

PT 1469

REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE

SÉRIE DE BIOLOGIE VÉGÉTALE

BIOL. INV. 93

TOME 22

1977

N° 1

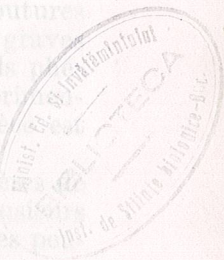
janvier—juin

SOMMAIRE

P. G. PLOAIE, ZOE PETRE, VICTORIA MOCANU et M. IONICĂ, Le virus de la mosaïque du peuplier en Roumanie : Identification, propriétés biologiques, morphologiques et sérologiques	
AURICA TĂCINĂ, The karyology of species <i>Hesperis oblongifolia</i> Schur	13
AURELIA CRIȘAN, Comparative investigations on <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary and <i>S. minor</i> Jagg	21
G. DIHORU and N. ROMAN, <i>Stipa crassiculmis</i> subsp. <i>Heterotricha</i>	27
L. GRUIA, Sur l'étude et les problèmes de la flore et de la végétation cavernicole	33
MARIA CELAN et A. BAVARU, Sur une population de l' <i>Entomomorpha linza</i> (Linné) J. Agardh du port de Tomis (Constantza)	37
AL. MANOLIU et M. RUSAN, Recherches mycoécologiques dans le bassin supérieur de la rivière de Suceava	45
N. S. MARGARIS et P. PAPADOGIANNI, Données concernant la population de <i>Phlomis fruticosa</i> en Grèce, selon le dessin «pattern» des flavonoïdes	49
S. PÉTERFI, A. MARTON, M. ȘTIRBAN and V. BERCEA, The culture of some green filamentous algae under various conditions of light and nutritive media. I. Biomass increase and quantitative variation of pigments and proteins	59
GEORGETA KEUL and M. KEUL, Die Hemmung der ATP- und ADP- Wirkung auf die Protoplasmaströmung durch Oligomycin	65
MARGARETA IORDAN and V. SORAN, The effect of some cations upon intracellular movements within barley root hairs	75
D. PUȘCARU, MARIA CIUCĂ, IOANA SPIRESCU, M. ALEXAN et GABRIELA FIȘTEAG, La dynamique de la composition et de la structure floristique du pré <i>Nardeto-Festucetum rubrae commutatum</i> de la montagne Chiruşca (Ciucas) fertilisé à engrais minéraux	



13670



LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU PEUPLIER EN ROUMANIE : IDENTIFICATION, PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES, MORPHOLOGIQUES ET SÉROLOGIQUES

PAR

P. G. PLOAIE, ZOE PETRE, VICTORIA MOCANU et M. IONICĂ

Le virus de la mosaïque du peuplier a été isolé en Roumanie à partir de *Populus × euramericana* « I 214 », « Robusta 16 » et « 34 ». Les meilleurs plantes test herbacées ont été : *Petunia hybrida*, *Vigna sinensis*, *Nicotiana megalosiphon*, *N. glutinosa* et *N. debneyi*. Le virus a été purifié à partir des feuilles triturées en 0,1 M Tris avec de l'acide thioglycolique 0,1%, pH 9. L'extrait a été mélangé v/v avec du chloroforme mélangé au butanole (v/v) et ensuite il a été soumis à la centrifugation différentielle (90 min à 30 000 g et 10 min à 5 000 g). L'examination au microscope électronique a mis en évidence des particules semblables au groupe Carlavirus ayant 650–730 nm. On a obtenu un antisérum au titre de 10^{-4} .

Les résultats des recherches sylviques effectuées en Roumanie ont abouti à l'extension des peuplements uniclonaux de peupliers euraméricains en vue de l'agrandissement de la production de bois.

L'état de santé du matériel utilisé pour la multiplication représente un élément essentiel de la culture, ayant en vue que la multiplication du peuplier par voie végétative, à l'aide du système des clones et des boutures mène parfois à la perpétuation des infections virales qui entraîne de graves conséquences manifestées par la dégénérescence des arbres. De tels phénomènes ont été observés depuis longtemps dans les cultures expérimentales de peuplier, aussi bien que dans d'autres régions où cette espèce est répandue.

Ce travail présente les résultats de nos recherches (les premières de telle sorte en Roumanie) que nous avons effectuées pendant plusieurs années sur la présence du virus de la mosaïque du peuplier dans les peuplements de peupliers euraméricains.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour connaître les principales caractéristiques du virus qui infecte les peupliers euraméricains (sa capacité de multiplication dans les plantes herbacées, la dilution limite, l'induction des symptômes en fonction de la température, la résistance du virus aux traitements chimiques pendant la purification, l'aspect morphologique et le pouvoir antigénique de préparations purifiées du virus), il a fallu standardiser les procédures et les méthodes de travail afin qu'elles puissent être facilement assimilées et utilisées comme tests de routine dans le but d'indexer les clones et d'éliminer les plantes de peuplier malade pour obtenir dans l'avenir un matériel de multiplication libre de virus.

a) *La source de virus.* Comme source de virus on a utilisé des boutures de peuplier *Populus* × *euramericana* « I 214 », « *Robusta 16* » et « 34 » en provenance d'une station expérimentale pour la culture du peuplier et du saule de l'Institut de Recherches, Etablissement de Projets et Documentation en Sylviculture.

b) *Les plantes test.* Pour les expériences on a utilisé les espèces de plantes suivantes : *Petunia hybrida* Hort., *Vigna sinensis* Savi et Hassk., *Datura stramonium* L., *Nicotiana megalosiphon* Heurk et Muell., *N. glutinosa* L., *N. alata* Link et Otto, *N. debneyi* et *Chenopodium foetidum* Schrad. Pendant la période d'expérimentation, les plantes ont été maintenues en serre chaude, la température de l'air étant de 18–30°C, selon le cas, et l'humidité de 70–80%. Pendant leur croissance, les plantes ont été illuminées artificiellement, jusqu'à 16 heures par jour, à l'aide des lampes à fluorescence placées à 50 cm au-dessus des plantes.

c) *L'inoculation du virus aux plantes herbacées.* Les feuilles des plantes test ont été poudrées de Carborundum très fin et frottées avec du jus de feuilles de peuplier, de bourgeons de peuplier, ou de feuilles des plantes herbacées infectées. L'inoculum a été préparé en broyant les feuilles présentant des symptômes dans une solution de tampon phosphate 0,1 M, au pH 7,2–7,4, à laquelle on a ajouté (afin de faciliter la transmission) du diethyldithio carbamate de natrium (DIECA) jusqu'à 0,015 M et du chlorhydrate de cystéine 0,01 M ou de la caféine 0,1%.

d) *La purification du virus.* Pour séparer et purifier le virus, celui-ci a été multiplié dans des plantes de *Petunia hybrida* et *Nicotiana megalosiphon* dont les feuilles aux symptômes de maladie évidents ont été broyées dans une solution tamponnée Tris (hydroxyméthyl-aminométhane) 0,1 M à laquelle on a ajouté 0,1% d'acide thioglycolique, au pH 9. Le jus contenant du virus a été séparé des débris cellulaires par centrifugation durant 5 min à 5 000 g. Le jus obtenu a été traité avec un mélange de chloroforme-butanole (v/v) et refroidi pendant 30 min. Le surnageant a été soumis à une ultracentrifugation différentielle en trois cycles (90 min à 30 000 g et 10 min à 5 000 g) et le culot final de virus a été repris en 1–2 ml de solution tamponnée Tris-HCl au pH 9.

e) *L'étude électro-microscopique du virus.* On a mélangé une goutte de suspension virale à une goutte de phosphotungstate de natrium à 2%, au pH 6,5 sur une plaque de cire. Les grilles-support, couvertes d'une pellicule de Formvar affermie au charbon, ont été placées sur la goutte à virus. L'excès de solution colorante a été éliminé à l'aide de papier-filtre et ensuite les grilles ont été examinées au microscope électronique JEM-7.

f) *L'obtention de l'antisérum.* La suspension virale d'une haute pureté a été injectée à des lapins, par voie intraveineuse, en quantité de 0,5 ml, 1 ml, 1 ml, 1 ml, à 4, 14, 14 jours d'intervalle. Les épreuves de sérum ont été récoltées 3 semaines après la dernière injection. On a apprécié la qualité du sérum par des tests d'agglutination des chloroplastes et de précipitation.

RÉSULTATS

1. *L'évolution de la maladie dans les cultures de peuplier.* Les recherches sur l'apparition et l'évolution de la maladie en conditions naturelles ont été effectuées sur des cultures expérimentales de peuplier situées dans différentes régions du pays. Les symptômes observés en plein champ chez les peupliers ont été corroborés à ceux développés en serre chaude sur les boutures de peuplier euraméricain à des températures de 20–27°C. On a pu constater que la maladie apparaît en pépinière déjà chez les clones de la première année, se manifestant sous forme d'une mosaïque des feuilles basales. Sur les plantes âgées de 2–3 ans, la mosaïque évolue à partir de la base et jusqu'à la moitié de la plante. On n'observe pas dans les pépinières la chute prématurée des feuilles (Pl. I, A). Dans les peuplements éclaircis selon les schémas de la cultivation du peuplier, la maladie se manifeste chroniquement chez tous les exemplaires, ayant des effets négatifs sur leur feuillage et leur croissance. Les symptômes de mosaïque apparaissent au printemps ; à partir du mois de juillet les feuilles affectées jaunissent tout à fait et la défoliation commence. La période critique est située dans la seconde partie de l'été, surtout en août, quand la chute des feuilles devient massive, les arbres perdant plus de 75% de leur feuillage (Pl. I, A). Chez *Populus* × *euramericana* « *Robusta 16* » les symptômes apparaissent d'abord sous forme de petites taches jaunes semblables à des piqures d'épingle, répandues sur tout le limbe de la feuille. Ensuite, les taches s'aggrandissent et souvent peuvent confluer, occupant de larges espaces entre les nervures (Pl. I, B, C, D). En serre chaude, aux températures de 22–27°C, apparaissent souvent des processus nécrotiques au niveau des nervures et du tissu situé entre les nervures. Sur « *Robusta 34* », les symptômes se manifestent sous forme de taches nettement limitées, légèrement annulaires ou irrégulières, comptant de 2 à 3 mm diamètre ; à « *I 214* » les symptômes sont identiques à ceux de « *Robusta 16* ».

2. *Transmission du virus aux plantes test herbacées.* Les résultats des expériences de transmission sont présentés dans le tableau N° 1. Les espèces les plus sensibles à ce virus ont été : *Petunia hybrida*, *Vigna sinensis*, *Nicotiana megalosiphon*, *N. glutinosa*, et *N. debneyi*. Le virus se multiplie plus rapidement à 18–20°C, les symptômes étant plus manifestes. Au-dessus de 25°C, les symptômes sont masqués. Pour la transmission du virus directement à partir du peuplier aux plantes herbacées, on a utilisé *Petunia hybrida*, *Vigna sinensis* et *Nicotiana debneyi*.

La période d'incubation du virus dans les plantes test est variable et dépend de la source d'inoculum. Généralement, lorsqu'on a utilisé comme inoculum le jus obtenu à partir des feuilles de peuplier infectées, chez quelques plantes, la période d'incubation a dépassé 20 jours. Par contre, lors de la retransmission du virus à partir des plantes test herbacées, la période d'incubation a été de 7–15 jours. La réaction des plantes vis-à-vis de l'infection avec ce virus est décrite ci-dessous.

Petunia hybrida présente, de 10 à 13 jours après l'inoculation, des lésions locales sous forme de zones chlorotiques limitées par des anneaux vert foncé (Pl. II, D). Ensuite, les feuilles malades deviennent jaunes, se fanent et pendent sur le rebord du pot. Après 20 à 28 jours depuis l'inoculation apparaît l'infection systémique caractérisée par la chlorose des ner-

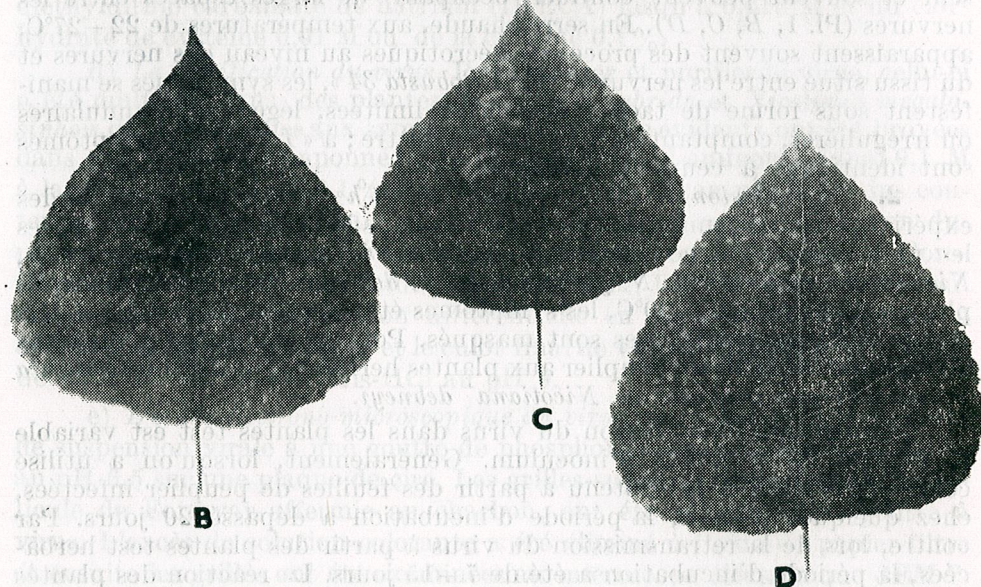


Planche I. — Symptômes induits par le virus de la mosaïque du peuplier sur les peupliers euraméricains, en conditions naturelles. A, Aspect d'une plantation de peupliers, au mois d'août, présentant de graves symptômes de défoliation (gauche), à côté d'une culture de jeunes peupliers «Robusta 16», la 2^e année après leur plantation, ne présentant pas de défoliation (droite). Symptômes de mosaïque chez les clones : B, «Robusta 16»; C, «Robusta 34»; D, «1214».

Tableau 1

Résultats de la transmission expérimentale du virus de la mosaïque du peuplier sur diverses plantes test herbacées

Plante test	N° de plantes		Période d'incubation (jours)	Type de symptômes
	infectées	testées		
Fam. Chenopodiaceae <i>Chenopodium foetidum</i>	5	6	14	LL
Fam. Leguminosae <i>Vigna sinensis</i>	108	114	9-12	LL+IS
Fam. Solanaceae <i>Datura stramonium</i>	5	7	17-27	IS
<i>Nicotiana glauca</i>	4	6	16	LL
<i>Nicotiana debneyi</i>	47	52	11-15	LL+IS
<i>Nicotiana glutinosa</i>	23	27	18-22	IS
<i>Nicotiana megalosiphon</i>	30	30	7-10	LL+IS
<i>Petunia hybrida</i>	153	162	10-13	LL+IS

LL = Lésions locales

IS = Infection systémique

vures, le fort enroulement du limbe foliaire vers la partie inférieure et la nécrose de la nervure principale. En quelques cas, les plantes restent naines et la floraison est retardée (Pl. III, B).

Nicotiana megalosiphon est une espèce très susceptible à l'infection avec ce virus. Les symptômes se manifestent sous forme de lésions locales nécrotiques, de 7 à 10 jours après l'inoculation (Pl. II, A); après 9 à 12 jours survient l'infection systémique, caractérisée par la chlorose et la nécrose des nervures, par la déformation et le dessèchement des feuilles.

Nicotiana debneyi réagit à l'infection par de petites lésions locales apparaissant sur les feuilles inoculées, de 11 à 15 jours après l'inoculation. L'infection systémique qui suit se manifeste par la clarification des nervures (Pl. II, B).

Vigna sinensis présente, de 9 à 12 jours après l'inoculation, des lésions locales brun-rougeâtres, sur les feuilles inoculées. Ces lésions subissent une nécrose et s'étendent souvent le long des nervures (Pl. II, C). L'infection systémique se manifeste par une forte déformation des feuilles supérieures.

Datura stramonium présente, de 17 à 27 jours après l'inoculation, une nécrose nervienne, surtout sur la face inférieure des feuilles qui s'enroulent et se modifient fortement. Les plantes ne fleurissent pas (Pl. III, A).

Ainsi qu'il en résulte du tableau 1, d'autres espèces ont aussi présenté des symptômes après l'infection par ce virus : *Nicotiana glutinosa*, *N. alata* et *Chenopodium foetidum*.

3. Propriétés du virus in vitro.

a) *Limite de dilution.* Le virus obtenu à partir des feuilles de *Petunia hybrida* à infection systémique, en solution tamponnée de phosphate 0,1 M contenant des inhibiteurs d'oxydation (DIECA et chlorhydrate de cystéine) ainsi qu'il a été mentionné auparavant, a été dilué successivement dans de l'eau distillée. Ensuite on a procédé à des infections sur *Vigna sinensis*, *Nicotiana glutinosa*, *N. megalosiphon* et *Petunia hybrida*. Le jus a gardé son infectivité jusqu'à la dilution 10^{-4} .

b) *Longévité in vitro*. Le jus extrait à partir des plantes malades et gardé, à la température du laboratoire (18—20°C), testé sur *Nicotiana megalosiphon*, *N. debneyi* et *Petunia hybrida* a perdu son pouvoir infectieux 48 heures après l'extraction.

c) *Aspect morphologique du virus*. Le virus purifié à partir des plantes test selon la méthode décrite apparaît sous forme de longs bâtonnets, légèrement flexueux, de 650 à 730 nm (Pl. 3, C). Le virus n'est pas aggloméré ou fragmenté et la force centrifuge de 30 000 g est suffisante pour le sédimenter.

d) *Testes sérologiques*. Le virus hautement purifié et inoculé à des lapins a produit un antisérum qui a réagi au test de précipitation avec le jus obtenu à partir des plantes malades de *Petunia hybrida*, jusqu'à la dilution de 1/10 000. On a utilisé aussi le test d'agglutination des chloroplastes du jus obtenu à partir des feuilles de peuplier.

DISCUSSION

L'étude de l'état de santé des cultures de peupliers euraméricains en diverses zones du pays a permis l'isolement et la caractérisation d'un agent viral, inducteur de graves modifications du métabolisme de cette espèce manifestées par la mosaïque et le jaunissement des feuilles et suivies de la défoliation partielle des arbres.

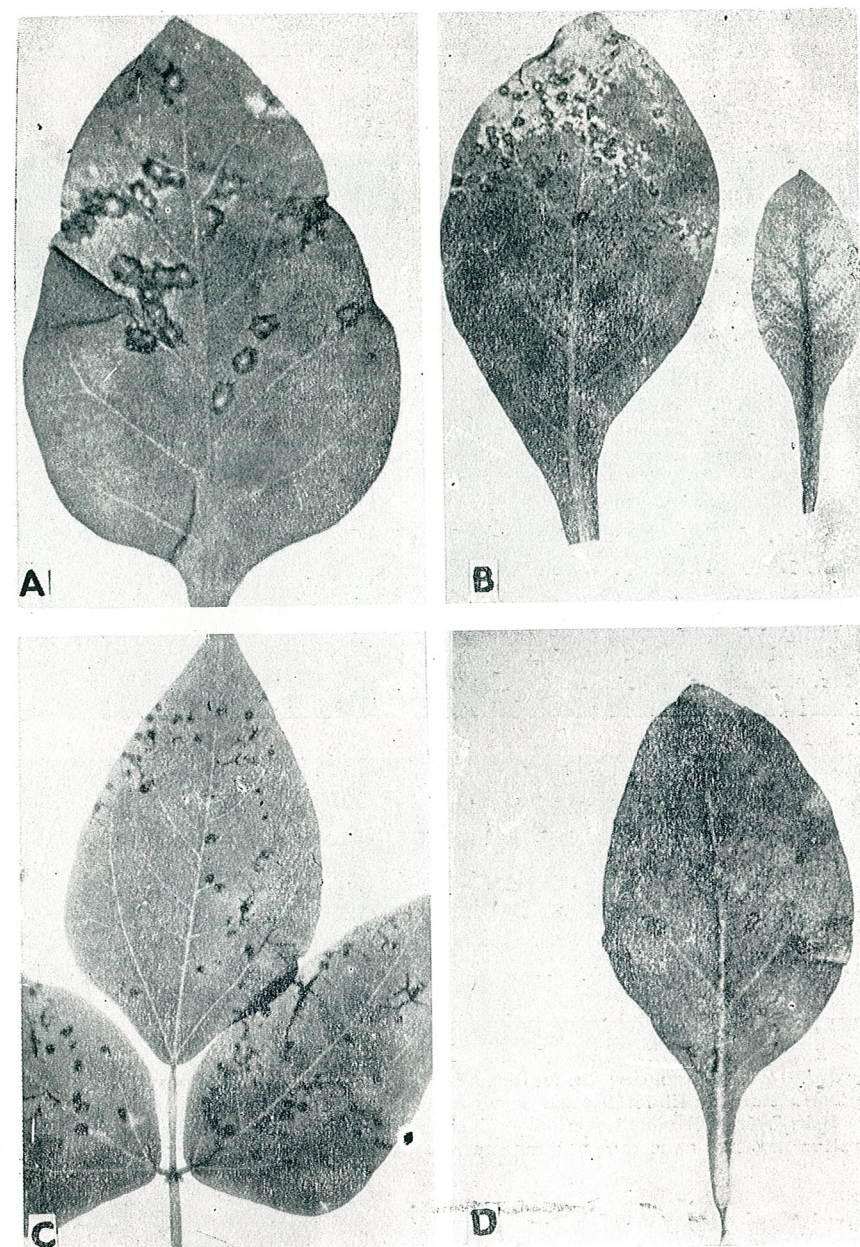
Le virus isolé est aisément transmissible par voie mécanique et d'après les symptômes induits aux plantes test herbacées comme aussi d'après la limite de dilution, la longévité in vitro et l'aspect morphologique, il présente les caractéristiques du virus de la mosaïque du peuplier [1], [2], [3], [5], [9], [10].

Selon les constatations faites en Tchécoslovaquie [8] et en Italie [7], la variété « I 214 » serait la plus résistante à l'infection virale. Dans nos expériences, la variété « I 214 » a été tout aussi sensible que les variétés « Robusta 16 » et « 34 ». La détection du virus en différents clones dépend surtout de la nature des solutions utilisées à l'extraction. Dans nos essais, d'une très grande efficacité a été la solution tamponnée de phosphate à laquelle on a ajouté du DIECA et du chlorhydrate de cystéine ayant une forte action réductrice.

Les meilleures plantes test pour l'isolement du virus à partir des boutures de peuplier ont été, dans nos essais: *Petunia hybrida*, *Nicotiana megalosiphon*, *N. glutinosa*, *N. debneyi* et *Vigna sinensis*, dont le plus sensibles à l'infection sont *N. megalosiphon* et *N. glutinosa*.

Quant à l'aspect morphologique, le virus isolé en Roumanie ressemble aux souches isolées en d'autres pays, ayant des particules de 650 à 730 nm, ce qui le place dans le groupe du virus latent de l'oeillet (*Carnation latent virus*) ou Carlavirus, à côté du virus M et S de la pomme de terre, du virus de la mosaïque latente du houblon et d'autres virus. Les dimensions des particules de ce virus, établies par nous, correspondent à celles indiquées par d'autres auteurs [1], [4], [6].

Le titre de l'antisérum que nous avons obtenu a atteint, par le test de précipitation, 1/10 000 par rapport à 1/2 048 chez d'autres auteurs [3].



Plaque II. — Réaction des plantes test herbacées à l'infection expérimentale par le virus de la mosaïque du peuplier. A, Lésions locales chez *Nicotiana megalosiphon*. B, Lésions locales nécrotiques et infection systémique sous forme d'une chlorose des nervures, chez *Nicotiana debneyi*. C, Lésions locales nécrotiques chez *Vigna sinensis*. D, Taches chlorotiques annulaires chez *Petunia hybrida*.

Les résultats de nos recherches prouvent qu'il sera possible d'éviter les infections en créant un stock de plantes, libres de virus, dont l'état de santé sera tout d'abord testé à l'aide des méthodes présentées.

OBLONGIFOLIA SCHUR

BIBLIOGRAPHIE

1. BERG T. M., Nature, 1962, 194, 1302—1303.
2. BERG T. M., Meded. Landb. Hoogeschool Wageningen, 1964, 64, 1—64.
3. BERTRANET Y., TARIS B., Bull. du service de culture et d'études du peuplier et du saule, 1971, R/444, 55—68.
4. BIDDLE P. G., TINSLEY T. W., The New Phytologist, 1971, 70, 67—75.
5. BOCCARDO G., LUISONI E., LOVISOLO O., 2nd International Congress of Plant Pathology, sept, 5—12, 1973, Abstracts of Papers 0928.
6. BRANDES J., Phytopathol. Z., 1963, 47, 84—89.
7. CASTELLANI E., CELLERINO G. P., Communication à la F.A.O., 1963.
8. ROMAN L., VAVRO G., Lesin. Casop., 1965, 2, 7.
9. SCHMELZER K., Archiv für Forstwesen, 1964, 13, 787—798.
10. SCHMELZER K., Phytopathol. Z., 1966, 55, 317—351.

Reçu le 11 juillet 1975 Institut de Recherches pour la Protection des Plantes

et
Institut de Recherches,
Etablissement de Projets et Documentation
Sylvique

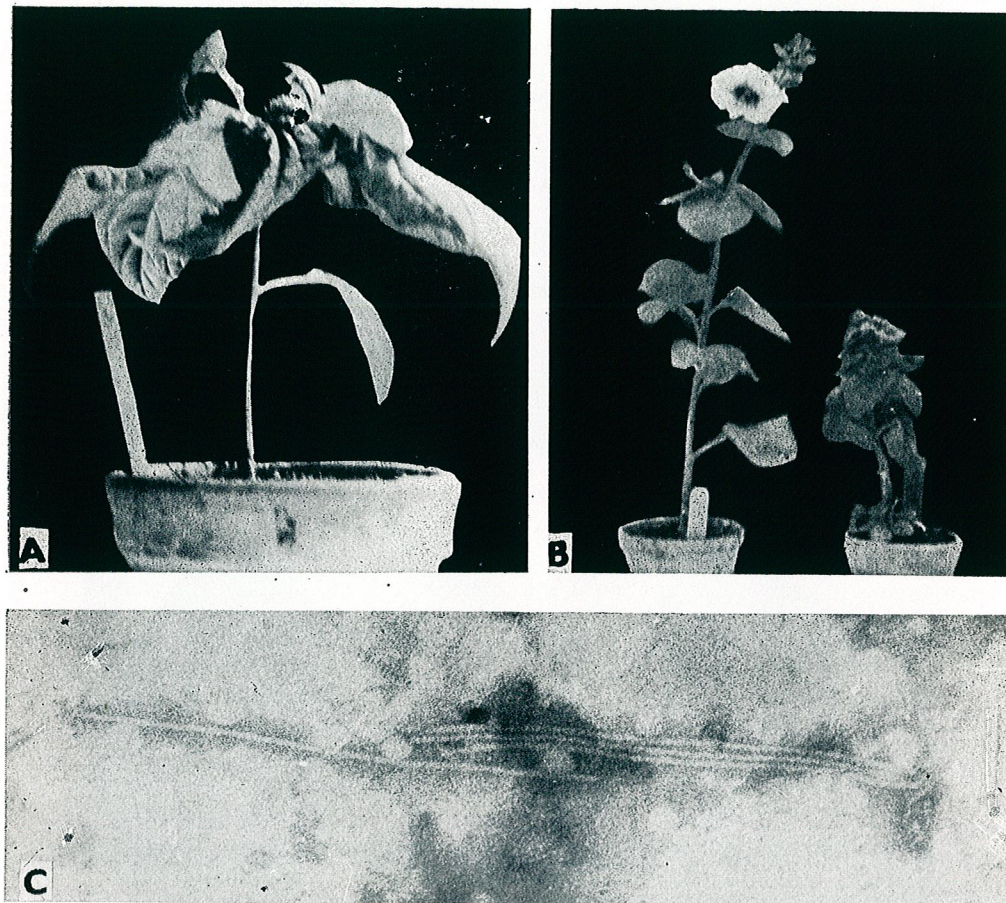


Planche III. — A, Déformation des feuilles avec enroulement et nécrose nervienne chez *Datura stramonium* à suite de l'infection par le virus de la mosaïque du peuplier. B, Nanisme chez *Petunia hybrida* produit par l'infection virale. C, Aspect morphologique du virus purifié, après la coloration négative avec du phosphotungstate de sodium à 2%. ($\times 100\ 000$)

MATERIAL AND METHOD

A population of *Hesperis oblongifolia* occurring in the Piatra Mare Massif (*Pinctum mugii carpaticum* Pavl. 1927) was investigated. The seed germination was carried out in Petri dishes kept at 4°C. The radial meristems were pretreated with calichein 0.1% for 3 hours and then fixed in a 3:1 mixture of alcohol + glacial acid.

