

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

COMITÉ DE RÉDACTION

Rédacteur en chef :

NICHIFOR CEAPOIU, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Rédacteur en chef adjoint :

NICOLAE SĂLĂGEANU, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Membres :

dr. LUCIAN ATANASIU, maître de conférences ; dr. NICOLAE BOSCAIU ; dr. ing. N. CRISTEA ; dr. TEODOR CHIFU ; dr. DOINA IVAN, maître de conférences ; dr. LEONTIN PETÉRFI ; pr. dr. ION TARNAVSCI ; pr. dr. CONSTANTIN TOMA ; pr. dr. GHEORGHE ZARNEA

Secrétaire de rédaction :

GEORGETA FABIAN-GALAN

La « Revue roumaine de biologie — Série de biologie végétale » paraît deux fois par an. Toute commande de l'étranger (fascicule ou abonnements) sera adressée à ROMPRESFILATELIA, Département d'exportation-importation (Presse), P.O. Box, 12-201, téléx 10376 prsfi r, București, Calea Griviței 64-66, România, ou à ses représentants à l'étranger.

Les manuscrits ainsi que toute correspondance seront envoyés à la rédaction et les livres et publications proposés en échange à INSTITUTUL DE ȘTIINȚE BIOLOGICE, 79651, București, Splaiul Independenței 296.

REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE
SÉRIE DE BIOLOGIE VÉGÉTALE

Calea Victoriei 125
R-79717, București, România
téléphone 50 76 80

EDITURA ACADEMIEI
REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

Calea Victoriei 125
R-79717 București, România
téléphone 50 76 80

REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE

SÉRIE DE BIOLOGIE VÉGÉTALE

TOME 34, N° 2

juillet — décembre 1989

SOMMAIRE

Le professeur docteur NICOLAE SĂLĂGEANU	85
Le professeur docteur agrégé ION T. TARNAVSCI	89
ANGHEL RICHITEANU, GEORGETA TEODORESCU, A new <i>Aureobasidium</i> , pathogen of the cultivated blueberries (<i>Vac-</i> <i>cinium</i> spp.) in Romania	93
A. POPESCU, V. SANDA, Les associations des rochers de la classe <i>Elyno-Seslerietea</i> Br.-Bl. 48 des Carpates de la Roumanie . .	103
ION ANGHEL, TATIANA VASSU, AURELIA BREZEANU, Protoplast fusion for obtaining recombinants in industrial yeast	113
ILEANA PETCU, AURELIA BREZEANU, M. RADU, Behaviour of vegetal protoplasts in fusogen electric fields	121
ANCA LIDIA ANTOHE, ALICE PISICĂ-DONOSE, ALEXAN- DRINA MURARIU, Recherches écophysologiques sur les es- pèces ligneuses du Massif Călimani	129
IOANA GOMOIU, Researches for obtaining schizophyllan I. Isola- tion and screening of <i>Schizophyllum commune</i> for schizophyllan production	137
ECATERINA T. TÓTH, TATIANA ONISEI, ELVIRA GILLE, G. I. GHIORGHITĂ, F. FLORIA, The comparative study of the composition of essential oils produced by <i>Chamomilla</i> <i>recutita</i> (L.) Rauschert in generative cultures and "in vitro" .	143
V.-A. C. BULGĂREANU, VENERA IONESCU, EUGENIA IOANȚESCU, The contribution of wood vegetation leaf material to the peloidogenesis in salt, meromictic and peloge- nous lake Ursu-Sovata (Transylvania, Romania)	149
COMPTES RENDUS	

REV. ROUM. BIOL. — BIOL. VÉGÉT., TOME 34, N° 2, P. 83 — 158, BUCAREST, 1989



LE PROFESSEUR DOCTEUR

NICOLAE SĂLĂGEANU

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE LA
RÉPUBLIQUE SOCIALISTE DE ROUMANIE
1907—1988

Le 25 décembre 1988 l'un des maîtres les plus distingués de la Faculté de Biologie, Géographie et Géologie de l'Université de Bucarest, l'académicien Nicolae Sălăgeanu, nous a quittés, laissant un vide immense aux rangs de ceux qui travaillent dans le domaine de la Physiologie végétale.

Né le 12 décembre 1907 dans la commune de Idicel du département de Mureș, il fit ses premières classes à Reghin et les études secondaires au lycée « Al. Papiu-Ilarian » de Tirgu-Mureș. De 1928 à 1932 il suit les cours de la Faculté des Sciences de l'Université de Bucarest, en étudiant les sciences naturelles et physico-chimiques.

En 1933, après avoir fini ses études universitaires, il fut nommé au laboratoire de Physiologie végétale de la Faculté des Sciences de l'Université bucarestoise, laboratoire créé et dirigé par le professeur Em. C. Teodorescu, fondateur de la première chaire de Physiologie végétale en Roumanie. Ce laboratoire, l'académicien Nicolae Sălăgeanu ne l'a jamais quitté, il y a toujours travaillé, se faisant remarquer par une activité soutenue et une rare persévérance tant dans son activité didactique que dans la recherche scientifique. Son travail jouissant d'appréciations élogieuses, il fut promu assistant (1938), maître-assistant (1943) et professeur (1948) de Physiologie végétale, domaine qu'il a servi avec abnégation toute sa vie.

Dans sa longue activité didactique il a donné des cours d'un haut niveau scientifique à de nombreuses générations d'étudiants, leur insufflant l'intérêt pour ce domaine de la biologie, si compliqué et si fascinant. Dans le désir d'aider ses étudiants et de leur offrir les meilleures conditions d'étude, le professeur Sălăgeanu a publié, en collaboration avec d'autres titulaires de la discipline de Physiologie végétale, deux manuels de Physiologie des plantes, les deux parus aux Editions Didactiques et Pédagogiques, le premier en 1957 (en deux volumes) et le second en 1972, manuels particulièrement appréciés et employés même aujourd'hui par les étudiants.

En parallèle avec l'activité didactique, cet éminent professeur se dédia avec la même passion à la recherche scientifique, activité qu'il commença par les recherches faisant l'objet de sa thèse de doctorat « Sur la nutrition chez les Rhinanthacées », ouvrage apportant de nombreux éclaircissements sur la nutrition de ces plantes demi-parazites. Ultérieurement, le champ de ses recherches s'élargit, couvrant les domaines les plus divers de la physiologie végétale. Possédant une excellente information scientifique, il réussit toujours à saisir les problèmes qui avaient encore besoin d'être clarifiés, contribuant par des études extrêmement précises à une meilleure connaissance d'un grand nombre de phénomènes de la vie des plantes. Il aborda maintes recherches concernant le régime en eau des plantes, leur régime de nutrition minérale, leur processus de développement, leurs mouvements, la stimulation de certains processus physiologiques, l'élaboration de nouvelles technologies pour la culture intensive de certaines espèces de micro-algues d'intérêt pour l'économie, plusieurs ayant, à part une valeur théorique, une importance pratique incontestable. Parmi toutes ces préoccupations, une place de choix revient aux recherches sur le procès de photosynthèse. En poursuivant l'influence de certains facteurs du milieu environnant sur le développement de ce processus physiologique, le professeur Sălăgeanu en apporta de nombreuses contributions à même d'élargir l'horizon des connaissances actuelles sur ce phénomène qui, même de nos jours, constitue, à l'avis de bien des spécialistes, le problème numéro un de la biologie. Ses recherches relatives à la photosynthèse ont été valorisées par l'élaboration d'une monographie *Fotosinteza* (La photosynthèse), parue dans une première édition en 1972, aux Editions de l'Académie, et dans une deuxième édition revue et augmentée, publiée cette fois-ci en collaboration, par les soins de la même maison d'édition en 1981.

Une caractéristique de l'activité scientifique du professeur Sălăgeanu c'est que sa vaste expérience et ses qualités de chercheur lui ont permis d'élaborer une série de méthodes originales de recherche ou d'améliorer les méthodes élaborées par d'autres chercheurs. Ces méthodes ont pour caractéristique d'ensemble une grande précision, la plupart présentant également l'avantage de pouvoir être utilisées en conditions de terrain, ce qui est particulièrement important, si l'on tient compte du fait que pour la majorité des cas des données réelles ne peuvent pas être obtenues en conditions de laboratoire, mais seulement dans les conditions où les plantes vivent dans la nature.

L'académicien Nicolae Sălăgeanu s'est préoccupé en permanence de former les futurs spécialistes en physiologie végétale. C'est pourquoi il a toujours entraîné dans son travail les jeunes chercheurs qui travaillaient à sa chaire ou dans le réseau de recherche, la majeure partie de ses ouvrages étant publiés en collaboration avec ces jeunes spécialistes. Ces collaborations se sont avérées une voie efficace dans l'initiation de ses élèves et dans la formation d'un grand nombre de chercheurs qui ont passé leur doctorat sous sa direction scientifique et qui se font remarquer à présent, suivant l'exemple de leur maître, soit dans l'enseignement supérieur, soit en divers instituts de recherche ou dans les unités productives.

Pour son esprit pratique, pour ses vues d'ensemble sur les problèmes fondamentaux de perspective et ses exceptionnelles qualités d'organisateur, on lui a confié de nombreuses fonctions dans la direction de diverses

institutions : dans l'intervalle 1948—1953, il fut doyen de la Faculté de Biologie de l'Université de Bucarest, de 1951 à 1954 — vice-recteur de l'Université et de 1954 à 1957 recteur de l'Université bucarestoise. Dans la même période il a été député dans la Grande Assemblée Nationale et membre du Présidium de celle-ci. Une longue période il assumait la direction de l'Institut de Sciences Biologiques de Bucarest, la présidence de la Société des Sciences Biologiques et de la Commission pour la protection de la nature, en contribuant à l'élargissement et à l'amélioration de l'activité de ces institutions. Dans sa qualité de membre du Présidium de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie, il a déployé une activité soutenue en tant que président de la section des Sciences Biologiques et rédacteur en chef des publications « Revue Roumaine de Biologie, Série de Biologie végétale » et « Studii și cercetări de Biologie, Seria Biologie vegetală », où sont publiés les résultats les plus importants des recherches de biologie végétale.

Pour son activité dans l'enseignement, dans la recherche scientifique et dans la direction des institutions, l'académicien Nicolae Sălăgeanu a reçu plusieurs ordres et médailles de la République Socialiste de Roumanie.

A sa mort, l'académicien Nicolae Sălăgeanu laisse aux spécialistes en biologie végétale un immense héritage — son œuvre scientifique. Outre cet héritage, ces anciens élèves et collaborateurs gardent le souvenir d'un maître éminent, d'un homme extrêmement modeste, honnête et digne — qualités qui lui ont attiré l'estime et le respect profond de ses collaborateurs et qui augmentent leur regret de le savoir parti à jamais.

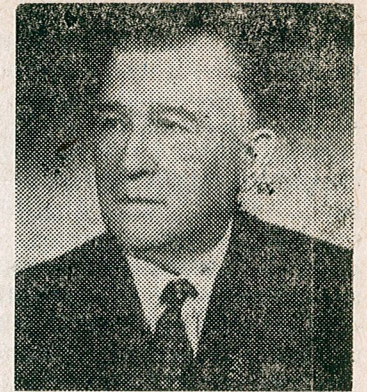
Reçu le 4 juin 1989

Maître de conférences Dr OCTAVIAN BOLDOR
Faculté de Biologie, Géographie et Géologie
de l'Université de Bucarest. Chaire de Biologie
végétale

LE PROFESSEUR DOCTEUR AGRÉGÉ

ION T. TARNAVSCHI

(19 VIII 1904 — 12 II 1989)



Après une activité didactique, scientifique et sociale de presque 60 années s'éteint de la vie à l'âge de 84 ans l'un des botanistes illustres de notre pays, le Professeur ION TARNAVSCHI.

Le 19 août de l'année 1904, dans les contrées moldaves, dans la ville de Rădăuți, est venu au monde le huitième descendant de la famille Teofil et Emilia Tarnavski, le futur homme de science épris de la nature, Ion Tarnavski.

L'amour qu'il a montré de tout petit aux fleurs et aux arbres des jolies forêts qui se trouvent aux alentours des lieux natals a été hérité de son père, un laborieux et passionné sylviculteur.

Son instruction scolaire commence dans la commune Vicovul de Sus, où demeuraient ses parents, ensuite il fréquente le lycée à Rădăuți, après quoi, ayant l'envie de s'instruire encore, il se fait inscrire à la Faculté de Sciences de Cernăuți obtenant la licence ès sciences naturelles en 1928.

Désirant approfondir l'étude des plantes vers lesquelles il s'est senti attiré dès son âge le plus bas, il continue sa préparation théorique et obtient le titre de docteur ès sciences en 1935 à l'Université de Cernăuți après une spécialisation à l'Université de Grenoble (France) dans le domaine de la caryologie en tant que boursier de l'Etat français.

Il commence l'activité didactique en 1929 comme préparateur suppléant à l'Institut Botanique de Cernăuți et passe tous les degrés de l'enseignement supérieur; il devient professeur à la chaire de Morphologie des plantes à la Faculté de Sciences de Bucarest.

Comme professeur il faisait une forte impression grâce à sa personnalité, ayant ce don propre aux hommes de grande compétence scientifique, de faire que ses exposés soient des confessions à part, d'une grande attraction intellectuelle, avec une tension intérieure par la richesse des idées exprimées qui semaient au champ fertile de l'intelligence de ceux qui l'écoutaient les germes de la soif démesurée de connaître la réponse à de nouvelles et nouvelles questions. Il dirigeait magistralement la curiosité et l'intérêt vers ce point, à savoir où et quand naît en l'homme une certitude, lorsque le métier qu'on a choisi pour une raison ou une autre devenait vocation.

Le professeur Ion Tarnavski a gagné le respect des jeunes en voie de formation comme botanistes, parce qu'il tenait compte du fait que ceux-ci disposaient d'une grande capacité d'assimilation, étaient pleins de dynamisme, assoiffés d'apprendre la vérité et des connaissances et n'avaient jamais perdu de vue ces traits naturels dans son travail de formation du caractère et de la tenue civique, témoignant d'un profond respect vis-à-vis des valeurs. Dans sa qualité d'enseignant il a été en permanence soucieux que chaque jeune devienne une personnalité complètement développée, originelle, créatrice, engagée effectivement dans l'ensemble des problèmes sociaux, apportant leur contribution à la prospérité de la société, soulignant qu'à cet effet une assimilation profonde, solide et durable des connaissances est absolument nécessaire.

La manière lucide, claire, éloquente de juger les choses, de discuter avec les jeunes, tout ayant pour base une exigence catégorique et profondément humaine, a eu comme résultat le fait que beaucoup d'entre eux ont été particulièrement attirés par la botanique, s'y adonnant avec résolution.

Le professeur Ion Tarnavski, dans son activité de tous les jours, découvrait des hommes, sélectionnait des talents, en leur assurant des conditions correspondantes de travail, en les guidant, en les stimulant dans l'esprit des mots pleins de sens fondamentaux prononcés par Démocrite : « Il faut dire la vérité, non pas parler trop ».

Grâce à son caractère d'homme intègre, équilibré en pensée et comportement, avec une affection réelle pour ceux qui en étaient dignes, il subjuguait du premier moment les cœurs de ceux avec lesquels il avait même une simple conversation, séduisait et restait un modèle pour ceux qui l'entouraient.

Dévoué animateur des idées du progrès, il s'efforçait avec une impressionnante force de travail de mener à bien les essais timides jaillis de son esprit. Son visage lumineux, son calme et sa formation intellectuelle d'une grande profondeur ont toujours imposé de même que sa force et sa vitalité grâce auxquelles il se faisait obéir, inspirant l'amour et le respect.

