besitzt eine homogene Hülle ohne Microvillireste⁶.

Diskussion. Die Simultanfixierung vereinigt Vorteile sowohl von O als auch von G/O¹¹. Es wurde gezeigt, dass die Nachbehandlung in wässriger Uranylacetatlösung den Kontrast der Strukturen steigert¹² und teilweise auch noch als Fixationsmittel wirkt¹⁴. Im Falle von *O. moubata* lassen sich mit der TF die Oozyten und die darin vorkommenden rickettsienähnlichen Mikroorganismen¹⁴ gleichermassen gut fixieren. Membransysteme werden ausgezeichnet dargestellt und verschiedene Vesikeltypen kann man an der Peripherie der Oozyten unterscheiden.

Gewisse Zellelemente, wie Diaphragmen der Kernporen und Microtubuli können nach TF nicht mehr gefunden

werden. Im Gegensatz dazu sind Microtubuli in Nierengeweben¹¹ und in Leukozyten¹² nach Simultanfixation vorhanden.

Das ER ist teilweise zusammenhängend und verzweigt, hingegen besteht es nach O oder G/O aus einzelnen Vakuolen. Die Ribosomen haben polymorphe Formen mit heterogener Struktur und nicht klar definierten Umrissen (nach O oder G/O sind es scharf begrenzte, rundliche Partikel). Welche Gestalt dem lebensfrischen Zustand des ER und der Ribosomen näher kommt, bleibt noch abzuklären.

Um die Zelldynamik während der Eireifung zu untersuchen, bringt uns die TF nicht bedeutend weiter. Hier müssen gezielte Markierungen mit Tracer-Substanzen helfen¹⁰.

Summary. The triple-fixation (simultaneous fixation in a mixture of glutaraldehyde and osmium tetroxide and post-treatment in aqueous uranylacetate) is especially suitable for the demonstration of membranes and to distinguish different types of vesicles in the oocytes of the soft tick *Ornithodoros moubata*.

H. HECKER

Schweizerisches Tropeninstitut, Socinstr. 57,
CH-4000 Basel (Schweiz), 6. März 1970.

On the Lay-Out of the Midgut Rudiment in *Loligo pealei* (LeSueur)

Since a developmental study published by KORSCHELT¹ in 1892, the mid- and hind-gut complex of the cephalopoda is unanimously considered as a non-ectodermic formation, which in later embryonic stages becomes connected with the ectodermic stomodaeal complex and with the anal ectoderm.

Very much attention has been paid to the questions arising about the origin of the mid- and hind-gut rudiment: whether it is the only remainder of entoderm, or part of it, or an actual mesentoderm, arising entirely from the mesoderm. A final conclusion seems impossible for various reasons that cannot be discussed in the present note.

As to its morphology, the early mid- and hind-gut rudiment has been described – in KORSCHELT's and subsequent studies – as a small medioventral epithelial plate lying on the yolk syncytium and consisting of very few cells at the beginning; this epithelial rudiment was assumed to expand laterally and to migrate posteriorly in order to fuse at the caudal end of the internal yolk sac with the stomodaeum.

A description of the early organogenesis of the mid- and hind-gut complex of *Octopus vulgaris* recently given by the author² depicts a somewhat different process that is in fact common to both *Octopus* and *Loligo*³: the early rudiment is already a compound one in the shape of a transverse epithelial band, laterally expanded from the beginning of its morphological appearance. The similarity between the morphogenetic action of this mes(ent)oedermic rudiment and the rudiment of the central nervous system, within the entire organogenesis of the embryo, is emphasized in the above-mentioned paper².

With ARNOLD's^{4,5} absolutely convincing hypothesis of an inductive role of the egg cortex in mind, one could

assume that the large size of the early rudiment is due to a corresponding lay-out of its particular organ-determining area on the cortex ('morphogenetic inductive map'⁵) rather than to an already completed growth of an originally small rudiment. The latter is in fact inconceivable for such early stages. Conclusive results about this, however, could only be expected of an experimental approach.

Some ligation experiments have therefore been made on eggs at very early embryonic stages in order to eliminate different parts of the cortex in the presumptive mid- and hind-gut area. The present results, although relying on a small number of specimens, provide us with a serious support of the ideas based on the earlier morphological observations².

Material and methods. Eggs of animals spawning in the laboratory were prepared for ligation by stripping off the jelly layers of the egg strings. The ligations were made with fine hair on eggs (surrounded by the chorion only) at early embryonic stages⁵, between 8 and 13 (staging according to ARNOLD⁶). Parts of the cortex in the presumptive ventral or ventrolateral area thus were completely separated from the egg. After periods of 5 or 6 days, the ligated specimens were preserved in Bouin's fixative, embedded either in Epon 812 or in Paraplast and

¹ E. KORSCHELT, Festschr. 70. Geburtstag R. Leuckarts (Leipzig 1892).

² S. v. BOLETZKY, Revue suisse Zool. 74, 555 (1967).

³ A. NAEF, Fauna Flora Golf. Neapel, 35. Monogr. I, 2 (1928).

⁴ J. M. ARNOLD, Biol. Bull. 129, 72 (1965).

⁵ J. M. ARNOLD, Develop. Biol. 78, 180 (1968).

⁶ J. M. ARNOLD, Biol. Bull. 128, 24 (1965).