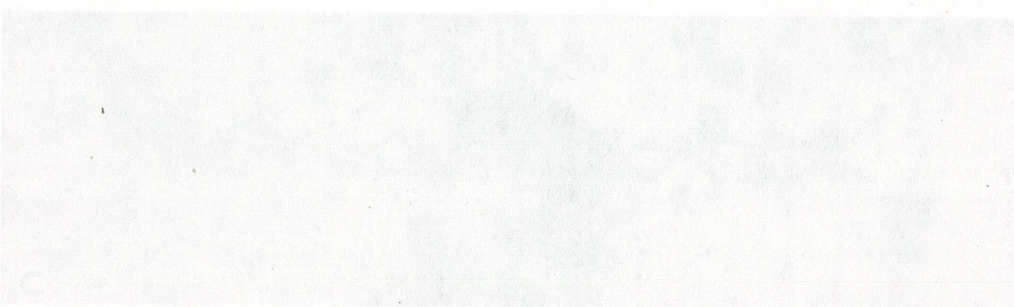
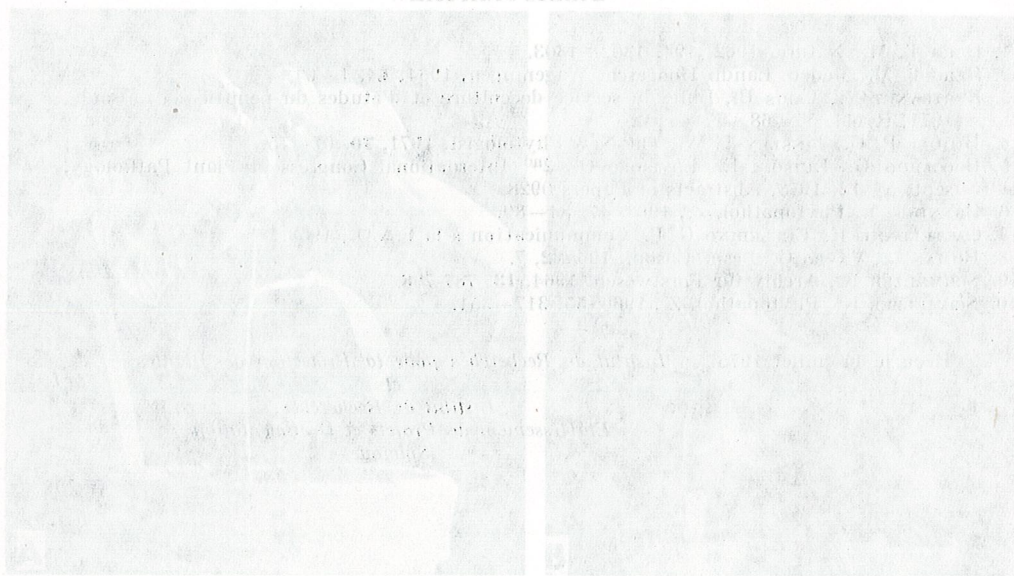
The hydrolysis was obtained by keeping the preparations for 15 minutes in hydrochloric acid 1 N at 60°C; a Schiff reagent staining followed. The squash preparations were examined at a MC-1 microscope and the microphotographs were obtained in direct 400 $\times$ size.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Hesperis oblongifolia was described for the first time in 1866 by Schur as occurring in Brasov, Transylvania [7]. In both *Flora R.P.R.* [6] and *Flora Europaea* [1], *Hesperis oblongifolia* is treated as a species. Later on, Fr. Dvorak, by carrying out a large taxonomic study on genus *Hesperis* in Czechoslovakia [3] [4], included this taxon into the subspecies *Hesperis matronalis* L.

Les résultats de nos recherches prouvent qu'il sera possible d'éviter les infections en créant un stock de plantes, libres de virus, dont l'état de santé sera tout d'abord testé à l'aide des méthodes présentées.

BIBLIOGRAPHIE



Planché III. — A. Déformation des feuilles avec enroulement et nécrose nervienne chez *Datura stramonium* à suite de l'infection par le virus de la mosaïque du peuplier. B. Nécrose chez *Pelargonium hybridum* produit par l'infection virale. C. Aspect morphologique du virus purifié, après la coloration négative avec du phosphotungstate de sodium à 2%. ($\times 100\ 000$)

THE KARYOLOGY OF SPECIES *HESPERIS* *OBLONGIFOLIA* SCHUR

BY
AURICĂ TĂCINĂ

The paper presents the observations made in a population of *Hesperis Oblongifolia* Schur, in the Piatra Mare Massif.

The species investigated has the diploid set of chromosomes $2n = 14$ among which 3 pairs are metacentric and 4 pairs submetacentric ones.

The genus *Hesperis* L. is represented in the flora of our country [6] by 9 species, 3 subspecies, 9 varieties and 8 forms, belonging to the sections *Hesperidium* DC. and *Deilosma* Andr.

Our research concerns the endemic species *Hesperis oblongifolia* Schur, belonging to section *Deilosma*. This species represents an element of the subalpine level in the limestone massifs on the Romanian Carpathians. *Hesperis oblongifolia* mainly differs from *Hesperis matronalis* with whom it is related by the sessile up to amplexicanul median stem leaves — the basal ones being oblong, long decurrent — and by the basis of the stem that is glabrous and glabrescent. The areal of the species *Hesperis oblongifolia* is limited to the Oriental Carpathians (Crăciunel, Rodna Massif, 1,000 m), Ciucas (1,600 — 1,800 m), Piatra Mare, slope of the Mountain Tîmpa, Piatra Craiului (above the Vlădușca — and in the Crăpătura valleys).

MATERIAL AND METHOD

A population of *Hesperis oblongifolia* occurring in the Piatra Mare Massif (*Pinetum mugii carpaticum* Pawl. 1927) was investigated. The seed germination was carried out in Petri dishes kept at 4°C . The radical meristems were pretreated with colchicine 0.1% for 3 hours and then fixed in a 3:1 mixture of alcohol + glacial acid.

The hydrolysis was obtained by keeping the preparations for 15 minutes in hydrochloric acid 1N at 60°C ; a Schiff reagent staining followed. The squash preparation were examined at a MC-1 microscope and the microphotographs were obtained in direct $400\times$ size.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Hesperis oblongifolia was described for the first time in 1866 by F. Schur as occurring in Braşov, Transilvania [7]. In both *Flora R.P.R.* [6] and *Flora Europaea* [1], *Hesperis oblongifolia* is treated as a species. Later on, Fr. Dvorak, by carrying out a large taxonomic study on genus *Hesperis* in Czechoslovakia [3] [4], included this taxon into the subspecies *Hesperis matronalis* L.

Karyologically speaking, there are some basic numbers given in literature for the species of genus *Hesperis* $n = 6, 7, 8, 12, 13, 14$ [5]. From the observation made on the material analyzed (Figs 1–3), it results that for *Hesperis oblongifolia* $n = 7$, the diploid set being $2n = 14$. Out of the 7 pairs of chromosomes, 3 pairs are metacentric and 4 pairs sub-metacentric ones. In some metaphasic plates the presence of accessory chromosomes was noticed, being also mentioned by the specialty literature in *Hesperis sylvestris* [4].

Taking into account the fact that the rank of taxon *Hesperis oblongifolia* is still under debate, the karyological data included offer an extra criterion for precisising its taxonomic position, considering that *Hesperis matronalis* has $2n = 24$. We notice that in its restricted areal, the morphological characters and the chromosome range lead to the idea of maintaining the rank of species for *Hesperis oblongifolia*.

The data presented in the above study have a preliminary character, since further researches have to be carried out which should more precisely and unitarily correlate the karyological features with the morphological and ecological ones.

REFERENCES

1. BALL P. V., in: TUTIN T. G. et al. (edit), *Flora Europaea*, I, 1964, 20, Cambridge.
2. BELDIE AL., *Plantele din Munții Bucegi-determinator*, Ed. Academiei, Bucharest, 1972.
3. DVORAK FR., Publ. Fac. Sc. Univ., Brno, 1966, 469, 21.
4. DVORAK FR., Scripta, Fac. Sci. Nat. Ujep. Brunensis. Biologia, 1974, 3, 4, 121–130.
5. LÖVE A., LÖVE D., Acta Horti göteburgensis, Göteborg, 1956, 20, 4, 65–291.
6. NYARADY V. in: SĂULESCU (ed.) *Flora RPR*, 3, Ed. Academiei, Bucharest, 1955.
7. SCHUR F., Enumeratio plantarum Transsilvaniae, 1866, 52.

Received July 5, 1976

The Institute of Biological
Sciences
Department of Ecology
Spl. Independenței nr. 296
Bucharest

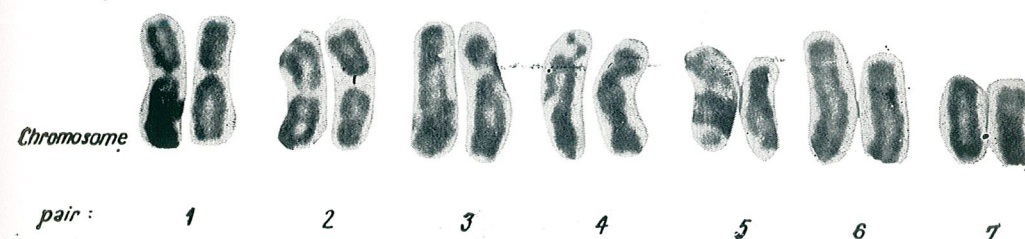


Fig. 1

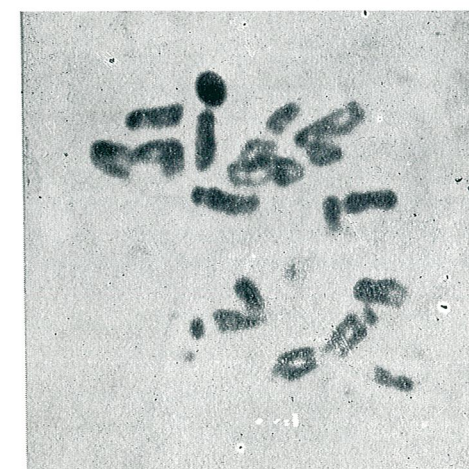


Fig. 2



Fig. 3

Fig. 1—3. — Mitosis metaphase in *Hesperis oblongifolia* Schur ($2n=14$) and homologous chromosomes in the diploid set.

COMPARATIVE INVESTIGATIONS ON *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* (LIB.) DE BARY AND *S. MINOR* JAGG

BY
AURELIA CRIȘAN

The morphological, biometrical and physiological patterns of two isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* were investigated. The author points out that the morphological differences between these latter are not significant. From the physiological point of view the two isolates behave very similarly. The influence of temperature, pH, carbon and nitrogen sources reveals but some minute differences which cannot be taken into consideration if we keep in mind the wide characteristic variability of *Sclerotinia sclerotiorum*. According to Whetzel and Purdy in the author's opinion *S. minor* should be only a form or in the best case a variety of *S. sclerotiorum*.

Sclerotinia sclerotiorum, the typical representative of the *Sclerotiniaceae* family, has been and continues to be the object of numerous and extensive investigations.

Its wide polyphagy attests great adaptation possibilities and a unanimously accepted variability. It is supposed to be a collective species made up of numberless physiological races, in the range of which Whetzel [17] includes other species of *Sclerotinia* too, *inter alia* *S. minor*. Whether one can speak of a peculiar species or whether the latter is only a variety or physiological race of the former is a problem unsettled yet. Many authors [1] [4] [6] [7] [14] consider them completely different, whereas others [3] [9] [11] recognize *S. minor* as being only a variety.

It is rather difficult to endorse one or another of the opinions suggested, but a clarification of the problem is undoubtedly called for.

On the basis of monosporal cultures, Purdy [11] succeeds in demonstrating that from the morphological point of view, no essential differences exist between *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*, and, as such, the latter should be included among the synonymies of the former.

In the present paper this problem is resumed in an attempt to extend the field of investigations by comparing some physiological characters to each other.

MATERIAL AND METHOD

Macro- and microscopical studies were carried out on fungi isolated in Cluj-Napoca from fresh material (stored celery) and culture media (mycelium, microconidia, sclerotia, apothecia). On similar culture media (potato slices, carrot, beet, malt-agar and Czapek's agar), growth and development, sclerotia formation, influence of temperature and pH were studied. Under identical field and laboratory conditions sclerotia were put

to germinate in order to produce apothecia in pots with clay-sandy soil and in Petri dishes containing distilled water and 1% agar-agar medium. The influence of carbon and nitrogen sources was also comparatively examined. The results were estimated by determining the mycelial and sclerotial dry weight 15 days after inoculating the liquid Czapek's medium in which the C and N source were replaced whenever the case. On identical agar media, the mycelial linear growth, as well as the number and size of sclerotia were recorded.

RESULTS

Morphological characters. On naturally infected material, the *S. minor* mycelium is less evident than the *S. sclerotiorum* one and slight differences have been detected microscopically concerning the thickness of hyphae, which in *S. minor* are usually thinner and more delicate, reaching only 2.3 μ on the average as compared to 6.9 μ in *S. sclerotiorum*. Nevertheless on favourable media, mature hyphae may reach a 10.5 μ thickness even in *S. minor*.

Microconidia are identically formed, on hyphae, sclerotia, apothecium peduncles and apothecia, having the same 2–3.7 μ dimension (3 μ on the average).

Sclerotia are of various shapes and sizes, depending on the medium conditions in which they are formed in (nutrition, humidity, temperature). In *S. sclerotiorum*, sclerotia are generally thicker (2–20 mm, 7 mm on the average) and rare, while in *S. minor* they are smaller (0.5–6 mm, 1.5 mm on average) and more numerous. The size differences of sclerotia, generally considered as basic criterion for separating the two species, has a relative value taking into account the fact that *S. minor* may form rather large sclerotia exceeding the usual dimensions (up to 5–6 mm) when grown up on favourable media, i.e. on beet slices or on Czapek's medium in which serine was used as N source. At the same time, *S. sclerotiorum* does not form always large sclerotia only. On unfavorable media or when some indispensable nutrient elements are lacking — as, for example, on Mg-lacking Czapek's medium — 2–5 mm thick sclerotia develop (Fig. 1, a–f).

Under experimental conditions, apothecia are obtained rather easily in *S. sclerotiorum* [5][13], and more difficult in *S. minor* [6][12]. Although for two years consecutively sclerotia have been put to germinate under identical conditions, we failed to get apothecia in *S. minor*, or even well developed apothecium peduncle in culture media, which in *S. sclerotiorum* were abundantly formed. In soil pots kept for 30 days at 4°C and then at room temperature (18–22°C), apothecium peduncles were also formed in *S. minor*, but after a month they got dried without producing apothecia. The same phenomenon was also reported by Glits [6]. According to the specialty literature [10–12], asci and ascospores are identical.

Cultural and physiological characters. The fact is well known that both fungi grow and develop excellently in culture media. *S. minor*, like *S. sclerotiorum*, develops better on solid natural media, but unlike the latter it also grows and develops very well on malt and Czapek's agar

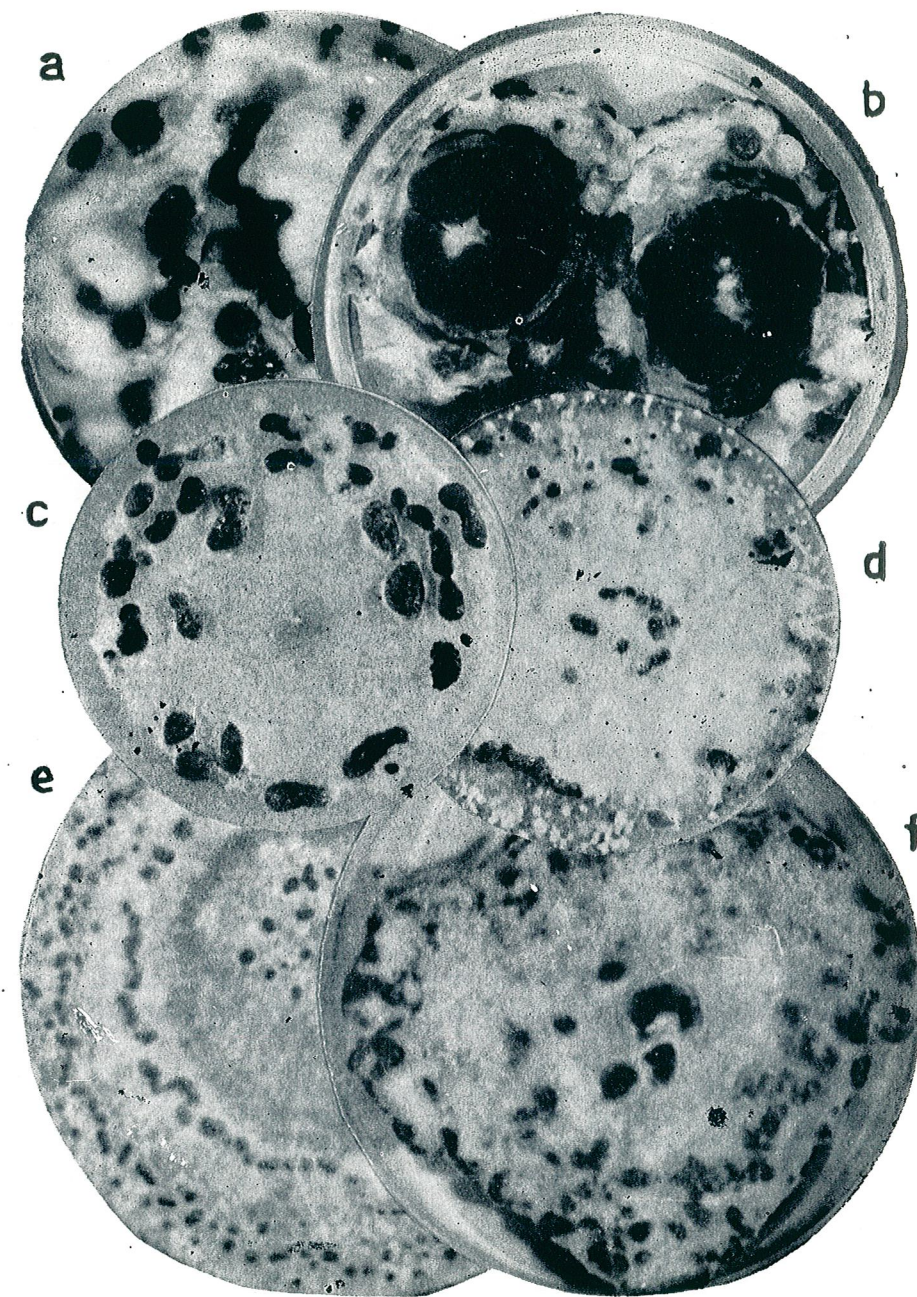


Fig. 1. — Variability of sclerotia depending on the nutrient medium: a–d, *Sclerotinia sclerotiorum* on potato slices, malt-agar and Mg-lacking Czapek's medium; e–f, *S. minor* on Czapek's medium and beet slices.

nonacidified medium, due to the fact that it is able to adapt itself more easily to a neutral or even alkaline pH.

Influence of temperature and pH. No significant difference was noticed concerning the influence of temperature upon the growth and development of both fungi. The minimum temperature required for the growth was found to be 4–5°C, the optimum being 20–25°C and the maximum 32°C, in agreement with the literature data [6] [13].

As already known, both isolates prefer an acid pH, *S. minor*, however, showing a wider pH tolerance and presenting an easier and faster adaptation to a neutral or even alkaline pH. It seems that the fungus acts more promptly in decreasing the pH of its medium (Fig. 2).

Influence of the carbon and nitrogen source. As regards the use of the C source no evident differences were revealed between the two species, as resulting from table 1. They developed quite well on media containing mannose, glucose, soluble starch, maltose, saccharose, pectine and galactose. They develop poorly, if not at all, on media with levulose, lactose, mannitol and salicine, without producing sclerotia. No growth was obtained on media containing inulin and cellulose (Table 1).

Concerning the N source utilization, some slight differences were disclosed between the two isolates after 15 days from inoculation. Such differences are less evident after 30 days. The same N source has generally favoured the mycelial growth, the asparaginic acid, holding the first place followed by: potassium nitrate, ammonium sulphate, sodium nitrate, phenylalanine and peptone. An outstanding case was that of histidine which determined an exuberant mycelial growth in *S. sclerotiorum* allowing but a relatively poor mycelial growth in *S. minor*; the same phenomenon was observed by using ammonium nitrate. On the other hand, serine, which permitted a relatively poor mycelial growth in *S. sclerotiorum* without sclerotia formation, determined a very good mycelial growth and production of numerous sclerotia in *S. minor*. In exchange, cysteine inhibited the mycelial growth and sclerotial production in both isolates.

Our results concerning *S. sclerotiorum* are in concordance with other authors [10] [15] [16], which agree that asparagine, potassium nitrate, ammonium salts and peptone help the development of sclerotia.

Figure 3 exhibits the mycelial linear growth rate and number of sclerotia produced. Phenylalanine and the asparaginic acid determined a more rapid mycelial growth in *S. minor* as compared to *S. sclerotiorum*. Nevertheless in some cases the mycelium rapidly extends, having a scarce arachnoid development without producing sclerotia, e.g. when histidine

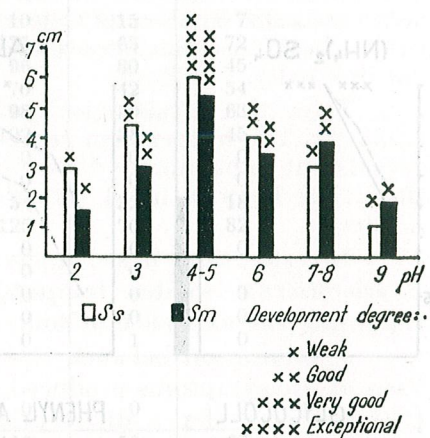


Fig. 2. — Influence of pH on the mycelial growth and development in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. □ *Sclerotinia sclerotiorum*; ■ *Sclerotinia minor*. Development degrees: x weak; xx good; xxx very good; xxxx exceptional.

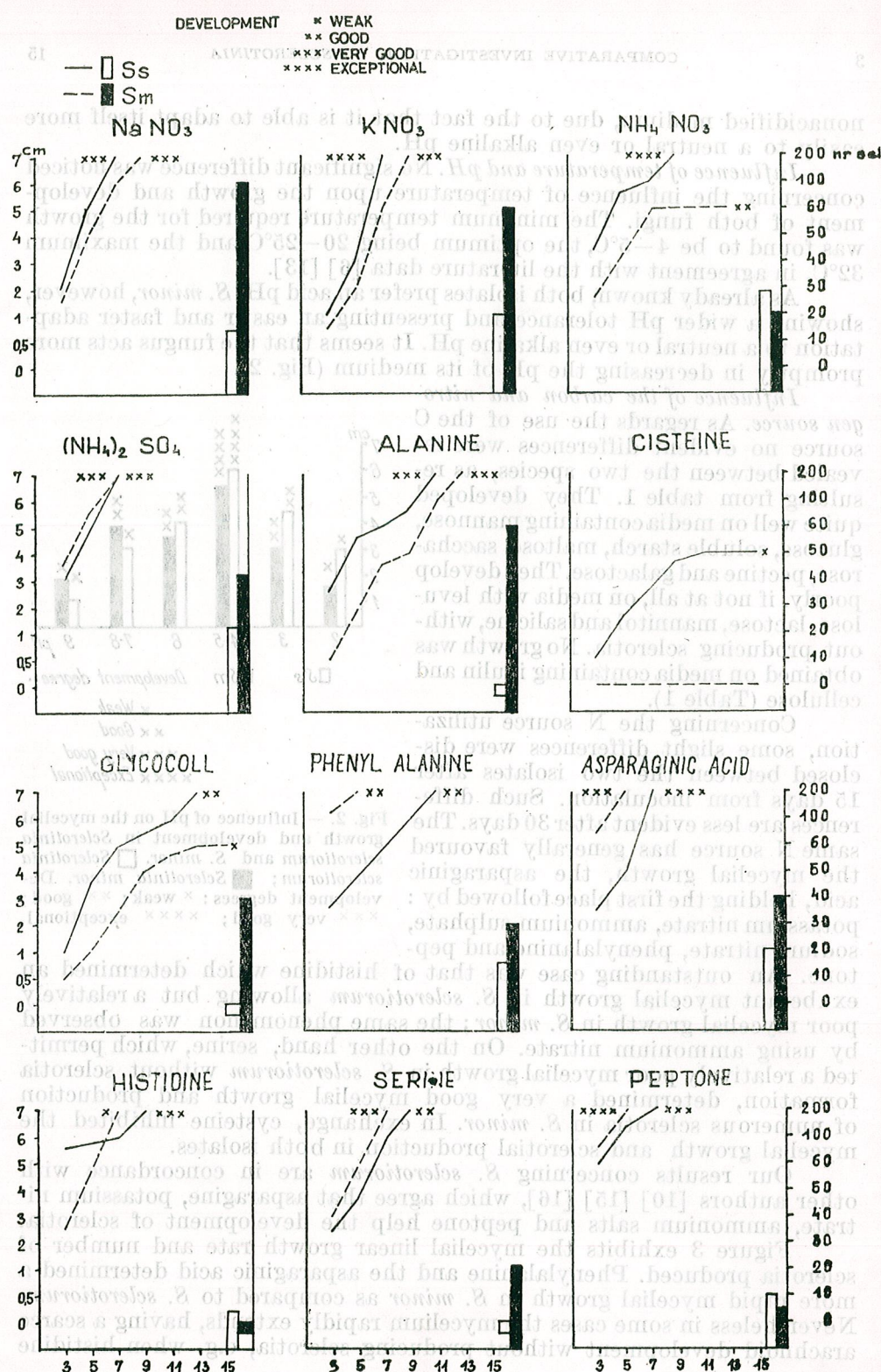


Fig. 3. — Influence of the N source on the linear growth of mycelia and production of sclerotia in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* after 15 days from inoculation. Same legend as figure 2.

is inoculated to *S. minor*. A very fast and exuberant mycelial growth was determined by peptone in both fungi, while the number of sclerotia formed was rather reduced. After 30 days from the inoculation the diffe-

Table 1
Influence of C and N sources on *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*

C source 10 g/l N source 0.25 gN/l	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		<i>Sclerotinia minor</i>	
	Dry weight (mg)		Dry weight (mg)	
	Mycelium	Sclerotia	Mycelium	Sclerotia
Arabinose	25	10	15	7
Glucose	98	135	65	72
Mannose	104	96	80	45
D-galactose	64	70	42	54
Saccharose	78	98	50	63
Maltose	84	102	38	45
Lactose	2	0	0	0
Levulose	2	0	0	0
Pectine	82	54	32	18
Soluble starch	102	125	70	82
Cellulose	0	0	0	0
Inulin	0	0	0	0
Mannitol	1	0	0	0
Glycerol	2	0	0	0
Salicine	1	0	1	0
Control without C source	0	0	0	0
NaNO ₃	60	110	56	67
KNO ₃	65	140	62	75
NH ₄ NO ₃	68	132	25	15
(NH ₄) ₂ SO ₄	65	128	45	53
Alanine	10	0	42	70
Monochloric cysteine	2	0	0	0
Glycocoll	30	0	17	24
Phenylalanine	45	64	20	15
Asparaginic acid	72	145	65	20
Histidine	78	25	2	0
Serine	40	0	24	63
Peptone 1%	65	22	70	25
Control without N source	1	0	0	0

ferences observed in the mycelial growth and sclerotia formation diminish. Even in the cases when no mycelial growth was recorded after 15 days (*S. minor* on cysteine medium), a poor growth was found to take place. The same thing also occurred in the case of those N sources (as for instance : alanine, glycocoll, serine) which did not allow sclerotia to form in *S. sclerotiorum* during the first 15 days, although after 30 days the development of a fairly great number of sclerotia was observed. In these cases, a pH change occurred as well, induced by the fungus which created a favourable growth medium.

It was found that *S. minor* forms much easier sclerotia, when grown up on alanine, serine and glycocoll media; under the same conditions *S. sclerotiorum* formed but a few sclerotia, if any, revealing this way how easy it uses certain amino acids. This phenomenon might explain the pathogenic differentiation of this fungus (Fig. 3).

CONCLUSIONS AND DISCUSSIONS

The morphological characters of two isolated do not allow their separation into distinct species. Shape, size of apothecia, asci and ascospores, basic characters in determining ascomycetes do not constitute in the present case a differentiating element. We also consider that the sclerotia size cannot be taken as basic morphological criterion, since numberless intergradations exist.

From the physiological point of view the two isolates behave very similarly. The influence of temperature, pH, carbon and nitrogen sources reveals but some minute differences which cannot be taken into consideration if we keep in mind the wide characteristic variability of *S. sclerotiorum*.

Investigations based solely on the physiological reactions observed in *S. sclerotiorum* isolates (temperature differences, pH, a.s.o.) resulted in supposing the existence of some physiological races [1] [15].

A separation between the two fungi cannot be made even on the basis of the symptoms produced, the rot induced being identical. Ramsey [12] points out that a differentiation can be made only when the mycelial growth characters became conspicuous and sclerotia were formed. He also mentions that in the case of cross-inoculations, a separation of species according to their hosts infections is not possible.

The rapid mycelium growth rate, more marked in *S. minor*, as noticed by some authors [12], is a less significant feature.

It seems reasonably to assume that, in the present case, the very slight morphological, biometrical and physiological differences observed do not justify a separation of the isolates studied into different species. We consider that *S. minor* should be included among the synonymies of *S. sclerotiorum*, though it could be as well a form or a variety of this latter. A complete elucidation of this problem might be done only on the basis of specific protein patterns.