L'activité de professeur allait de pair avec celle de directeur du Jardin d'Essai, celle de Doyen de la Faculté de Biologie, titulaire de la chaire de Botanique, membre du Sénat de l'Université de Bucarest, membre de l'Association Internationale de Biosystématique, au Conseil des Musées auprès le Comité d'Etat pour la Culture et l'Art, au Conseil directeur et vice-président de la Société de Sciences Biologiques de la R. S. de Roumanie et président de la section de botanique de cette société, au Comité directeur et de rédaction de la revue *Natura*, au Comité de rédaction des « Annales de l'Université de Bucarest », au Comité de rédaction des publications de l'Académie de la R. S. de Roumanie *Revue Roumaine de Biologie végétale et Etudes et recherches*, au Comité de rédaction de la revue internationale *Feddes Repertorium* (Berlin — R. D. Allemande) au Centre de documentation de l'Académie de la R. S. de Roumanie, collaborateur aux revues spécialisées ou de vulgarisation. On peut dire ainsi que son dévouement pour l'activité didactique, scientifique et sociale a été total, il renonçait au repos et aux heures libres, bien que souvent il fût épuisé par la multitude des problèmes qui jamais ne restaient inachevés.

Au sujet de l'activité scientifique on peut souligner qu'il a eu la satisfaction de voir paraître un nombre impressionnant de travaux scientifiques originaux. Le début fut une contribution à la connaissance des algues de Bucovine, en 1930, après quoi il s'occupa dans différentes études de la flore et de la végétation algueuse.

Les recherches, les études du professeur Ion Tarnavski se sont développées dans plusieurs directions, l'une d'entre elles représentant un début qui par la suite est devenu une école roumaine dans la spécialité. La thèse de doctorat, portant sur les études cario-systématiques chez le genre *Pulmonaria* L., approfondissant la connaissance de la morphologie des chromosomes et de la méiose, a brillamment démontré la formation du professeur Ion Tarnavski dans des disciplines d'une importance capitale au domaine de la botanique en général.

Cet ouvrage a déterminé la reprise de la recherche par d'autres botanistes aussi au champ de la cytologie et de la cytogénétique, contribuant ainsi à la mise en évidence de la première école de Roumanie dans ce domaine. Son activité a déterminé sa nomination comme vice-président de la Section de Cytologie au Congrès de Botanique qui a eu lieu à Montréal (Canada) en 1960.

Mentionnons encore les recherches cytologiques, anatomiques et morphologiques liées à la génétique expérimentale sur quelques plantes hybrides obtenues au laboratoire — céréales et plantes horticoles — sélectionnant de nouvelles espèces, très méritantes du point de vue pratique.

Une contribution à part est celle qui se rapporte à la traduction de l'allemand des œuvres du grand biologiste Charles Darwin dans le cadre du collectif d'hommes de science constitué à cet effet. Des contributions scientifiques importantes sont à mentionner concernant les recherches morpho-pallinologiques. L'étude du pollen actuel, commencée dans le cadre de la Faculté de Biologie bucarestoise est devenue l'intérêt constant du professeur Tarnavski auquel il a entraîné les collaborateurs enseignants de la morphologie et de l'anatomie des plantes, en fondant ainsi la première école de pallinologie à l'Université de Bucarest. Le sérieux de l'élaboration des travaux, l'intérêt montré par les spécialistes du pays et de l'étranger pour ces études ont déterminé la rédaction d'un ouvrage de synthèse, à savoir « La monographie du pollen de la flore roumaine », due à l'initiative du professeur Tarnavski, contribution particulièrement importante à la connaissance des caractéristiques pallinologiques de la flore du Sud-Est de notre continent, représentant également un événement éditorial majeur pour la littérature biologique de Roumanie. La valeur de cet ouvrage a été appréciée par l'Académie de la R. S. de Roumanie qui lui a accordé le prix « Em. Teodorescu ».

Travaillant d'une manière soutenue, titanesque dans le domaine scientifique, le professeur Ion Tarnavski a effectué des recherches dans presque tous les domaines des disciplines botaniques, élucidant de nombreux problèmes de morphologie, embryologie, géobotanique, systématique, phytocénologie, etc.

Le professeur Ion Tarnavski a lié son nom au développement du Jardin d'Essai de Bucarest, lieu de vulgarisation de la science, lieu d'étude de plus en plus apprécié à l'étranger : on a établi des relations scientifiques

avec plus de 60 pays. Il a soutenu l'apparition annuelle du volume *Lucrările Grădinii Botanice*. (Acta Botanica Horti Bucurestiensis), qui publie les divers travaux scientifiques du domaine de la biologie végétale.

Dans le cadre de la Commission des monuments de la nature, il a déployé une riche activité vouée à la protection des plantes rares de la flore roumaine, contribuant par ses vastes connaissances à l'identification de celles-ci et à l'adoption des mesures visant leur protection.

Dans le cadre de la Société de Biologie il a travaillé sans répit, considérant que le lieu du savant n'est pas au « tour d'ivoire », mais là où la science doit revêtir des formes de vulgarisation, des formes d'expression qui soient à la portée des larges couches d'intellectuels à diverses orientations, de sorte que la biologie devienne facilement accessible à tous, son activité dans cette direction étant très vaste.

Un mérite particulier du professeur Tarnavski a été l'organisation de dix conférences nationales de géobotanique, avec la participation de tous les botanistes du pays intéressés aux recherches sur la végétation, contribuant ainsi à la solution des problèmes visant la sauvegarde de la nature.

Il a été l'initiateur et l'organisateur du musée botanique, l'augmentant avec le matériel prélevé personnellement du terrain et entraînant en même temps les plus jeunes à ce difficile et tellement nécessaire travail.

Mais l'une des réalisations qui demeurent comme un témoignage de son esprit de bon administrateur et à côté de son œuvre scientifique, c'est l'effort déployé en vue de la construction de l'édifice actuel situé au Jardin d'Essai, l'allée des orangers, où se trouvent tous les laboratoires de recherches pour la biologie végétale et où les étudiants suivent des cours.

Labor omnia vincit improbus dit Virgile dans ses *Georgiques* (Un travail opiniâtre vient à bout de tout) : ces mots pourraient le mieux exprimer le trait distinctif de l'activité du professeur Ion Tarnavski, le travail du maître, de l'homme de science dépositaire d'une grande richesse de connaissances, témoignant d'une ardeur infinie pour le travail le plus systématique, le souci pour le détail le plus insignifiant, la hardiesse des hypothèses les plus audacieuses. Son temps n'était pas partagé entre jour et nuit, il se déployait dans un seul cycle, voire son œuvre, toujours dévoué au travail et aux idéaux nobles.

Ainsi a été connu le professeur Ion Tarnavski et c'est ainsi qu'il est resté dans nos cœurs, comme un modèle à suivre pour tous ceux qui l'ont entouré, collaborateurs ou seulement d'anciens étudiants.

Son souvenir durera tant que son œuvre.

Dr. agrégé GABRIELA ȘERBĂNESCU-JITARIU

A NEW *AUREOBASIDIUM*, PATHOGEN OF THE CULTIVATED BLUEBERRIES (*VACCINIUM* spp.) IN ROMANIA

ANGHEL RICHITANU, GEORGETA TEODORESCU

Aureobasidium vaccinii A. Richitanu et G. Teodorescu is identified as a causal agent of a leaf and twig blight of cultivated blueberries in two widely separate locations in Romania.

The symptomatology of the disease, as well as the morphology and some cultural characteristics of this new imperfect fungus are described and illustrated.

As a result of these investigations, *Aureobasidium vaccinii* should be considered a potential dangerous pathogen which should be permanently surveyed for taking precautions in case of some wide occurrence in plantations.

In the summer of 1987 a species of *Aureobasidium* associated with a leaf and twig blight was observed on several varieties and hybrids of cultivated blueberries (*Vaccinium* spp.) grown at the Fruit Research Institute, Pitești-Mărăcineni, Argeș county, Romania. Subsequently, the same fungus was also detected at the Fruit Research Station Geoagiu, Hunedoara county.

We cannot find any report of the occurrence of an *Aureobasidium* on a species of *Vaccinium* or on other member of the family *Ericaceae*. Morphological, pathological and cultural characteristics, unique in this pathogen, support the decision to describe it as a new species of *Deuteromycotina*.

SYMPTOMS

The fungus causes both leaf and twig symptoms. The leaf lesions appear as oval-to-irregular necrotic spots, usually marginal, dark reddish brown on the ventral side, pale reddish brown on the dorsal side, with a distinct purplish-brown border. The lesions spread from the margin and tip towards the center and base, eventually extending over the entire leaf (Pl. 1 a). The conidiomata of the pathogen are scarcely detectable macroscopically, but are readily observed with a hand lens or with the aid of the low power of the stereoscopic microscope (Pl. 2 a).

In the case of young leaves, the fungus progresses from the leaf lesions into the petioles and herbaceous twigs, producing typical twig blight symptoms. The infected leaves become shriveled and dry, and many remain attached to the branch. Blighted twigs often form a cane-like or shepherd's crook at their tips, a symptom useful in detecting injured bushes from a distance (Pl. 1 b, c, d). Affected twigs are at first brown to black, and finally become gray with weathering.

In the cultivated fields *Aureobasidium* twig blight is generally limited to the current season's growth, and any extension of the injury into the older wood is usually associated with other fungi, particularly *Cytospora*.

Severely infected bushes look as though they were affected by sunscald, drought or improper pesticides, and they may be partly or completely defoliated by the end of the growth season.

DESCRIPTION OF THE PATHOGEN

The following description is based on the observations of the fungus made on host material. The collections, including the type specimen, have been deposited in the Mycological Herbarium of the Institute of Biological Sciences, Bucharest (BUCM).

Aureobasidium vaccinii A. Richiteanu et G. Teodorescu sp. nov. Pls. 1-2, Figs. 1-7.

Mycelium in substrato immersum, ex hyphis ramosis, septatis, tortuosis, hyalinis vel subhyalinis, 3-10.5 μm (plerumque 4-6 μm) crassis compositum. *Stromata* partim superficialia et partim immersa, hyalina vel subhyalina, 20-125 μm lata. *Conidiomata* acervularia vel sporodochia, hypophylla, dispersa vel gregaria, punctiformia, initio subepidermide nidulantia, dein e stomatibus emergentia, 30-140 μm diam., albida vel ochraceo-bubalina (Fig. 1). *Conidiophora* semi-macronematosae, fasciculatae, simplicia vel raro inferiore parum ramosa, recta vel leviter curvata, septata, apice plus minusve clavata, hyalina. *Cellulae conidiogenae* blasticae, po-

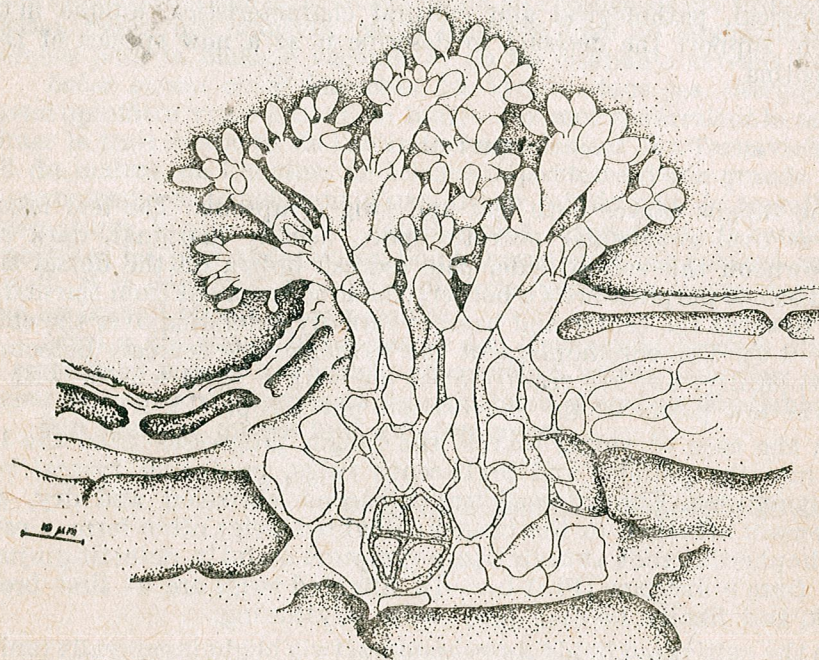


Fig. 1. — *Aureobasidium vaccinii* — conidioma with conidiogenous cells and conidia (from the type).

liphialidicae, in conidiophores incorporate, terminales vel intercalares, 9-25 $\times$ 5-8 μm (Fig. 2). *Conidia* 4-12 apice vel raro in latere evoluta, ellipsoideo-oblonga, subfusioidea vel subcylindrica recta vel interdum le-

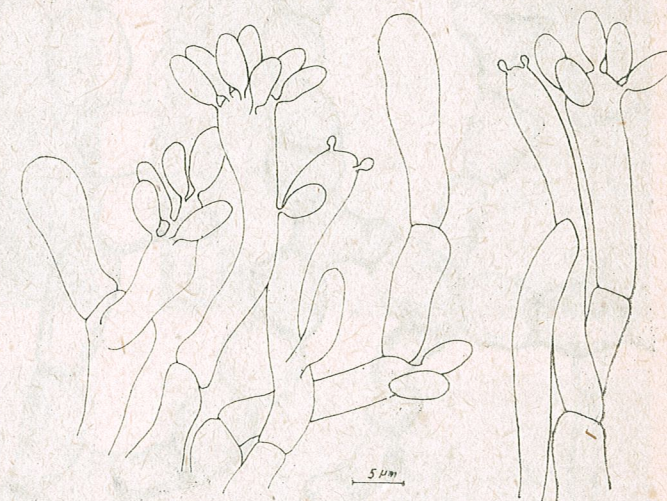


Fig. 2. — *Aureobasidium vaccinii* — conidial apparatus (from BUCM 94380).

viter curvata, saepe irregularia, tenui-tunicata, mox conidia secundaria proferentia, continua, raro 1-septata, hyalina, saepe 2-pluriguttulata, 6-17 $\times$ 2-4.5 μm , mostly 7-10 $\times$ 2.5-3.5 μm (Fig. 3). *Status perfectus* ignotus.

Hab. in foliis *Vaccinii* 'Pemberton' $\times$ 'Bluecrop', Pi-tești-Mărăcineni, county, Argeș, Romania, 44°53'55" N, 24°52'08" E, alt. cca 286 m.s.m., 19.VIII. 1987, leg. A. Richiteanu, BUCM 94373, holotypus.

Mycelium immersed in the substratum, composed of branched, septate, sinuose, hyaline or subhyaline hyphae, up to 3-10.5 μm (mostly 4-6 μm) wide. *Stromata* partly superficial and partly immersed, 20-125 μm wide. The immersed part of each stroma is usually located in the substomatal cavity and is made up of agglomerations of small, thin-walled, hyaline, subhyaline or pale olivaceous brown, more or less isodiametrical cells; from the upper part of this stroma hyphae often pass between the guard

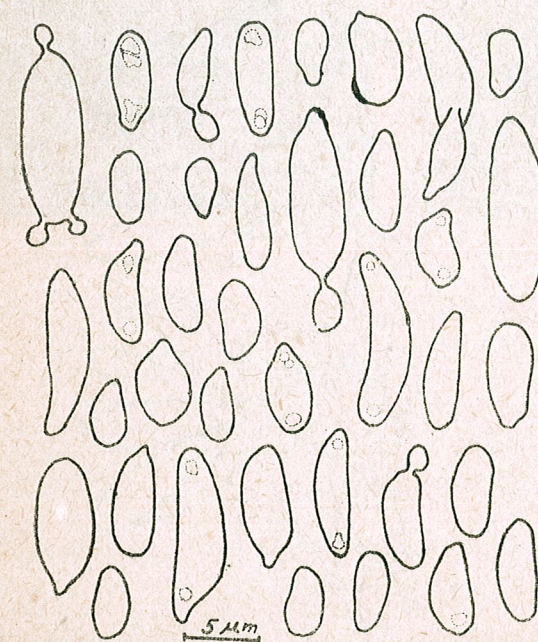


Fig. 3. — *Aureobasidium vaccinii* — conidia (from the type).

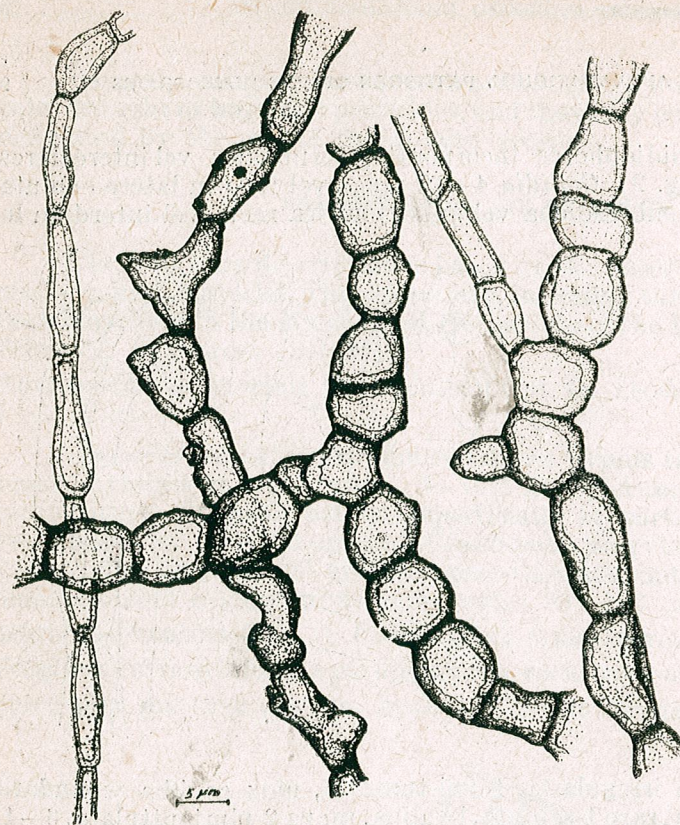


Fig. 4. — *Aureobasidium vaccinii* — dark hyphae (from a fresh culture of the isolate KV9).

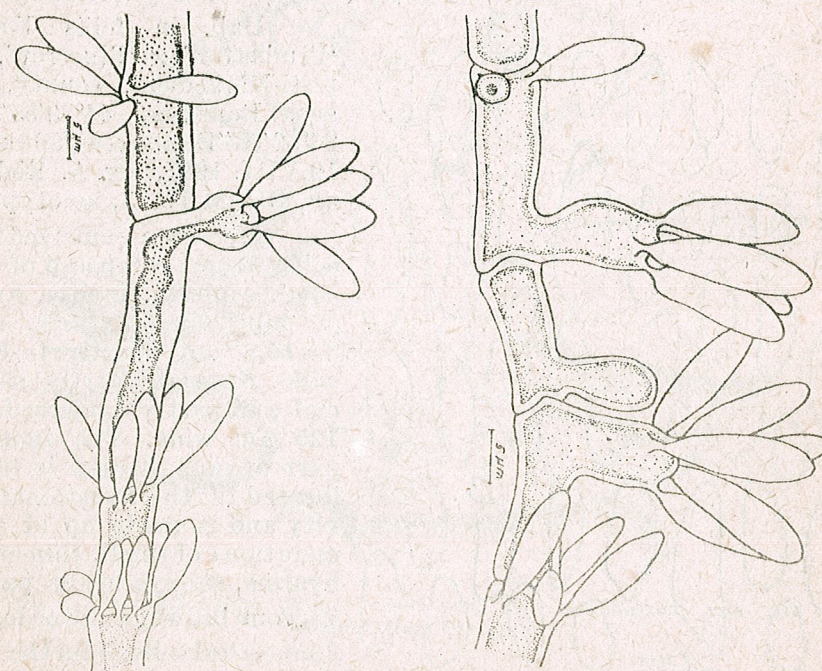


Fig. 5. — *Aureobasidium vaccinii* — fertile hyphae (from a fresh isolate).

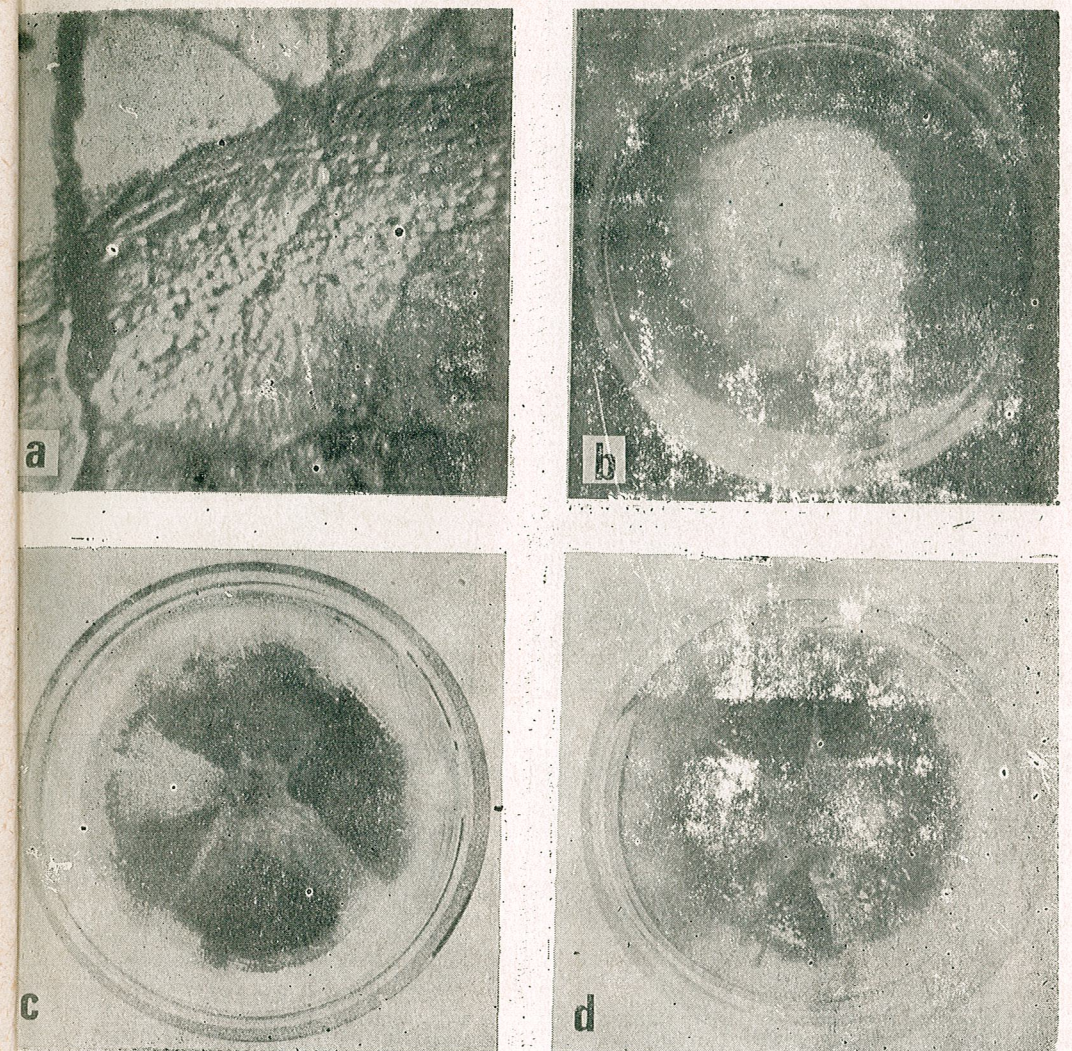


Plate II. — *Aureobasidium vaccinii*; a — sporodochial conidiomata on a leaf spot of *Vaccinium* 'Heermann' × 'Ivanhoe' (from BUCM 94380); b — two week-old colonies; c, d — one month-old colonies.



Plate 1.—*Aureobasidium vaccinii*; a — leaf lesions on 'Pemberton' x 'Bluecrop' blueberry; b, c, d — naturally infected twigs of cultivated blueberries showing typical shepherd's crooks at tips.

cells, expand and branch just the surface to form a small hemispherical sporodochium. *Conidiomata* acervular to sporodochial, hypophyllous, scattered or gregarious, punctiform, mostly near the margin of the spot, at first subepidermal, protruding through the stomata, minute, 30–140 μm in diam., at first whitish, soon becoming ochraceous-buff (Fig. 1). *Conidiophores* arising terminally and laterally from the upper cells of the stomata, simple or proximally branched, straight or curved, septate, with more or less clavately inflated or lobed tips, hyaline. *Conidiogenous cells* blastic, polyphialidic, integrated, terminal or intercalary, 9–25 $\times$ 5–8 μm (Fig. 2). *Conidia*, usually 4–12 in number, produced simultaneously in the apical region of the fertile cells, sometimes also laterally, elliptical-oblong, subfusiform to subcylindrical, straight or slightly curved, rather variable in shape and size, thin walled, smooth, one-celled, rarely 1-septate, hyaline, contents often 2-multiguttulate, 6–17 $\times$ 2–4.5 μm , mostly 7–10 $\times$ 2.5–3.5 μm (Fig. 3).

On leaves of *Vaccinium* cv. Pemberton x *Vaccinium* cv. Bluecrop, Pitești — Mărăcineni, Argeș county, Romania, 44°53' 55" N, 24°52' 08" E, alt. c. 286 m, 19.VIII.1987, A. Richișeanu, BUCM 94373, holotype.

CHARACTERS IN CULTURE

Leaf samples with symptoms of disease, collected in August 1987 and placed in a moist chamber, were used to obtain pure culture of the fungus. Isolations were made from typical fruiting structure arising on the lower leaf surface. These cultures were grown in Petri dishes on malt agar, at 24 °C.

The following culture characteristics are based on the isolate KV9, started from a leaf sample of *Vaccinium* cv. Heermann I x *Vaccinium* cv. Ivanhoe, grown in a hybrid field at the Fruit Research Institute, Pitești-Mărăcineni. Both the specimen from which the isolate was obtained, and a dried, inactivated culture from KV9, are deposited in BUCM under the numbers 94380 and 94381, respectively.

Colonies attaining a diameter of about 31 mm in 7 days, appearing smooth, soon covered with a slimy mass due to abundant sporulation, cream or light pink, finally changing to black due to the production of dark hyphae and chlamidospores; sometimes a sparse whitish aerial mycelium is formed; submerged mycelium tough, compact (Pl. 2 b, c, d). *Hyphae* hyalinae, smooth, thin-walled, 3–10 μm wide, with transverse septa only. Dark, brown, thick-walled, up to 13 μm wide hyphae which often disintegrate into separate cells were observed in older cultures (Fig. 4). *Conidiogenous cells* undifferentiated, intercalary or terminal on hyaline hyphae or arising as short lateral branches, in the later case often without a basal septum. The blastic conidia are formed in usually dense groups, initially at the apex of the fertile cells, being produced all over the cell surface when sporulation is abundant (Fig. 5). *Conidia* hyaline, smooth, ellipsoidal, clavate to subcylindrical, one-celled, rather variable in shape and size, 6–20 $\times$ 3–6 μm . Liberated conidia often swell, become brown and somewhat thick-walled, frequently two-celled. Secondary conidia are

often produced by both the brown and the hyaline conidia. Endoconidia $5.5-9 \times 2.5-3 \mu\text{m}$ are occasionally produced by an intercalary cell and released into a neighbouring empty cell (Fig. 6). In old cultures the wider



Fig. 6. — *Aureobasidium vaccinii* — endoconidia (from a fresh culture of the isolate KV9).

hyphae are partially converted into chains or clusters of dark-brown, swollen, thick-walled chlamydospores $8-23 \times 8-17 \mu\text{m}$ wide (Fig. 7).

In pure culture the species is similar to *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn., but differs by the slightly longer and narrower conidia, and by larger endoconidia. In addition, *A. pullulans* was reported as a common saprophyte on a variety of substrates, while *A. vaccinii* seems to be a parasite with a restricted host-range.

HOSTS

At Pitești-Mărăcineni *Aureobasidium* blight was observed on 18 cultivars and several hybrids resulted from crosses between members of three American tetraploid species of blueberry classified into the subgenus *Cyanococcus*: *Vaccinium angustifolium* Ait. (= *V. pennsylvanicum* Lam., *V. lamarkii* Camp), *V. corymbosum* L., and *V. australe* Small. We have noticed a marked variation in varietal susceptibility

'Dixi' and 'Burlington' being the most susceptible, and 'Herbert' and 'Concord', the most resistant.

The disease was also found on low sugar blueberry (*V. angustifolium* Ait.) and on a species of cranberry assigned to the subgenus *Oxycoccus*, *Vaccinium macrocarpum* Ait., but they were only lightly affected. The same fungus was detected at the Fruit Research Station Geoagiu, Hunedoara county, on a selection of *Vaccinium angustifolium* Ait. $\times$ *V. corymbosum* Lam.

SPECIMENS EXAMINED

On *Vaccinium angustifolium* Ait. (= *V. pennsylvanicum* Lam., *V. lamarkii* Camp), Argeș county, Pitești-Mărăcineni, Fruit Research Institute, alt. c. 286 m, 31.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 82708.

On *Vaccinium macrocarpum* Ait., 31.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94368, 19.X.1987, A. Richițeanu, BUCM 94372.

On *Vaccinium* cv. Heermann I $\times$ *Vaccinium* cv. Pemberton, 12.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94370.

On *Vaccinium* cv. Heermann I $\times$ *Vaccinium* cv. Berkeley, 19.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94371.

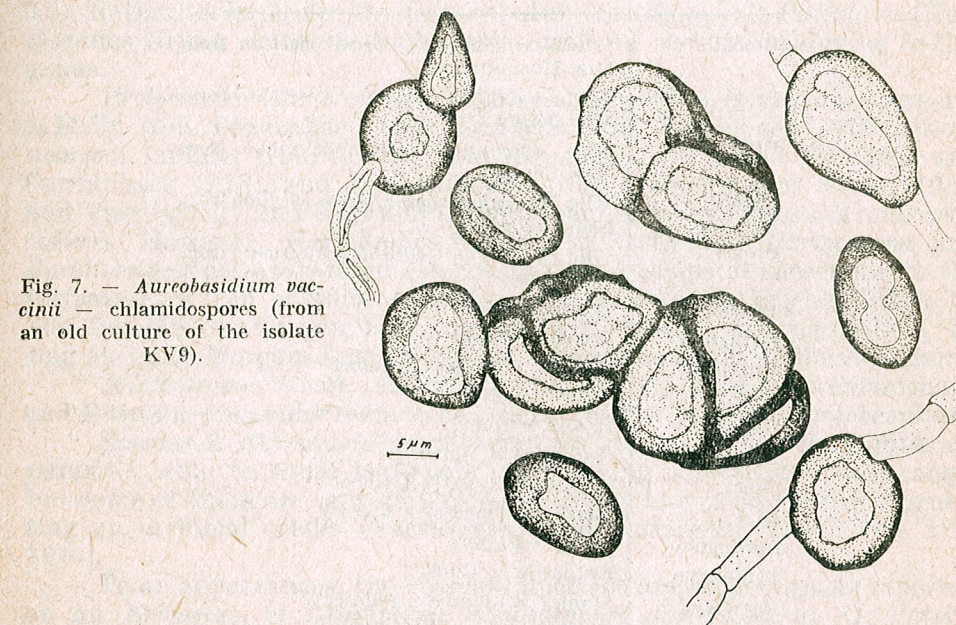


Fig. 7. — *Aureobasidium vaccinii* — chlamydospores (from an old culture of the isolate KV9).

On *Vaccinium* cv. Heermann I, 9.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94374.

On *Vaccinium* cv. Bluecrop $\times$ *Vaccinium* cv. Pemberton, 18.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94375.

On *Vaccinium* cv. Heermann I $\times$ *Vaccinium* cv. Blue-ray, 19.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94376.

On *Vaccinium* cv. Zuckertraube, 9.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94377.

On *Vaccinium* cv. Heermann I $\times$ *Vaccinium* cv. Pemberton, 19.VIII.1987, A. Richițeanu, BUCM 94379.