REFERENCES

1. ANTOKOLSKAYA M. P., Bull. Pl. Prot., Leningrad, 1932, 5, 1.
2. BUCHWALD, N. F., R.A.M., 1949, 28, 1, 546.
3. CARRANZA, J. M., Fitosanit., 1962, 1, 7-8.
4. CHUPP C., Manual of Vegetable Garden Diseases. Ronald Press Co., New York, 1925.
5. CRIȘAN A., Contribuții la cunoașterea biologiei și combaterii ciupercii *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib). De Bary, Ph. D. Thesis, Bucharest University.

Fig. 3. — Influence of the N sources on the linear growth of mycelia and production of sclerotia in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* after 15 days from inoculation. Same legend as Figure 2.

6. GLITS M., Ann. Acad. Hort. Vitic., 1961, 8, 2, 129-139.
7. GOIDANICH G., R.A.M., 1940, 19, 5, 320.
8. LAROUSSE F., R.A.M., 1931, 10, 4, 285.
9. MESSIAEN C. M., LAFON, R., Les maladies des plantes maraichères, I, Paris, 1963.
10. NEWTON W., R.A.M., 1947, 26, 2, 75.
11. PURDY L. H., Phytopath., 1955, 45, 421-427.
12. RAMSEY G. B., J. Agric. Res., 1925, 30, 7, 597-631.
13. RĂDULESCU E., CRIȘAN A., Lucr. št. Inst. Agr., Dr. P. Groza, Cluj, 1961, 17, 163-179.
14. SANDU-VILLE C., LAZĂR A., St. Cerc. St. Biol. St. Agric., 1959, 10, 2, 365-69.
15. TANRIKUT S., VAUGHAN E., Phytopath., 1951, 41, 12, 1099-1103.
16. TOWNSEND B., R.A.M., 1957, 36, 8, 491.
17. WHETZEL H. H., Mycologia, 1945, 38, 6, 664.

Received July 26, 1974.

The "BABEȘ BOLYAI" University
Department of Plant Biology
Cluj-Napoca

The representatives of the *Stipa* genus are not exhaustively known in Romania although special works have already been published so far (Dibora, 1968; Dibora & Roman, 1969). As the researches concerning upon this topic go concentrating, new species are expected to be pointed out also taking into consideration the contribution of the syntheses literature (Taveler, 1974; Martynovskiy, 1975, ined.). It should be recalled, for example, that the species *Stipa pennata* L. is not elucidated yet, since his analysis was not carried out according to the actual knowledge of the problem.

On the occasion of botanical researches performed in the southern tranche of the Meridional Carpathians (Goiaș Mt), *Stipa* specimens were collected which, at first sight, could be assigned to *S. vulcheriana* C. Koch. When carefully examined according to the latest specialty data (Martynovskiy, 1975, a-e), these specimens appeared to belong to *Stipa crassicaulis* P. Smol. subsp. *heterotricha* subsp. nova. The *S. crassicaulis* species has not been previously mentioned in Romania's flora.

Stipa crassicaulis P. Smol.

subsp. *heterotricha* Dibora & Roman subsp. nova

Description. Perennial plant, lax-caespitose, robust, c. 100 (120) cm, with dense and fine hairs under the pubes. Stem leaves are flat, densely pubescent-above and beneath, similarly with the sheath, adaxially shortly ciliate on ribs and on these latter's sides. Ligule c. 5 mm. The basal vegetative-leaves have an obliquely or horizontally emarginately apex and are up to 150 mm long and 3-4 mm wide, abaxially tubercled, adaxially long haired on the ribs apex of late July with hairs.

The hardness of the stem leaves is obviously different from that of the basal (vegetative) leaves.

We have also used the valuable monographs carried out for the *Stipa* genus within the framework of the FLORA EUROPAEA synthesis (Martynovskiy, 1975, ined.).

Stipa crassicaulis P. Smol. subsp. heterotricha Dibora & Roman subsp. nova

It was found that *S. minor* and *S. sclerotiorum* differ in the content of alanine, aspartic acid, glutamic acid, and glycine. The content of these amino acids in *S. sclerotiorum* was higher than in *S. minor*. The difference in the content of these amino acids is not statistically significant.

The morphological characters of *S. sclerotiorum* and *S. minor* are similar. The influence of temperature, pH, carbon and nitrogen sources on the growth of these fungi is similar. The difference in the content of amino acids is not statistically significant.

From the physiological point of view the two isolates are very similar. The influence of temperature, pH, carbon and nitrogen sources on the growth of these fungi is similar. The difference in the content of amino acids is not statistically significant.

Investigations based solely on the physiological reactions observed in *S. sclerotiorum* isolates (temperature differences, pH, a.s.o.) resulted in supposing the existence of some physiological races [1] [15].

A separation between the two fungi cannot be made even on the basis of the symptoms produced, the rot induced being identical. Ramsey [12] points out that a differentiation can be made only when the mycelial growth characters became conspicuous and sclerotia were formed. He also mentions that in the case of cross-inoculations, a separation of species according to their hosts infections is not possible.

The rapid mycelium growth rate, more marked in *S. minor*, as noticed by some authors [13], is a less significant feature.

It seems reasonable to assume that, in the present case, the very slight morphological, biometrical and physiological differences observed, do not justify a separation of the isolates studied into different species. We consider that *S. minor* should be included among the synonyms of *S. sclerotiorum*, though it could be as well a form or a variety of this latter. A complete elucidation of this problem might be done only on the basis of specific protein patterns.

REFERENCES

1. ANTOKOLSKAYA M. P., Bull. Pl. Prot., Leningrad, 1952, 5, 1.
2. BUGNIALD, N. E., R.A.M., 1949, 22, 7, 546.
3. CAMERON, J. M., Fitopatol., 1953, 1, 7-8.
4. CHIPP, G., Manual of Vegetable Garden Diseases, Ronald Press Co., New York, 1933.
5. CUGAN A., Contribuții la cunoașterea biologică și combaterea ciupercii *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, Ph. D. Thesis, Bucharest University.

STIPA CRASSICULMIS SUBSP. HETEROTRICHIA*

BY

G. DIHORU and N. ROMAN

The species *Stipa crassiculmis* evidenced in south-western Romania is described, which is represented in our country by subspecies *heterotricha*. This taxon is characterized by a differentiated hairiness of the leaves: the basal ones are adaxially hairy on the ribs apex, while the stem ones are adaxially glabrous showing dispersed papillae.

The representatives of the *Stipa* genus are not exhaustively known in Romania although special works have already been published so far in this domain (Dihoru, 1968; Dihoru & Roman, 1969). As the researches bearing upon this topics go concentrating, new species are expected to be pointed out also taking into consideration the contribution of the synthesis literature (Tzvelev, 1974; Martinovský, 1975, ined.). It should be recalled, for example, that the species appurtenance of the *Stipa* genus occurring in the Ciucas Mts (Buia, 1941) is not elucidated yet, since its analysis was not carried out according to the actual knowledge of the problem.

On the occasion of botanical researches performed in the southern frame of the Meridional Carpathians (Cozia Mt), *Stipa* specimens were collected which, at first sight, could be assigned to *S. pulcherrima* C. Koch. When carefully examined according to the latest specialty data (Martinovský, 1967 a-c)**, these specimens appeared to belong to *Stipa crassiculmis* P. Smirn. subsp. *heterotricha* subsp. nova. The *S. crassiculmis* species has not been previously mentioned in Romania's flora.

Stipa crassiculmis P. Smirn.subsp. *heterotricha* Dihoru & Roman subsp. nova

Description. Perennial plant, lax-caespitose, robust, c. 160 (180)cm, with dense and fine hairs under the panicle. Stem leaves are flat, densely tubercled-scabrous abaxially, similarly with the sheaths, adaxially shortly aculeolate on ribs and on these latter's sides. Ligule c. 5 mm. The basal (vegetative-shoot) leaves have an obliquely or horizontally cut nonhairy apex and are up-to-100 cm long and 3-4 mm wide, abaxially tubercled-scabrous, adaxially *long haired* on the ribs apex (Plate I, 1), with hairs

* The hairiness of the stem leaves is obviously different from that one of the basal (vegetative-shoot) leaves.

** We have also used the valuable manuscript carried out for the *Stipa* genus within the framework of the FLORA EUROPAEA synthesis (Martinovský, 1975, ined.).

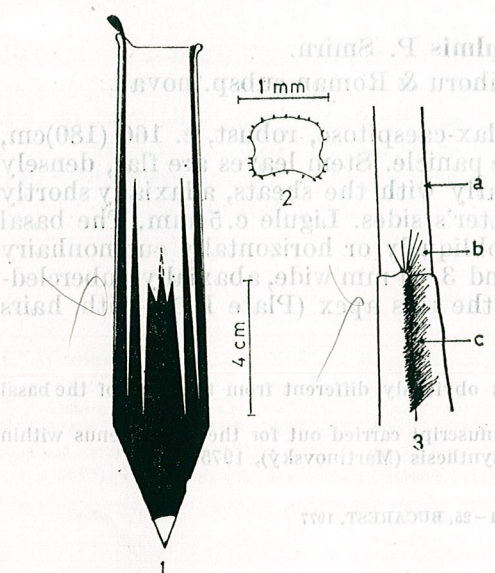
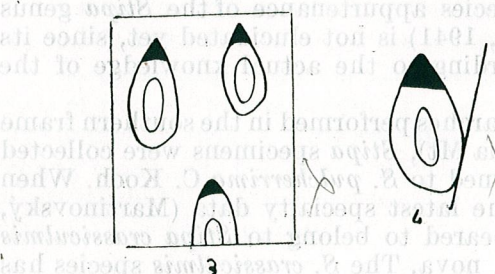
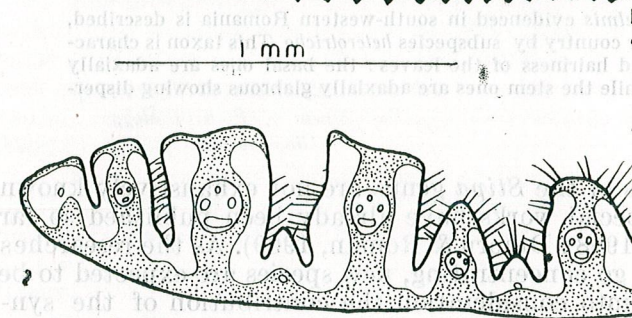
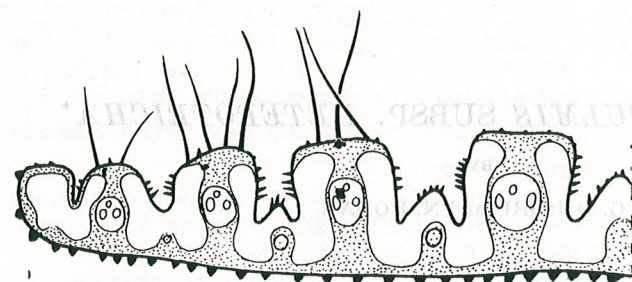


Plate I. — 1, Transversal section in basal leaf of *Stipa crassiculmis* subsp. *heterotricha*. 2, idem, *Stipa pulcherrima*. 3, 4, Aculeoles on abaxial surface of leaves of *Stipa crassiculmis* subsp. *heterotricha*, dorsal (3) and lateral (4).

Plate II. — 1, Lemma of *Stipa crassiculmis* subsp. *heterotricha* (schematically). 2, Transversal section in column. 3, Apex of the lemma (a, base of awn; b, beard on apex of lemma; c, ventral line of hairs).

longer than the ribs width (0.5—0.8 mm, respectively 0.3—0.35 mm), sharply aculeolate on the ribs sides, smooth in the raw state (sometimes slightly concave abaxially), bent when dry, with elliptic section (1.35 : 1.05 mm), with ligule c. 2.3 mm and external margin of sheaths ciliated.

Panicle with 6—8 florets and axes hairy on crests.

Glume 1 : 7.3—10.0 cm ; glume 2 : 9.2—10.6 cm.

Lemma (23)24—27(28) mm, 25.5 mm on the average, bilobed at the apex ; marginal hair line reaches basis of arista and is continued with a beard on the lobes, which exceeds these latter by 1.3—1.5 mm (Plate II, 1 and 3) ; length-variable dorsal line, submarginals c. 2/3 of lemma (Plate II, 1).

Awn 359—497 mm long (424.8 mm on the average) with column of 114—132 mm (121 mm on the average), 0.8—0.85 mm thick, slightly scabrous especially between the genicles (Plate II, 2) where sometimes some hairs are also found. Seta 245—365 mm (304 on the average), with c. 5 mm hairs (Table 1).

Table 1

Dimensions of lemma and awn in 35 fruits (mm)

	dimensions frequencies	23 2	24 7	25 10	26 9	27 6	28 1
a Length of lemma							
b Length of column		114—119 15	121—127 16	128—132 4			
c Length of seta		245— 265	266— 285	286— 305	306— 325	326— 345	346— 365
		4	7	7	10	5	2

The species under study fructifies between the end of June and the beginning of July.

Station. In arid zones, on brown mountainous skeletal soil, formed on gneisses ; south-south-eastern exposure, at c. 800—900 m.

Areal. The south-western zone of Romania, in the Meridional Carpathians.

Locus classicus. The Olt gorges, at the foot of the Cozia Mt, in the rocky clearings occurring between the Turneanu and the Armăsaru valleys (leg. N. Roman, 1975).

Type. The species is preserved in the herbarium of the Institute of Biological Sciences, Bucharest (BUCA, nr. 128642).

Coenology. It cohabits with a large group of xerothermophilic species, among which most important are the following : *Acinos alpinus major anifolius*, *Chamaecytisus hirsutus*, *Achillea erithmifolia*, *Thymus comosus*, *Phleum montanum*, *Linaria genistifolia*, *Fraxinus ornus*, *Stachys recta labiosa*, *Inula hirta*, *Veronica bachofenii*, *Melica ciliata*, *Delphinium fissum*, *Lychnis coronaria*, *Alyssum murale*, *Potentilla thuringiaca*, *Dictamnus albus*, *Dianthus giganteus*, *Cotinus coggygia*, *Iris aphylla*, *Genista januen-*

sis, *Cnidium silaifolium*, *Carduus candicans*, *Ferulago sylvatica*, *Trifolium alpestre*, etc.

Both the isolated growth point and the long hairiness occurring on the apex of the vegetative-shoot leaf ribs — species diagnema in other numerous cases (Martinovský, 1975, inedited) — differentiate our plants as a local subspecies:

***Stipa crassiculmis* P. Smirn.**

subsp. ***heterotricha*** Dihoru et Roman subsp. nova

Descriptio. A subspeciebus *crassiculmis* (Kopet-Dagh) et *euroanatolica* Martinovský (e Europa meridionali ac centrali) per pilositatem foliorum differt: nam folia surculorum vegetativorum adaxialiter in apice, costarum pilos, 1,5–2,0 plo longiores (0,5–0,8 mm) quam costarum latitudine (0,3–0,35 mm) gerant; illa caulinarum glabra, cum nonnullis papillis in costis instructa. Lemma (23) 24–27 (28) mm longa.

Statio. In locis aridis, solo brunneo-montano, sceletico, gneissaceo, expositione meridionali, alt. 800–900 m.

Area geographica. Regione australo-occidentali Carpatorum meridionalium Romaniae.

Locus classicus. In angustis fluminis Olt (Aluta) ad locus glareosos radicum montis Coziae intra valles Turneanu et Armăsarū dictos (leg. N. Roman, 1975).

Holotypus in Herbario Institutii Scientiarum Biologicarum Bucurestiense (BUCA nr. 128642) conservatur.*

Observations. *Stipa crassiculmis* is a relict species in Romania's flora which has differentiated as local subspecies in the Olt gorges, on arid rocky slopes. Its flat, wide leaves, as well as lemma's hairiness bring this species near to *S. pulcherrima* C. Koch which, on the contrary, has short hairs (not aculeoles) on the ribs sides (Plate I, 2), shorter, apex beardless lemma.

Subspecies *heterotricha* differs from *S. dasyphylla* Czern., which has soft hairy-on-both-sides leaves. It is easily differentiating it also from *S. glabrata* P. Smirn. and from *S. austroitalica* Martinovský, which have hairs on the leaf ribs, but their lemmas do not exceed 22 mm (Rojevitz, 1934; Tzvelev, 1974; Martinovský, 1975 inedit.). It differs from subsp. *crassiculmis* (Kopet-Dagh) and from subsp. *euroanatolica* Martinovský (1967 a) (=subsp. *macedonico-anatolica* Martinovský (1967 c) nom. nud.) by the differentiated hairiness of the leaves: those occurring on the vegetative shoots have adaxially on the ribs apex 0.5–0.8 mm long hairs by 1.5–2.0 times longer than the ribs width (0.3–0.35 mm); the stem leaves are glabrous, with a few papillae on the ribs. Lemma (23) 24–27(28) mm long.

The differences between the species occurring in our country also result from the determination key*:

- 1 Seta *scabrous* — 1. *capillata* L.
Seta *plumose* — 2
- 2 Column densely *hairy* — 2. *danubialis* Dihoru & Roman
Column smooth or *scabrous*, *glabrous* (rarely with scattered hairs) — 3
- 3 Lemma 8–11 mm, with a ring of hairs at the apex — 3. *lessingiana* Trin.
Lemma 13–28 mm, without a ring of hairs at the apex — 4

* Latin diagnosis by G. Váczky.

** In order to evidentiate the diagnemas cross sections through the basal leaves should be carried out.

- 4 Apex of bazal leaves *setaceous*, their ligule c. 0.3 mm — 4. *tirsa* Čelak.
Apex of bazal leaves *obtuse* or *acute*, their ligule c. 0.5 mm — 5
- 5 Abaxial leaf-surface *hairy* — 6
Abaxial leaf-surface *glabrous*, sometimes *scabrous* — 7
- 6 Lemma 17–19 mm, ventral line of hairs 2–4 mm below of apex; abaxial leaf-surface rigid-hairy — 5. *ucrainica* P. Smirn.
Lemma 19–23 mm, ventral line of hairs to *apex*; leaves long and soft hairy on both surfaces — 6. *dasyphylla* Czern.
- 7 Ventral line of lemma 2–4 mm below of apex — 8
Ventral line of lemma to *apex* (or c. 1 mm below of it) — 10
- 8 Basal leaves 0.4–0.6 mm in diameter, abaxial surface *acute scabrous* — 5. *ucrainica* P. Smirn. (see level 6).
Basal leaves 0.6–1.0 mm in diameter, abaxial surface *smooth* or weakly *scabrous* — 9
- 9 Lemma (14) 17–18(20) mm, sheaths cauline leaves *smooth* — 7. *joannis* Čelak.
Lemma c. 21 mm, sheaths of cauline leaves *scabrous* — 8. *sabulosa* (Pacz.) Sljuss.
- 10 Basal leaves with *long hairs* on adaxial surface (on ribs) — 9. *crassiculmis* P. Smirn. subsp. *heterotricha* Dihoru & Roman.
Basal leaves *without* long hairs on adaxial surface — 11
- 11 Sides of ribs with very short *aculeoles* — 12
Sides of ribs with short *hairs* — 13
- 12 Lemma over 23 mm; abaxial leaf-surface *scabrous* — *crassiculmis* P. Smirn. subsp. *euroanatolica* Martinovský/*
Lemma to 22 mm; abaxial leaf-surface *smooth* — 10. *epilosa* Martinovský**
- 13 Abaxial leaf-surface *smooth*; column *straw-coloured*, *scabrous* — 11. *eriocaulis* Borbás.
Abaxial leaf-surface *scabrous*; column *brown*, *smooth* — 12. *pulcherrima* C. Koch.

REFERENCES

1. BUTA AL., Bul. Grăd. Bot. Cluj, 1941, **21**, 3–4, 132–133.
2. DIHORU G., Stud. Cerc. Biol. - Bot., 1968, **20**, 2, 95–106.
3. DIHORU G., ROMAN N., Rev. roum. Biol. - Bot., 1969, **14**, 1, 21–27.
4. MARTINOVSKÝ J., Bot. Jb., 1967 a, **87**, 4, 383–398.
5. MARTINOVSKÝ J., Preslia (Praha), 1967 b, **39**, 260–275.
6. MARTINOVSKÝ J., Bot. Közlem., 1967 c, **54**, 1, 45–52.
7. MORARIU I., *Stipa* in: Săvulescu (edit.), *Flora R. S. Romania*, **12**, 1972.
8. ROJEVITZ R., *Stipa* in: Komarov (edit.), *Flora U.R.S.S.*, **2**, 1934.
9. TZVELEV N., *Poaceae* in: Fedorov (edit.), *Flora evropeiskoi ciasi S.S.S.R.*, **1**, 1974.

Received October 11, 1976

The Institute of Biological Sciences
Spl. Independenței nr. 296
Bucharest

* Taxon replaced in our country by *S. crassiculmis* subsp. *heterotricha*.

** Martinovský (*Stipa*, 1975 inedit.) notes from Romania *Stipa epilosa* Martinovský (1967 b) which differs from *S. eriocaulis* Borbás only by the length of the aculeoles on the ribs sides (0.01 mm as against 0.04 mm), a fact we consider insufficient for separating the two species from each other. As a consequence of these differentiations, the presence of species *S. eriocaulis* should be confirmed in the country's flora (?)

SUR L'ÉTUDE ET LES PROBLÈMES DE LA FLORE ET DE LA VÉGÉTATION CAVERNICOLE

PAR

L. GRUIA

Après un court résumé des œuvres portant sur les plantes des cavernes, l'auteur soulève le problème de la source d'énergie des algues vivant habituellement dans les profondeurs des cavernes. L'auteur mentionne que la nutrition saprophyte ou les radiations infrarouges comme source énergétique n'expliquent pas leur existence. Il suppose que les algues cavernicoles peuvent utiliser — dans leurs processus endoénergétiques — des radiations invisibles, d'une longueur d'onde petite, devenue plus grande par un processus de fluorescence endocellulaire. Elles sont utilisables directement par les pigments chlorophylliens d'assimilation. En tant que réponse au problème de la source énergétique des algues cavernicoles, l'auteur propose des études complexes sur les cavernes, sur les algues qu'on y trouve, ainsi que sur l'environnement.

La flore des cavernes a été mentionnée dès 1760 par l'autrichien J. V. Skopoli, mais ce n'est qu'en 1835 que Welwitsch a étudié minutieusement la flore des cavernes d'Autriche. Pokorny, en 1853, a développé ce sujet, mais une étude détaillée sur ce problème n'a été élaborée qu'en 1906 par J. Maheu. De nos jours, les études de spéobotanique se sont diversifiées et se sont spécialisées.

Dans notre pays les cavernes ont été longtemps négligées du point de vue botanique. En 1949, E. Pop [45] cite des bactéries nitrifiantes de la grotte de Scărișoara. Après cette date, M. Șerbănescu et V. Decu [50], L. Gruia [21], se préoccupent des algues cavernicoles, E. Nestorescu [41] de certaines bactéries des mines et Tr. Ștefureac des bryophytes de l'entrée des grottes [51].

Le premier problème soulevé par les plantes des cavernes se réfère à leur existence dans des avens et à l'entrée des grottes, et à leur dépendance stricte de la quantité de lumière qui diminue proportionnellement à la profondeur de référence à l'entrée [29]. Zmuda, en 1915, établit que la végétation chlorophyllienne disparaît lorsque le substrat reçoit moins de 1/2 000 de la lumière normale [2]. Les modifications subies par les plantes supérieures sous l'influence des conditions cavernicoles sont, d'après la mention faite par E. A. Martel [29], des adaptations passagères. Dans les conditions cavernicoles, les plantes supérieures ne donnent pas des formes et des variétés stables et capables de multiplication. D'autres plantes, inférieures aux mousses et aux lichens, comme seraient les bactéries, les moisissures et les champignons, peuvent vivre et vivent réellement dans les conditions cavernicoles, accomplissant complètement leur cycle vital. Celles-ci sont toutefois des plantes dénuées de chlorophylle et, en conséquence, nullement affectées par la lumière, étant parfois même

favorisées par les conditions cavernicoles. Leur existence est toutefois déterminée par la possibilité d'avoir leur nourriture assurée [28], [29]. C'est pour cela que les organismes végétaux hétérotrophes saprophytes sont présents dans les cavernes, indifféremment à la profondeur de référence. Le groupe des bactéries chimiosynthétisantes est présent aussi dans les cavernes, mais en fonction des possibilités de nourriture qui, elles, ne dépendent pas du facteur lumière. Un groupe de végétaux qui présentent un intérêt particulier par leur présence et leur existence dans des cavernes est celui des algues. En effet, beaucoup de recherches mentionnent la présence dans les cavernes des algues les plus diverses. Si l'existence de cette catégorie de plantes dans les cavernes ne peut pas être mise en doute, il nous faut rédiger l'inventaire floral de chaque caverne, en étudiant ensuite les problèmes y impliqués :

— Les modifications anatomo-morphologiques subies par les plantes, en fonction de leur passage graduel des conditions terrestres vers celles cavernicoles.

— Le mode de pénétration des plantes dans les cavernes.

La présence des plantes dans les cavernes marines et leurs modifications anatomo-morphologiques.

— L'étude de la végétation des microphytes des cavernes en fonction des conditions existantes (surtout les possibilités de nourriture) et des nécessités de chaque espèce ou groupe de végétaux, en partant de l'entrée vers les profondeurs des cavernes.

A côté du mode de dispersion, l'existence de la base trophique pour les différents groupes de végétaux dans les cavernes est essentielle à l'explication de la présence des plantes vivantes dans les cavernes. Le problème actuel le plus important de la flore chlorophyllienne dans les cavernes se réfère à leur mode de nutrition, respectivement à la ressource énergétique de ces plantes. Nous nous référons particulièrement à l'existence dans les cavernes — dans l'obscurité absolue — de certaines algues vivantes dans des formes actives de vie [8], [9], [10], [21], [22], [25], [26], [38], [43], [52]. En ce qui concerne cette situation, il y a plusieurs explications :

1. La première explication est que les algues respectives sont amenées dans les cavernes par l'eau des ruisseaux qui traversent les cavernes, ou par l'eau d'infiltration [13], d'une manière presque continue et permanente. Nous pensons que le fait de trouver certaines algues bleues-vertes comme noyau de formation des perles de caverne [11], peut être expliqué par leur arrivée dans la caverne simultanément avec l'eau d'infiltration, jusque dans les gouttes d'eau des stalactites. Le problème reste encore ouvert, mais il ne faut pas oublier que souvent les espaces par lesquels passe l'eau qui forme des stalactites sont de dimensions moléculaires, et les fragments d'algues bleues-vertes n'auraient, en aucun cas, assez de place pour passer.

2. Une seconde explication c'est que les algues peuvent arriver vivantes dans les cavernes, apportées par les courants d'air, par l'homme ou par d'autres animaux [13].

Les deux explications sont basées sur l'existence, dans les cavernes, de certaines algues identiques — comme taxons — à celles du sol [13], sur la durée de vie très longue de certaines algues [13], ainsi que sur la

grande résistance, variabilité et adaptabilité des algues aux différentes conditions de vie.

3. Une troisième explication c'est que certaines algues peuvent vivre, au moins un certain temps, dans les conditions de l'absence totale de la lumière, grâce à leur possibilité de passer à une nutrition saprophyte en présence de certaines substances organiques facilement dégradables [13].

A première vue il paraîtrait que ces trois explications sont suffisantes pour l'existence de la flore des algues dans les cavernes. Nous considérons toutefois que, si chacune de celles-ci séparément est parfaitement viable, toutes les trois ensemble n'expliquent pas suffisamment l'existence d'une flore algologique dans les cavernes, d'autant plus que les premières deux explications se réfèrent d'avantage au mode de pénétration des algues dans les cavernes. D'ailleurs, en 1919 déjà, E. A. Martel affirme qu'« en complète obscurité ne se développent que les champignons et quelques algues ». On peut considérer que cette affirmation ignore la manière de pénétration des algues dans les cavernes, leur capacité de résistance, d'adaptabilité ou de nutrition saprophyte, mais nous ne sommes pas d'accord avec cette objection.

C'est le cas d'intervenir ici pour établir le parallélisme existant entre les conditions de vie dans les profondeurs des sols vierges et les conditions cavernicoles. La différence essentielle on la trouve dans la composition de l'air et dans la base trophique qui est plus riche pour le sol que pour les cavernes [24]. Dans le sol, aussi bien que dans les cavernes, le problème se pose du mode de nutrition des algues, en dehors de celui saprophyte — exclus parce que pas toutes les algues trouvées dans le sol peuvent passer au saprophytisme et parce que pas toujours et pas partout où des algues ont été trouvées dans le sol il y avait aussi des substances organiques facilement dégradables.

Pour les algues du sol, le problème de la ressource énergétique est partiellement résolue, dans le sens que quelques-unes peuvent utiliser comme source d'énergie les radiations infrarouges pénétrant dans le sol jusqu'à des profondeurs d'environ 1 m [27].

Théoriquement, les algues des cavernes profondes peuvent photosynthétiser par un processus similaire à la fluorescence, c'est-à-dire par la transformation des radiations à petite longueur d'onde en radiations à longueur d'onde plus grande (correspondant à la lumière visible). La fluorescence n'est autre chose que le phénomène suivant lequel la lumière est libérée ; c'est ainsi que l'objet qui produit la fluorescence devient visible. Or, la chlorophylle a aussi la propriété de fluorescence, que celle de se former dans l'obscurité [18]. Nous pouvons supposer que dans les conditions cavernicoles, les algues transforment — par fluorescence — des radiations à longueur d'onde plus petite que le spectre visible en lumière, mais en quantité infime, qui est utilisée intégralement dans la photosynthèse ; donc, les algues n'apparaissent pas visibles. Les pigments chlorophylliens absorbent des radiations à différentes longueurs d'ondes. Une étude quantitative des pigments chlorophylliens des algues cavernicoles mise en corrélation avec l'étude des radiations existantes dans la caverne respective, donnerait une réponse portant sur le mode de nutrition des algues dans l'obscurité complète. De même, comme l'absorption des radiations à grande longueur d'onde (visibles) est étroitement liée et déterminée par la

présence des liaisons métallo-organiques dans la molécule de la chlorophylle, il peut signifier que, dans le cas de la chlorophylle des algues cavernicoles, le nombre de ces liaisons serait petit; une étude sur celles-ci donnerait aussi des indications précieuses concernant le mode de nutrition des algues dans l'obscurité.

En conclusion, nous croyons que l'étude des algues cavernicoles devrait comprendre tous les problèmes concernant leur répartition dans différentes cavernes en tenant compte de leur stade ontogénétique — le système de radiations des cavernes, leur régime hydrologique mis en corrélation avec le système carstique environnant, l'influence de la flore des algues aquatiques et édaphiques de l'environnement sur la flore des algues des cavernes, ainsi que leur morphologie, anatomie et biochimie.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOROȘ A., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 45—46.
2. CAUMARTIN V., Notes biospéol., Paris, 1957, 57—64.
3. CAUMARTIN V., Ann. de Spéléol., Moulis-Ariège, 1959, 14, 1—2, 147—157.
4. CAUMARTIN V., Spelunca Memoires, 1962, 2, 99—103.
5. CAUMARTIN V., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 1—12.
6. CAUMARTIN V., Bull. Scient. de Bourgogne, Dijon, 1967, 24, 39—56.
7. CAUMARTIN V., Bull. Scient. de Bourgogne, Dijon, 1970, 25, 87—103.
8. CLAUS G., Hidrobiologia, Haga, 1962, 19, 2, 192—222.
9. CLAUS G., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 13—18.
10. CLAUS G., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 541—552.
11. COPPENOLLE J. C., L'électron, Bruxelles, 1971, 1, 49—52.
12. DOBAT K., Rasegna Speleologica Italiana, 1963, 15, 4, 164—165.
13. DOBAT K., Ann. de Spéléol., Moulis-Ariège, 1970, 25, 4, 871—907.
14. DUVIGNEAUD I., Les Troglodytes, Namur, 1952, 1, 3, 10—11.
15. FEODOROV M. V., Microbiologia solului, București, Edit. Agrosilvică, 1957, 104—120.
16. FRIEDMAN I., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 29—34.
17. GARKUSA I. F., Potchivovédénie, Leningrad-Moscova, Selhozizdat, 1962, 36—51.
18. GODNEV T. N. et collab., Fiz. rast., 1959, 6, 1, 36—41.
19. GOUNOT A. M., Ann. de Spéléol., Moulis-Ariège, 1967, 22, 19—125.
20. GOUNOT A. M., Ann. de Spéléol., Moulis-Ariège, 1969, 24, 3, 595—601.
21. GRUIA L., Rev. Algologique, Paris, 4, 290—294.
22. GRUIA L., Natura, 1969, 6, 68.
23. HOLLERBAH M. M., STINA E. A., Potchivenyé vodorosti, Izd. Nauka, Leningrad, 1969.
24. HORST ROY, Bull. Nat. Speleol. Soc., Columbia-SUA, 1972, 34, 2, 49—54.
25. JONES H. J., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 491—516.
26. KOL E., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 19—24.
27. KRASILNIKOV N. A., Mikroorganizmy potchiv i vyschie rastenija, Moscova, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1958, 161—162.
28. LOHWAG K., Die Höhle, 1961, 1, 21—24.
29. MARTEL E.-A., L'Évolution souterraine, Paris, Ed. E. Flammarion, 1919.
30. MASON-WILLIAMS A., Actes 4^e Congr. Int. Spéléol., Ljubljana, 1965, 4—5, 161—166.
31. MORTON F., Le grotte d'Italia, Udine, 1938, ser. 2-a, 2—16, 1—39.
32. MORTON F., Le grotte d'Italia, Trieste, 1941, ser. 2-a, 20, 1—8.
33. MORTON F., Mitt. der Höhlenkommission, Wien, 1955, 41—53.
34. MORTON F., Die Pyramide, 3, 87—89.
35. MORTON F., Jahr. des Oberösterreichischen Musealvereines, Linz, 1967, 112, 269—275.
36. MORTON F., Rass. Speleol. ital., Como, 1969, 21 (14), 50—53.
37. MOTAȘ C., DECOU V., BURGELE A., Ann. de Spéléol., Moulis-Ariège, 1967, 22, 3.
38. NAGY J. P., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 479—490.
39. NEGREA ȘT., NEGREA A., SENCU V., BOTOȘĂNEANU L., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 379—439.

40. NEGREA ȘT., NEGREA A., Lucr. Inst. Speol. «Emil Racoviță», 1968, 7, 79—148.
41. NESTORESCU E., Rev. Ecol. Biol. Sol., 9, 3, 549—553.
42. ORGHIDAN TR. et collab., Lucr. Inst. Speol. «Emil Racoviță», 1965, 4, 75—104.
43. PALIK P., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 35—44.
44. PEIVE IA. V., Biohimiia potchiv, Moscova, Selhozghiz, 1961.
45. POP E., Bul. St. St., Cluj, 1949, 1, 9.
46. POP E., SĂLĂGEANU N., PÉTERFI ST., CHIRILEI H., Manual de fiziologia plantelor, București, Edit. Did. și Pedag., 1957, 1.
47. POULSON L. T., Bull. Nat. Speleol. Soc., Columbia-SUA, 1972, 34, 2, 55—59.
48. SENCU V., NEGREA ȘT., NEGREA A., BOTOȘĂNEANU L., Trav. de l'Inst. de Spéol. «Emile Racovitza», 1971, 10, 43—70.
49. SUBA E., Verh. der Zool. Bot. Geselsch. in Wien, 1957, 97.
50. ȘERBĂNESCU M., DECU V., Rev. Roum. Biol., 1962, 7, 2, 201—214.
51. ȘTEFUREAC TR. I., Bryophytes trouvées à l'entrée de quelques grottes de Roumanie. Livre du centenaire E. Racovitza, Acad. de la Rép. Soc. de Roumanie, 1970.
52. VAN LANDINGHAM S. L., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 517—540.
53. VERSEGHY K., Int. Journ. of Speleol., Weinheim, 1964, 1, 553—560.

Reçu le 19 juillet 1974

Laboratoire de l'Algologie
Station Zoologique Sinaia

telle qu'elle a été définie et décrite par K.L. Vinogradova [6]. Nous allons examiner successivement les principaux caractères distinctifs de cette plante, de façon à y apporter des précisions utiles.

Tout d'abord, dans la région stipale, on observe facilement l'image qu'en donne Bliding [1] et aussi Vinogradova [6] pour l'*Enteromorpha linza*. Cependant, la disposition des cellules en rangées régulières est, dans le cas de notre plante, beaucoup plus nette. Dans la région stipale les cellules sont des dimensions plus grandes que dans le reste du thalle. Vers la base du stipe, ces cellules sont intensément colorées, piriformes, orientées dans le sens de la longueur du thalle et se prolongent en longs rhizoïdes à membrane épaissie; elles mesurent en moyenne $24 \times 14 \mu$; $27 \times 16 \mu$.

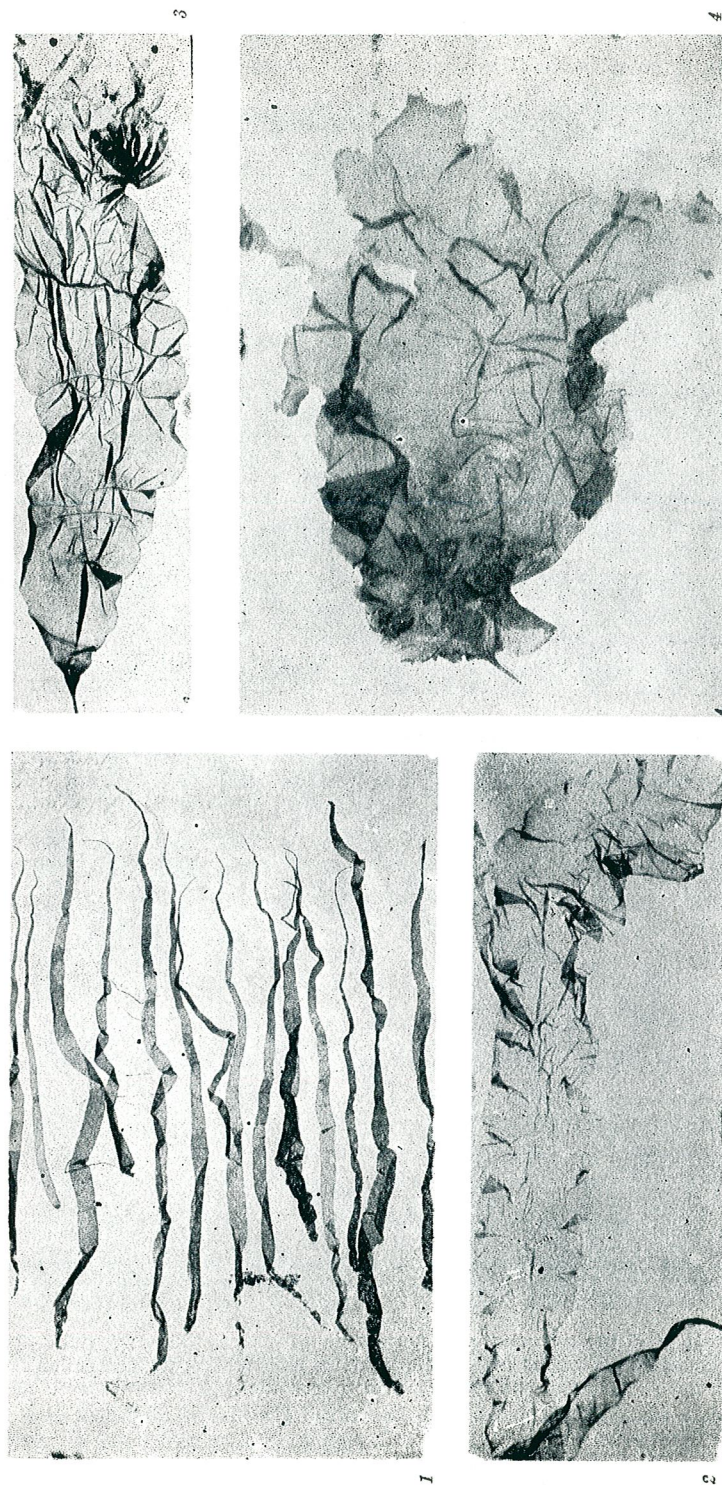
De même, les cellules d'au-dessus de la partie rhizoïdale du thalle ont des dimensions plus grandes que les cellules de la partie élargie de ce dernier, mesurant approximativement $16 \times 17 \mu$, tandis que dans le reste, les dimensions de cellules ne dépassent pas $8 \times 10 - 11 \mu$, $8 - 13 \mu$, $10 \times 13 \mu$. La division des cellules au moyen des parois obliques est très fréquente et cela finit par troubler la disposition des cellules en séries régulières longitudinales et transversales au-dessus de la région stipale. Dans la partie élargie du thalle, les cellules régulièrement alignées ne forment plus que des îlots ou des plages d'une étendue variable (Pl. 2, 1). Parmi ces îlots à alignement de sens longitudinal et transversal se trouvent des centres de croissance entourés de rangées circulaires et concentriques de cellules — disposition indiquée comme propre à l'*Enteromorpha intestinalis*. Parfois on observe de même plusieurs couches concentriques de cellules entourant des îlots de cellules à alignement régulier.

Ces deux particularités des structures, les îlots de cellules en rangées régulières et des rosettes de cellules en rangées circulaires et concentriques ne sont pas signalées et semblent ne pas exister chez les *Enteromorpha linza* provenant de la baie de Novorossisk et décrites par Vinogradova.

Comme on le sait, selon les travaux récents [1], [3], [6], les caractères essentiels pour l'identification des espèces du genre *Enteromorpha* sont les caractères du chromatophore et le nombre de ses pyrénoides. Le chromatophore de notre plante est en forme de plaque pariétale, appliquée contre la paroi externe de la cellule et dont les bords semblent descendre sur les côtés à mi-hauteur des parois latérales.

Vues de face, les cellules au contour rectangulaire ou carré apparaissent entièrement colorées en vert. C'est donc un chromatophore dont l'aspect est caractéristique pour l'*Enteromorpha linza*. Ce chromatophore présente les mêmes perforations indiquées pour *E. linza* par Dangeard [3], et se trouve pourvu d'un ou deux gros pyrénoides. Dans la région stipale et immédiatement au-dessus, les pyrénoides sont plus fréquemment en nombre de deux ou trois, ou même quatre (Pl. 2, 2).

L'étude d'un grand nombre d'exemplaires, fait ressortir une tendance à la variabilité. Ainsi, certains exemplaires présentent des portions de fronde constituées entièrement des plages de cellules disposées en cercles concentriques. D'autres ont des cellules qui ne dépassent pas $8-9 \mu$. Chez d'autres encore, la région stipale ne se distingue en rien de la région basilaire de la fronde, étant formée des cellules polygonales-arrondies, plus ou moins allongées, mais cependant disposées en séries longitudinales et



dières entre la forme de l'extrémité sud du bassin et la forme ulvoïde; 4, Forme ulvoïde (grandeur naturelle: $30 \times 13 \text{ cm}$).

Planche 1. — 1, Echantillon récolté sur les parois du quai d'amarrage (grandeur naturelle: $10-12 \text{ cm}$); 2, Echantillon récolté à l'extrémité sud du bassin; 3, Exemplaire aux caractères intermé-

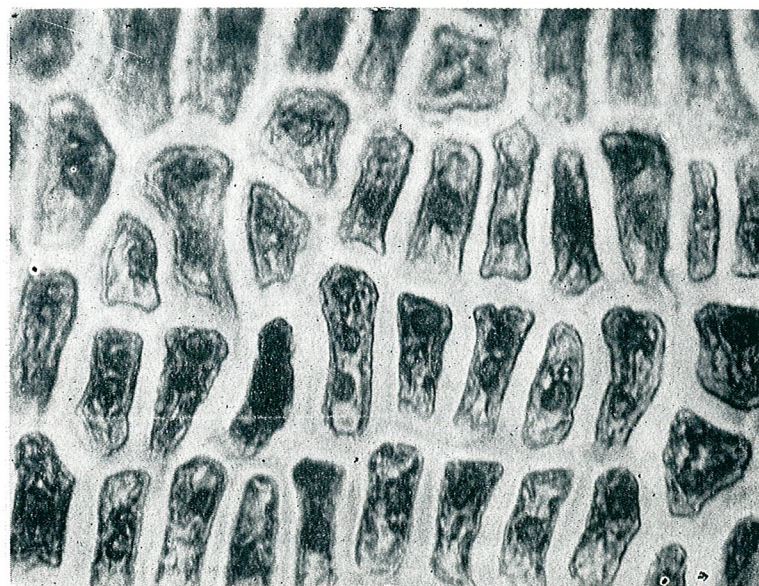
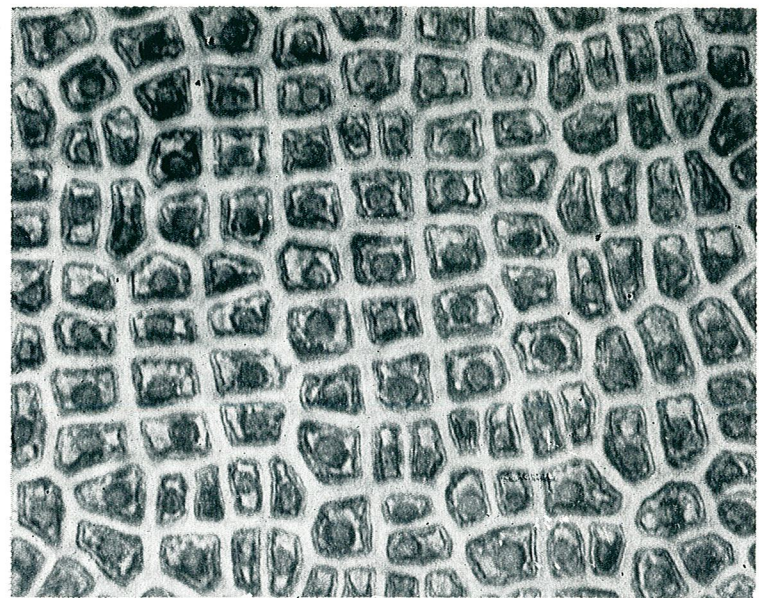


Planche II. 1 «Îlot» de cellules disposées en séries régulières; 2, Cellules au-dessus de la région rhizoïdale à deux pyrénoides; au centre on voit une cellule à trois pyrénoides.

transversales. Dans une autre variante, présentant des îlots des cellules à disposition régulière, ces dernières ont des dimensions plus grandes que les cellules de la région basilaire; en même temps les cellules à deux pyrénoides sont rares. Enfin, on rencontre des plantes lesquelles, tout en gardant certains caractères, essentiels du type, présentent une disposition irrégulière des cellules penta- et hexagonales, comme dans l'*Enteromorpha intestinalis*; en même temps, les îlots des cellules à disposition régulière en séries longitudinales et transversales sont très réduits.

Malgré leurs dimensions plus grandes et une coloration différente, les plantes croissant à l'extrémité sud du bassin présentent les mêmes caractères de la structure anatomique et d'organisation cellulaire que les plantes récoltées sur les parois du quai d'abordage. Cependant, dans la même station où furent prélevés les échantillons de ce deuxième groupe, mais à une profondeur de quelques deux mètres, donc du côté des fonds vaseux, on a pu récolter une troisième forme, très différente des deux premières. Il s'agit des plantes aux dimensions exceptionnelles, pouvant dépasser 30 cm en hauteur et 12 cm en largeur. D'un vert assez foncé, la plante présente une surface inégale, chiffonnée et se trouve fixée par un stipe le plus souvent très court, presque nul (Pl. I, 3, 4). L'existence des formes portuaires semblables — «Hafenformen» — est d'ailleurs signalée par plusieurs auteurs, comme Hylmö [5] et Bliding qui les ont rapportées à l'*Enteromorpha linza*. E. S. Zinova [7] les rapporte à l'*Enteromorpha compressa*; d'après Vinogradova, E. S. Zinova a eu à faire à un *Enteromorpha linza*.

En dépit de sa morphologie externe, qui la fait ressembler plutôt à un Ulva, les caractères de la structure anatomique de cette troisième forme ne diffèrent pas de ceux décrits plus haut et dont l'ensemble constitue la caractéristique de la population tout entière du port Tomis. On n'aurait à signaler de plus qu'un épaississement considérable des parois cellulaires dans la partie basilaire du thalle; ensuite, l'absence d'une zone de passage, aux cellules de dimensions plus grandes, entre la zone rhizoïdale et les cellules de la partie élargie du thalle, lesquelles n'ont que $13,5 \times 10 - 11 \mu$; $11 \times 8 \mu$. Dans les «îlots», les cellules présentent une régularité surprenante dans leur disposition en séries transversales et longitudinales. Les centres de croissance avec une disposition de cellules en cercles concentriques sont très nombreux; souvent, les îlots mêmes des cellules à disposition régulière se trouvent encerclés par deux ou plusieurs couches concentriques de cellules. Un important caractère d'organisation cellulaire est constitué par la fréquence des cellules à deux gros pyrénoides non seulement dans la région stipale et dans le voisinage immédiat de cette région, mais dans le thalle tout entier. Sur des coupes transversales les deux strates de cellules du thalle sont adhérentes les unes aux autres; leurs parois internes ne sont pas épaissies. L'épaisseur du thalle est de $35 - 40 \mu$ et la hauteur des cellules sur des coupes transversales est de $20 - 21 \mu$.

D'après Hylmö [5], les formes portuaires, caractérisées surtout par une grande largeur du thalle, sont des formes «d'acquae tranquillae». Dangeard [3] signale des formes ulvoïdes pour des bassins abrités. La forme ulvoïde du bassin portuaire de Tomis, ainsi que l'on a vu plus haut, ne se rencontre qu'à une certaine profondeur. D'ailleurs on a pu constater l'existence des formes intermédiaires entre les échantillons à thalle en ruban et ces «Hafenformen» typiques.

CONCLUSIONS

1. La population d'*Enteromorpha* du port Tomis comprend des plantes manifestant une assez grande variabilité morphologique.
2. La présence de l'*Enteromorpha linza* dans la mer Noire est conditionnée par un degré élevé de pollution [6]. Son caractère écologique et certains caractères anatomiques (la structure de la région rhizoïdale et celle du cromatophore) nous permettent de rapporter les plantes de la population étudiée à l'espèce *Enteromorpha linza*, telle que Vinogradova l'a définie.
3. Cependant, aucune des descriptions d'*E. linza* ne signale pas les deux particularités de structure très caractéristiques pour les plantes du port de Tomis, rapportées par nous à l'espèce *E. linza*: l'existence dans la partie élargie du thalle des ilots des cellules régulièrement alignées et l'existence des rosettes formées par des cellules disposées en cercles concentriques. De ces deux particularités de structure l'une est propre à l'*E. compressa* et l'autre à l'*E. intestinalis*.
4. Les particularités de structure signalées plus haut, ainsi que l'existence des divisions cellulaires au moyen des parois obliques, les dimensions réduites de cellules et la pluralité des pyrénoides, font de la plante étudiée par nous une forme d'*Enteromorpha* aux caractères intermédiaires, ce qu'on a trouvé plus d'une fois parmi les espèces du genre *Enteromorpha* [3].
5. Les dimensions plus réduites des cellules du thalle peuvent être une traduction morphologique de l'isolement physiologique des populations algales du littoral roumain de la mer Noire.
6. Dans une note antérieure, nous avons signalé l'existence, dans les différents points du littoral roumain, d'une forme d'*Enteromorpha* rapportée également par nous à l'*E. linza* [2]. Une précision sur l'affinité entre cette dernière, étudiée seulement sur des échantillons d'herbier, et les *Enteromorpha* du port Tomis exige une étude supplémentaire sur des échantillons vivants.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLIDING C., A. Opera Botanica Soc. Bot. Lundensis 1963, 8; 3.
2. CELAN M., BAVARU A., Rev. roum. Biol. Botanique, 1967, 12, 1.
3. DANGEARD P., BOTANIST, 1960, 43.
4. HAMEL G., Rev. Algol., 1931, 4.
5. HYLMO D. E., Arch. för Bot. 1916, 14.
6. VINOGRADOVA K. L., Species generis *Enteromorpha* a sinu Novorossijskensi et vicinitate eius. — *Novitates systematicae plantarum non vascularium*. Akad. Nauk SSSR, 1966.
7. ZINOVA A. D., *Opérédelitek zelenyh, buryh i krasnyh vodoroslei iujnyh morei S.S.S.R.*, «Nauka», Moskva. Leningrad, 1967.

Reçu le 20 juillet 1975

Institut pédagogique, Constanța,
Bd. V. I. Lenin nr. 124

RECHERCHES MYCOÉCOLOGIQUES DANS LE BASSIN SUPÉRIEUR DE LA RIVIÈRE DE SUCEAVA

PAR

AL. MANOLIU et M. RUSAN

Ce travail porte sur quelques observations faites à l'égard des micromycètes du bassin supérieur de la rivière Suceava.

On présente les variations saisonnières de quelques micromycètes (*Peronosporaceae*, *Erysiphaceae* et *Uredinales*) ainsi que la présence et la fréquence des micromycètes en fonction de certains indicateurs écologiques qui caractérisent les écotopes où vivent les plantes hôtes. On a poursuivi également la présence des micromycètes parasites et saprophytes sur diverses catégories de plantes fourragères.

Les investigations sur la flore et la végétation effectuées par les géobotanistes du Centre de recherches biologiques de Iași, commencées pendant le printemps de l'année 1971 dans le bassin supérieur de la rivière Suceava, ont été accompagnées par des études mycologiques, pour contourner d'une manière plus précise certains aspects, non seulement floristiques mais, particulièrement, écologiques. Avant nos études, on ne connaissait dans cette zone que 60 espèces de micromycètes, les premières mentions mycofloristiques datant de l'année 1921. Dans un travail antérieur on a présenté l'histoire des recherches mycologiques effectuées dans cette région [8].

La récolte du matériel mycologique et les observations sur la vie des micromycètes ont été faites mensuellement à partir du mois de mai jusqu'en octobre. Le matériel mycologique récolté comprend 280 espèces de micromycètes appartenant à 85 genres parmi lesquelles 32 espèces dont nouvelles pour la flore mycologique de Roumanie et 96 espèces ont été trouvées sur 96 espèces de plantes hôtes nouvelles [7], [8].

Selon les grandes groupes systématiques, les micromycètes récoltées ont été réparties en : *Phycomycètes* 8 espèces = 2,85%, *Ascomycètes* 93 espèces = 33,22%, *Basidiomycètes* 52 espèces = 18,58%, *Deutéromycètes* 128 espèces = 45,35%. Etant donné que les micromycètes sont des composants naturels des phytocénoses, on a fait aussi des observations sur le rapport micromycètes — plante hôte, en relation étroite avec les conditions du milieu.

Par rapport au spectre biologique des plantes hôtes, on a constaté que les espèces de micromycètes les plus nombreuses ont été récoltées sur les plantes hémicryptophytes (46,56%), parmi lesquelles nous rappelons : *Phomopsis subordinaria* sur *Plantago media*; *Cladosporium nodulosum* sur *Eryngium campestre*; *Pleospora media* sur *Centaurea micranthos*; *Ophiobolus acuminatus* sur *Eupatorium cannabinum*, etc., ensuite sur les hydro-

phytes (14,48%), terrophytes annuelles (14,10%), megaphanérophytes (7,03%), mésophanérophytes (5,92%), terrophytes biannuelles (5,92%), géophytes (5,78%), nanophanérophytes (0,71%).

Analysant la répartition des micromycètes en fonction du spectre des éléments floristiques, on a observé que la plupart des micromycètes ont été trouvées sur les plantes eurasiatiques (44,14%), par exemple: *Puccinia coronata*, *Diplodia frangulae*, *Cytospora ceratophora*, *Tuberularia vulgaris* sur *Rhamnus frangula*; *Septoria gladioli* sur *Gladiolus imbricatus*; *Sphaerella sagedioides*, *Phoma dipsaci*, *Alternaria tenuis* sur *Dipsacus laciniatus*; *Alternaria tenuis* sur *Ligularia glauca*; *Septoria gymnadeniae* sur *Gymnadenia conopea*, etc., et les moins nombreuses sur les espèces daciques (0,25%): *Erysiphe asperifoliorum* sur *Symphytum cordatum*, etc. Entre ces deux extrêmes on peut encadrer les autres catégories: cosmopolites (14,34%), européennes (14,08%), centrales européennes (9,74%), circumpolaires (9,44%), adventives (2,04%), continentales (1,85%), méditerranéennes (1,58%), pontico-méditerranéennes (1,42%), alpines (1,12%).

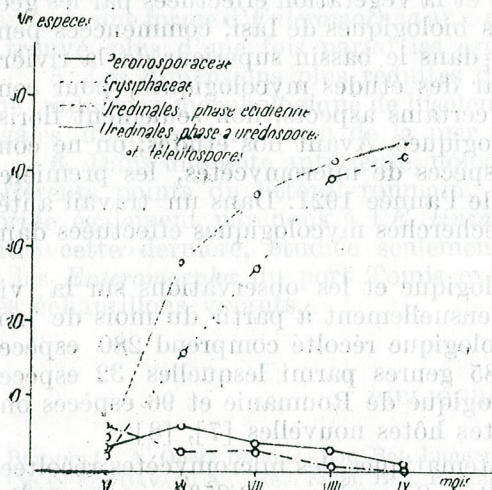


Fig. 1. — La dynamique annuelle de certaines espèces de micromycètes.

Pendant les années 1971–1972 on a effectué des observations sur les variations saisonnières dans la répartition et la fréquence des micromycètes dans le bassin supérieur de la rivière Suceava. Dans ce travail nous présentons la dynamique saisonnière chez les *Peronosporaceae*, *Erysiphaceae* et *Uredinales* (fig. 1).

Les espèces de *Peronosporaceae* paraissent en grand nombre au cours du printemps et pendant le premier mois d'été. C'est ainsi qu'à la fin du mois de mai, et particulièrement en juin, on a trouvé: *Plasmopara pusilla* (syn. *Plasmopara geranii-pratensis*) sur *Chenopodium album*; *Peronospora thlaspeos-arvensis* sur *Thlaspi arvense*, etc. Le nombre des espèces de *Peronosporaceae* diminue à mesure qu'on avance en été, car la température optimale pour le développement de ces micromycètes est de 10° à

20° et leur cycle évolutif est lié d'une certaine phénophase de la plante hôte. A partir du mois de juin on peut également trouver de nombreuses espèces d'*Erysiphaceae* dues aux conditions du milieu, favorables pour leur développement (température au dessus de 20°). Leur nombre augmente jusqu'au mois d'août; en septembre on peut observer une certaine diminution. Le genre *Erysiphe* a été le plus fréquemment récolté, dont particulièrement l'espèce *Erysiphe galeopsidis*, trouvée à travers toute la zone sur plusieurs espèces de plantes de la flore des prairies: *Stachys silvatica*, *S. germanica*, *Marrubium vulgare*, *Galeopsis speciosa*. Les genres *Sphaerotheca*, *Microsphaera*, *Podosphaera*, *Uncinula* et *Phyllactinia* sont plus faiblement représentés. Contrairement aux autres régions de notre pays où la plupart des espèces d'*Erysiphaceae* paraissent en juillet, dans le bassin supérieur de la rivière Suceava, « l'explosion » de ce groupe de micromycètes a lieu en juin, parce que la température optimale pour leur développement y est atteinte déjà.