On *Vaccinium* cv. Heermann I $\times$ *Vaccinium* cv. Ivanhoe, 28.VIII.1987, G. Teodorescu, BUCM 94380 (sample from which the strain KV9 was isolated).

On *Vaccinium* cv. Heermann I, district of Hunedoara, Fruit Research Station Geoagiu, 12.IX.1987, A. Richițeanu, BUCM 94378.

BUCM 94381 (dried inactivated culture isolated by A. Richițeanu from BUCM 94380).

The parentage of the blueberry cultivars previously mentioned is presented in the table 1.

Table 1

Parentage of some blueberry cultivars affected by *Aureobasidium* blight, mentioned in the ext

Cultivar	Parentage
Brooks	Wild <i>Vaccinium corymbosum</i> selection from New Hampshire
Sooy	Wild <i>Vaccinium australe</i> selection from New Jersey
Rubel	Wild <i>Vaccinium australe</i> selection from New Jersey
Russell	Wild <i>Vaccinium angustifolium</i> selection from New Hampshire
Grover	Wild <i>Vaccinium australe</i> selection from New Jersey
Pioneer	Brooks × Sooy
Katharine	Brooks × Sooy
Rancocas	(Brooks × Russell) × Rubel
Jersey	Rubel × Grover
Concord	Brooks × Rubel
Stanley	Katharine × Rubel
June	(Brooks × Russell) × Rubel
Dixi	(Jersey × Pioneer) × Stanley
Burlington	Rubel × Pioneer
Pemberton	Katharine × Rubel
Berkeley	Stanley × (Jersey × Pioneer)
Coville	(Jersey × Pioneer) × Stanley
Ivanhoe	(Rancocas × Carter) × Stanley
Bluecrop	(Jersey × Pioneer) × (Stanley × June)
Blueray	(Jersey × Pioneer) × (Stanley × June)
Herbert	Stanley × (Jersey × Pioneer)
Collins	Stanley × Weymouth
Heermann I	Selection of <i>V. angustifolium</i> × <i>V. corymbosum</i>
Zuckertraube	Selection of <i>V. angustifolium</i> × <i>V. corymbosum</i>

Sources: Eck P. and N. F. Childers (Eds.), 1966; Liebster G., 1961.

DISCUSSION

The genus *Aureobasidium* is characterised by the synchronous formation of blastoconidia from slightly differentiated hyaline conidiogenous cells. It was introduced in 1891 by Viala and Boyer for *A. vitis*, isolated by them from spots on berries and leaves of *Vitis vinifera*. Arnaud (1910) suggested that *A. vitis* and de Bary's *Dematium pullulans* (= *Aureobasidium pullulans*), a common saprophyte on a variety of substrates, were identical.

The genus *Aureobasidium* Viala & Boyer was revised by Hermanides-Nijhof (1977) who listed as synonymous six generic names: *Kabatiella* Bubák, *Protocoronospora* Atk. & Edgerton, *Pachybasidiella* Bubák & Syd., *Polyspora* Lafferty, *Pullularia* Berkhout, and *Dematoideum* Stautz.

In his study based mainly on the examination of all strains maintained in CBS collection (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands) under the name of *Aureobasidium* and *Pullularia*, Hermanides-Nijhof recognized 14 species and one variety belonging to this genus.

Protocoronis (fide von Arx, 1970, sub *Kabatiella*), *Hormonema* Lagerb. & Melin (fide Carmichael, from Kendrick and Carmichael, 1973), *Sarcinomyces* Lindner (fide Cooke, from Ainsworth, 1971, and Kendrick and Carmichael, 1973), and *Exobasidiopsis* (fide Clements and Shear, 1931, and Vassiljevsky and Karakulin, 1950) seem to be synonyms of *Aureobasidium*. However, Hermanides-Nijhof (1977) treated *Hormonema* and *Sarcinomyces* as separate genera owing to the basipetal succession in the formation of the conidia. Likewise, *Rhabdogloeopsis* Petrak, listed by von Arx (1970) as a possible synonym of *Kabatiella*, was maintained by Nag Raj and Morgan-Jones (1973) as a separate genus of Melanconiales.

Microstroma Niessl, *Articularia* von Hoehn., *Exophiala* Carmichael, and *Kabatina* Schneider seem to be genera closely related to *Aureobasidium*.

Species of *Aureobasidium* hitherto assigned to *Kabatiella* Bubák are parasitic, able to cause leaf-spots, and having a restricted host-range, but some of them are saprophytes on decaying leaves and easily sporulating on artificial media (Vassiljevsky and Karakulin, 1950; von Arx, 1970).

To all appearances, the nearest imperfect fungus previously reported on an *Ericaceae*, is *Cryptocline arctostaphyli*, described by O. Petrini (1984) on *Arctostaphylos uva-ursi* L. and *Vaccinium vitis-idaea* L., and also isolated by him from *Arctostaphylos alpina* (L.) Spreng., *Calluna vulgaris* (L.) Hull., *Erica carnea* L., *Loiseleuria procumbens* (L.) Desv., *Rhododendron ferrugineum* L., and *Vaccinium myrtillus* L. from Switzerland (O. Petrini, 1985). This species, in most of its morphological features and cultural characteristics, is similar to *Aureobasidium vaccinii*, the only difference being that the conidiogenous cells are predominantly monophialidic. Owing to the pleomorphism and great variability of *Aureobasidium*-like fungi, and judging by the original description and figure given by Petrini (1984), it seems likely that *Aureobasidium vaccinii* and *Cryptocline arctostaphyli* may represent two substrate dependent forms of a single species.

It is interesting to note that *Cryptocline arctostaphyli* has often been isolated from *Arctostaphylos uva-ursi* in Western Oregon, U.S.A., as *Aureobasidium ribis* (Petrini, 1986).

REFERENCES

1. Ainsworth G. C., Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 6th ed., Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
2. Arnaud, G., Contribution à l'étude des Fumigines. Ann. mycol. 3, 470-476, 1910.

3. Arx, J. A. von, *A revision of the fungi sporulating in pure culture*. Bibl. Mycol. **24**, 1—203, 1970.
4. Clements, F. E., C. L. Shear, *The Genera of Fungi*. Wilson, New York, 1931.
5. Cooke, W. B., *An ecological life history of Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud*, Mycopath. Mycol. appl. **12**, 1—45, 1959.
6. Cooke, W. B., *A taxonomic study in the "Black yeasts"*. Mycopath. Mycol. appl. **17**, 1—43, 1962.
7. Eck, P., N. F. Childers (eds), *Blueberry Culture*. Rutgers University Press, New Brunswick/New Jersey, 1966.
8. Ellis, M. B., *Dematiaceae Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
9. Hawksworth, D. L., B. C. Sutton, G. C. Ainsworth, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 7th ed., Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1983.
10. Hermanides-Nijhof, E. J., *Aureobasidium and allied genera*. St. Mycol. **15**, 141—177, 1977.
11. Hoog, G. S. de, E. J. Hermanides-Nijhof, *Survey of the Black yeasts and allied fungi*. St. Mycol. **15**, 178—221, 1977.
12. Kendrick, W. B., J. W. Carmichael, *Hyphomycetes*. In Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., Sussman, A. S. (eds), *The Fungi. IVA. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi imperfecti*, Academic Press, New York, London, 1973, pp. 323—509.
13. Lieber, G., *Die Kulturheidelbeere*, Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1961.
14. Milholland, R. D., R. Jones, C. N. Clayton, *Blueberry Diseases in North Carolina*. The North Carolina Agricultural Extension Service, Cir. 466, January 1974.
15. Nag-Raj, T. R., G. Morgan-Jones, *Genera Coelomycetum. VIII. Rhabdogloeopsis Petrak & Rhabdogloeum Sydow*. Can. J. Bot. **51**, 565—569, 1973.
16. Petrini, O., *Cryptocline arctostaphyli sp. nov., ein Endophyt von Arctostaphylos uva-ursi und anderen Ericaceae*. Sydowia **37**, 238—241, 1984.
17. Petrini, O., *Wirtsspezifität endophytischer Pilze bei einheimischen Ericaceae*. Botanica Helvetica **95**, 213—238, 1985.
18. Petrini, O., *Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues*. In Fokkema, N. J., J. van der Heuvel (eds), *Microbiology of the Phyllosphere*, Cambridge University Press, 1986.
19. Petrini, O., J. K. Stone, F. E. Carroll, *Endophytic fungi in evergreen shrubs in Western Oregon: a preliminary study*. Can. J. Bot. **60**, 789—796, 1982.
20. Sutton, B. C., *Coelomycetes*. In Ainsworth, G. C., F. K. Sparrow, A. S. Sussman (eds), *The Fungi. IV. A. A taxonomic review with keys: Ascomycetes and Fungi imperfecti*, Academic Press, New York/London, 1973, pp. 513—582.
21. Vassiljevsky, N. I., B. P. Karakulin, *Fungi imperfecti parasitici. Pars II. Melanconiales*. Acad. Sci. U.R.S.S., Moscow, Leningrad, 1950.

Received 20 November, 1988

Fruit Research Institute,
Pitești-Mărăcineni, Romania

LES ASSOCIATIONS DES ROCHERS DE LA CLASSE ELYNO-SESLERIETEA Br.-Bl. 48 DES CARPATES DE LA ROUMANIE

A. POPESCU, V. SANDA

Le travail fait l'analyse des prairies des rochers calcaires neutrophiles-basophiles et rarement acidophiles ayant généralement un puissant caractère de héliophilie à la suite duquel elles occupent des versants fortement inclinés à exposition méridionale.

Ces phytocénoses réparties en 2 ordres, 3 alliances et 18 associations sont analysées sous divers aspects (aréalographique, syndynamique, cénotaxonomique) en décrivant une nouvelle association du massif de Piatra Craiului — *Festuco (saxatilis)-Trisetetum (macrotrichum)* ass. nova.

La végétation de la classe *Elyno-Seslerietea* Br.-Bl.48 comprend des cénotaxa qui commencent à se former sur les parois plus ou moins rocheuses faiblement jusqu'à fortement inclinées, ensoleillées et moins ombragées dans des stations dont le xérophitisme est accentué. Y est comprise une large gamme écologique d'espèces à savoir : rupicoles, xérothermes, mésothermes, méso-oligothermes, mésotopes, méso-oligo-thermes, eutrophes. Les espèces de ces phytocénoses sont neutrophiles-basophiles et rarement acidophiles facultatives. Les plus caractéristiques sont : *Sesleria coerulans*, *S. haynaldiana*, *Poa violacea*, *Carex sempervirens*, *Onobrychis transsilvanica*, *Koeleria transsilvanica*.

1. SESLERIETALIA VARIAE Br.-Bl. 26

Les phytocénoses basophiles de cet ordre occupent le même aréal que la classe s'étendant dans l'étage alpin, sur les pentes rocheuses, les cimes de montagnes, les moraines fixés, etc. Espèces caractéristiques : *Festuca versicolor*, *F. amethystina*, *Myosotis alpestris*, *Euphrasia salisburgensis*, *Anthyllis alpestris*, *Aster alpinus*, *Biscutella laevigata*, *Calamintha alpina*, *Phyteuma orbiculare*, etc.

1.1. *Festuco saxatilis-Seslerion bielzii* (Pawl. et Walas 49) Coldea 84 (Syn. : *Seslerion bielzii* (Pawl. 35 emend. A. Nyár. 67) *calcophilum* I. Pop 68). Comprend les prairies calcophiles, héliophiles fortement xérophiles jusqu'aux mésothermes. Espèces caractéristiques : *Sesleria coerulans*, *S. rigida* ssp. *haynaldiana*, *Festuca rupicola* ssp. *saxatilis*, *F. amethystina* ssp. *orientalis*, *F. versicolor* ssp. *dominii*, *Carex sempervirens*, *Sesleria bielzii*, *Poa rehmanii*, *Silene nutans* ssp. *dubia*, *Dianthus tenuifolius*, *Carduus kernerii*, *Achillea schurii*, *Potentilla thuringiaca*, *Centaurea pinatifida*, *C. kotschyana*, *Oxytropis carpatica*, *Linum extraaxillare*, *Bupleurum diversifolium*, *Thymus pulcherrimus*.

1.1.1. *Seslerio (haynaldianae)-Saxifragetum rocheliana* Boşcaiu 71. Identifiée par N. Boşcaiu (1971) dans le massif Godeanu, elle est rencon-

trée par C. Maloş (1977), dans le bassin supérieur du Motru (Mont de Vilcanu). Elle constitue un homologue cénotique des altitudes plus élevées de l'association *Seslerio rigidae-Saxifragetum rocheliana* Gergely 67. Le noyau central de l'association est déterminé par des espèces de *Seslerietalia* par exemple : *Carex sempervirens*, *Galium anisophyllum*, *Dryas octopetala*, *Saxifraga moschata*, *Helianthemum alpestre*, *Euphrasia salisburgensis*.

1.1.2. *Festucetum versicoloris* Pawl. 23, 35 (Syn. : *Festucetum versicoloris transsilvanicum* Soó 44 ; *Festuca versicolor-Carex sempervirens* (*transsilvanicum*) ass. Soó 44 ; *Festucetum versicoloris* Domin 33 ; Puşcaru et al. 50, 56 ; Pócs 63 ; *Festucetum versicoloris transsilvanicum* Csűrös et al. 56 ; Borhidi 58 ; As. *Carex sempervirens-Festuca versicolor* A. Nyár. 63 ; *Festucetum versicoloris bucegicum* Beldie 67). Se développe sur les pentes plus ou moins inclinées dans un microclimat caractérisé par une puissante isolation dans les endroits à l'abri de l'action intense des vents. A cause du drainage, les sols perméables des stations où pousse *Festuca versicolor* sont parmi les plus sèches par rapport au sol des autres associations de l'ordre *Seslerietalia*. Elle se développe en général dans les sols de type rendzinique riches en humus avec des débris calcaires qui assurent la saturation en carbonate de calcium, de manière que la réaction soit maintenue neutre ou faiblement alcaline. Parmi les espèces caractéristiques de l'association il faut mentionner : *Helianthemum alpestre*, *Alyssum repens*, *Cerastium transsilvanicum*, *Dianthus tenuifolius*, *Oxytropis carpatia*, *O. sericea*, *Calamintha alpina*, ssp. *baumgarteni*.

La sous-association *seslerietosum haynaldiana* Beldie 67 (Syn. : *Seslerio-Festucetum versicoloris calcicolum* Beldie 67) se reconnaît par la présence constante des espèces de *Sesleria haynaldiana* et *Carex sempervirens* auxquelles on ajoute souvent *Festuca saxatilis*. L'association est citée des Carpates Orientales et Meridionales.

1.1.3. *Seslerio haynaldiana-Caricetum sempervirentis* Puşcaru et al. 56 (Syn. : *Seslerietum haynaldiana sempervirentis* Puşcaru et al. 50, 56 ; *Seslerietum rigidae retezaticum* Csűrös et al. 56 ; *Seslerietum rigidae biharicum* Csűrös 63, Resmeriţă 65).

Les nécessités plutôt mésothermes-héliophiles de cette association se reflètent dans sa composition floristique formée d'un contingent plus élevé d'espèces reliquétaires thermophiles. *Sesleria rigida* var. *haynaldiana* est dominante dans ces phytocénoses. Les cénooses prennent naissance sur des sols pararendziniques des corniches ayant un contenu riche en carbonate de calcium et un degré élevé de saturation en bases. Dans les Bucegi on la rencontre sur les versants ensoleillés et dans Ţarcu-Godeanu sur ceux septentrionaux. Les espèces composantes sont pour la plupart les mêmes que celles des autres associations de l'alliance de *Festuco saxatilis-Seslerion bielzii* avec cette différence qu'auprès des éléments caractéristiques xérophiiles-thermophiles on rencontre aussi toute une série d'espèces mésophiiles telles : *Geranium coeruleum*, *Astragalus frigidus*, *Centaurea pinatifida*.