Les espèces appartenant au genre *Uredinales* sont bien représentées dans la flore du bassin supérieur de la rivière Suceava, surtout par le genre *Puccinia* (28 espèces). On a fréquemment récolté *Puccinia graminis* en phase d'écidienne aussi bien qu'en phase d'urédospores et de téléospores; *Puccinia holcina* sur *Holcus lanatus*; *Puccinia tinctoriicola* sur *Serratula tinctoria*; *Puccinia suaveolens* sur *Cirsium arvense*; *Puccinia pringsheimiana* sur *Carex gracilis*, etc. Les autres genres d'*Uredinales* récoltés dans cette zone ont été: *Pucciniastrum*, *Melampsora*, *Phragmidium*, *Uromyces*, *Coleosporium* et *Aecidium*. Les premières espèces d'*Uredinales* on été récoltées pendant le mois de mai; au cours des mois suivants on a observé une diminution du nombre des espèces en phase écidienne et un accroissement permanent du nombre des espèces en phase d'urédospores et téléospores. Analysant le rapport entre les différentes espèces d'*Uredinales*, on constate un pourcentage plus élevé d'espèces autoïques (58%) par rapport aux hétéroïques (42%) (fig. 2).

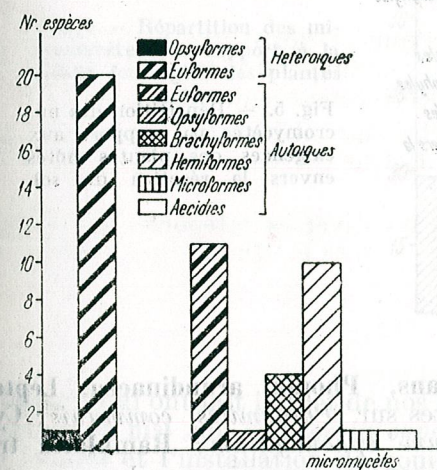


Fig. 2. — Répartition des micromycètes de l'ordre *Uredinales* par rapport à leur cycle évolutif.

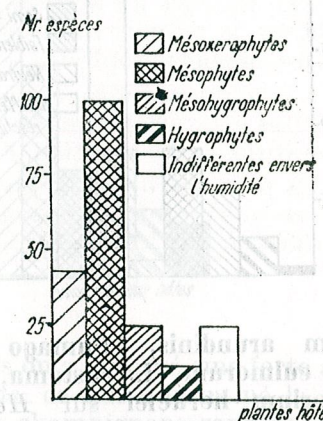


Fig. 3. — Répartition des micromycètes par rapport aux exigences des plantes hôtes envers l'humidité.

Un autre aspect étudié a été la présence et la fréquence des micromycètes en fonction d'une série d'indicateurs écologiques qui caractérisent les écotopes où vivent les plantes hôtes. Ces dernières ont des besoins différents envers l'humidité et c'est en fonction de ce facteur qu'on a établi plusieurs catégories écologiques (fig. 3). Les micromycètes les plus nombreuses ont été trouvées sur les plantes hôtes mésophytes : *Septoria colechici* sur

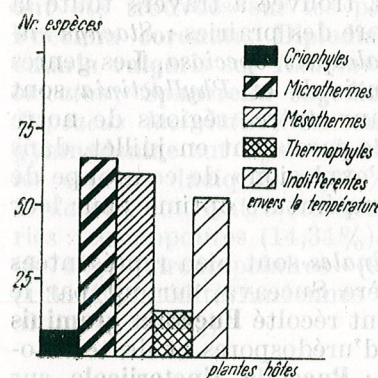


Fig. 4. — Répartition des micromycètes par rapport aux exigences des plantes hôtes envers la température.

Sur les plantes hôtes hygrophytes on a trouvé un nombre réduit de micromycètes : *Cladosporium herbarum* sur *Lysimachia vulgaris*; *Phoma equiseti*, *Epicoccum purpurascens*, *Cladosporium herbarum* var. *fasciculare* sur *Equisetum palustre*.

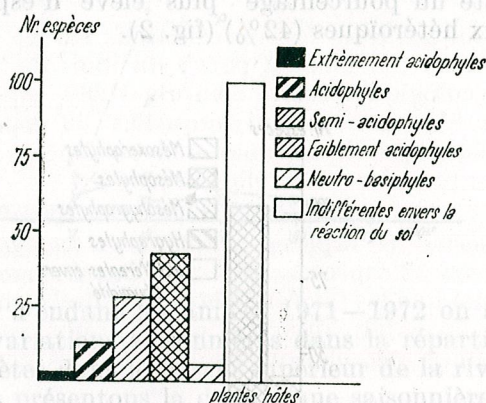


Fig. 5. — Répartition des micromycètes par rapport aux exigences des plantes hôtes envers la réaction du sol.

rosporium arundinis, *Fumago vagans*, *Phoma arundinacea*, *Leptosphaeria culmorum*, *L. eustoma*, toutes sur *Phragmites communis*; *Cylindrosporium heraclei* sur *Heracleum sphondylium*; *Ramularia tricherae* sur *Knautia arvensis*, etc. Les espèces les moins nombreuses ont été rencontrées sur les plantes hôtes criophytes : *Septoria orchidearum* sur *Orcis maculata*; *Sphaerotheca alchemillae* sur *Alchemilla vulgaris*; *Lep-*

tosphaeria nardi et *Vermicularia dematium* sur *Nardus stricta*. Les plantes hôtes mésothermes, thermophyles et indifférentes envers la température occupent des positions intermédiaires entre ces deux extrêmes.

En fonction des exigences des plantes hôtes envers la réaction du sol, on constate que la plupart des micromycètes ont été récoltées sur les plantes hôtes indifférentes à la réaction du sol, par exemple : *Erysiphe cruchetiana*, *Ophiobolus fruticum*, *Sarcopodium roseum*, *Coniothyrium ononidis* sur *Ononis hircina*; *Septoria cirsii*, *Ophiobolus acuminatus*, *Leptosphaeria dolioloides* sur *Cirsium rivulare*; *Septoria lepidii* sur *Lepidium campestre*, etc. (fig. 5).

Selon la présence des micromycètes, y suivent les plantes hôtes faiblement acidophyles, semi-acidophyles, neutro-basiphyles et extrêmement acidophyles.

Finalement on a observé la présence des micromycètes sur diverses catégories des plantes fourragères. Dans notre pays les études concernant la fréquence des micromycètes parasites et saprophytes sur les plantes fourragères spontanées ne sont pas nombreuses et, jusqu'à présent, les pâturages du bassin de la rivière Suceava n'ont pas été étudiés à cet égard. La répartition des micromycètes par rapport à la valeur fourragère des plantes hôtes est représentée dans la figure 6. Les plantes nuisibles et très nuisibles à la santé des animaux sont — en assez grand nombre — des plantes hôtes pour certaines espèces de micromycètes. Dans tous les

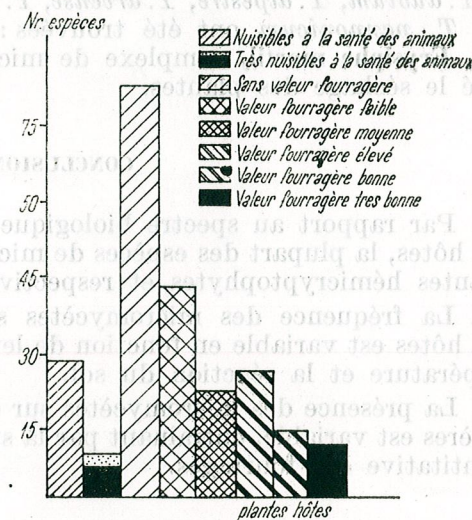


Fig. 6. — Répartition des micromycètes par rapport à la valeur fourragère des plantes hôtes.

pâturages qui ont fait l'objet de nos études on a observé une forte attaque d'*Uromyces pisi* sur *Euphorbia cyparissias*, ce qui a entraîné le séchage des feuilles et l'installation de nombreux champignons saprophytes; sur les feuilles d'*Euphorbia villosa* se sont développées *Aecidium euphorbiae*, *Diaporthe chaillatii* et sur les feuilles de *Ranunculus repens* on a observé une forte attaque d'*Uromyces dactylidis*.

La plupart des espèces de micromycètes ont été rencontrées sur des plantes sans valeur fourragère : *Ramularia buniadis* sur *Bunias orientalis*; *Uromyces geranii* sur *Geranium pratense*, etc. La présence des micromycètes sur des plantes ayant une valeur fourragère élevée a des conséquences négatives, car elles entraînent la formation des taches sur les feuilles, leur séchage et, finalement, leur chute; c'est ainsi qu'on arrive à la diminution quantitative et qualitative des fourrages. Sur ces catégories de plantes on a récolté les espèces de micromycètes suivantes : *Puccinia triseti*, *Ascochyta graminicola*, *Cladosporium herbarum* sur *Trisetum flavescens*; *Puccinia poae-sudeticae* sur *Poa annua*; *Puccinia recondita*, *Leptosphaeria culmorum*, *Vermicularia graminicola* sur *Agrostis stolonifera*, etc.

Sur les pâturages et les prairies aux alentours de la localité Voitinel, sur *Lolium perenne* on a identifié les micromycètes : *Claviceps microcephala* (une attaque très forte), *Leptosphaeria culmorum*, *Septoria tritici*; à Bivolărie, sur *Festuca rubra* on a trouvé *Leptosphaeria arundinacea*, *L. culmorum*, *L. eustoma*, *Cladosporium graminum*, *Vermicularia graminicola*, tandis que sur *Sieglingia decumbens* on a identifié *Phyllachora graminis*.

Les légumineuses fourragères ont été également parasitées : *Lotus corniculatus* a été attaqué par *Erysiphe martii*, surtout dans les pâturages aux alentours de la localité Todirești. Sur les feuilles de *Trifolium campestre*, *T. dubium*, *T. alpestre*, *T. arvense*, *T. repens*, *T. hybridum*, *T. ochro-eucum*, *T. pannonicum* ont été trouvées : *Uromyces trifolii*, *Uromyces striatus*, *Erysiphe martii*, complexe de micromycètes parasites qui ont entraîné le séchage des plantes.

CONCLUSIONS

1. Par rapport au spectre biologique et floristique des espèces de plantes hôtes, la plupart des espèces de micromycètes ont été récoltées sur des plantes hémicryptophytes et respectivement eurasiatiques.
2. La fréquence des micromycètes sur différentes catégories des plantes hôtes est variable en fonction de leur exigence envers l'humidité, la température et la réaction du sol.
3. La présence des micromycètes sur diverses catégories de plantes fourragères est variable, entraînant par la suite la diminution qualitative et quantitative des fourrages.

BIBLIOGRAPHIE

1. BLUMER S., *Echte Mehltäupilze (Erysiphaceae)*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1967.
2. BONEA VERA, *Ciuperci parazite și saprofite din R.P.R.*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1953.
3. BYZOVA Z. M. et collab., *Nesoverchennye griby, Sphaeropsidales*, Edit. « Nauka », Alma-Ata, 1970.
4. BYZOVA Z. M. et collab., *Nesoverchennye griby, Sphaeropsidales*, Edit. « Nauka », Alma-Ata, 1971.

5. HATMANU M., *Contribuțiuni la cunoașterea ciupercilor parazite și saprofite pe Gramineele furajere din Moldova*, (Teză), Iași, 1958.
6. LAZĂR AL., *Contribuțiuni la cunoașterea ciupercilor parazite și saprofite pe Leguminoasele furajere din Moldova*, (Teză), Iași, 1958.
7. MANOLIU AL., *Lucrări științifice — Stațiunea experimentală agricolă Suceava — Volum omagial 1947—1971*, Redacția revistelor agricole, 1973, 327—335.
8. MANOLIU AL., RUSAN M., *St. și cerc. biol., Seria botanică*, 1973, 25, 3, 197—204.
9. RESMERIȚĂ I., *Flora, vegetația și potențialul agroproductiv pe masivul Vlădeasa*, Edit. Acad. R.S.R., București, 1970.
10. SANDU-VILLE C., *Ciupercile Erysiphaceae din România*, Edit. Acad. R.S.R., București, 1967.
11. SANDU-VILLE C., *Ciuperci Pyrenomycetae — Sphaeriales din România*, Edit. Acad. R.S.R., București, 1971.
12. SĂVULESCU TR., *Monografia Uredinalelor din Republica Populară Română*, Edit. Acad. R.P.R., București, 1953.
13. SĂVULESCU TR., SĂVULESCU OLGA, *Acta Bot. Horti Buc.*, 1963, 1—146.

Reçu le 7 février 1975

Centre de Recherches Biologiques
Iași
Str. Karl Marx nr. 47

DONNÉES CONCERNANT LA POPULATION DE *PHLOMIS FRUTICOSA* EN GRÈCE, SELON LE DESSIN « PATTERN » DES FLAVONOÏDES

PAR

N. S. MARGARIS et P. PAPADOGIANNI

Tenant compte de la surface occupée en Grèce par les associations de *Phlometum fruticosae*, on se demande pourquoi il y a si peu d'information sur l'écophysiologie de l'élément phryganie *Phlomis fruticosa* [2], [3]. Nous présentons ici les résultats acquis par l'examen de la population de *P. fruticosa* de 16 régions grecques, utilisant comme critère le dessin des flavonoïdes de ses grains.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Pendant les mois d'août et septembre des années 1974 et 1975, on a collectionné des graines de *P. fruticosa* dans les 16 régions suivantes (Fig. 1) :

- | | |
|------------------|---------------------|
| — 1. Hemettus | — 9. Mistras |
| — 2. Astakos | — 10. Githion |
| — 3. Volos | — 11. Areopolis |
| — 4. Kanalakia | — 12. Kalamata |
| — 5. Amfilochia | — 13. Monemvassia |
| — 6. Phoinikion | — 14. Kréta |
| — 7. Kandyla | — 15. Iliki |
| — 8. Igoumenitsa | — 16. Achladokampos |

On a pulvérisé 10 ml 95° d'éthanol sur 5 gr de graines qu'ensuite on a fait bouillir pour 5 minutes. Après, on a réduit le volume final à 1 ml, en concentrant le liquide dans un verre de montre devant un courant d'air [1].

La séparation des flavonoïdes a été faite par la chromatographie de couche-mince sur cellulose et on a utilisé comme liquide de développement le n-butanol : acide acétique : eau (BAW, 4 : 1 : 5). Après la séparation, on a marqué d'abord les taches fluorescentes à la lumière ultraviolette et après, on a effectué le développement dans une chambre d'iode [4].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 2 présente le dessin des flavonoïdes des différentes régions et entraîne les conclusions suivantes :

1. Les grains de *P. fruticosa* donnent une chromatographie unidimensionnelle de 6—9 taches dont les trois sont fluorescentes.

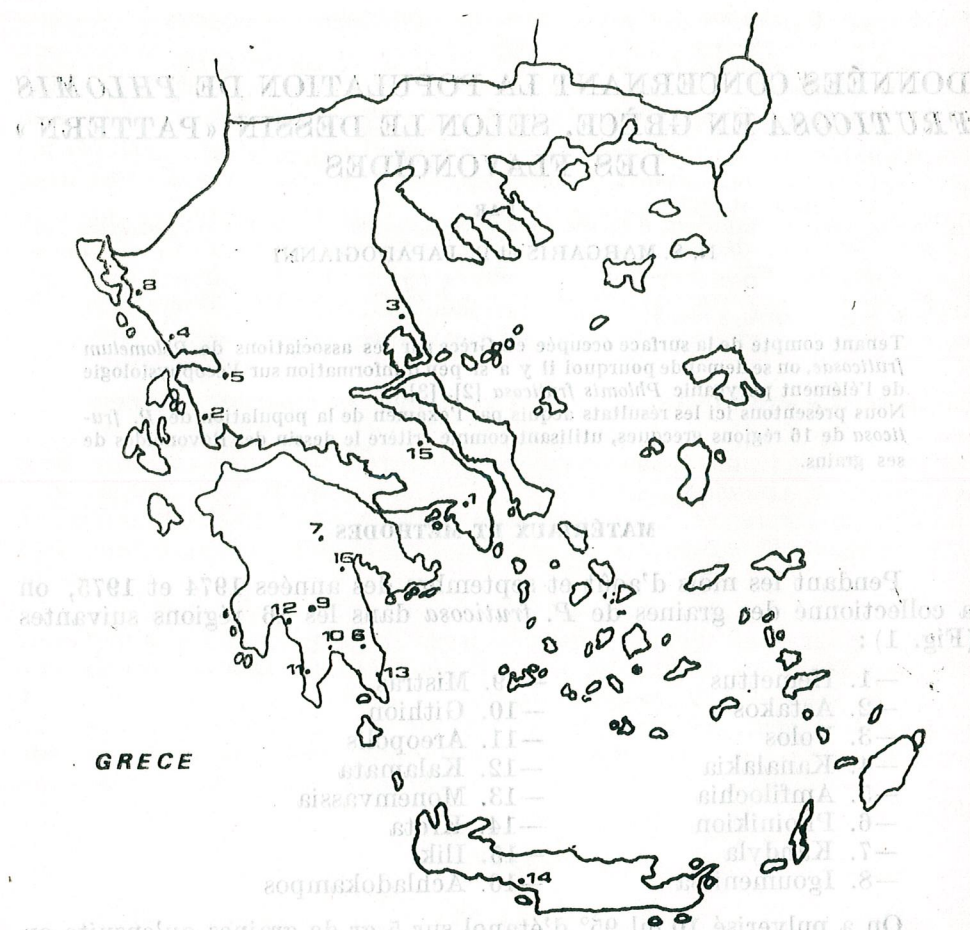


Fig. 1. — Les 16 régions de Grèce d'où les grains de *Phlomis fruticosa* ont été ramassés.

2. En ce qui concerne les flavonoïdes fluorescents on n'observe pas des différences entre les régions diverses.

3. Les différences observées et mentionnées existent entre les taches avec $R_f < 50$.

4. Les populations des régions :

- | | |
|----------------|-------------------|
| — Hemettus (1) | — Igoumenitsa (8) |
| — Astakos (2) | — Kandyla (7) |
| — Kreta (14) | — Githion (10) |

ne ressemblent pas à d'autres.

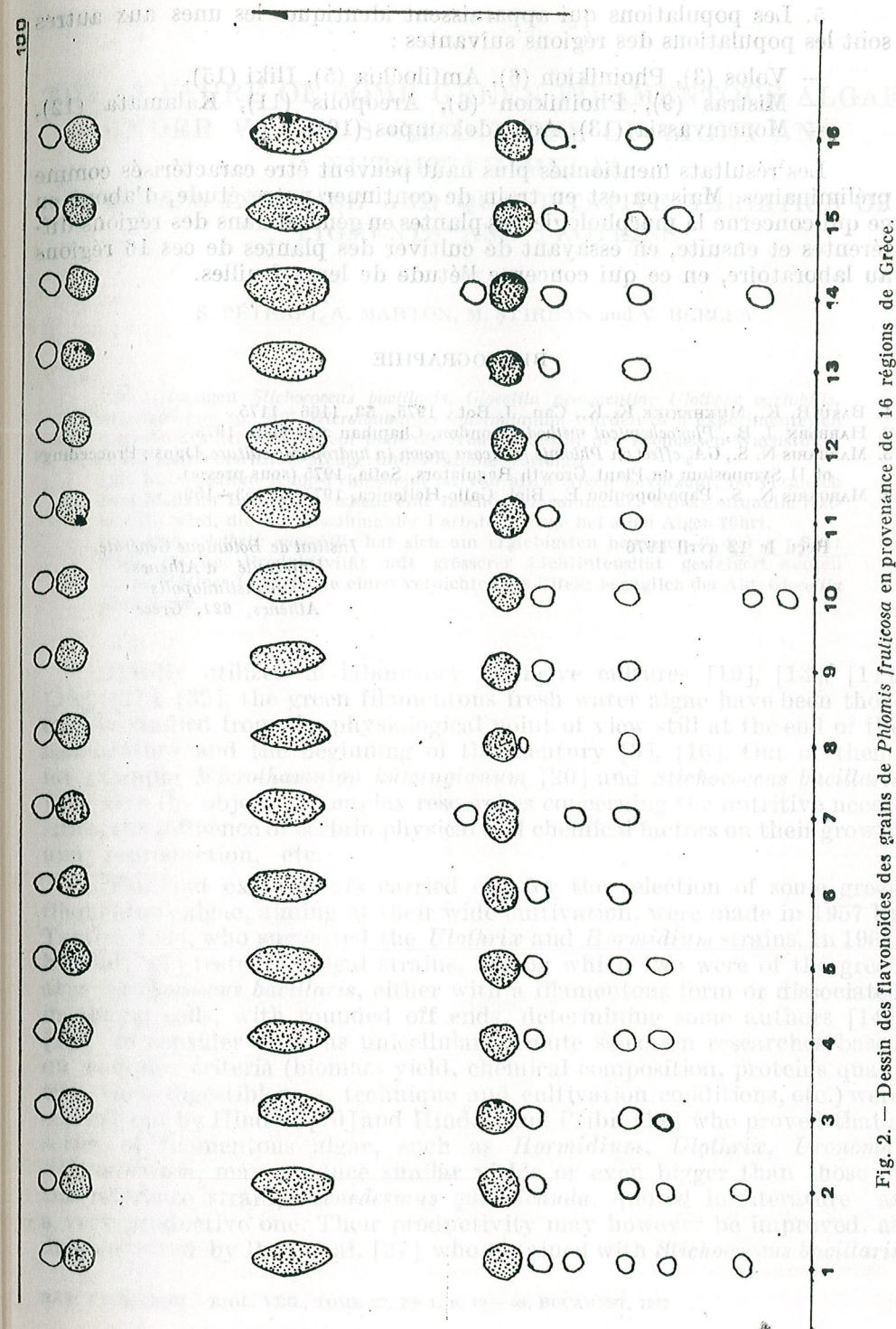


Fig. 2. — Dessin des flavonoïdes des grains de *Phlomis fruticosa* en provenance de 16 régions de Grèce.

5. Les populations qui apparaissent identiques les unes aux autres sont les populations des régions suivantes :

- Volos (3), Phoinikion (6), Amfilochia (5), Iliki (15),
- Mistras (9), Phoinikion (6), Areopolis (11), Kalamata (12),
- Monemvassia (13), Achladokampos (16).

Les résultats mentionnés plus haut peuvent être caractérisés comme préliminaires. Mais on est en train de continuer notre étude, d'abord en ce qui concerne la morphologie des plantes en général dans des régions différentes et ensuite, en essayant de cultiver des plantes de ces 16 régions au laboratoire, en ce qui concerne l'étude de leurs feuilles.

BIBLIOGRAPHIE

1. BASU R. K., MUKHERJEE K. K., Can. J. Bot., 1975, **53**, 1166—1175.
2. HARBORN J. B., *Phytochemical methods*, London, Chapman and Hall, 1975.
3. MARGARIS N. S., *GA₃ effect on Phlomis fruticosa grown in hydroponic culture*. Dans : Proceedings of II Symposium on Plant Growth Regulators, Sofia, 1975 (sous presse).
4. MARGARIS N. S., Papadopoulou E., Biol. Gallo-Hellenica, 1975, **6**, 153—159.

Reçu le 12 avril 1976

Institut de Botanique Générale
Université d'Athènes
Panépistimiopolis
Athènes, 621, Grèce

THE CULTURE OF SOME GREEN FILAMENTOUS ALGAE UNDER VARIOUS CONDITIONS OF LIGHT AND NUTRITIVE MEDIA

I. BIOMASS INCREASE AND QUANTITATIVE VARIATION OF PIGMENTS AND PROTEINS

BY

S. PÉTERFI, A. MARTON, M. ŞTIRBAN and V. BERCEA

Die Grünalgen *Stichococcus bacillaris*, *Gloeotila protozenila*, *Ulothrix variabilis*, *Stigeoclonium* sp. und *Microthamnion kützingerianum* wurden in 4 experimentellen Varianten kultiviert, indem man die Abänderungen des Biomassen-Wachstums, der Plastidenfarbstoff-Menge und Proteine verfolgte.

Das Nährmedium Knop-Pringsheim ist von allen Algen bevorzugt, im Vergleich zum Medium Bold, in welchem eine rasche Verarmung der Stickstoffquelle festgestellt wird, die zur Abnahme der Farbstoffmenge bei allen Algen führt. Die Alge *Ulothrix variabilis* hat sich am ergiebigsten bewiesen (0,400 g t.S./l/Tag), welche Produktivität mit grösserer Lichtintensität gesteigert werden kann. Stetiges Licht hatte einen vernichtenden Effekt bezüglich der Alge *Gloeotila protozenila*.

Hardly utilized in laboratory intensive cultures [10], [13], [14], [18], [27], [32], the green filamentous fresh water algae have been thoroughly studied from the physiological point of view still at the end of the last century and the beginning of this century [3], [16]. Out of them, for example *Microthamnion kützingerianum* [20] and *Stichococcus bacillaris* [28] were the object of complex researches concerning the nutritive necessities, the influence of certain physical and chemical factors on their growth and reproduction, etc.

The first experiments carried out for the selection of some green filamentous algae, aiming at their wide cultivation, were made in 1957 by Tamiya [32], who suggested the *Ulothrix* and *Hormidium* strains. In 1964, Rélföldy [7] tested 35 algal strains, among which two were of the green alga *Stichococcus bacillaris*, either with a filamentous form or dissociated in oblong cells, with rounded off ends, determining some authors [14], [15] to consider them as unicellular. Minute selection researches based on complex criteria (biomass yield, chemical composition, proteins quantity, their digestibleness, technique and cultivation conditions, etc.) were carried out by Hindák [10] and Hindák and Přibil [11] who proved that a series of filamentous algae, such as *Hormidium*, *Ulothrix*, *Uronema*, *Stigeoclonium*, may produce similar yields or even bigger than those of the reference strain, *Scenedesmus quadricauda*, quoted in literature as a very productive one. Their productivity may however be improved, as demonstrated by Prat et al. [27] who obtained with *Stichococcus bacillaris*

and *S. chloranthus* up to 500% stimulations by adding to the nutritive medium optimum concentrations of glucose.

Based on our experience concerning the physiology of some filamentous green algae [20]—[24], [26], we considered necessary to thoroughly investigate the nutrition and light factors, from the static cultures [25] to the intensive ones, and to widen the range of algal species. Though the results initially obtained with *Stichococcus bacillaris* [18] were not encouraging, further research will fully prove — we think — the importance of these algae as biomass producers, as well as the multiple possibilities of continuously improving their yield.

MATERIAL AND METHOD

The algae *Stichococcus bacillaris* Naeg., *Gloetila protogenita* Kütz., *Ulothrix variabilis* Kütz. and *Stigeoclonium subsecundum* Kütz. (and *Microthamnion kützingerianum* Naeg.) have been cultivated, for 14 days, in an intensive culture equipment, thermostated at 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), in 50 cm long and 20 mm diameter cylindrical vessels and 100 ml nutritive medium. Two variants of nutritive medium have been used: Knop-Pringsheim (KP), and Bold medium with soil extract (BS), after Cox and Bold [5]. The light intensity was of 9,000 lx., and the photoperiod of 12 hours light/12 hours darkness. The algae *Ulothrix* and *Stigeoclonium* (and *Microthamnion*) have been previously macerated 5 minutes by means of a homogenizer at 2000 r/minute. Optical density of cultures (FEKN-54 photocolormeter, red filter), dry substance at 42°C, assimilative pigments accumulation, productivity, modifications of the pH, cellular structure and ultrastructure were studied. The pigments extraction was made with a mixture of acetone and methyl 8 : 2 and their separation through thin layer chromatography; the quantitative determination of the pigments and proteins was obtained spectrophotometrically [9], [17], [31]. An OP-101 type electric pH-meter was used for the pH modifications, and a BS-613 Tesla electron microscope for the algae ultrastructure.

In order to have comparative data, parallel static, non-bubbled cultures of these algae in KP medium and in two illumination variants have also been studied: I. NW natural illumination in room temperature, and II. continuous illumination in fluorescent lighting of 9,000 lx. intensity, for 7 days, and their transition to the I-variant conditions. After 21 days of cultivation, the pigments were quantitatively determined, and the algae examined in optical and electron microscopy. In the non-bubbled cultures, both in liquid and solid media, respectively with 15‰ agar, five parallel samples for each alga and experimental variant were set up. For the intensive cultures the results represent the mean of three parallel samples. The experiment was twice repeated, and thrice for the alga *Stichococcus*. For the latter case, as compared to BS medium, intensive cultures were carried out in another seven experiment variants, by adding mineral salts in quantities equivalent to the KP medium.