On remarque la présence de nombreux endémistes carpatiques : *Sesleria rigida* var. *haynaldiana*, *Bromus riparius* ssp. *barcensis*, *Festuca sa-*

xatilis, *Onobrychis transsilvanica*, *Anthyllis alpestris*, *Hedysarum hedysaroides*, *Cardus kernerii*, *Dianthus tenuifolius*, *D. spiculifolius*, *Alyssum repens*, *Geranium coeruleum*, *Cerastium transsilvanicum*, *Calamintha alpina* ssp. *baumgarteni*, *Linum extraaxillare*.

Al. Beldie (1967) décrit les suivants faciès de Bucegi : avec *Festuca versicolor*, *Sesleria haynaldiana*, *Carex sempervirens*, *Festuca saxatilis* et *Poa violacea* (mentionné aussi par Maria Ciucă, 1971, dans Ciucas).

1.1.4. *Seslerio heufleriana-Caricetum sempervirentis* Coldea 84

Végète sur des sols rendziniques riches en squelette calcaire des Monts de Rodna. A côté des deux espèces codominantes — *Sesleria heufleriana* et *Carex sempervirens* — ce sont les éléments daco-balkaniques caractéristiques à l'alliance *Festuco-Seslerion bielzii* qui détiennent un rôle important dans la structure floristique des phytocénoses.

1.1.5. *Diantho tenuifolii-Festucetum amethystine* (Domin 33) Coldea 84 (Syn. : *Festucetum amethystinae* Pawl. 23 *transsilvanicum* A. Nyár. 67 ; *Festucetum amethystinae* Soó 44 ; Puşcaru et al. 50, 56 ; Csűrös 57 ; A. Nyár. 63, 64 ; *Festucetum amethystinae-Seslerietum coeruleantis* A. Nyár. 63).

Association obligatoirement calcophile qui végète dans les écotopes les plus xérophiiles. Elle se développe sur les versants calcaires ensoleillés dont les pentes sont de 10°—45° et même plus inclinées. Pendant l'hiver les phytocénoses sont protégées par une couche assez épaisse de neige qui fond vite le printemps. Au cours de cette saison les stations ont l'humidité assurée par la fonte de la neige ou des infiltrations et les écoulements venus d'amont, mais en été les biotopes souffrent d'une grande sécheresse. Les phytocénoses donnent de l'extension verticalement entre 1500—1700 m dans les Carpates Orientales (les Monts de Rodna par exemple) et 1700—2100 m dans celles Méridionales (Bucegi). L'espèce dominante et caractéristique de l'association est *Festuca amethystina* élément rupicole xéro-mésotermes héliophile et la caractéristique transgressive est *Carex sempervirens*. Parmi les accompagnateurs nous mentionnons : *Poa violacea*, *P. nemoralis*, *Scorzonera rosea*, *Polygonum viviparum*, *Trifolium repens*, *Potentilla aurea*, *Bartschia alpina*, *Aster alpinus*, *Calamintha alpina*, *Festuca airoides*, *Agrostis rupestris*, etc. Les biotopes à l'abri du vent, où sont cantonnées ces phytocénoses, ont dans leur composition cénotique les espèces communes aux associations des plateaux couverts d'une couche épaisse de neige. De Bucegi (D. Puşcaru et al. 56 ; Al. Beldie 67) ont décrit le faciès avec *Poa violacea* et des Carpates Orientales (Rodnei, Rarău, Ciucului) le faciès *caricosum montanae* Domin 33 (Syn. : *Cariceto-Festucetum amethystinae* A. Nyár. 63).

1.1.6. *Festucetum flaccidae* Coldea 84

Les phytocénoses mésophiles édifiées par *Festuca nitida* ssp. *flaccida* des pentes ensoleillées calcaires des Monts de Rodna végètent sur des sols rendziniques riches en humus en occupant les stations entre 1750—2000 m. Dans ces groupements on rencontre des espèces basophiles caractéristiques pour l'alliance *Festuco-Seslerion bielzii* et l'ordre *Seslerietalia varia* comme : *Phyteuma orbiculare*, *Pedicularis verticillata*, *Polygonum viviparum*, *Potentilla crantzii*, *Helianthemum grandiflorum*, *Leontodon repens*,

Carex atrata, *Bartschia alpina*, *Myosotis alpestris*, *Hieracium villosum*, *Galium anisophyllum*, mais aussi des espèces acidophiles caractéristiques à l'alliance *Potentillo-Nardion* comme : *Scorzonera purpurea* ssp. *rosea*, *Campanula patula* ssp. *abietina*, *C. serrata*, *Potentilla aurea* ssp. *chrysocraspeda*, *Viola declinata*, qui mettent en évidence l'évolution syndynamique de ces phytocénoses en tant que conséquence du pacage intensif.

1.1.7. *Festucetum saxatilis* Domin 33 (Syn. : *Festucetum saxatilis subalpinum* Domin 33 ; *Festuca saxatilis*-*Festuca versicolor*-*Carex sempervirens* ass. Soó 44).

Cette association présente une diffusion relativement grande dans nos Carpates en occupant les versants ensoleillés ou ombragés avec un substrat calcaire. A côté de l'espèce caractéristique *Festuca saxatilis* nous mentionnons en tant qu'accompagnateurs de l'association : *Dianthus tenuifolius*, *Carex sempervirens*, *Polygonum viviparum*, *Sesleria haynaldiana*, *Cruciata glabra*, *Scabiosa lucida*. Les suivantes sous-associations sont connues (I. Pop, 1968) : *semperviretosum* I. Pop 68, *poëtosum nemoralis* (Beldie 67) I. Pop 68 (Syn. : *Festuca saxatilis*-*Poa nemoralis* Beldie 67), *seslerietosum bielzii* I. Pop 68, *seslerietosum haynaldianae* I. Pop 68 (Syn. : *Seslerio-Festucetum saxatilis* Beldie 67). En tant que faciès les suivantes sont citées : *caricosum sempervirentis* Pawl. 36, *seslerietosum coerulantis* Răclăru 67, *caricosum montanae* Ștefureac 41, cum *Iris ruthenica* Pușcaru et al. 56 (Syn. : *Allio (ochroleucae)*-*Iridetum ruthenicae* Dihoru 75), *dryadetosum octopetalae* Ștefureac 41.

Les conditions écologiques spécifiques pour *Festucetum saxatilis* sont : humidité relativement élevée et insolation plus modérée par rapport aux autres associations des parois. Le sol est de type colluvial en friche, superficiel, non différencié, en stades jeunes de formation. Les prairies de *Festucetum saxatilis* sont pour la plupart dans le stade optimum de développement et d'évolution.

1.1.8. *Festuco (saxatilis)*-*Trisetetum (macrotrichum)* ass. nova (Tableau 1). Les phytocénoses édifiées par *Trisetum macrotrichum* et *Festuca saxatilis* végètent dans le massif de Piatra Craiului à l'altitude de 1700—1750 m sur des pentes abruptes avec un exposition orientale-méridionale-orientale et une inclinaison de 25—40°. Dans l'association domine d'habitude *Trisetum macrotrichum* à côté de laquelle hormis *Festuca rupicola* ssp. *saxatilis*—en tant qu'espèce caractéristique on rencontre de nombreux taxa caractéristiques à l'alliance *Festuco-Seslerion bielzii* comme : *Linum extraaxillare*, *Festuca versicolor*, *Dianthus tenuifolius*, *Androsace lactea*, *Carduus kernerii* et *Achillea schurii*. De même les espèces de *Seslerietalia*—qui forment le noyau central de ces phytocénoses—sont également bien représentés. De celles-ci, en tant que différentielles locales, nous signalons la présence des taxa suivants : *Dianthus callizonus*, *Gentiana lutea*, *Onobrychis transilvanica* et *Hedysarum hedysaroides*. Le relevé n° 4 représente le type de nomenclature selon lequel l'association a été décrite. Cette association est caractéristique des prairies alpines et sous-alpines du massif de Piatra Craiului à côté de *Seslerio haynaldianae*-*Caricetum sempervirentis*, *Festucetum versicoloris* et *Festucetum saxatilis*.

1.1.9. *Seslerietum bielzii* (Domin 33) *transsilvanicum* Borhidi 58 (Syn. : *Seslerieto-Sempervirentis transsilvanicum* (Soó 44 p.p.) Borhidi 58 ; Ass. *Carex sempervirens*-*Sesleria coerulans* (Pușc. et al. 56) Beldie 67 ; *Caricetum sempervirentis seslerietosum coerulantis* Pușcaru et al. 56 ; *Seslerietum coerulantis basif.* Csűrös et al. 57 ; *Seslerietum coerulantis alpinum* Csűrös 57 ; *Caricetum sempervirentis* Domin 33 ; *Caricetum sempervirentis rodense* Soó 44 p.p.).

L'association est présente dans l'étage alpin des massifs de Făgăraș, Retezat, Rodnei, Ciucas, Ceahlău, Piatra Craiului, Bucegi, Maramureș, Hăghimaș, Cibin, Țarcu, Parîng, Vilcan. Elle s'installe dans l'étage alpin inférieur et supérieur. Dans le premier cas, elle occupe des stations ombragées et dans le deuxième des stations ensoleillées, poussant dans des conditions défavorables sur des sols rankéreux, riches en squelette, souvent faiblement en friche. A cause de la non-uniformité des terrains dans lesquels se développe l'association, elle présente un aspect en mosaïque. *Carex sempervirens* est une accompagnatrice fidèle de l'édificatrice *Sesleria coerulans*. A côté de celles-ci avec une constance élevée on rencontre : *Astragalus alpinus*, *Saussurea alpina*, *Cerastium transsilvanicum*, *Androsace chamaejasme*, *Astragalus frigidus*, *Bartschia alpina*, *Hedysarum hedysaroides*, *Biscutella laevigata*. En condition d'humidité élevée on observe souvent l'infiltration d'espèce de *Salicetum reticulatae* dans l'association. Dans le massif de Bucegi aux altitudes plus élevées elle est rencontrée sur les versants orientaux mais surtout dans les dépressions faibles où elle forme des faciès de pair avec *Trisetum fuscum* ou *Festuca carpatica*.

1.1.10. *Poa molinerii*-*Festucetum pachyphyllae* (Boșcaiu 70 mscr.) Boșcaiu et al. 78. Les cénoses les plus étendues des moraines enherbées du secteur calcaire du massif de Retezat sont édifiées par *Festuca pachyphylla* et *Poa molinerii*. Dans la composition de ces phytocénoses on remarque le grand nombre d'espèces caractéristiques pour l'ordre *Seslerietalia* dont nous mentionnons : *Ranunculus oreophilus*, *Cerastium arvense* ssp. *calcicolum*, *Saxifraga ascendens*, *Polygala alpestris*, *Helianthemum oelandicum* ssp. *alpestre*, *Galium anisophyllum*, *Oxytropis montana* ssp. *retezatensis*, etc. Cette association présente des liaisons syntaxonomiques autant avec les groupements de l'alliance *Seslerion bielzii* qu'avec ceux des alliances *Seslerion rigidae* Zóly. 39 et *Seslerio-Festucion pallentis* Klika 31.

2. SESLERIETALIA RIGIDAE Gergely 67

La note dominante est donnée par l'endémite *Sesleria rigida*. Des espèces pour la reconnaissance de l'ordre : *Sesleria rigida*, *Carex sempervirens*, *Dianthus spiculifolius*, *Cerastium arvense* ssp. *calcicolum*, *Moehringia muscosa*, *Thesium alpinum*, *Dianthus simonkaianus*, *Ranunculus oreophilus*, *Aconitum anthora*, *Saxifraga paniculata*, *S. rocheliana*, *Biscutella laevigata*, *Draba lasiocarpa*, *Alyssum repens*, *Kernera saxatilis*, *Onobrychis transilvanica*, *Helianthemum nummularium*, *Daphne cneorum*, *Bupleurum diversifolium*, *Pedicularis comosa* ssp. *campestris*, *Myosotis alpestris*, *Aster alpinus*, *Leontopodium alpinum*, *Centaurea pinnatifida*, *Hieracium bifidum*, *H. pseudobifidum*, *Poa alpina*, *Iris ruthenica*, *Helictotrichon decorum*, *Festuca saxatilis*.

2.1. *Seslerion rigidae* Zólyomi 39

L'alliance réunit les prés des rochers calcaires de l'étage montagneux inférieur. Les espèces caractéristiques (après A. Nyárády 1967) sont : *Alyssum petraeum*, *A. repens* ssp. *transsilvanicum*, *Asperula capitata*, *Helictotrichon decorum*, *Athamanta hungarica*, *Campanula divergens*, *Centaurea atropurpurea*, *Cnidium silaifolium*, *Dianthus petraeus* (recte *kitaibelii*), *D. spiculifolius*, *Erysimum witmannii*, *Seseli libanotis* var. *humulis*, *Minuartia setacea* ssp. *banatica*, *Peucedanum austriacum*, *Poa nemoralis* var. *agrostoides*, *Primula auricula* ssp. *serratifolia*, *Scrophularia heterophylla* ssp. *laciniata*, *Sempervivum marmoreum*, *Sesleria rigida*, *Thalictrum foetidum*, *Thymus comosus*, *Th. jankae*, *Viola joóii*.

2.1.1. *Avenastretum decori* Domin 32; Zólyomi 39

Une analyse détaillée de la diffusion de ces phytocénoses en Roumanie a été effectuée par I. Gergely (1972). Ces prés s'installent sur des rochers et des moraines calcaires fixés dans des gorges et des vallées sur les pentes abruptes ou ombragées ayant une exposition méridionale ou sud-ouest. Le sol propre à ces prés est de type rendzine lévigué, formant une couche superficielle.

Les stations où pousse le *Helictotrichon decorum* sont bien alimentées en eau, ce qui se reflète dans le grand nombre de mésophiles dans les cénoses. Dans les cénoses d'altitude plus basse, 270–400 m, (le défilé Crișul Repede, les gorges de Turul et ceux de Turda), la quantité réduite de précipitations est compensée par l'humidité atmosphérique des vallées qui abritent cette végétation. Dans la composition floristique de l'association on distingue de nombreux endémistes : *Dianthus spiculifolius*, *D. simonkaianus*, *Seseli gracile*, *S. rigidum*, *Sorbus dacica*, *Viola joóii*, *Asperula capitata* ainsi que certaines espèces rares : *Saponaria bellidifolia* et *Dracopcephalum austriacum*. L'association est citée dans les Monts Apuseni, les Carpates Méridionales (près de Brașov), les Carpates Orientales (Suhardul Mic).

On distingue les sous-associations suivantes : *caricetosum humilis* Csűrös 58, *seslerietosum rigidae* Csűrös 58 et *melicetosum flavescens* Zólyomi 39.

2.1.2. *Festucetum xanthinae* Boșcaiu 71

Décrite de la Vallée de Cerna et les versants d'Arjana (Boșcaiu 71) elle est identifiée aussi par C. Maloș (1973, 1977) à Piatra Cloșani. Elle pousse sur les parois des versants abruptes ainsi qu'à la base des roches sur un substrat rendzinique, en contact avec les cénoses de l'alliance *Micromerion banaticum* et *Seslerio-Festucion pallentis*. Dans la composition de l'association, on remarque la présence d'un grand nombre de reliques thermophiles. A côté de la dominante *Festuca xanthina* il y a la *Sesleria rigida*, qui y participe presque toujours. Parmi les espèces qui l'accompagnent nous rappelons : *Minuartia graminifolia*, *Dianthus kitaibelii*, *Asperula capitata*, *Draba lasiocarpa*, *Saxifraga rocheliana*, *Campanula kladniana*, *Primula auricula* ssp. *serratifolia*, *Viola joóii*, *Saxifraga paniculata*, etc.