The algae *Ulothrix variabilis* Kütz. and *Microthamnion kützingerianum* Naeg. have been the object of some researches concerning the action of the light intensity. In intensive cultures, similar to those described

above, light intensities between 1,500 and 12,500 lx. have been ensured. The variations of the algae yield, of the biomass accumulation, and of the pH were studied as compared to static cultures of the same algae in NW natural light.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The algae productivity in intensive cultures is determined by many factors, among which the chemical composition of the nutritive medium and the light seem to be prevalent. With our experiment, a comparison of the results is difficult, because of the different quantity of inoculum used at the beginning. In table 1 as well as in some graphs we used the multiplication factor (M.F.) reckoned on the basis of the pigments, the optical density, etc., representing the ratio between the final values and the product of the initial values and the number of cultivation days. In this way the results obtained in different algae may be corroborated. Moreover, our results can be compared to our previous ones, although the cultures were carried out under other experimental conditions.

In table 1 we present the results obtained in intensive algae cultures in KP and BS medium.

Table 1
Variation of some parameters based on the nutritive medium composition

Parameter	Knop-Pringsheim medium				Bold medium			
	<i>Sticho-</i> <i>coccus</i>	<i>Gloeo-</i> <i>tila</i>	<i>Ulo-</i> <i>thrix</i>	<i>Stigeo-</i> <i>clon-</i> <i>ium</i>	<i>Sticho-</i> <i>coccus</i>	<i>Gloeo-</i> <i>tila</i>	<i>Ulo-</i> <i>thrix</i>	<i>Stigeo-</i> <i>clon-</i> <i>ium</i>
Initial pH	6.85	6.95	6.95	7.10	6.82	6.90	6.88	6.82
Final pH	7.75	7.88	7.70	7.90	7.50	7.43	7.43	7.58
Dry weight g/l.	4.755	4.421	6.270	3.620	3.175	3.390	4.658	2.575
Productivity g d.w./l/24 hours	0.354	0.319	0.400	0.277	0.221	0.202	0.322	0.187
M.F.*								
— E	5.375	4.512	4.120	2.100	3.500	3.215	3.102	1.307
— chl. a	34.633	32.173	59.985	56.021	3.240	2.401	2.930	2.470
— chl. b	16.676	16.741	21.126	23.491	1.794	1.223	1.997	1.166
— β -carot.	1.227	1.639	1.701	2.567	0.205	0.103	0.563	0.314
— lutein	4.989	7.400	5.214	5.131	0.904	0.685	0.772	0.559
— violax.	2.414	3.022	3.482	4.483	0.254	0.181	0.315	0.238
— neoxant.	2.209	1.615	2.097	2.353	0.251	0.195	0.247	0.210
— Total green pig.	51.309	48.854	81.112	79.512	4.918	3.624	4.927	3.636
— Total yellow pigments	10.840	13.676	12.495	14.534	1.595	1.164	1.898	1.271
— Total pigments	52.149	62.530	93.607	94.046	6.642	4.206	6.826	4.908
Chl. a/Chl. b	2.076	1.919	2.839	2.384	1.806	1.963	1.467	2.118
Green/yellow pigments	4.733	3.572	6.491	5.470	3.083	3.113	2.595	2.860

* M.F. = multiplication factor reckoned on the basis of the extinction data (E) and pigments.

One sees that the largest amounts of biomass have been obtained in KP medium, the most productive being *Ulothrix variabilis*, with 0.400 g d.w./l/ day, a value close to that obtained by Hindák [10] with some species

of *Ulothrix* and with the reference strain *Scenedesmus quadricauda* (0.455 g d.w./l/day at 20°C). The same alga has the best productivity in the BS medium, too.

The reaction of the nutritive media was modified during the experiment by a slight alkalization. In previous experiments [18] this tendency, which we ascribe to the metabolic activity of the *Stichococcus bacillaris* alga, was more accentuated. We think that it is due—in the latter case—also to the bubbling of the cultures only in the light period. The continuous bubbling with the air and the 3–5% CO₂ contributes to the lower alkalization of the medium. The conclusion is underlined also by the results of some static, non-bubbled cultures researches, when in *Ulothrix* cultures pH values of 10.91 were obtained after 23 days of cultivation in the Bold medium [26].

The values of the cultures multiplication factor, reckoned on the basis of extinction (E), are about 10 times higher than those obtained in the KP medium with *Stichococcus bacillaris* static cultures [25]. This emphasizes the extent to which the intensive cultures contribute to the increase of the algal yield. One can also ascertain that the M.F. values do not change parallelly to the biomass: in this case maximum values are obtained with *S. bacillaris*, demonstrating that between the processes of algal substance accumulation and those which determine the colour — i.e. the optical density of the cultures — there is no absolute parallelism.

The synthesis of the pigments is significantly more complete in the KP medium as compared to the BS medium, the same as the green and yellow pigments ratio, respectively the ratio chlorophyll *a*/chlorophyll *b*. An obvious quantitative variation of the different pigments depending on the composition of the nutritive medium is found, demonstrating the strong dependence of the pigments synthesis process upon the quality and quantity of the nutritive elements. Unlike these variations, the interspecific ones are much more reduced. The thorough observation of the experiment brought about an interesting discolouring phenomenon of the cultures in the BS medium after 7–10 days, strengthened toward the end of the experiment. With the KP medium cultures the optical density has a slow evolution to a final dark green colour, which corresponds to a big quantity of green pigments. This phenomenon in all repetitions and in all tested algae determined us to suppose the depletion possibility of some nutrients of the BS medium. We mention that this phenomenon was not observed by us in static cultures and neither was it by Cox and Bold [5], who suggest the use of this medium especially for the filamentous green algae culture. This finding determined us to carry out an experiment in which the *S. bacillaris* alga was cultivated in seven variants as compared to the control in BS medium. These variants contained quantities of salts equivalent to those of KP medium and two more variants.

The results (fig. 1) show that the most depleted element in the BS medium seems to be the nitrogen. Applied as sodium nitrate, in a fourfold quantity, it determined an about 250% stimulation as compared to the BS medium. The productivity of the alga was greater than the one obtained in the KP medium, respectively 0.375 g d.w./l/day as compared to 0.354 g

d.w./l/day. In the parallelly carried out static cultures the nitrogen was not lost, and its excessive adding did not stimulate the growth. But by adding a double quantity of iron sulphate, and especially of B₁₂ vitamin, stronger stimulations were determined.

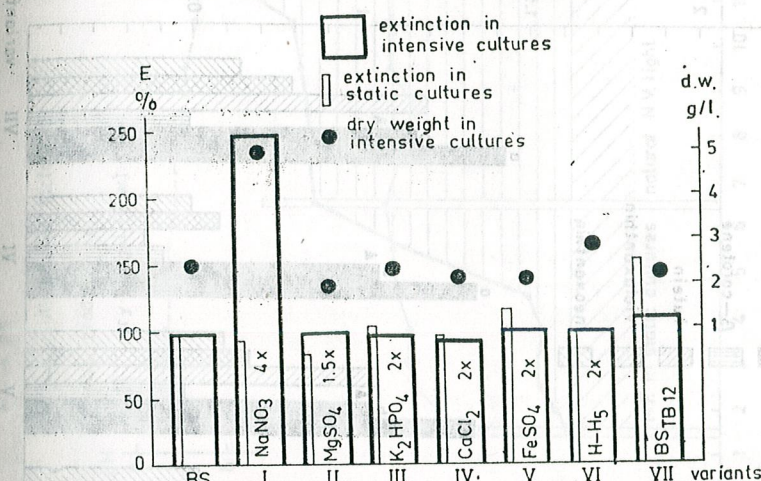


Fig. 1. — Growth of *Stichococcus bacillaris* cultures in different variants of Bold nutritive medium (BS, I–VII).

E = extinction; d.w. = dry weight.

The quantitative variations of the pigments and proteins (fig. 2) show the same dynamics, stressing the above-mentioned conclusion. We mention that in the literature we have not found any data concerning the quality and quantity of the pigments in the algae experimented by us.

The results prove the multiple possibilities to increase the yield of these algae, a statement mentioned in other works, too. Thus, Artari [3], Algéus [2], Eilers [6], Prat et al. [27] show the strongly stimulating effect of glucose on the *Stichococcus* alga. Rădulescu [28] with *S. bacillaris*, as well as ourselves in unpublished researches, found the stimulating effect, of different amplitudes, of CINA added in various concentrations to the nutritive medium. In the static cultures we obtained — from the optical density point of view — the following increases: 36% with *S. bacillaris*, 65.8% with *G. protogenita*, and 30% with *S. subsecundum* at CINA concentrations ranging from 1 to 10 g/l. Gibor [8] underlined the preference of a *Stichococcus* strain for an inorganic nitrogen source, a fact observed also by Kossikov [14] and Kossikov and Karnaukhova [15], who cultivated, with good results, the alga in the Tamiya medium having a high content of potassium nitrate. The heteroauxin influence on some strains of *Stichococcus*, *Stigeoclonium*, and *Microthamnion* has also been found to be very strong [21].

We started our researches concerning the action of the light on *S. bacillaris* [25] and established the preference of the alga for a 13-hour light/11-hour darkness at 9,000 lx. intensity. The reddish light stimulates the alga growth. We also noticed the interference of the light action with

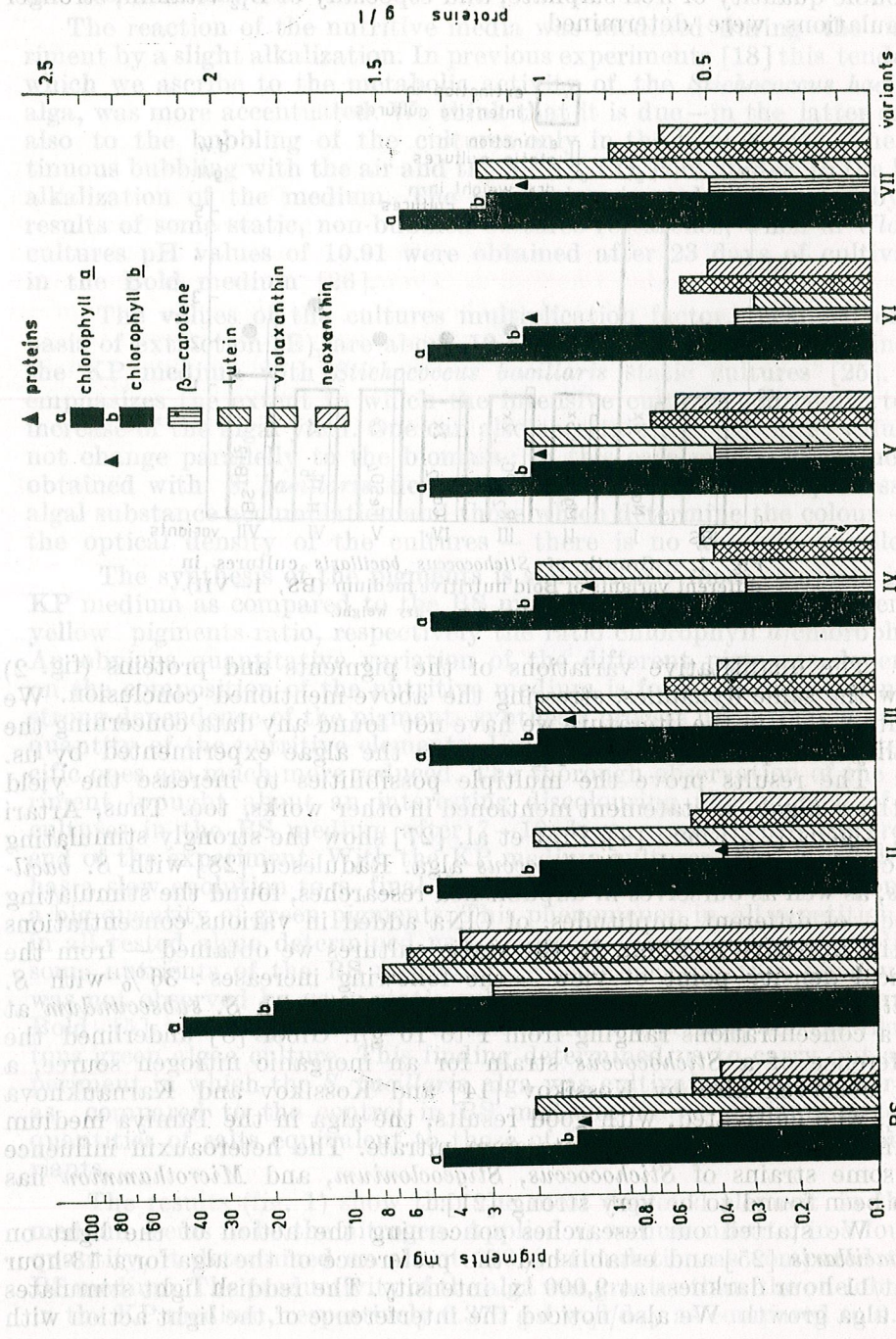


Fig. 2. — Variation of pigments and proteins quantity in different variants of Bold nutritive medium.

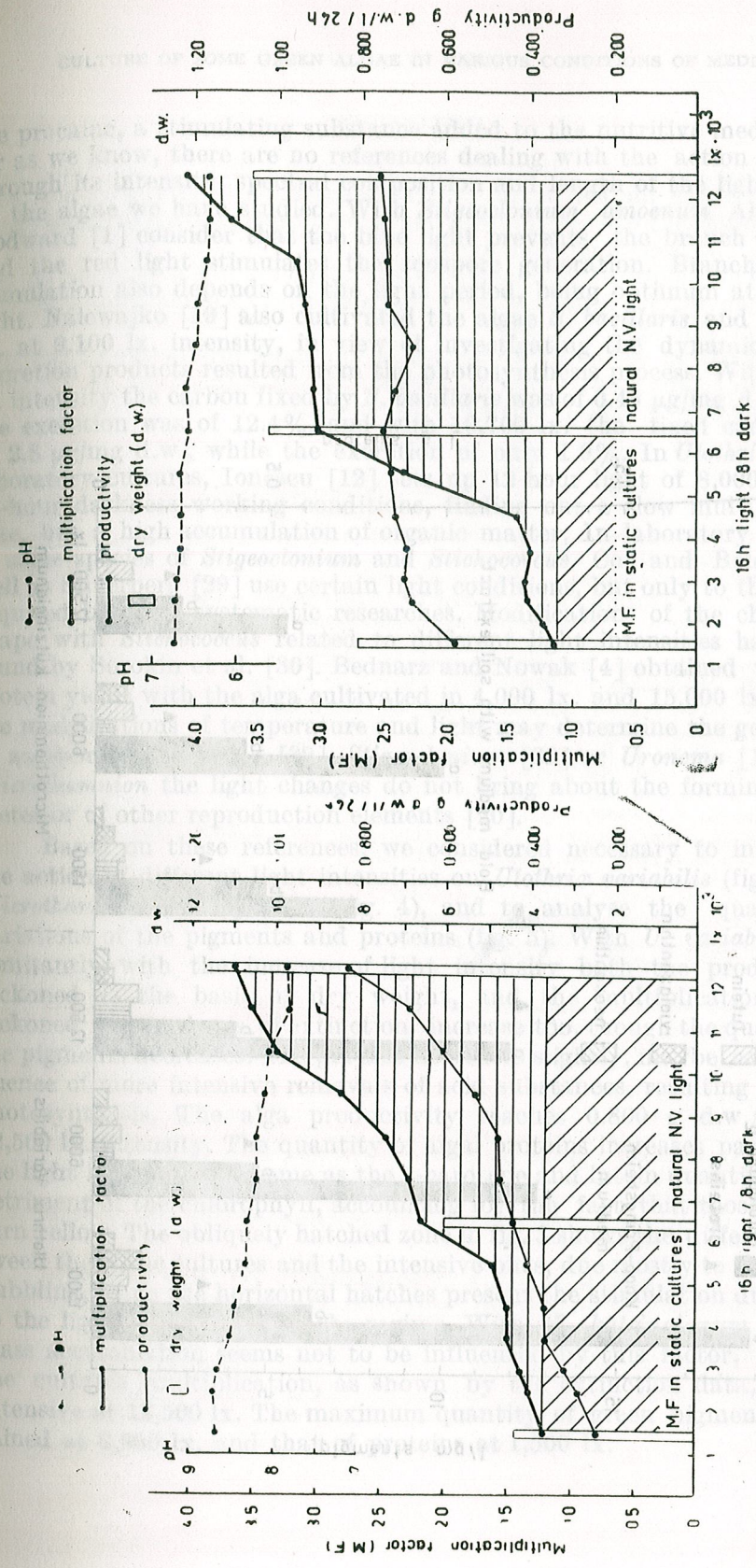


Fig. 3. — Modifications induced by light intensity in *Ulothrix variabilis* cultures.

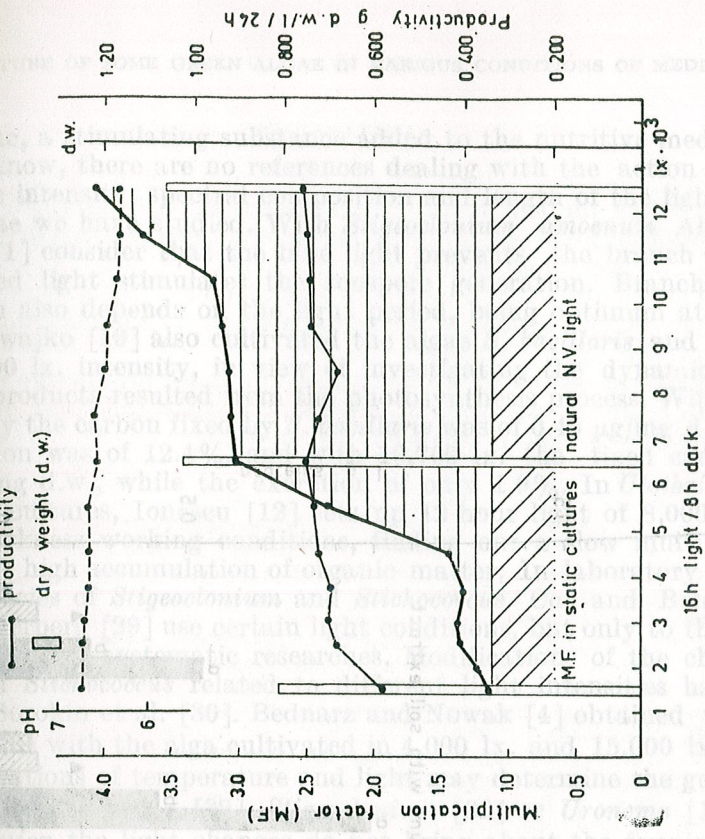
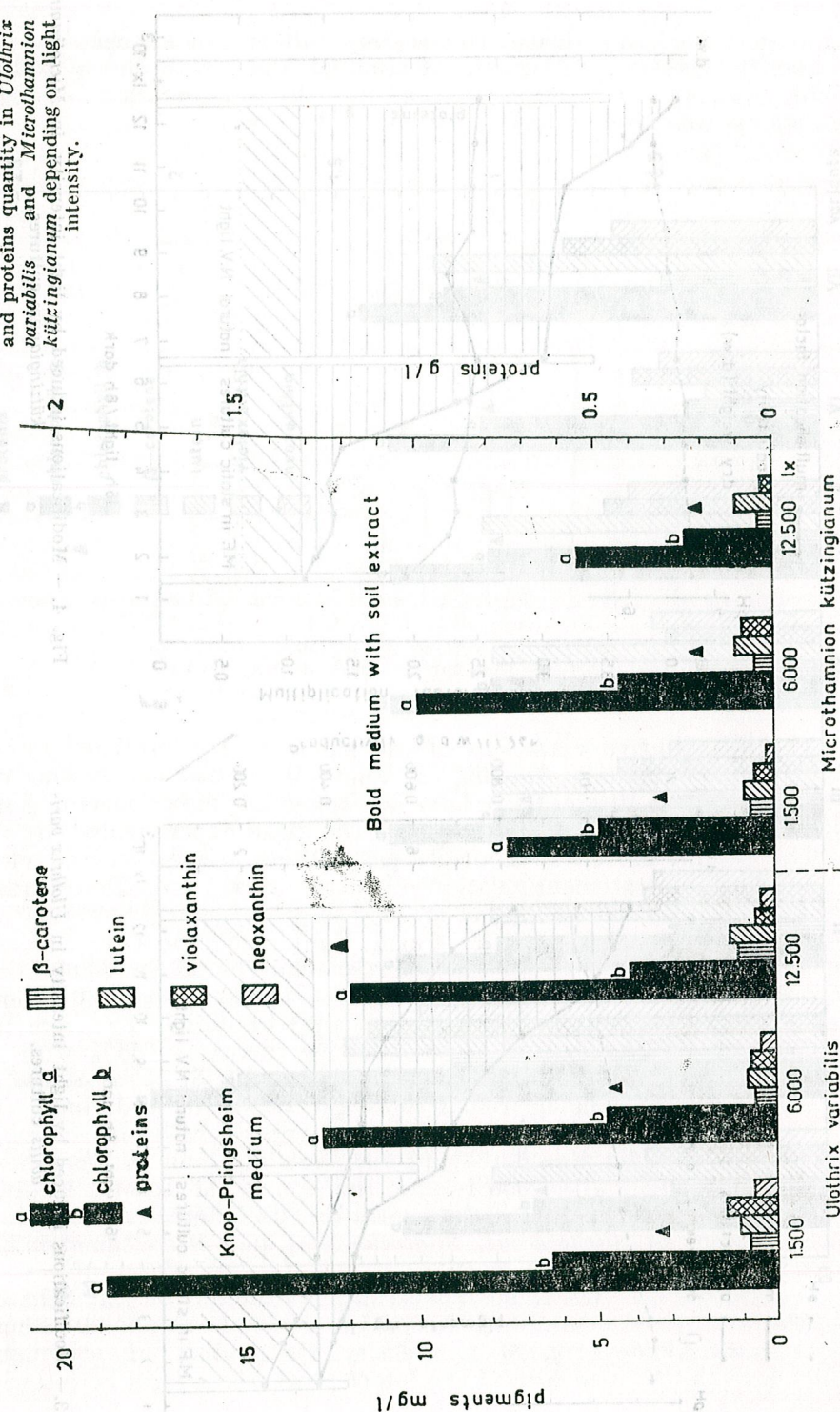


Fig. 4. — Modifications induced by light intensity in *Microthamnion kützingerianum* cultures.

Fig. 5. — Variation of pigments and proteins quantity in *Ulothrix variabilis* and *Microthamnion kützingerianum* depending on light intensity.



the procaine, a stimulating substance added to the nutritive medium. As far as we know, there are no references dealing with the action of light through its intensity, spectral composition and length of the light period on the algae we have studied. With *Stigeoclonium amoenum* Abbas and Godward [1] consider that the blue light prevents the branch forming, and the red light stimulates the zoospore generation. Branch-forming stimulation also depends on the light period, being optimum at 18-hour light. Nalewajko [19] also cultivated the algae *S. bacillaris* and *Ulothrix* sp. at 9,100 lx. intensity, in view of investigating the dynamics of the excretion products resulted from the photosynthesis process. With 75,300 lx. intensity the carbon fixed by *S. bacillaris* was of 0.45 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d.w. while the excretion was of 12.4%, and with 10,700 lx. the fixed carbon was of 2.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d.w., while the excretion of only 1.9%. In *Ulothrix zonata* laboratory cultures, Ionescu [12] sets up 12-hour light of 8,000 lx. and 12-hour darkness working conditions, finding out a slow multiplication rate, but a high accumulation of organic matter. In laboratory cultures of some species of *Stigeoclonium* and *Stichococcus* Cox and Bold [5], as well as Silverberg [29] use certain light conditions, but only to the extent required by their systematic researches. Modifications of the chloroplast shape with *Stichococcus* related to different light intensities have been found by Sorokin et al. [30]. Bednarz and Nowak [4] obtained the same protein yields with the alga cultivated in 4,000 lx. and 15,000 lx. While the modifications of temperature and light may determine the generation of zoospores in *Ulothrix* [32], *Stigeoclonium* [33] or *Uronema* [10], with *Microthamnion* the light changes do not bring about the forming of gametes or of other reproduction elements [20].

Based on these references, we considered necessary to investigate the action of different light intensities on *Ulothrix variabilis* (fig. 3) and *Microthamnion kützingerianum* (fig. 4), and to analyse the quantitative variations of the pigments and proteins (fig. 5). With *U. variabilis*, concomitantly with the increase of light intensity both the productivity, reckoned on the basis of dry weight, and the multiplication factor, reckoned on the basis of extinction, increase too, though the quantity of the pigments decreases. The pH also decreases slightly, maybe as a consequence of more intensive removals of acid substances, resulting from the photosynthesis. The alga productivity reaches 0.800 g d.w./l/day at 12,500 lx. intensity. The quantity of algal proteins increases parallelly to the light intensity, the same as the β -carotene and lutein quantity, to the detriment of the chlorophyll, accounting for the fact that those cultures turn yellow. The obliquely hatched zone in fig. 3 shows the differences between the static cultures and the intensive ones, due mostly to the culture bubbling, while the horizontal hatches present the stimulation due mostly to the light intensity and light regime. With *M. kützingerianum* the biomass accumulation seems not to be influenced by this factor, although the cultures multiplication, as shown by the extinction data, is more intensive at 12,500 lx. The maximum quantity of green pigments is obtained at 6,000 lx, and that of proteins at 1,500 lx.

CONCLUSIONS

1. The intensive culture of the filamentous green algae underlined their preference for the Knop-Pringsheim medium and the importance of the inorganic nitrogen in obtaining productions similar to those mentioned in the reference literature.
2. The quantitative changes of the pigments are depending on the composition of the nutritive medium, and with *Microthamnion kützianum* on the light intensity, too.
3. *Ulothrix variabilis* proved to be the most productive of the studied algae (0.400 g d.w./l/day), a productivity which may be doubled by the increase of light intensity to 12,500 lx.

REFERENCES

1. ABBAS A., GODWARD M. B. E., Br. Phycol. Bull., 1963, 4, 281.
2. ALGÉUS S., Bot. Notiser, 1946, 129—280.
3. ARTARI A., Jahrb. wiss. Bot., 1904, 40, 593—613.
4. BEDNARZ T., NOWAK M., Acta Hydrobiol. (Krakow), 1972, 1, 1—18.
5. COX E. R., BOLD H. C., Phycological studies. Univ. Texas Publ. No. 6618, 1966, 7.
6. EILERS H., Rec. Trav. Bot. Néerl., 1926, 23, 362—395.
7. FELFÖLDY L.J.M., Ann. Biol. Tihany, 1964, 31, 177—183.
8. GIBOR A., Biological Bull., 1956, 2, 223—229.
9. HAGER A., BERTENRATH T. M., Planta, 1966, 69, 198—216.
10. HINDÁK F., Algol. Stud. (Třeboň), 1970, 1, 77—109.
11. HINDÁK F., PRIBIL S., Biologia Plant. (Praha), 1968, 3, 234—244.
12. IONESCU A., St. Cerc. Biol., Seria Botanică, 1969, 1, 61—65.
13. — Rev. Roum. Biol. — Botanique, 1970, 2, 103—110.
14. KOSSIKOV K. V., Mikrobiologhia, 1969, 5, 811—815.
15. KOSSIKOV K., KARNAUKHOVA E. A., Mikrobiologhia, 1970, 6, 1079—1081.
16. LIVINGSTON B. E., Bot. Gaz., 1905, 39, 297—300.
17. LOWRY O. H., ROSENBRANCH M. J., FAYE A. L., RANDALL R. J., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
18. MARTON A., Rev. Roum. Biol., 1975, 1, 49—53.
19. NALEWAJKO C., Limnol. & Oceanogr., 1966, 1, 1—10.
20. PÉTERFI S., Contribuții la morfologia și fiziologia algei verzi *Microthamnion kützianum* Naeg. Thesis, Cluj, 1937.
21. — Acta Bolyaiana, 1946, 1, 44—69.
22. — Acta Bolyaiana, 1947, 1, 147—155.
23. PÉTERFI S., BRUGOVITZKY E., NAGY-TOTH F., Studia Univ. Babeș-Bolyai, Ser. Biol., 1962, 1, 67—74.
24. PÉTERFI S., NAGY-TOTH F., Com. Acad. R.P.R., 1963, 11, 957—962.
25. PÉTERFI S., MARTON A., CACIȚĂ-COSMA DORINA, Rev. Roum. Biol. — Biol. Vég., 1976, 1, 25—30.
26. PÉTERFI S., MARTON A., Studia Univ. Babeș-Bolyai, Ser. Biol., 1976, 1, 20, 27.
27. PRAT S., DVOŘÁKOVÁ J., BASLEROVÁ M., Cultures of algae in various media, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1972, p. 119.
28. RĂDULESCU ELISABETA, Cercetări experimentale asupra fiziologiei algei verzi *Stichococcus bacillaris* Naegeli, Thesis, Bucharest, 1939.
29. SILVERBERG B. A., Trans. Amer. Micros. Soc., 1975, 3, 417—421.
30. SOROKIN C., CORBETT M. K., NISHINO S., J. Phycol., 1972, 8, 152—156.
31. ȘTIRBAN M., FRECUȘ G., St. Cerc. Biol., Seria Botanică, 1968, 1, 69—75.
32. TAMIYA H., Ann. Rev. Plant. Physiol., 1957, 8, 309—334.
33. USPENSKAIA V. I., Mikrobiologhia, 1936, 3, 307—321.

Received September 17, 1976

The Biological Research Centre
Cluj Napoca
Str. Republicii 48

DIE HEMMUNG DER ATP- UND ADP-WIRKUNG AUF DIE PROTOPLASMASTRÖMUNG DURCH OLIGOMYCIN

VON

GEORGETA KEUL und M. KEUL

In vorliegender Arbeit wurde die Wirkung von Oligomycin 0,5 µg/ml auf die Zirkulationsströmung in den Wurzelhaaren der Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) bei Verabreichung von ATP und ADP (10^{-6} M) untersucht. Oligomycin allein stimuliert die Strömung in der verwendeten Konzentration. Die strömungsfördernde Wirkung von ATP und ADP wird in Gegenwart von Oligomycin 0,5 µg/ml aufgehoben. In den Versuchsvarianten mit ATP bewirkt Oligomycin die rasche Hemmung oder den Stillstand der Strömung; mit ADP wird die Strömung nur bei gleichzeitiger Oligomycin-Behandlung sistiert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Energie für die Plasmaströmung durch die Atmung oder ATP bereitgestellt wird. Oligomycin hemmt neben der oxydativen Phosphorylierung wahrscheinlich auch verschiedene ATPasen-Systeme außerhalb der Mitochondrien.

Oligomycin ist in die zellphysiologische Forschung als Hemmstoff der oxydativen Phosphorylierung und der ATP-Synthese in den Mitochondrien eingegangen [5], [14]. Der Wirkungsmechanismus des Oligomycins beruht dabei auf der Blockierung des phosphorylierenden Elektronentransportes [4] und der Mitochondrien-ATPasen [3], [8], [14]. Durch Oligomycin wird der Ablauf derjenigen Zellprozesse unterbunden, die energetisch von der Atmung bzw. von dem in der Atmungskette gebildeten ATP abhängig sind [1], [6], [7], [10], [14].

In einer früheren Arbeit [10] wurde gezeigt, daß die Protoplasmaströmung in den Wurzelhaaren der Tomate durch entsprechende Oligomycin-Konzentrationen (5 und 10 µg/ml) rasch gehemmt und irreversibel zum Stillstand gebracht wird. In keiner der Versuchsvarianten konnte diese Hemmwirkung durch von außen zugeführtes ATP aufgehoben werden, während ADP dazu teilweise befähigt war. Diese Ergebnisse führten zur Schlußfolgerung, daß Oligomycin die Protoplasmaströmung über die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung und der in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisierten ATPasen beeinflusst.

Zur weiteren Aufklärung der Oligomycin-Wirkung auf die Plasmaströmung wurden die vorliegenden Versuche mit einer stark verdünnten und stimulierend wirkenden [10] Hemmstofflösung unter Verabreichung von ATP und ADP durchgeführt.

MATERIAL UND ARBEITSMETHODE

Als Versuchsmaterial wurden 400—500 µm lange Wurzelhaarzellen der Tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.), Sorte Rütgers, verwendet, die eine lebhaft Zirkulationsströmung aufweisen. Die Keimung der Samen

REV. ROUM. BIOL.—BIOL. VÉG., TOME 22, N° 1, p. 59—63, BUCAREST, 1977

erfolgte in Petrischalen auf mit Leitungswasser befeuchtetem Filterpapier [10].

Oligomycin (rein, Serva-Heidelberg) wurde in absolutem Äthylalkohol gelöst und mit bidestilliertem Wasser bis auf eine Endkonzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die Arbeitslösung enthielt $0,4\%$ Äthylalkohol. Die gleiche Menge an Äthylalkohol wurde allen anderen Versuchslösungen beigelegt.

ATP und ADP (Natrium-Salze) wurden als 10^{-6} molare Lösungen verwendet.

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) und bei pH 4,5–5,0 durchgeführt. Die Kontrolle wurde in bidestilliertem Wasser mit $0,4\%$ Äthylalkohol gemessen. Die Behandlung der mikroskopischen Präparate mit Oligomycin, ATP und ADP erfolgte durch Infiltration unter dem Deckglas. Weitere technische Einzelheiten der Versuchsdurchführung sind früheren Arbeiten zu entnehmen [10], [11], [12], [13].

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Protoplasmaströmung ist als aktive Leistung der Zelle von den energieliefernden Stoffwechselprozessen abhängig [12], [13]. Im Einklang mit früheren Untersuchungen [11], [12], [13] bewirkt die Ver-

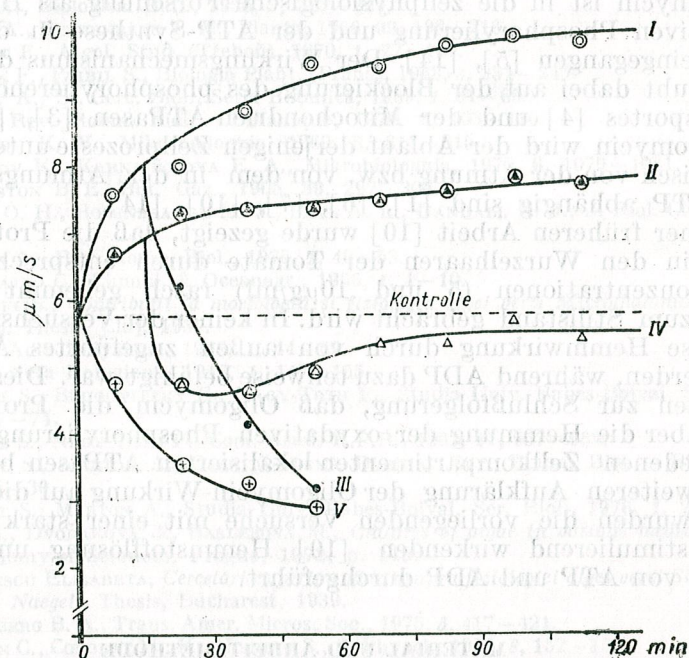


Abb. 1. — Die Wirkung von Oligomycin ($0,5 \mu\text{g/ml}$) und ATP (10^{-6}M) auf die Zirkulationsströmung in den Wurzelhaaren der Tomate. I = kontinuierliche ATP-Verabreichung; II = kontinuierliche Oligomycin-Behandlung; III = Oligomycin nach 15 min ATP-Vorbehandlung; IV = ATP nach 15 min Oligomycin-Vorbehandlung; V = gleichzeitige ATP- und Oligomycin-Behandlung. Die eingekreisten Punkte markieren statistisch gesicherte Werte.

abreichung von ATP bzw. von ADP (10^{-6}M) eine beträchtliche Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit (Abb. 1 und Abb. 2, I). Diese Ergebnisse beweisen, daß die von außen zugeführte ATP- bzw. ADP-Menge unmittelbar bzw. über die Stimulation der Atmung für den Betrieb der Plasmaströmung genutzt wird (vgl. [10]).

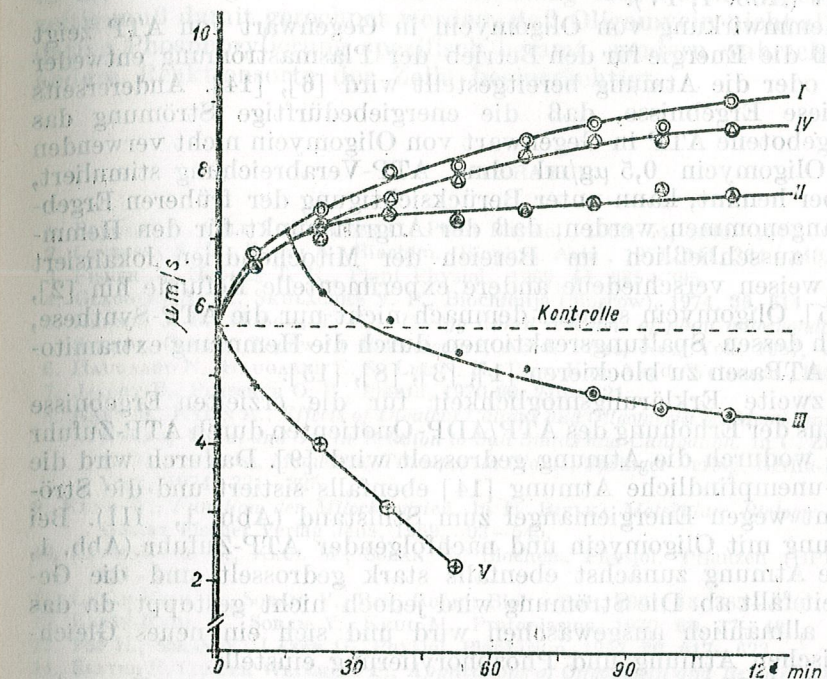


Abb. 2. — Die Wirkung von Oligomycin ($0,5 \mu\text{g/ml}$) und ADP (10^{-6}M) auf die Zirkulationsströmung in den Wurzelhaaren der Tomate. I = kontinuierliche ADP-Verabreichung; II = kontinuierliche Oligomycin-Behandlung; III = Oligomycin nach 15 min ADP-Vorbehandlung; IV = ADP nach 15 min Oligomycin-Vorbehandlung; V = gleichzeitige ADP- und Oligomycin-Behandlung. Die eingekreisten Punkte markieren statistisch gesicherte Werte.

Im Gegensatz zur Wirkung höherer Oligomycin-Konzentrationen (5 und $10 \mu\text{g/ml}$), die die Strömung durch die Blockierung der ATP-Synthese zum Stillstand bringen, verursacht die in vorliegender Arbeit verwendete Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ eine leichte, aber statistisch gesicherte Stimulation (Abb. 1 und Abb. 2, II). Die stimulierende Wirkung stark verdünnter Oligomycin-Lösungen auf die oxydative Phosphorylierung, die Glykolyse und ATP-abhängige Zellprozesse ist bekannt [14].

Die Wirkung dieser Oligomycin-Konzentration ($0,5 \mu\text{g/ml}$) wurde in verschiedenen Versuchsvarianten mit der Verabreichung von ATP und ADP (10^{-6}M) kombiniert. Die erzielten Ergebnisse stimmen z.T. überraschend mit der Wirkung einer zehnmal höheren und kategorisch hemmenden Dosis ($5 \mu\text{g/ml}$) überein [10]. So wird die Strömung nach

einer Vorbehandlung mit ATP durch Oligomycin 0,5 µg/ml (Abb. 1, III) bzw. nach gleichzeitiger Verabreichung von ATP und Oligomycin 0,5 µg/ml (Abb. 1, V) in gleicher Weise gehemmt und gestoppt, wie das auch bei Anwendung von Oligomycin 5 µg/ml der Fall war [10]. Nach einer Vorbehandlung mit Oligomycin 0,5 µg/ml induziert die Zufuhr von ATP eine schockartige Hemmung der Geschwindigkeit bis auf den Kontrollwert (Abb. 1, IV).

Die Hemmwirkung von Oligomycin in Gegenwart von ATP zeigt deutlich, daß die Energie für den Betrieb der Plasmaströmung entweder durch ATP oder die Atmung bereitgestellt wird [6], [14]. Andererseits beweisen diese Ergebnisse, daß die energiebedürftige Strömung das von außen gebotene ATP in Gegenwart von Oligomycin nicht verwenden kann. Da Oligomycin 0,5 µg/ml ohne ATP-Verabreichung stimuliert, mit ATP aber hemmt, kann unter Berücksichtigung der früheren Ergebnisse [10] angenommen werden, daß der Angriffspunkt für den Hemmstoff nicht ausschließlich im Bereich der Mitochondrien lokalisiert ist. Darauf weisen verschiedene andere experimentelle Befunde hin [2], [3], [7], [15]. Oligomycin scheint demnach nicht nur die ATP-Synthese, sondern auch dessen Spaltungsreaktionen durch die Hemmung extramitochondrialer ATPasen zu blockieren [1], [3], [8], [15].

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit für die erzielten Ergebnisse ergibt sich aus der Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten durch ATP-Zufuhr von außen, wodurch die Atmung gedrosselt wird [9]. Dadurch wird die Oligomycin-unempfindliche Atmung [14] ebenfalls sistiert und die Strömung kommt wegen Energiemangel zum Stillstand (Abb. 1, III). Bei Vorbehandlung mit Oligomycin und nachfolgender ATP-Zufuhr (Abb. 1, IV) wird die Atmung zunächst ebenfalls stark gedrosselt und die Geschwindigkeit fällt ab. Die Strömung wird jedoch nicht gestoppt, da das Oligomycin allmählich ausgewaschen wird und sich ein neues Gleichgewicht zwischen Atmung und Phosphorylierung einstellt.

Diese Schlußfolgerungen werden durch die Ergebnisse der Versuchsvarianten mit ADP und Oligomycin untermauert (Abb. 2). Die durch ADP hervorgerufene Strömungsstimulation (Abb. 2, I) beruht nach den bisherigen Befunden [10], [12] auf einer erhöhten ATP-Synthese in der Atmungskette. Die ADP-stimulierte Atmung und die dadurch induzierte zusätzliche ATP-Synthese werden durch Oligomycin wieder aufgehoben [14], so daß die Geschwindigkeit bis auf den Kontrollwert vor der ADP-Verabreichung herabgesetzt und leicht gehemmt wird (Abb. 2, III). Diese Ergebnisse sind andererseits ein Beweis für die oben angenommene Oligomycin-unempfindliche Atmung [14]; dadurch kann ein Teil des zugeführten ADP in ATP umgesetzt werden, so daß die Strömung weiterhin bestehen bleibt. In die gleiche Richtung deuten auch die Befunde der Versuchsvariante, in der ADP nach Oligomycin geboten wird (Abb. 2, IV), wodurch keine weitere Beeinflussung der Strömung erzielt wird. Dagegen führt die gleichzeitige Verabreichung von ADP und Oligomycin (Abb. 2, V), wie die entsprechende Variante mit Oligomycin 5 µg/ml [10] bzw. mit ATP (Abb. 1, V), ebenfalls zum raschen Stillstand der Strömung. In dieser Variante kann das zugeführte ADP demnach nicht zur Stimulation der Atmung und der Strömung verwendet werden. Diese Angaben scheinen auf die gleichzeitige Hemmung verschiedener Reaktionsorte

der Zelle durch Oligomycin hinzuweisen. Vermutlich wird die aktive ADP-Aufnahme in die Zelle bzw. in die Mitochondrien durch die Blockierung membrangebundener ATPasen-Systeme gehemmt [2], [3], [8], so daß die Phosphorylierung in der Atmungskette wegen ADP-Mangel zum Stehen kommt.

Die durchgeführten Versuche ermöglichen einen weiteren Einblick in die Bioenergetik der Plasmaströmung und deren Regelung. Gleichzeitig muß damit gerechnet werden, daß Oligomycin nicht allein die oxydative Phosphorylierung spezifisch hemmt, sondern wahrscheinlich auch andere Reaktionsorte der Zelle beeinträchtigt.

LITERATUR

1. BLEDSOE C., COLE C. V., ROSS C., *Plant Physiol.*, 1969, **44**, 1040–1044.
2. CONTESSA A. R., BRUNI A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, **241**, 334–340.
3. FISHER J., HODGES T. K., *Plant Physiol.*, 1969, **44**, 385–395.
4. GLAGOLEV A. N., SKULACHEV V. P., *Biochimija* (Moscow), 1974, **39**, 614–618.
5. HANSON J. B., HODGES T. K., *Energy linked reactions of plant mitochondria*. In D. R. SANADI, *Current Topics in Bioenergetics*, Acad. Press, New York, 1967, vol. 2, 65–98.
6. HAUGAARD N., HAUGAARD E. S., LEE N. H., *Proc. Kon. Akad. Wetensch.*, 1969, **C. 72**, 1–15.
7. JACOBY B., PLESSNER O. E., *Planta*, 1970 **90**, 215–221.
8. KÄHR M., KYLIN A., *Effects of Divalent Cations and Oligomycin on Membrane ATPases from Roots of Wheat and Oat in Relation to Salt Status and Cultivation*. In U. ZIMMERMANN and J. DAINTY (eds), *Membrane Transport in Plants*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1974, 321–325.
9. KUNZ W., *Funktion der Mitochondrien*. In H. BIELKA *Molekulare Biologie der Zelle*, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1969, 503–545.
10. LAZÄR-KEUL G., KEUL M., SORAN V., *Biochem. Physiol. Pflanzen* (BPP), 1974, **166**, 255–262.
11. LAZÄR-KEUL G., SORAN V., *Rev. Roum. Biol.—Bot.*, 1971, **16**, 365–370.
12. LAZÄR-KEUL G., SORAN V., KEUL M., *Protoplasma*, 1970, **69**, 37–48.
13. POP E., SORAN V., LAZÄR G., *Physiol. Plantarum*, 1967, **20**, 617–623.
14. SLATER E. C., TER WELLE H. F., *Applications of Oligomycin and Related Inhibitors in Bioenergetics*. In Th. BÜCHER and H. SIES *Inhibitors Tools in Cell Research*, 20. Colloquium der Ges. für Biol. Chemie, Springer-Verlag New York-Heidelberg-Berlin, 1969, 258–278.
15. WHITTAM R., WHEELER K. P., BLAKE A., *Nature*, 1964, **203**, 720–724.

Eingegangen am 26. April 1976

Biologisches Forschungszentrum
Cluj-Napoca

THE EFFECT OF SOME CATIONS UPON INTRACELLULAR MOVEMENTS WITHIN BARLEY ROOT HAIRS

BY MARGARETA JORDAN and V. SORAN

The effect of calcium, magnesium, potassium and sodium in various concentrations and at different rates, coupled two by two, upon the speed of protoplasmic streaming was searched. The behaviour of protoplasmic streaming after the treatment with all these cations indirectly proved the existence of four different kinds of ATP-ases within root hairs cytoplasm. The strongest stimulative effect of cations on protoplasmic streaming speed was obtained by treatment with Ca : K (1 : 1), K : Na (1 : 1 and 1 : 3), Ca : Mg (1 : 1 and 3 : 1), Ca and Mg separately, all of them at 10^{-3} M concentration.

The investigations performed in the last two decades [14], [15], [22], [23] have shown that the protoplasmic movement within plant cell, in spite of the fact that it is a more simple and ancestral phenomenon than muscle contraction, is essentially grounded on the same sequences of biochemical reactions and biophysical processes.

It was proved, by different experimental methods, that protoplasmic movements both within lower plant cell [20], [21], [30], [31], [32] and within higher plant cell [2], [17], [24], [27], [29], are dependent on ATP-released energy.

The general biochemical reaction at the basis of all active movements performed by living systems is an enzymic one, according to equation :



The released energy obtained by ATP hydrolysis in ADP is used during the change of contractile protein configuration. At the cellular and tissular level the biomechanical work results from this released energy.

This general reaction may be influenced by various factors ; among them the cations may play a conclusive role [4], [7], [17]. Because the role of different cations in achieving the intracellular movements is still little known, the aim of this paper was to study some dynamical aspects of several cations upon rotational streaming (a kind of intracellular movement within higher plant cell).

¹ (Pc)' and (Pc)'' = the molecule of contractile protein in two different space configurations which correspond at the cellular and tissue levels to relaxed or contracted state of contractile fibrils (i.e. different types of myosin) ; Pi = inorganic phosphate.

MATERIAL AND METHODS

The plant material used in our investigations was barley (*Hordeum vulgare* L.) root hairs. The reason of choosing this material was a methodological one.

The root hairs are rhizodermal cell protuberances which can be easily and separately observed by the phase contrast technique. This facility increases the measurement accuracy.

On the other hand, they take up very easily and rapidly many substances, even those which cannot penetrate or penetrate very slowly into other types of plant cell. In this respect almost all inorganic and micro-molecular organic substances which are able to influence the biophysical and biochemical state of cytoplasm will disclose their presence through their action upon rotational streaming.

A basic condition for studying such a changeable process as the protoplasmic streaming is to obtain under standard circumstances a plant material as uniform as possible. We achieved this by the germination of barley seeds on filter paper moistened with bidistilled water in Petri dishes, when studying calcium action and its antagonism with other cations. We used filter paper moistened with tap water (at pH = 7) when studying the action of potassium, sodium and magnesium.

The temperature during the germination and experimental procedure was maintained relatively constant at $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

The measurement of the rotational streaming rate was made by following up the spherosomes running per unit of time with the aid of an eyepiece scale and a stopwatch [15], [28].

The rate of spherosomes was given in $\mu\text{m}/\text{sec}$ and relative values. The obtained data were processed by usual statistic-mathematical methods [33].

RESULTS AND DISCUSSIONS

Action of bivalent cations. Among many bivalent cations we used only Ca and Mg because they participate directly, but through not yet well understood ways, in the contraction and relaxation mechanisms of myosins.

In figures 1 and 2 are plotted the relative values of changes of the rotational streaming speed after the treatment of root hairs with CaCl_2 and MgCl_2 in the following concentrations: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} M. In table 1 are shown the differences between control and treated root hairs both in $\mu\text{m}/\text{sec}$ and relative values for steady state of the process (during 45 — 120 minutes of continuous treatment).

It was proved that the effect of these two cations is slightly different. Calcium in all supplied concentrations, within the first 30 — 45 minutes, brought about an exponential increase of the rotational streaming speed. Then the increase of streaming velocity became slower and slower, a steady state with small fluctuations around the mean values being finally reached (Table 1).

The effect of calcium was different according to the concentrations both in the phase of exponential increase and in the phase of steady state of streaming speed.

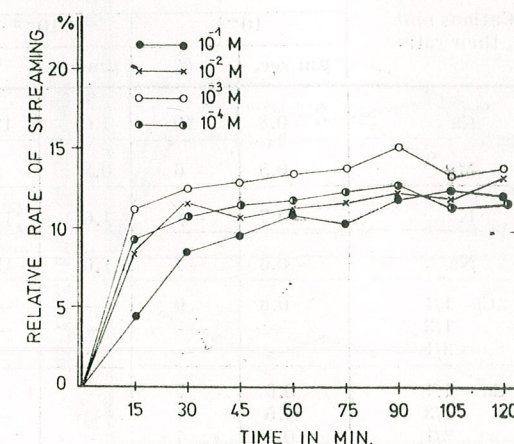


Fig. 1. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the effect of various CaCl_2 concentrations. The data are in %, against the control which is 0.

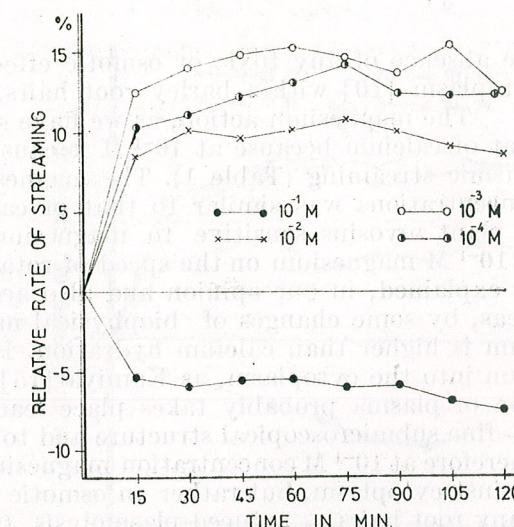


Fig. 2. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the effect of various MgCl_2 concentrations. The data are in %, against the control which is 0.

The most stimulative concentration was proved to be 10^{-3} M. These results agree with Sato's [25], [26], Kamiya's [15] and Poglavov's [22], [23] data about the action of calcium upon different kinds of contractile proteins and movements caused by them. We suppose that the concentration of 10^{-3} M calcium is an optimal one for the activation of phytomyosins (ATP-ases sensitive to calcium) and for the release of energy needed to support the streaming. On the other hand, our investigations have proved

Table 1

The effect of various cations on rotational streaming within barley root hairs. The speed of streaming is in $\mu\text{m}/\text{sec}$ and the differences between control and treated is in %. The data are related to the steady state period of the process, i.e. 45–120 minutes after treatment

Cations and their ratio	Concentration in mol.							
	10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}	
	$\mu\text{m}/\text{sec.}$	%	$\mu\text{m}/\text{sec.}$	%	$\mu\text{m}/\text{sec.}$	%	$\mu\text{m}/\text{sec.}$	%
Ca	0.8	10	1.0	12	1.2	14	0.9	11
Mg	—0.5	—6	0.8	9	1.2	14	1.1	11
K	—0.7	—8	1.0	11	0.7	8	0.6	7
Na	—0.6	—7	1.0	12	0.9	11	0.5	6
Mg : Ca 1/1	0.8	9	—	—	1.3	14	—	—
1/3	—	—	—	—	1.3	14	—	—
3/1	—	—	—	—	1.1	12	—	—
K : Ca 1/1	0.6	7	—	—	1.4	17	—	—
1/3	0.5	7	—	—	1.0	12	—	—
3/1	0.6	7	—	—	1.0	12	—	—
K : Na 1/1	—	—	—	—	1.3	15	—	—
1/3	—	—	—	—	1.2	14	—	—
3/1	—	—	—	—	1.1	13	—	—

the absence of any toxic or osmotic effect of calcium against plant cell cytoplasm [10] within barley root hairs.

The magnesium action, as we have shown, was quite different from that of calcium because at 10^{-1} M it caused a strong inhibition of protoplasmic streaming (Table 1). The magnesium action for the other three concentrations was similar to that of calcium, probably by activation of plant myosins sensitive to magnesium. The entirely different effect of 10^{-1} M magnesium on the speed of rotational streaming may probably be explained, in our opinion and also according to Kamiya's [14], [15] ideas, by some changes of biophysical nature. The hydration of magnesium is higher than calcium hydration. By bulky penetration of magnesium into the cytoplasm, as Kamiya [15] maintained, a partial dehydration of plasma probably takes place leading to another orientation of its fine submicroscopical structure and to a small increase of its viscosity. Therefore at 10^{-1} M concentration magnesium does not have a toxic action against cytoplasm, but rather an osmotic one. On the other hand, within many root hairs a reduced plasmolysis (incipient plasmolysis) at 10^{-1} M magnesium may be noticed. The lowering of rotational streaming rate in the case of 10^{-1} M was probably due to biophysical processes in connection with the increase of viscosity and incipient plasmolysis.

Action of monovalent cations. Barley root hairs were treated during 120 minutes with KCl or NaCl at the concentrations of 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} M. The speed of streaming was measured per 15 minutes interval. It is assumed that these two monovalent cations play a different rôle in the life of plant organism. It is well known that K is necessary for plant growth, being selectively accumulated by all plant cells [3]. In ex-

change sodium is considered by many authors as an important element for animal cell but without meaning for plant cell, except in the halophytes.

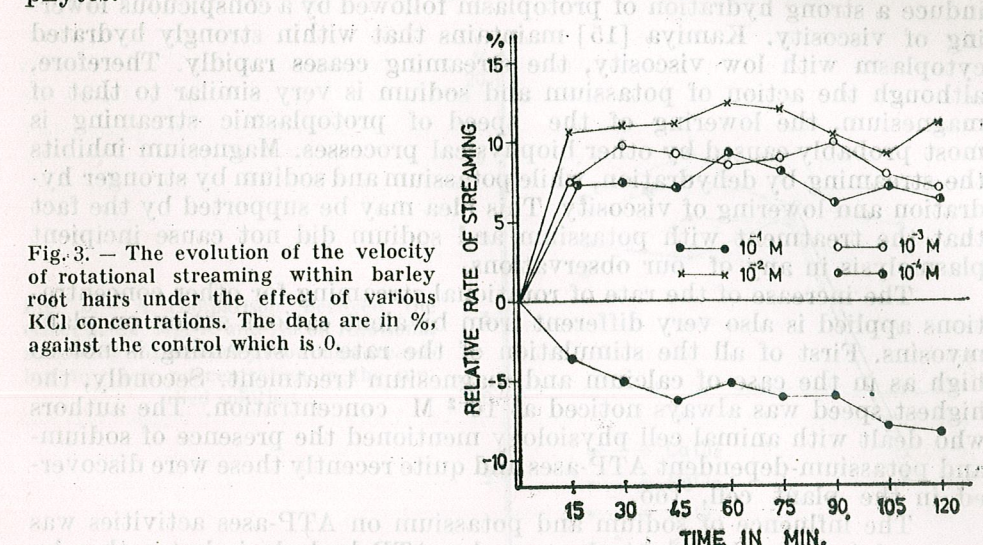


Fig. 3. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the effect of various KCl concentrations. The data are in %, against the control which is 0.

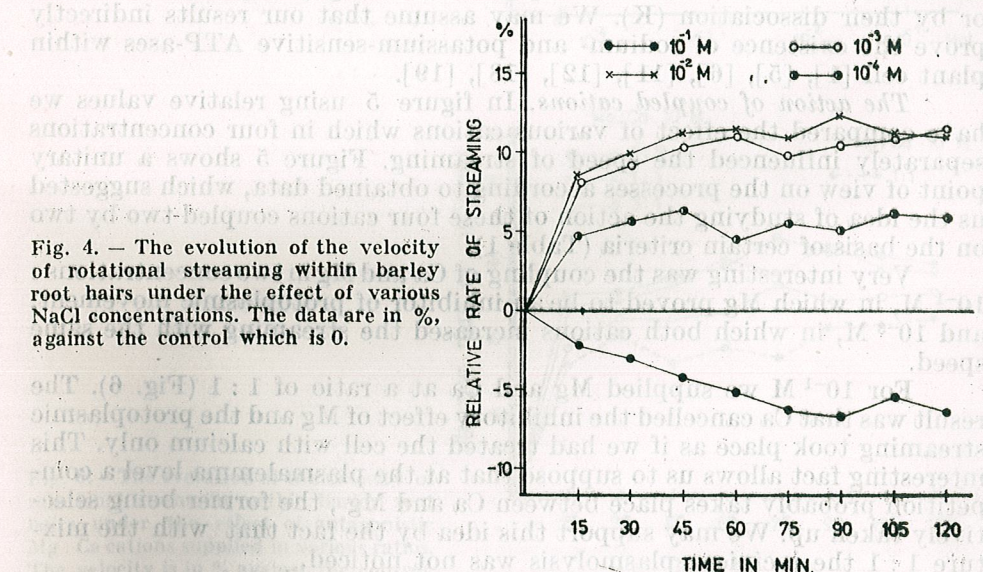


Fig. 4. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the effect of various NaCl concentrations. The data are in %, against the control which is 0.