2.1.3. *Seslerietum heuflerianae siculum* (Zólyomi 30) Soó 44

Pousse sur les cimes ou pentes faibles (I. Gergely, 1967, la signale dans Colții Trascăului et Culmea Bedeleului) ainsi que sur les parois rocheuses de Cheile Dîmbovicioarei et Dîmboviței (V. Sanda et al. 77) à une altitude basse. Dans ce cas l'humidité du substrat est plus grande et presque uniforme, parce que l'eau s'infiltre par les fissures des rochers calcaires. De même les courants d'air ont-ils une intensité plus faible qu'à une altitude élevée. La plupart des plantes rencontrées ici sont saxicoles, mais il n'y manquent pas celles facultativement saxicoles ainsi que bien des espèces communes aux régions collinaires et montagneuses. On remarque les phytocénoses de la Vallée de Dîmbovicioara (V. Sanda et al. 1977), on remarque la présence des espèces suivantes : *Dianthus spiculifolius*, *Euphrasia salisburgensis*, *Campanula carpatica*, *Scabiosa columbaria*, qui indiquent un certain degré de thermophilie de ces groupements. On y mentionne deux sous-associations : *Festuca glauca-Avenastrum decorum* Soó 44 de Rodna et *Festuca saxatilis-Sesleria heufleriana* Soó 44 de Sărățel-Chiraleș-Lechința.

2.1.4. *Thymo comosi-Seslerietum rigidae* Pop et Hodișan 85 (Syn. : *Seslerietum rigidae* (Borza 33) *transsilvanicum* Zólyomi 39; As. *Sesleria rigida-Dianthus spiculifolius* Zólyomi 39).

L'association est largement répandue dans les Monts Apuseni et citée dans les Carpates Méridionales (Piatra Craiului, Lotrului, Tarcu, Cernei). Dans l'étage alpin de Piatra Craiului elle est bien représentée. Ici l'espèce caractéristique *Sesleria rigida* dresse des phytocénoses pauvres en espèces dans la plupart des plantes saxicoles. Parmi les plus représentatives, nous rappelons : *Festuca versicolor*, *Saxifraga paniculata*, *Dryas octopetala*, *Thymus comosus*. Dans Bucegi (Al. Beldie, 1967) on remarque la présence de la codominante *Poa nemoralis* var. *agrostoides* accompagnée de peu d'éléments, pour la plupart saxicoles. Ces phytocénoses sont décrites comme *Seslerietum rigidae bucegicum* Beldie 67. Dans l'association on a distingué les sous-associations suivantes : *burcicum* Zólyomi 39, *oltenicum* Borza 65, *bucegicum* Beldie 67, *praebiharicum* Zólyomi 39.

En tant que faciès on a décrit : *stachyosum* Simon 65, *caricosum* (*digitatae* ssp.) *piroskanae* Gergely 57, *poosum agrostoidis* Simon 56, cum *Dryas octopetala* Csűrös 62, *Arctostaphylos uva-ursi* Csűrös 62, *Poa nemoralis* var. *firmula* Csűrös 63 et *Carex sempervirens* Csűrös 63.

2.1.5. *Diantho petraei-Seslerietum rigidae* Pop et Hodișan 85 (Syn. : *Seslerietum rigidae moesicum* Zólyomi 39; *Sesleria rigida-Dianthus petraeus* Zólyomi 39).

Est rencontrée sur les roches de Monts Banatului. Par ses différences illiriques et surtout mœsiques l'association occupe une position intermédiaire entre *Seslerietum rigidae transsilvanicum* et *Seslerietum rigidae praemoesicum* Zólyomi 39 (= As. *Sesleria rigida-Primula auricula* var. *serratifolia* (Domin 32) Zólyomi 39)) qui est encadrée comme sous-association-*primuletosum auriculo-serratifoliae* Pop et Hodișan 85. A Cheile Minișului (P. Peia, 1978) les cénoses de *Seslerietum rigidae* sont rarement rencontrées à une altitude réduite (environ 300 m) où elle végète sur un sol rendzinique richement humifère. A côté de *Sesleria rigida* on y rencontre : *Poa nemoralis*, *Melica ciliata*, *Doronicum columnae*, *Veronica*

spicata ssp. *crassifolia*, *Aster amellus*, *Orlaya grandiflora*, *Scabiosa columbaria* ssp. *pseudobanatica*, *Centaurea triniaefolia*.

2.1.6. *Seslerietum filifoliae* Zólyomi 39

L'aire de diffusion de cette association en Roumanie est limitée à Clisura Cazanelor, Cheile Caraşului, Minişului, Beuşniţa-Cheile Nerei, et les Monts d'Anina. Des fragments cénotiques sont signalés par P. Peia (1978), à Cheile Minişului où elle occupe des biotopes bien ensoleillés. *Sesleria filifolia* s'associe à : *Campanula divergens*, *Ceterach officinarum*, *Galium album*, *Saxifraga paniculata* *Dianthus tenuifolius*, *Alyssum saxatile*, *Erysimum odoratum*, *Cerastium arvense* ssp. *calcicolum*. De Cazanele Dunării elle est analysée par Erika Schneider-Binder et col. (1970) et Gh. Dihoru et col. (1973). Les espèces qui l'accompagnent sont celles appartenant à l'ordre *Seslerietalia* (alliance *Seslerion rigidae*) et à l'alliance *Seslerio-Festucion pallentis*. Parmi les éléments les plus intéressants de Portile de Fier rencontrés dans ces phytocénoses, nous rappelons : *Dianthus kitaibelii*, *Campanula crassipes*, *C. divergens*, *Centaurea atropurpurea*, *Seseli rigidum*, *Melica ciliata* var. *flavescens*, *Ceterach officinarum*, *Satureja kitaibelii*, etc.

2.1.7. *Asplenio-Seslerietum rigidae* Csűrös 58

L'association a été décrite par St. Csűrös (1958) dans le massif de Scărişoara-Belioara et T. Simon (1966) de la Vallée de la Tisa (Monts de Bihor). Dans les phytocénoses, *Sesleria rigida* et *Asplenium trichomanes* s'associent aux espèces qui présentent des indices d'abondance-dominance augmentés : *Valeriana tripteris*, *Campanula rapunculoides*, *Poa nemoralis*, *Rhytidiadelphus triqueter*, *Saxifraga cuneifolia*, *Hylocomium proliferum*, *Gentiana asclepiadea*, *Scabiosa columbaria* ssp. *pseudobanatica*, *Campanula persicifolia* et *Phyllitis scolopendrium*. Ces phytocénoses ont été analysées sur les versants ayant une exposition septentrionale, la pente ayant une inclusion de 70° à une altitude de 500 m (T. Simon, 1966). Celles de Scărişoara-Belioara végètent à 1350 m installées dans une exposition sud-sud-ouest. Dans ces phytocénoses on a rencontré, en tant qu'espèce rare pour la flore de Roumanie, *Taraxacum hoppeanum* (St. Csűrös et S. Pap, 1958).

3. POION VIOLACEAE Horv. 37

Groupe les associations d'altitude de l'étage subalpin sur des terrains abrités mais ensoleillés. Le sol, même que superficiel, est riche en substances organiques et déficitaire en humidité particulièrement au cours de l'été. Espèces de reconnaissance : *Poa violacea*, *P. alpina* var. *vivipara*, *Festuca saxatilis*, *Carex sempervirens*, *Sesleria rigida*, *Helianthemum alpestre*.

3.1. *Poëtum violaceae* Răv. et Mit 58 ; Ciucă 71, 73.

C'est la seule association de l'alliance *Poion violaceae* de Roumanie et forme des phytocénoses réduites dans l'étage subalpin des Carpates. Dans Piatra Craiului (V. Sanda et col. 1977) elle végète sur les versants orientaux et sud-orientaux. Parmi les espèces qui l'accompagnent ici, nous rappelons *Carex sempervirens*, *Veronica montana*, *Poa alpina*, *Ranunculus*

Tableau 1

Festuco (saxatilis)-Trisetetum (macrotrichum) ass. nova

N° des relevés	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	AD	K
Surface (m²)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
Hauteur de la végétation (cm)	30	35	25	40	30	40	40	35	25	30		
Recouvrement (%)	75	80	85	80	70	75	60	65	70	75		
Exposition	SE	SE	S	SE	SE	E	SE	E	SE	S		
Pente (°)	30	25	30	30	30	20	25	20	25	20		
<i>Festuco saxatilis</i> - <i>Seslerion bielzii</i>												
<i>Trisetum macrotrichum</i>	3	4	4	3-4	5	2	3	4	4	3	2-5	V
<i>Festuca rupicola</i> ssp. <i>saxatilis</i>	1-2	1	1	1-2	+	3	2	1	1	2	+ -3	V
<i>Linum extraaxillare</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Carex sempervirens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Festuca versicolor</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Dianthus tenuifolius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Androsace lactea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Carduus kernerii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I
<i>Achillea schurii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Seslerietalia</i> s.l.												
D) <i>Dianthus callizonus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
(D) <i>Gentiana lutea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Dianthus spiculifolius</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Thesium alpinum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Bartschia alpina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Phyteuma orbiculare</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
(D) <i>Onobrychis transsilvanica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Aster alpinus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Galium anisophyllum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Helianthemum alpestre</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Calamintha alpina</i> ssp. <i>baumgarteni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
(D) <i>Hedysarum hedysaroides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I
<i>Elyno-Seslerietea</i>												
<i>Saxifraga paniculata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Dryas octopetala</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Seslerion rigidae</i>												
<i>Asperula capitata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Linum uninerve</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Libanotis montana</i> ssp. <i>alpina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Polygonum viviparum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	I
<i>Caricion curvulae</i>												
<i>Oreochloa disticha</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Androsace chamaejasme</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Compagnes</i>												
<i>Lotus corniculatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Festuca rubra</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Salix retusa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Achillea distans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Asplenium viride</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Fragaria vesca</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Epilobium angustifolium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
<i>Galium mollugo</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II
<i>Vaccinium myrtillus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Campanula patula</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	IV
<i>Thymus comosus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Polygala vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Luzula luzuloides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Avenula planiculmis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Hypericum umbellatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Hieracium murorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Poa nemoralis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Festuca cinerea</i> ssp. <i>pallens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	III
<i>Knautia longifolia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	II

Espèces trouvées en un seul échantillon : *Scabiosa columbaria* (1), *S. lucida* (8), *Gymnadenia conopsea* (3), *Ajuga reptans* (7), *Ranunculus montanus* (8), *Minuartia gerardii* (9), *Myosotis alpestris* (10).

L'endroit et la date de la réalisation des relevés : 1-10, Turnu Pietrii Craiului, 4-5.08.1976.

oreophilus, *Agrostis tenuis*, *Potentilla ternata*, *P. crantzii*. Dans le Mont Siriu (Gh. Dihoru, 1975) elle est répandue sur les versants sud-ouest où elle est accompagnée par *Festuco-Nardetum strictae*, apparaissant quelques fois sur les abruptes où elles se mêle à *Festuca amethystina*.

Maria Ciucă (1973) fait l'analyse de l'association du massif de Ciucaș où les phytocénoses sont caractérisées par la présence de l'espèce *Sca-biosa lucida* dans la plupart des relevés. Al. Beldie (1967) la décrit dans les Bucegi en tant que faciès de *Seslerietum haynaldianae*.

L'association représente un cénotaxon mésotherme, mésotrophe, xéromésophytique, rupicole. C'est d'ailleurs l'une des prairies calcaires plus sèches de l'étage inférieur qui végète sur un sol superficiel de type brun alpin rendzinique non différencié, non podzolite et riche en calcaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Beldie Al., *Flora și vegetația munților Bucegi*, Ed. Academiei, București, 1967.
2. Boșcaiu N., *Flora și vegetația munților Țarcu, Godeanu și Cernel*, Ed. Academiei, București, 1971.
3. Ciucă Maria, *Acta Bot. Horti Buc.*, 1972—1973, București, 1973, 501—510.
4. Csűrös St., *Studia Univ. Babeș-Bolyai, Ser. Biol.*, Cluj, 1958, 2, 105—128.
5. Coldea Gh., *Contrib. Bot. Cluj-Napoca*, 1984, 137—153.
6. Gergely I., *Contrib. Bot. Cluj*, 1967, 131—143.
7. Gergely I., *Contrib. Bot. Cluj*, 1972, 207—221.
8. Maloș C., *Flora și vegetația cormositelor din bazinul superior al Motrului*. Rezumatul tezei de doctorat, București, 1977.
9. Nyárády A., *Contrib. Bot. Cluj*, 1967, 263—269.
10. Peia P., *Contrib. Bot. Cluj-Napoca*, 1978, 235—250.
11. Pușcaru D. et al., *Pășunile alpine din munții Bucegi*, Ed. Academiei, București, 1956.
12. Sanda V., Popescu A., Doltu M. I., *St. Comunic. Șt., Nat. Sibiu*, 24, Supliment 1980, 172 p.
13. Soó R., *Synopsis systematico-geobotanica-florae vegetationisque Hungariae*, Acad. Kiadó, Budapest, 1964—1980, vol. I—VI.

Reçu le 10 janvier 1989

Institut de sciences biologiques
Bucarest, Splaiul Independenței n° 299

PROTOPLAST FUSION FOR OBTAINING RECOMBINANTS IN INDUSTRIAL YEAST

ION ANGHEL*, TATIANA VASSU*, AURELIA BREZEANU**

An attempt was made to improve the brewing and distillery yeast strains *Saccharomyces carlsbergensis* and *S. cerevisiae* by parasexual hybridization with the strain *S. diastaticus*, which is able to utilize a non-fermentable polysaccharide material termed dextrin. Mutant strains obtained after mutagenesis with nitrosoguanidine, selected for nuclear (auxotrophic mutants — his, ade, cyt, ile, met) and mitochondrial markers (Ni^R , Cd^R , rho^-) were used in fusion experiments. Some of the fusion products obtained by protoplast fusion were tested for their genetic stability and biological performances by estimating the ploidy level (DNA content) the capacity to utilize anaerobically and oxidatively carbon sources and the alcohol yield produced by fermentation.

The yeasts conventionally used in the alcohol and brewery industry, namely *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*, are not able to metabolize all the glucides present in the malt juice (5, 8, 10, 12, 13); our research aimed at improving these yeast strains by somatic fusion of their protoplasts with those of *S. diastaticus*, the latter having the ability to utilize a nonfermentable polysaccharide material termed dextrin.