The effect of these two cations on rotational streaming within barley root hairs is similar (Figs 3 and 4) and partly reminds us of the action of magnesium (Fig. 2).

At the concentration of 10^{-1} M both cations induced a lowering of protoplasmic streaming at a velocity under the control level. Both cations

are strongly hydrated and through their penetration within the plant cell they probably change the hydration and viscosity of cytoplasm [13].

According to Höfler's idea [13] the salts of alkaline metals usually induce a strong hydration of protoplasm followed by a conspicuous lowering of viscosity. Kamiya [15] maintains that within strongly hydrated cytoplasm with low viscosity, the streaming ceases rapidly. Therefore, although the action of potassium and sodium is very similar to that of magnesium, the lowering of the speed of protoplasmic streaming is most probably caused by other biophysical processes. Magnesium inhibits the streaming by dehydration, while potassium and sodium by stronger hydration and lowering of viscosity. This idea may be supported by the fact that the treatment with potassium and sodium did not cause incipient plasmolysis in any of our observations.

The increase of the rate of rotational streaming for other concentrations applied is also very different from bivalent cations action on plant myosins. First of all the stimulation of the rate of streaming is not so high as in the case of calcium and magnesium treatment. Secondly, the highest speed was always noticed at 10^{-2} M concentration. The authors who dealt with animal cell physiology mentioned the presence of sodium- and potassium-dependent ATP-ases and quite recently these were discovered in the plant cell, too.

The influence of sodium and potassium on ATP-ases activities was not explained in this particular case by ATP hydrolysis but rather by formation of some intermediate products during phosphorylation (Na) or by their dissociation (K). We may assume that our results indirectly prove the existence of sodium- and potassium-sensitive ATP-ases within plant cell [1], [5], [6], [11], [12], [18], [19].

The action of coupled cations. In figure 5 using relative values we have compared the effect of various cations which in four concentrations separately influenced the speed of streaming. Figure 5 shows a unitary point of view on the processes according to obtained data, which suggested us the idea of studying the action of these four cations coupled two by two on the basis of certain criteria (Table 1).

Very interesting was the coupling of Ca and Mg in two concentrations: 10^{-1} M, in which Mg proved to be an inhibitor of protoplasmic movement, and 10^{-3} M, in which both cations increased the streaming with the same speed.

For 10^{-1} M we supplied Mg and Ca at a ratio of 1:1 (Fig. 6). The result was that Ca cancelled the inhibitory effect of Mg and the protoplasmic streaming took place as if we had treated the cell with calcium only. This interesting fact allows us to suppose that at the plasmalemma level a competition probably takes place between Ca and Mg, the former being selectively taken up. We may support this idea by the fact that with the mixture 1:1 the incipient plasmolysis was not noticed.

For 10^{-3} M we supplied the two cations in three different ratios, according to table 1.

It was noticed that 1:3 and 1:1 ratios of Mg to Ca induced a higher speed of streaming than their separate supplying. With the 3:1 ratio of Mg to Ca the speed of protoplasmic streaming was lower. It is very difficult to explain all these behaviours. One assumption could be the slight in-

crease of ATP hydrolysis through two ATP-ases activated by these two cations. Anyway, the process is facilitated when calcium exceeds Mg. The increase of Mg leads to a slight decrease of protoplasmic movement

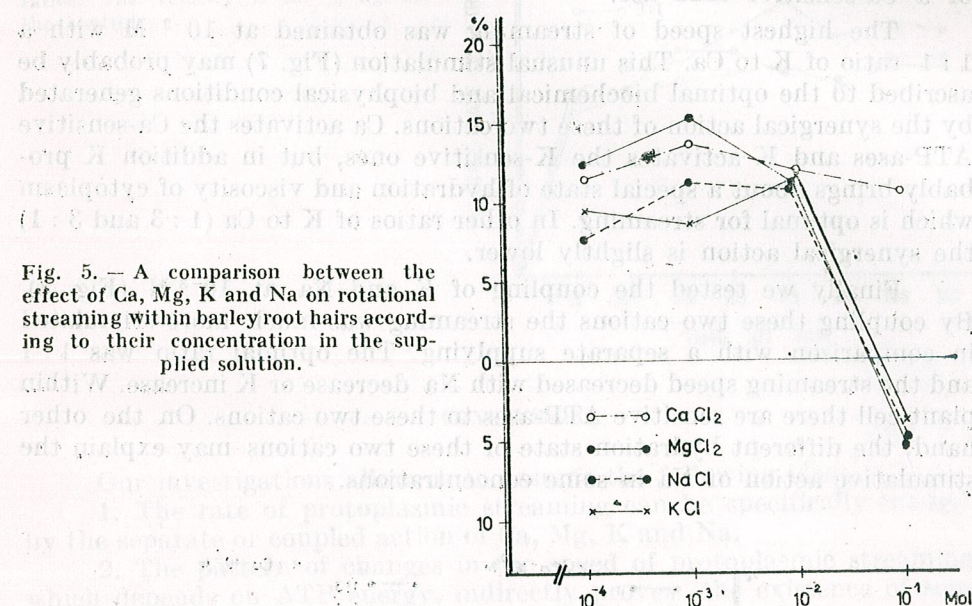


Fig. 5. — A comparison between the effect of Ca, Mg, K and Na on rotational streaming within barley root hairs according to their concentration in the supplied solution.

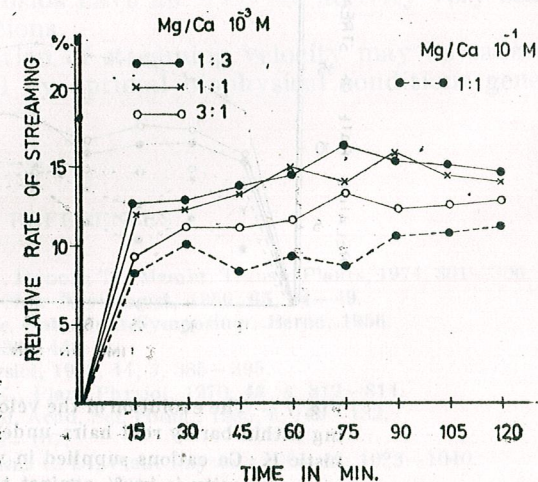


Fig. 6. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the effect of antagonistic Mg:Ca cations supplied in various ratios. The velocity is in % against the control.

speed in comparison with the treatment made separately with these two cations.

A similar effect, consisting in the cancelling of inhibition and a subsequent stimulation of streaming was noticed when we supplied K and Ca at 10^{-1} M concentration. Within steady state the highest values

of streaming velocity were reached irrespective of the initial ratio between K and Ca (Table 1), but they were smaller than after treatment with Ca alone. This stimulative effect may be also ascribed to the activation of a Ca-sensitive ATP-ase.

The highest speed of streaming was obtained at 10^{-3} M with a 1:1 ratio of K to Ca. This unusual stimulation (Fig. 7) may probably be ascribed to the optimal biochemical and biophysical conditions generated by the synergical action of these two cations. Ca activates the Ca-sensitive ATP-ases and K activates the K-sensitive ones, but in addition K probably brings about a special state of hydration and viscosity of cytoplasm which is optimal for streaming. In other ratios of K to Ca (1:3 and 3:1) the synergical action is slightly lower.

Finally we tested the coupling of K and Na at 10^{-3} M (Fig. 8). By coupling these two cations the streaming was much more stimulated in comparison with a separate supplying. The optimal ratio was 1:1 and the streaming speed decreased with Na decrease or K increase. Within plant cell there are sensitive ATP-ases to these two cations. On the other hand, the different hydration state of these two cations may explain the stimulative action of Na in some concentrations.

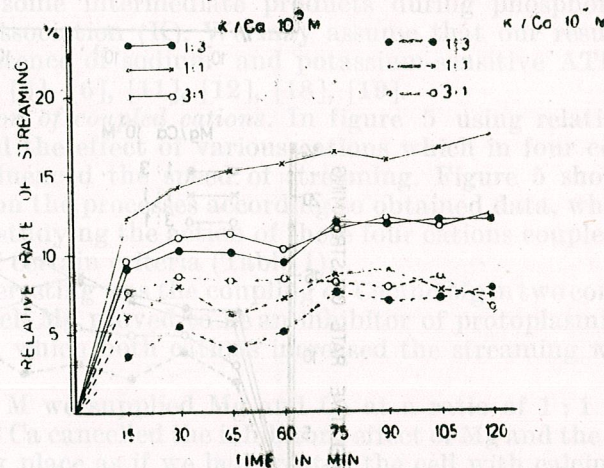
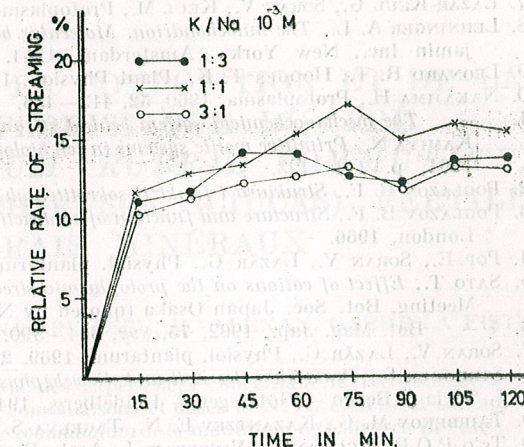


Fig. 7. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the action of antagonistic K:Ca cations supplied in various ratios. The velocity is in % against the control.

The connection of protoplasmic streaming in plant cell with Na proves the great anciency of cytoplasmic motility within the living world, which probably originates in the period when the marked difference between animal and plant kingdoms was not yet achieved.

Fig. 8. — The evolution of the velocity of rotational streaming within barley root hairs under the action of antagonistic K:Na cations supplied in various ratios. The velocity is in % against the control.



CONCLUSIONS

Our investigations allow us to assume the following ideas:

1. The rate of protoplasmic streaming can be specifically changed by the separate or coupled action of Ca, Mg, K and Na.
2. The pattern of changes in the speed of protoplasmic streaming, which depends on ATP energy, indirectly proves the existence of some phytomyosins within plant cell.
3. The assumed phytomyosins have an ATP-ase activity very sensitive to the experimented cations.
4. The maximum stimulation of streaming velocity may be caused by some cations synergism and by optimal biophysical conditions generated by their coupling.

REFERENCES

1. BALKE N. E., HEVEN S., LEONARD R., HODGES T., Membr. Transp. Plants, 1974, 301—306.
2. BRUESKE C. H., APPEGATE H. H., New Phytologist, 1966, 65, 44—49.
3. COIC Y., *Le potassium dans la cellule*. Potassium-Symposium, Berne, 1956.
4. COLLA S., Protoplasma, 1929, 6, 438—448.
5. FISHER J., HODGES T. K., Plant Physiol, 1969, 44, 3, 385—395.
6. FISHER J., HANSEN D., HODGES T. K., Plant Physiol, 1970, 46, 6, 812—814.
7. GIMESI N. I., POZSAR B. J., Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 1955, 6, 113—132.
8. HALL J. L., Planta, 1969, 85, 105—107.
9. HANSON J. B., MALHOTA S. S., STONER C. D., Plant Physiol., 1965, 40, 1023—1040.
10. HOLST A., Svensk. bot. T., 1964, 58, 2, 409—431.
11. HODGES T. K., HANSON J. B., Plant Physiol., 1965, 40, 101—109.
12. HODGES T. K., Adv. Agron. U.S.A., 1973, 25, 163—207.
13. HÖFLER K., Ber. dtsch. Bot. Ges., 1940, 58, 292—305.
14. KAMIYA N., NAKAJIMA H., ABE S., Protoplasma, 1957, 48, 94—112.
15. KAMIYA N., *Protoplasmic streaming*. Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung, Springer Verlag, Wien, 1959, VIII, 3a.
16. — *Protoplasmic streaming*. In: RUHLANDS W., Encyclopedia of plant physiology. Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1962, 17, part 2, p. 979—1035.

17. LAZĂR-KEUL G., SORAN V., KEUL M., *Protoplasma*, 1970, **69**, 1, 37—48.
18. LEHNINGER A. L., *The mitochondrion. Molecular basis of structure and function*. W. A. Benjamin Inc., New York — Amsterdam, 1964.
19. LEONARD R. T., HODGES T. K., *Plant Physiol.*, 1973, **52**, 1, 6—12.
20. NAKAJIMA H., *Protoplasma*, 1960, **52**, 413—436.
21. — *The mechanochemical system behind streaming in Physarum*. In: ALLEN R. D. and KAMIYA N., *Primitive motile systems in cell biology*, Academic Press, New York — London, 1964, p. 111—123.
22. POGLAZOV B. F., *Struktura i funkții sokrotitelnykh belkov*. Izd. Nauka, Moskova, 1965.
23. POGLAZOV B. F., *Structure and function of contractile proteins*. Academic Press, New York — London, 1966.
24. POP E., SORAN V., LAZĂR G., *Physiol. plantarum*, 1967, **20**, 617—623.
25. SATO T., *Effect of cations on the protoplasmic streaming in Acetabularia calyculus*. Kanazai Meeting, Bot. Soc. Japan Osaka (quoted by N. KAMIYA, 1962), 1959.
26. — *Bot. Mag. Jap.*, 1962, **75**, 892, 384—390.
27. SORAN V., LAZĂR G., *Physiol. plantarum*, 1969, **22**, 560—569.
28. STRUGGER S., *Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen*, 2nd ed., Springer Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg, 1949.
29. TAIRBEKOV M. G., KAZANTZEV E. N., TAGEEVA S. V., *Biohimija*, 1965, **30**, 1007—1012.
30. Ts'o P.O.P., EGGMAN L., VINOGRAD J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **66**, 64—70.
31. VOROBEVA I. A., POGLAZOV B. F., *Biofizika*, 1963, **8**, 427—429.
32. VOROBEVA I. A., VOROBEV L. N., *Biofizika*, 1965, **10**, 1007—1012.
33. WEBER E., *Grundriß der biologischen Statistik*, 2nd ed. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1964.

Received April 27, 1976

Institute of Pedagogical Sciences

8700 Constanța, Bd. Lenin 124

and

Biological Sciences Center

3400 Cluj Napoca, str. Republicii 48

LA DYNAMIQUE DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE FLORISTIQUE DU PRÉ NARDETO-FESTUCETUM RUBRAE COMMUTATUM DE LA MONTAGNE CHIRUȘCA (CIUCAȘ) FERTILISÉ À ENGRAIS MINÉRAUX

PAR

D. PUȘCARU, MARIA CIUCĂ, IOANA SPIRESCU, M. ALEXAN, GABRIELĂ FIȘTEAG

L'ouvrage comprend les résultats des expériences concernant la fertilisation à engrais minéraux de différentes combinaisons et doses de NPK, effectuées sur un pré de *Nardeto-Festucetum rubrae commutatum* de la montagne de Chiruşca (à l'altitude de 1 600 m).

Dans la composition et la structure floristique du pré, l'espèce *Nardus stricta* est diminuée et parallèlement s'accroît la participation des espèces valéneuses *Festuca rubra commutata* et *Agrostis tenuis*.

On montre ensuite l'augmentation de la production de biomasse aux différentes variantes, tout en indiquant comme les plus efficaces du point de vue économique les variantes à doses moyennes (V_3 à N 100, P 50, K 50 et V_4 à N 50, P 100, K 50).

Pour assurer la nourriture des animaux de notre pays avec des fourrages de qualité supérieure et en quantités suffisantes, on a élaboré la loi pour l'organisation, la production et l'utilisation rationnelle des ressources fourragères, en accordant une importance majeure aux prairies naturelles comme nourriture de base pour les bovinés et les ovins pendant l'été.

A cet effet, la pratique agro-pastorale des différentes régions du pays peut être basée sur les résultats des expériences effectuées par des spécialistes, en vue d'améliorer les prairies naturelles en les fertilisant par des engrais minéraux et organiques [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

A partir de 1958, notre collectif a organisé une série d'expériences d'amélioration dans divers groupes de prairies de la zone forestière et dans le territoire sousalpin. Pour la prairie au tordyle élevé à paille rouge (*Nardeto-Festucetum rubrae commutatum*), nos expériences de fertilisation ont commencé depuis 1966 sur la montagne Chiruşca à une altitude de 1 600 m, dans la prairie la plus représentative pour être améliorée en perspective.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'étude ci-dessous.

MÉTHODE DE RECHERCHE ET D'EXPÉRIMENT

Nos recherches et expériences furent effectuées sur l'association de *Nardeto strictae-Festucetum rubrae commutatum* du mont Chiruşca, pendant 6 années (1966—1971) à l'exception de l'année 1967, quand les recherches furent interrompues à cause des calamités naturelles.

Les expériences de fertilisation ont été appliquées d'après le schéma du collectif du CAER, en utilisant des doses petites et moyennes de NPK

ayant un caractère trifactoriel en 4 variantes : V_1 = témoin non fertilisé ; V_2 = N 50, P 50, K 50 ; V_3 = N 100, P 50, K 50 ; V_4 = N 50, P 100, K 50, auxquelles ont été jointes encore 2 autres variantes avec des doses plus grandes, c'est à dire : V_5 = N 200, P 100, K 100 et V_6 = N 300, P 100.

Toutes les doses mentionnées ont été appliquées une seule fois, au printemps de l'année 1966. La surface des parcelles expérimentales a été de 32 m² (8 × 4), rangées en rectangle à 4 répétitions.

LES RÉSULTATS DE NOS PROPRES RECHERCHES

La composition ainsi que la structure floristique de V_1 sont restées les mêmes, aussi dans les années après la fertilisation (Tableau 1).

Les doses d'engrais appliquées ont influencé les composants du sol d'une manière différente.

Les engrais combinés de NPK (diverses doses) ont influencé d'une manière favorable, par leur effet rémanent, les propriétés physico-chimiques du sol podsolique humico-féruleux, enrichissant surtout le contenu du sol en azote et en stimulant le développement des espèces valeureuses.

LA DYNAMIQUE DE LA COMPOSITION ET DE LA STRUCTURE FLORISTIQUE

Les prairies de *Nardeto-Festucetum rubrae commutatum* fertilisées avec des engrais minéraux ont réagi énergiquement par l'augmentation et la restructuration de la biomasse, aussi bien que par l'enrichissement des espèces composantes.

Dans la première année d'observation (1966), 22 espèces sont enregistrées, dont 8 du groupe des graminées, 2 du groupe de *Cyperaceae-juncaceae*, 1 du groupe des légumineuses et 11 appartenant au groupe « diverses espèces ». Les espèces du groupe des graminées sont restées numériquement constantes pendant toutes les quatre années d'observation (1968–1971) ; en échange, le groupe des « diverses espèces » s'est enrichi chaque année de nouvelles espèces, en arrivant en 1969 à 33 et en 1971 à 37 espèces (Tableau 1). Parmi les graminées, *Nardus stricta* fut trouvée pendant toutes les années d'observation (1966–1971) comme espèce dominante, dans V_1 (témoin). Cette espèce s'est maintenue plus ou moins abondante, même à la variante V_2 à faible dose d'engrais, tandis qu'aux doses moyennes des variantes V_3 et V_4 on a observé une diminution de cette espèce indésirable, et aux variantes avec des doses plus grandes de la V_5 et V_6 elle a été fortement réduite, restant sous 10% en comparaison avec la variante témoin.

L'espèce *Nardus stricta*, d'une productivité et d'une valeur nourricière très faibles, a été remplacée par des espèces valeureuses comme sont *Festuca rubra* et *Agrostis tenuis*.

LA DYNAMIQUE DE LA PRODUCTION DE BIOMASSE SELON LES ANNÉES

Les résultats obtenus entre les années 1966 et 1971 présentés dans la figure 1, nous montrent que la puissante influence des engrais sur la production de biomasse fut constatée même dans la première année d'observation.

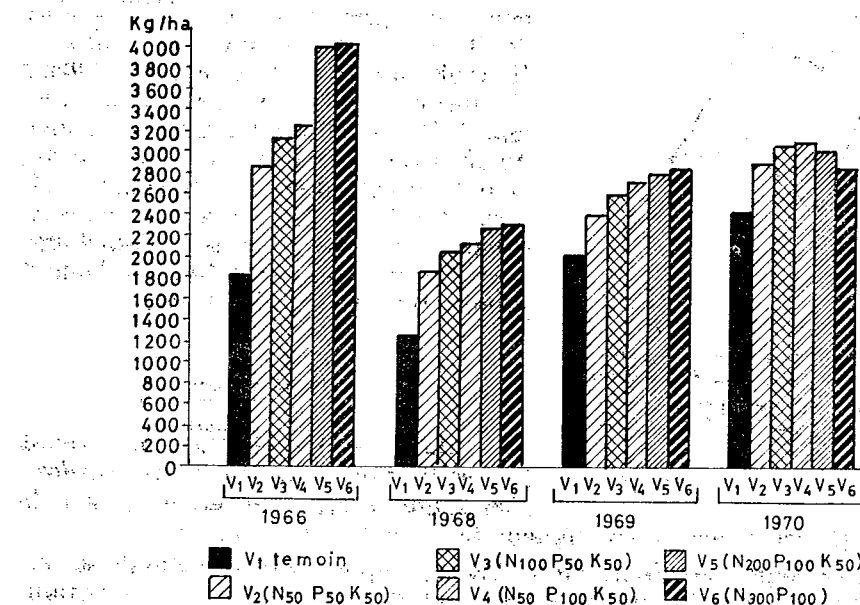


Fig. 1. — La dynamique annuelle de biomasse (récolte de mois août) du pré de *Nardeto-Festucetum rubrae commutatum*, fertilisé avec engrais minéraux une seule fois (1966), effet rémanent.

En 1966, la production de biomasse (récolte de mois août) fut de 1800 kg/ha pour la variante témoin, et de 4000 kg/ha pour la variante V_6 . Durant les années suivantes, la production de biomasse s'est maintenue aux parcelles fertilisées relativement élevée (avec 64–114,6% de juillet 1968) en face de la variante témoin, en obtenant en même temps un fourrage de bonne qualité. Il faut souligner qu'aux variantes avec les doses moyennes (V_3 et V_4) les productions sont significatives, pendant qu'aux variantes avec des grandes doses (V_5 et V_6) qui ont donné les plus grandes productions, celles-ci ne sont pas significatives.

En faisant une comparaison entre l'accroissement de substance sèche des parcelles fertilisées, réalisé en 1970, et les parcelles témoin, on constate que cet accroissement est plus réduit en comparaison avec l'accroissement de la première année (1966).

Mais, si nous comparons la production de substance sèche (kg/ha) par exemple celle-là de V_3 et V_4 (doses moyennes) de 1970 avec la production des mêmes variantes de 1966, on constate que les productions respectives sont très proches l'une à l'autre : 97,7% à V_3 et respectivement 95,7% à V_4 . Cette situation est due autant à l'effet rémanent de la fertilisation, qu'aux conditions atmosphériques plus favorables à la multiplication des espèces diverses et aussi au fait qu'on ne fait pas paître les parcelles.

LE SPECTRE ÉCONOMIQUE DE LA FERTILISATION (fig. 2)

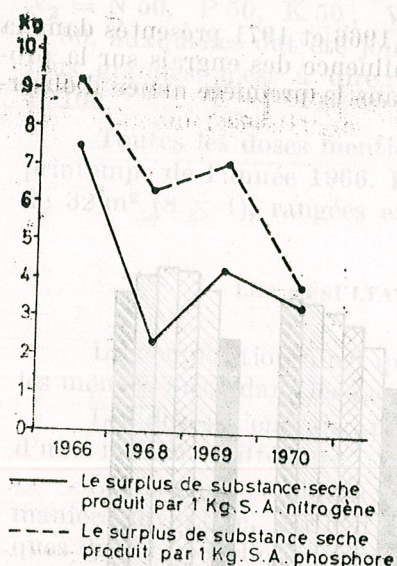


Fig. 2. — Spectre économique.

En analysant les résultats, on constate que le plus grand accroissement de substance active d'azote a été en 1966 à V_3 de 7,5 kg et à V_4 de 9,2 kg; par conséquence les doses moyennes de N et P ont été les plus efficaces. Il résulte de ces faits que nous venons de montrer ci-dessus que P a un très grand rôle dans l'augmentation de la production de biomasse (substance sèche) et qu'il mérite d'être utilisé comme élément fertilisant en doses moyennes en combinaison avec N et K à l'amélioration des prairies naturelles faiblement productives du massif Ciucas.

CONCLUSIONS

Basé sur les résultats concernant la fertilisation de la prairie de *Nardeto-Festucetum rubrae commutatum* sur le mont Chiruşca (Ciucas) on détache les conclusions suivantes :

1. Les engrais combinés de N.P.K. appliqués en différentes doses ont influencé d'une manière positive les propriétés du sol concernant notamment le contenu en humus et azote qui se sont maintenus à des valeurs élevées jusqu'au quatrième année de la fertilisation.
 2. La composition et la structure floristique des parcelles fertilisées ont été aussi influencées favorablement dès la première année d'application des engrais. L'espèce dominante *Nardus stricta* est beaucoup réduite, de 88% (V_1) à 50% resp. 35% (V_4 resp. V_6). Les années suivantes, l'effet rémanent de l'engrais a réduit encore plus l'espèce sans valeur *Nardus stricta*, jusqu'à un coefficient de 5% resp. 8% aux grandes doses (V_6) et de 9—10% aux doses moyennes (V_4) en comparaison avec la prairie non fertilisée V_1 . En échange, ce sont les espèces valeureuses qui se sont développées, *Festuca rubra commutata* et *Agrostis tenuis* en proportion jusqu'à 80% resp. 35%, améliorant ainsi la valeur nutritive de la prairie étudiée.
 3. La production de biomasse a grandi dès la première année chez toutes les variantes fertilisées en proportion de 55% (V_2) — 123% (V_5), devant le témoin.
 4. Le spectre économique de fertilisation montre que 1 kg de substance active de N a produit à V_3 une quantité de 7,5 kg de substance sèche, pendant que 1 kg de substance active de P a produit à V_4 une quantité de 9,2 kg de substance sèche. P a produit toutes les années beaucoup plus de substances sèches que N.
- Les doses les plus efficaces ont été les doses moyennes de V_3 et de V_4 .

BIBLIOGRAPHIE

1. BĂRBULESCU C., BURCEA P., Rev. de Zootechn. et Méd. Vét., 1964, 7.
2. NIEDERMAIER KL., Com. Acad. R.P.R., 1962, 12, 12.
3. PUȘCARU-SOROCEANU E., PUȘCARU D., SÂNDULEAC I., St. și cerc. biol., seria biol. veg., 1963, 15, 4.
4. PUȘCARU-SOROCEANU E. et collab., Anal. ICCPT Fundulea, 1967, 33, S.B.
5. PUȘCARU D. et collab., Pășunile alpine din Munții Bucegi, Ed. Academiei R.P.R., 1956.
6. REȘMERIȚA I., Flora, vegetația și potențialul productiv pe masivul Vlădeasa, Edit. Academiei, 1970.
7. SAMOILĂ Z. et collab., St. și cerc. biol., seria biol. veg., 1963, 15, 3.

Reçu le 19 décembre 1974

Université de Bucarest
Faculté de Biologie
Spl. Independenței Nr. 91—95
et
Institut des Sciences
Biologiques
Spl. Independenței Nr. 296
Bucarest

AVIS AUX AUTEURS

La « Revue roumaine de Biologie-Série de Biologie végétale » publie des articles originaux d'un haut niveau scientifique, de tous les domaines de la biologie végétale : morphologie, systématique, géobotanique, physiologie, écologie, génétique, microbiologie, phytopathologie. Les sommaires des revues sont complétés par d'autres rubriques, comme : 1. La vie scientifique, qui traite des manifestations scientifiques du domaine de la biologie : symposiums, conférences, etc ; 2. Comptes rendus des livres de spécialité parus en Roumanie. Les auteurs sont priés d'envoyer leurs articles, notes et comptes rendus dactylographiés en deux exemplaires.

Les tableaux et l'explication des figures seront dactylographiés sur pages séparées et les diagrammes exécutés à l'encre de Chine noire, sur papier calque.

Les tableaux et les illustrations seront numérotés avec des chiffres arabes. La répétition des mêmes données dans le texte, dans les tableaux ou dans les graphiques sera évitée.

Les références bibliographiques, citées par ordre alphabétique des auteurs, comporteront le nom de l'auteur, l'initiale du prénom, le titre de la revue, abrégé conformément aux usances internationales, l'année, le tome, le numéro, la page. Les travaux seront accompagnés d'un court résumé, de maximum 10 lignes. Les textes des travaux ne doivent pas dépasser 7 pages dactylographiées (y compris les tableaux, la bibliographie et l'explication des figures).

La responsabilité concernant le contenu des articles revient exclusivement aux auteurs.