MATERIALS AND METHODS

The yeast strains used in the present study are presented in Table 1. Protoplast isolation and fusion were performed according to Kuo and

Table 1

Yeast strains used in protoplast fusion

Genus and species	Genotype
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α his	α his Ni^Rrho^+
2. <i>S. cerevisiae</i> a trp4	atrp4 ade1 ade2 Ni^Rrho^+
3. <i>S. cerevisiae</i> X203	a leu2
4. <i>S. cerevisiae</i> I.C.A.	Ni^Rrho^-
5. <i>S. cerevisiae</i> I.C.A.	Ni^Rrho^+
6. <i>S. diastaticus</i> I.C.A.	Ni^Srho^+
7. <i>S. diastaticus</i> I.C.A.	Ni^Srho^-
8. <i>S. diastaticus</i> I.C.A.	Ni^Rrho^+
9. <i>S. carlsbergensis</i> I.F.O. 0565	cyt Ni^Rrho^+
10. <i>S. carlsbergensis</i> I.F.O. 0565	ile Ni^Srho^-
11. <i>S. carlsbergensis</i>	met Ni^Rrho^-

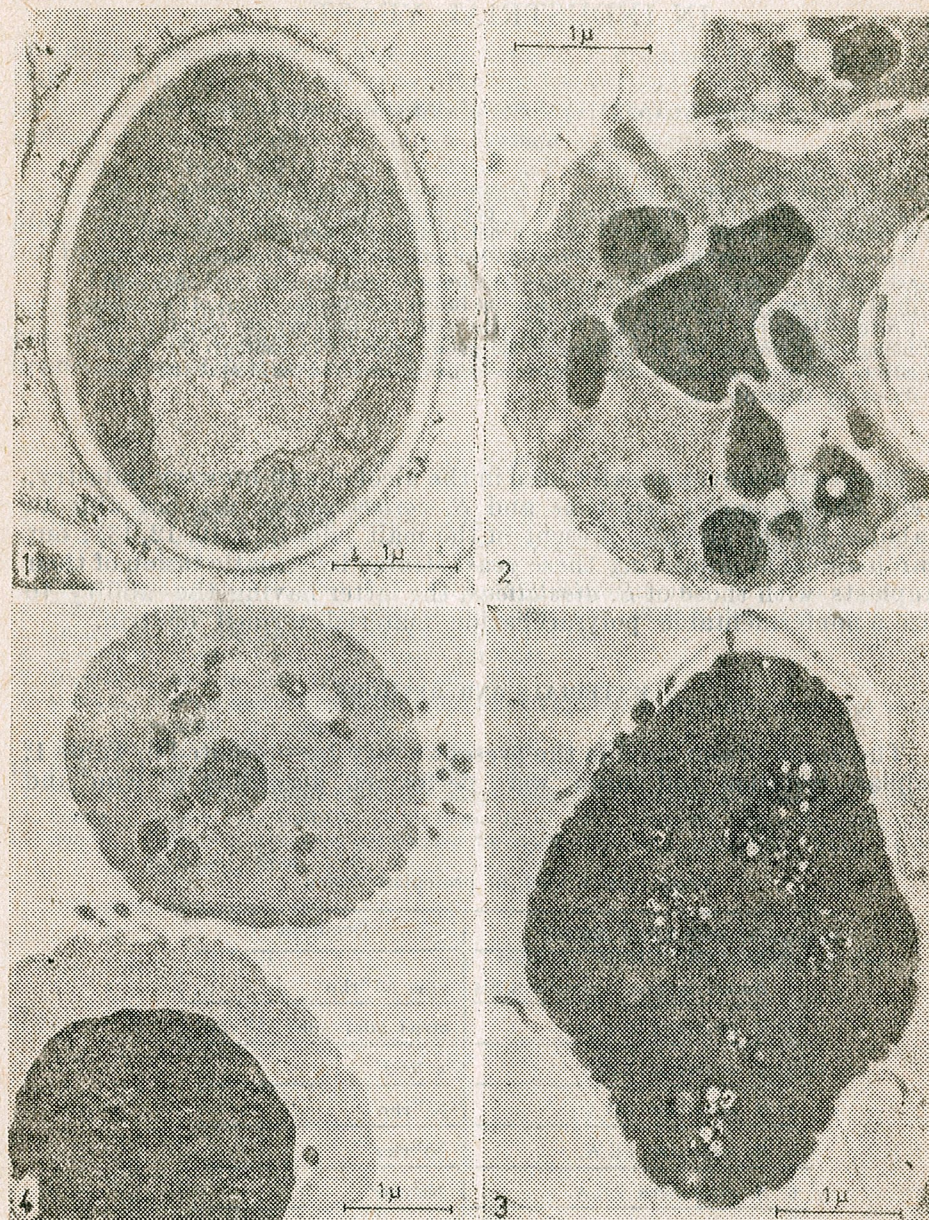


Plate I. — Ultrastructural aspects of yeast protoplasts isolation: Fig. 1. — The ultrastructural peculiarities of the yeast cell; Fig. 2. — Release of protoplasts by the enzymatic digestion of the cell wall, in many areas; Fig. 3. — Protoplast isolation by cell extrusion after enzymatic digestion of the cell wall in only two areas (arrow); Fig. 4. — Ultrastructural peculiarities of the isolated yeast freshly protoplasts;

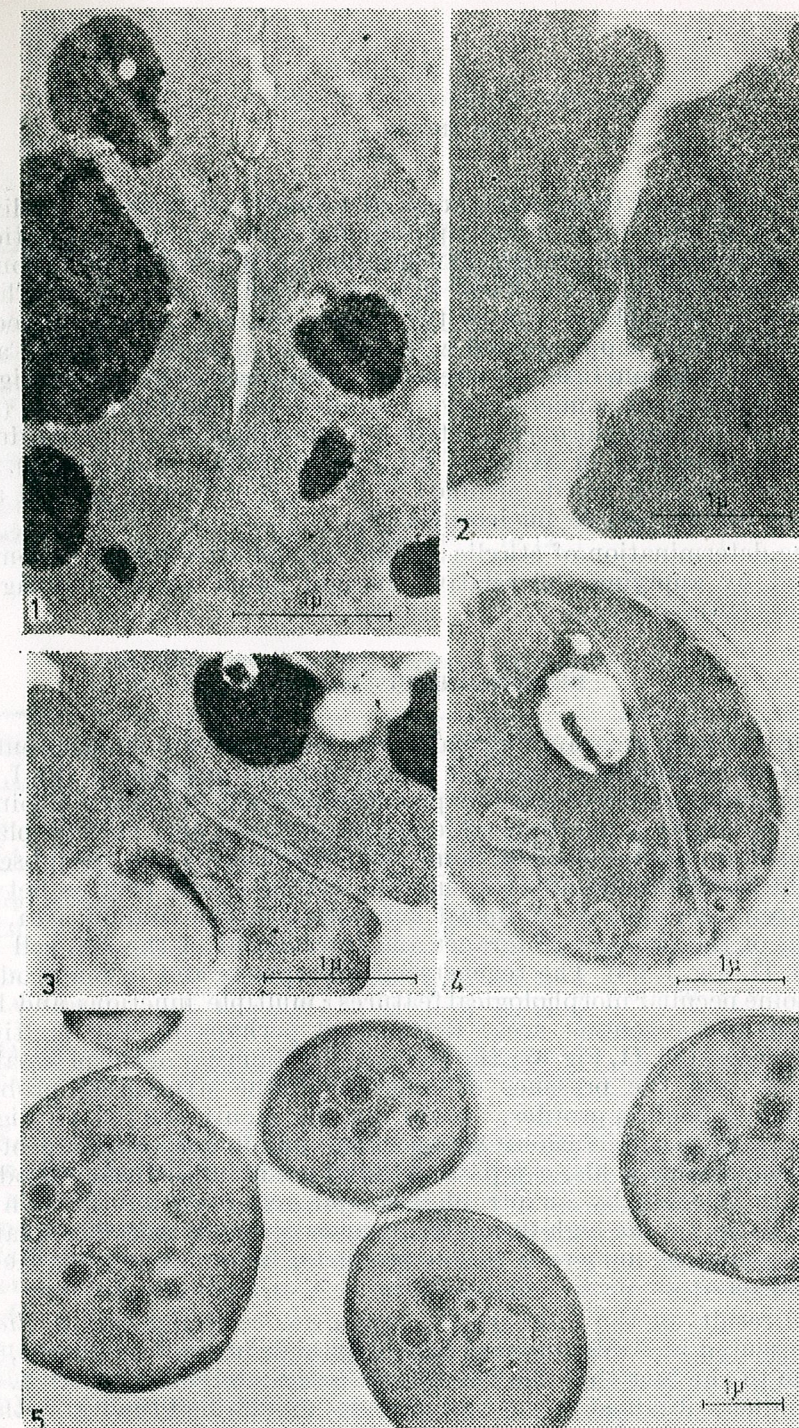


Plate II. — Successive stages of protoplast agglutination and fusion: Fig. 1. — Multiple associations between adjacent protoplasts after PEG treatment in the presence of Ca^{2+} ions. Cytoplasts differentiation between plasma membranes of the fusing cells. Fig. 2. — The modifications of the plasma membrane normal configuration during the fusion process; Fig. 3. — Tight associations between two adjacent protoplasts; Fig. 4. — Cell regeneration after fusion. Characteristic sinuous outline of the plasma membrane and the presence of the membranous structure (probably endoplasmic reticulum profiles) inside the cell, in contiguity with different cell compartments; Fig. 5. — Ultrastructural characteristics of the fusion products resulted from yeast somatic hybridisation experiments; The presence of multiple junctions and of slight local plasmolysis in the contact areas probably determined by the multipolar budding phenomenon (arrows).

Lampen (1971), and Ota (1972), adapted to our experimental conditions (pretreatment with 0.1M 2-mercaptoethanol followed by enzymatic digestion of cell walls with rough snail gut juice), (1,3). Protoplast fusion was accomplished by using PEG 6.000 40% (W/v) and 10 mM CaCl_2 . The regeneration of protoplasts and of the fusion products was achieved on YPG solid medium supplemented with an osmotic stabiliser (0.6M CaCl_2), (14–16). The isolation, fusion and regeneration processes were investigated with the help of electron microscopy by using the standard procedure (fixation in 3% glutaraldehyde over night, at 4°C, postfixation in 2% OsO_4 during two hours, embedding in Araldite, staining according to Reynolds). The DNA content per cell was determined by the diphenylamine method after extraction of the soluble nucleotides (16).

The determination of ethylic alcohol formed after fermentation was performed by applying the relative method based on monitoring the weight loss (16).

RESULTS AND DISCUSSIONS

The electromicrographs revealed the characteristic sinuous outline of the plasma membrane around the freshly isolated protoplasts (Pl. I, Fig. 2-4). During the successive stages of protoplast fusion, frequent cell joinings followed by simple or multiple adhesions are noticed, until the two plasma membranes are closely attached. Some particular aspects were also observed during the agglutination process, such as: cytoplasmatic bridges between two adjacent protoplasts, cytoplasm generation in the contact area, dissociations of the plasma membranes and intermixing of the two cell contents (Pl. II, Fig. 1,2,3). The regenerated protoplasts and fusion products exhibit some peculiar morphological features: multiple junctions and local plasmolysis in the contact areas determined perhaps by the multipolar budding process (Pl. II, Fig. 6); the pronounced sinuosity of the plasmalemma outline and the presence of some membrane structures, probably endoplasmic reticulum profiles, should also be mentioned (Pl. II, Fig. 4).

The intraspecific fusions between the auxotroph mutants of the *S. cerevisiae* strains α his, *a trp4* and X203 resulted in fusion products which were selected by auxotrophic complementation on the minimal medium (Table 2); the high fusion frequencies obtained may be explained by the presence of numerous fusion products, heterozygous for the parental markers.

The results of the interspecific fusion (*S. cerevisiae* and *S. diastaticus*) presented in Table 3 reveal relatively high fusion frequencies, probably due to the fact that the two yeast species are closely related. The fusion products obtained in the four variants maintained their growth capacity on the minimal medium supplemented with Ni (the first two variants) and the glycerol plus Ni medium (the last two variants), even after many subcultures were performed.

For interspecific fusions between *S. carlsbergensis* and *S. diastaticus* auxotroph and mitochondrial mutants obtained by mutagenic experiments with nitrosoguanidine were used. The selection of fusants was achieved on a minimal medium supplemented with Ni or glycerol.

Table 2

The regeneration and fusion frequencies in intraspecific fusions of *S. cerevisiae*

	Parentals	Protoplast no./ml	Reverted protoplasts		No. of fusion products/ml	Fusion frequency
			no./ml	%		
1	α his	6.2×10^8	1.36×10^8	21.94	6.3×10^3	5.04×10^{-3}
	<i>a trp4 ade1 ade2</i>	5.8×10^8	1.14×10^8	19.65		
2	α his	5.2×10^8	1.05×10^8	20.19	1.8×10^3	2.8×10^{-3}
	<i>a leu2</i> (X203)	1.1×10^8	2.05×10^7	18.64		
3	<i>a trp4 ade1 ade2</i>	4.9×10^8	8.4×10^7	17.14	1.2×10^3	2.1×10^{-3}
	<i>a leu2</i> (X203)	1.6×10^8	2.58×10^7	16.12		

Table 3

The regeneration and fusion frequencies in interspecific fusion of *S. cerevisiae* (S.c.) $\times$ *S. diastaticus* (S.d.)

	Parentals	Protoplast no./ml	Reverted protoplasts		No. of fusion products/ml	Fusion frequency
			no./ml	%		
1.	S.c. α his. $\text{Ni}^{\text{Rrho}+}$	1.22×10^8	2.56×10^7	20.98	1.03×10^2	9×10^{-5}
	S.d. ICA $\text{Ni}^{\text{Srho}+}$	7×10^8	2.01×10^8	28.71		
2.	S.c. <i>a trp4</i> $\text{Ni}^{\text{Rrho}+}$	3.2×10^8	6.50×10^7	20.31	1.29×10	1.2×10^{-5}
	S.d. ICA $\text{Ni}^{\text{Srho}+}$	5.6×10^8	1.41×10^8	25.18		
3.	S.c. ICA $\text{Ni}^{\text{Rrho}-}$	2.02×10^8	4.91×10^7	24.31	0.81×10	9.3×10^{-6}
	S.d. ICA $\text{Ni}^{\text{Srho}+}$	4.15×10^8	1.25×10^8	30.12		
4.	S.c. ICA $\text{Ni}^{\text{Rrho}+}$	6.1×10^8	1.11×10^8	18.20	0.96×10	8×10^{-6}
	S.d. ICA $\text{Ni}^{\text{Srho}-}$	6.7×10^8	1.29×10^8	19.25		

The hybrid nature of the fusion products was firstly tested by establishing the ploidy level of the fusants, in comparison with the parentals. In this respect, the DNA quantity, both in the parental strains *S. cerevisiae* and *S. diastaticus* as well as in some fusion products *S. cerevisiae* $\times$ *S. diastaticus* was estimated by the standard curve obtained with hering sperm DNA, reported to the initial density of the cell suspension (Table 4).

Due to the fact that only the diploid hybrids have genetic stability (7,11), the aneuploid, triploid and tetraploid ones manifesting a decrease of the DNA content/cell during the subsequent passages until the diploid level, is reached and an increased frequency of the parental markers for auxotrophy, the periodical verification of the fusion product stability is necessary, both for the determination of the DNA content and for the application of adequate techniques for analyses and selection.

The assessment of the biological performances of the fusion products of yeasts used in the fermentation industry was accomplished by

determining their bioconversion capacity of the wort in ethanol. The ethanol quantities produced by fermentation were estimated in parallel both in some fusion products and in parentals at 24, 48, 72, 96, 120 hours intervals (Table 5).

Table 4

DNA content per cell in parental strains and in some fusants

Yeast strains	DNA content per cell ($\times 10^{-12}$ /cell)	Ploidy level
1. <i>S. cerevisiae</i> α his (S.c. α)	18	haploid
2. <i>S. cerevisiae</i> a trp4 (S.c.a)	16	haploid
3. <i>S. cerevisiae</i> I.C.A.(S.c.ICA)	58	triploid
4. <i>S. diastaticus</i> I.C.A.(S.d. ICA)	65	triploid
5. P.F. _A S.c. α $\times$ S.c.a	34	haploid
6. P.F. _B S.c. α $\times$ S.c.a	42	diploid
7. P.F. _C S.c. α $\times$ S.c.a	26	haploid
8. P.F. ₁ S.c. ICA $\times$ S.d.ICA	53	triploid (?)
9. P.F. ₂ S.c. ICA $\times$ S.d.ICA	60	triploid
10. P.F. ₃ S.c. ICA $\times$ S.d. ICA	56	triploid
11. P.F. ₄ S.c. α $\times$ S.d. ICA	46	diploid (?)
12. P.F. ₄ S.c. α $\times$ S.d. ICA	46	diploid (?)

Table 5

Alcohol quantities produced as a result of fermentation processes by the fusion products in comparison with the parentals

Yeast strains	Alcohol quantity g/l				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1. <i>S. cerevisiae</i> (S.c. ICA)	27.87	32.05	41.80	54.34	54.34
2. <i>S. diastaticus</i> (S.d. ICA)	35.53	41.10	57.13	68.57	68.57
3. <i>S. carlsberg</i> . (S.cl.IFO)	31.35	36.92	46.37	59.21	59.21
4. <i>S. cerevisiae</i> α his (S.c. α)	9.05	14.63	20.90	20.90	20.90
5. P.F. ₁ (S.c. ICA $\times$ S.d.ICA)	32.74	38.31	52.25	64.09	64.09
6. P.F. ₂ (S.c. ICA $\times$ S.d. ICA)	34.13	39.71	52.94	65.48	65.48
7. P.F. ₃ (S.c. ICA $\times$ S.d. ICA)	29.26	34.83	43.19	55.73	55.73
8. P.F. ₄ (S.c. α $\times$ S.d. ICA)	9.66	15.33	21.60	26.47	26.47
9. P.F. ₅ (S.c. α $\times$ S.d. ICA)	19.50	27.87	34.13	37.62	37.62
10. P.F. ₆ (S.cl.IFO $\times$ S.d. ICA)	32.04	37.86	49.53	61.05	61.05
11. P.F. ₇ (S.cl.IFO $\times$ S.d.ICA)	32.26	38.09	49.90	61.71	61.71
12. P.F. ₈ (S.cl.IFO $\times$ S.d. ICA)	33.92	38.57	53.10	64.74	64.74
13. P.F. ₉ (S.cl. $\times$ S.d.ICA)	34.35	40.41	53.64	65.08	65.08
14. P.F. ₁₀ (S.cl.IFO $\times$ S.d. ICA)	32.97	38.83	50.05	62.34	62.34

CONCLUSION

The protoplast fusion technology represents a promising trend in obtaining yeast strains with a superior capacity of metabolising carbohydrates and, consequently, high producers of ethanol. The interval between a desired strain is obtained and its industrial utilization should be long enough, because repeated evaluations are necessary in order to verify the parameters of the tested strain and to confirm the fact that the "improved" strain does not present disadvantages for industry.

BIBLIOGRAPHY

1. Anghel, I., Toma, N., Vassu, T., Moisa, I., Cărciumărescu, D., *Genetica microorganismelor. Principii și metode de laborator*. Universitatea din București, 1985, 201-211.
2. Anghel, I., Brezeanu, A., Vassu, T., Toma, N., *Lucrările celui de al III-lea Simpozion Național de Culturi de celule și Țesuturi Vegetale "in vitro"*, București, 1985, 23-34.
3. Anghel, I., Vassu, T., Brezeanu, A., Toma, N., *Lucrările celui de al III-lea Simpozion Național de Culturi de Celule și Țesuturi vegetale "in vitro"*, București, 1985, 165-174.
4. Barney, M. C., Jansen, G. P., Helbert, J. R., J. Amer. Soc. Brew. Chem., **33**, 1-5.
5. Brown, S. W., Oliver, S. G., Tenth Inst. Conf. Yeast Genetics and Molecular Biology, Louvain-le-Neuve, 1980.
6. Freeman, R. F., Proc. 18-th Congress Eur. Brew Conv. London: IRL Press London, 1981, 497-504.
7. Freeman, R. F., Peberdy, F. I., *Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects*. Ed. by J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, A. R. W. Smith, Springer-Verlag, New York 1983, 9, 243-253.
8. Johnston, J. R., *Genetic Engineering or Biotechnology. Proceed. of the International Symposium on Genetic Engineering*, 1981, Sao Paulo, Brasil, 13-18.
9. Kuo, S. C., Yamamoto, S., 1975, *Yeast Cells*, **3**, 169-181.
10. Morgan, A. J., *Protoplasts, 6th International Protoplast Symposium*, Ed. by I. Potrykus, Birkhauser Verlag Basel, 1983, 155-166.
11. Skatrud, P. L., Haack, D. M., Kot, E. J., Helbert, J. R., Ann. Soc. Brew. Chem. 1980, **38**, 49-53.
12. Spencer, J. F. T., Spencer, D. M., Curr. Genet., 1982, **4**, 177-180.
13. Stewart, C. G., Russell, I., *Yeast Genetics*, New York, 1983, **15**, 461-484.
14. Vassu, T., Anghel, I., Brezeanu, A., Toma, N., Cărciumărescu, D., *Lucrările celui de al IV-lea Simpozion al Țărilor socialiste de Biotehnologie de la Varna*, 1986.
15. Vassu, T., Anghel, I., Brezeanu, A., Toma, N., Cărciumărescu, D., *Microbiologie industrială și biotehnologie*, Iași, 1986, 641, 652.
16. Vassu, T., Anghel, I., Brezeanu, A., Son'a, D., KIM ROYNEZI, *Microbiologie Industrială și biotehnologie*, Iași, 1988, 517-529.

Received October 20, 1988

* University of Bucharest
** Institute of Biological Sciences

BEHAVIOUR OF VEGETAL PROTOPLASTS IN FUSOGEN ELECTRIC FIELDS

ILEANA PETCU*, AURELIA BREZEANU**, M. RADU*

Electrofusion experimental conditions and fusion yields are reported for vegetal protoplasts belonging to some species of *g. Nicotiana* (*N. tabacum* cv. Xanthi and *N. alata*). The effect of different protoplast preparation methods on the electrofusion yield was investigated. In optimal conditions, for protoplasts isolated by the sequential method, 70% — 90% fusion were obtained. As concerns the electrical field parameters the best fusion yields were found for short (10 sec) application of alternating electrical field of $f = 1$ MHz and $E_d = 200$ V/cm followed by series of 1—3 electric fusion pulses of $E_f = 1-2$ kV/cm and 40 μ s duration.

INTRODUCTION

The investigations of biosystems at cellular level in order to outline the effects resulting from the application of continuous and low frequency alternating electrical fields have recently yielded numerous information concerning the processes located in the membranous system (1). The studies in this field led to the achievement of a very refined technique suitable to basic research with biotechnological implication: cell electrofusion.

The fusion of cells under electrical field, first described by Senda et al. (2) and further refined by Zimmerman et al. (3), has been introduced as an alternative to fusion methods based on chemical and virological agents and it is still considered as a nonconventional technique. In comparison with the other methods, the electrically induced fusion appears to allow the possibility of process synchronization and is carried out under conditions similar to the physiological ones.

It is well known that polyethylene glycol (PEG) frequently used as fusogenic agent in chemically induced cell fusions is efficient but not ideal, because of its rather high toxicity. This agent can yield only 1% to 10% random fusion and in order to maintain cell viability in vitro numerous washings are necessary so as to ensure its complete removal. The rise of PEG concentration aimed to increase fusion yields strongly influences the protoplast viability. Besides, the PEG is relatively toxic for the mesophyll protoplasts of many species (4). Consequently, the electrical fusion aroused a great interest due to its flexibility and efficiency, high yields of 40—60% being obtained for various protoplasts (5). Some investigations have revealed a certain preferential formation of bi-nucleate heterokaryons. A long discussed problem has been the maintenance of the viability of electrically fused protoplasts (6).

The results obtained for other experimental systems, as for instance yeast protoplasts (7) and animal cells (8) evidenced that the electrical fusion is not cytotoxic.

The successful results obtained in the technology of fusion by the application of electrical fields to plants led to the achievement of cell cultures and later on to the regeneration of normal plants from fusion products, proving their unaltered viability (5, 9, 10).

In spite of these good results, the extended application of the electrofusion in somatic hybridization of plants, met with several difficulties of a biological and especially a technical nature, demanding further thorough investigations.

This work gives, in addition to our previous reported studies (11, 12), experimental original results concerning the achievement of electrofusion products in vegetal protoplasts belonging to some species of *g. Nicotiana*. Some essential elements influencing the fusion yields are discussed: the procedure of extraction and purification of protoplasts, protoplast source, the osmotic stabilizing agent, the electrical field characteristics.

MATERIAL AND METHOD

Isolation of vegetal protoplasts. Two species of *g. Nicotiana* (i.e. *N. tabacum* cv. Xanthi and *N. alata*) were comparatively investigated.

As protoplast source the foliar mesophyll from greenhouse grown plants in optimal physiological conditions and from "in vitro" plants obtained by aseptic germination of seeds was used.

The use of the in vitro plants foliar mesophyll appears to be suitable since it gets rid of superficial sterilization of the leaves which often stresses and hinders the extraction step and the fusion. Besides, the cells of the mesophyll of plants grown in vitro are physiologically uniform due to the control of growing conditions. The physiological uniformity of cells allows the synchronization of their response to the testing conditions.

For greenhouse-grown plants, prior to the enzymatic treatment, the leaves had been superficially sterilized through a 3-min. immersion in 0.1% HgCl_2 solution followed by 3 washings in distilled water after which the lower epidermis was carefully removed. In the case of aseptically grown plants, the removal of the lower epidermis of the leaves was no longer necessary.

In order to obtain the protoplasts, two methods were parallelly used (Table 1): a) a direct method, a version of Power and Cocking's method implying a single-step enzymatic treatment (13); b) a sequential method elaborated by Takebe and Nagata (14) which implies a two-step enzymatic treatment.

— in the first step, the tissue is exposed to the action of pectinases in order to remove middle pectical lamella and to release successively into the suspension the cells of palisade and spongy parenchyma;

— in the second step, the treatment with cellulase determines the conversion of isolated cells into protoplasts.

Isolation was achieved by incubation of mesophyll fragments in enzyme solutions of cellulase Onozuka R-10 (produced by Serva Co.) and macerozyme R-10 (produced by Calbiochem Co.) in concentrations

Table 1
The main enzyme combination and the protoplasts isolation methods

No.	Enzyme solution combination	Conc. %	Osmotic pH	Isolation method time	Biological material source	Effects on isolation efficiency	
						<i>N. tabacum</i>	<i>N. alata</i>
1.	Cellulase O R-10 Macerozyme MT	1.25 0.50	Mannitol 0.7M pH = 5.8	direct (13) 18h	mesophyll from green house plants mesophyll from in vitro plants	++ ++	++ ++
2.	Cellulase OR-10 Macerozyme MT	1.25 0.5	sorbitol 0.7M pH = 5.8	direct (13) 18h	mes. gr. pl. mes. in vitro pl.	++ ++	++ ++
3.	Cellulase OR-10 Macerozyme MT	1.25 0.5	sorbitol 0.6M MES 20mM MgCl_2 5mM pH = 5.8	direct (13) 18h	mes. gr. pl.	+	+
4.	Macerozyme MT Cellulase OR-10	0.50 1.00	Mannitol 0.7 M dextran SO_4 0.5 % Mannitol 0.7M pH = 5.8	sequential (14) 2 × 2h	mes. gr. pl. mes. in vitro pl.	++ ++ ++	++ ++ ++

++ + very good isolation ($5-10 \times 10^6$) protoplasts/g of fresh vegetal material)
++ + good isolation (3×10^6 protoplasts/g of fresh vegetal material)
++ + satisfactory isolation (1×10^6) protoplasts/g of fresh vegetal material)
++ + poor isolation (0.5×10^6) protoplasts/g of fresh vegetal material)

mentioned in Table 1. They were solved in mannitol 0.6–0.7 M or sorbitol 0.6–0.7 M used as osmotic stabilizer. Prior to the experiment the enzyme solutions has been sterilized through filtration. The treatment duration varied according to the method used (Table 1) as follows: 18 hours under static conditions for the direct method and 3–4 hours under slow agitation for the sequential method. Incubation was performed in complete darkness, at a temperature of $25-28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. At the end of enzymatic digestion the protoplasts were purified by passage through 4 layers of nylon screen (62–70 μm) followed by 3 successive centrifugations and resuspensions (centrifugation: 5 min. at $100\times g$) in the osmotic stabilizer. In order to ensure an optimal reactivity of the protoplasts, it was essential to remove any trace of the enzyme. Purification proper was achieved by layering the protoplasts on to 23% sucrose and subsequent centrifugation (8 min. at $75-100\times g$). At the mannitol-sucrose interphase the viable protoplasts formed a light-green band. The cellular wastes destroyed during the extraction process, as well as the nonviable protoplasts sedimented, forming deposits.

The layer of viable cells obtained in this way became the biological material used in the electrofusion experiments.

The method of electrically-induced cellular fusion. The method of electrically-induced cellular fusion, introduced by Zimmerman (3) actually puts together two phenomena, studied independently until then, i.e. cell dielectrophoresis and electrical breakdown of the membrane.

The phenomenon known as dielectrophoresis consists in the motion towards the region of the highest electrical field intensity of charged dielectrical bodies (as living cells are) when submitted to an unhomogeneous alternating electrical field (kHz – MHz), sufficiently powerful (10^2 V/cm). Field unhomogeneities appeared due to the very presence of cells in the case of cell suspension of densities greater than 10^4 cells/ml induce the phenomenon of mutual dielectrophoresis displayed through the arrangement of the cells oriented in "pearl chains" along the field lines. The overall result is a tight contact between the cell membranes.

The process of electrical breakdown of the cells is evidenced by the reversible rise of the membrane permeability following the application of an external electrical field of some kV/cm intensity and some microsecond duration on a cellular suspension. At the molecular level, the process generally associates with the formation of conducting transmembrane pores and, in this way, with local modification of the membrane structure.

If the cells are put in close contact like "pearl chains" along the field lines through mutual dielectrophoresis in a radiofrequency field and subsequently are submitted to the action of direct pulses of an electrical field of over-critical intensity, the pore formation is induced and configurational changes occur, especially in the area of cell joining. In this way cytoplasmatic points of continuity are obtained and afterwards, through lipid bilayer reorganization, membrane continuity areas are also formed. After the establishment of continuity of the membrane the relaxation process of the fusion product takes place. This happens in the absence of any external electrical field implying a redistribution of membrane and intercellular components of two or more partners.

The entire sequence of events may be observed under the microscope. The experimental arrangement for inducing and visualizing electrofusion used in our investigations consists of:

- a Versatester generator for sinusoidal signals (IEMI—Bucharest);
- a pulse generator and an amplifier (IFIN—Bucharest);
- an optical microscope type MC 3 (IOR—Bucharest);
- an optical microscope with reverse visualisation OPTON type in case a sterile processing and cultivation of fusion products is aimed at;
- fusion chambers with Cr electrodes obtained by deposition on glass by vacuum evaporation; the separation between the electrodes was 100–150 μm ;

The fusion chambers were sterilized by ethanol washings. The entire experiment was carried in aseptical environment.

After the deposition of the sample on the fusion chamber and the focusing of the microscope image, an alternating electrical field was applied (the dielectrophoretic field) having a frequency of 1 MHz and an intensity of 100–200 V/cm. Shortly (10 sec) after the occurrence of the dielectrophoretic effect (pearl chains formation), series of 1–3 electrical pulses of 35–45 μsec duration and 0.5–3 kV/cm intensity were applied on the electrodes at 3–5 sec intervals. Subsequent to the pulse end, the dielectrophoretic alternating field is automatically reapplied for some seconds.

The fusion yields were determined either by directly counting the cells under the microscope or on photographs taken before and after the pulse application. The yield value errors amounted to 15%.

Culture and testing of fusion products viability. The culture of the protoplasts after the sterile collection from the electrofusion chamber was parallelly achieved by two methods: a) the microdroplet method (15), which consist of deposition of small droplets of protoplast suspension in fertile medium at the top of a Petri box 10 cm in diameter. This method appears to be adequate since it allows visualization and initiation of cell division; b) the method of deposition of drops of protoplast suspension on a support of agarised nutritive medium of the same composition.

In connection with the chemical composition of the nutritive media we mention that they were variants of Takebe and Nagata's medium (14): these are complex media containing in addition to macro and micro elements also organic compounds currently used in protoplast culture, and specific phytohormones like 2,4-D (1–1.5 mg/l) and NAA (1–3 mg/l), as well as the citric acid as antioxidant and mannitol (0.6 M) as osmotic stabilizer. The culture was achieved under a light intensity of 1000 lux and a temperature of $25-28^{\circ}\text{C}$. The density of protoplast population in the culture was set at about 10^3-10^4 /ml. The protoplast culture was achieved by mixing the suspension of protoplast fusion products in the 0.6 M mannitol solution with the culture medium in a 1/1 (v/v) proportion.

The protoplast viability during the experimental work was assessed by: the analysis of cell shapes under the reverse light microscope and under the phase contrast one and also through observation of protoplas-

matic movements as well as through vital staining with neutral red of 0.1% in 0.6 M mannitol.

The perfect spherical shape and the parietal regular ordering of the plastids in addition to the presence of cytoplasmatic movements represents certain indicators of cell viability.

The structural functional stability of the tonoplast of viable protoplasts was shown through the vacuole retention of the specific staining agent (neutral red).

RESULTS AND DISCUSSION

The development of the electrofusion process is determined by a number of experimental parameters, some referring to the cell suspension (the physiological state of the protoplasts and the cell density in suspension), while others characterize the conditions of electrical dielectrophoretic field and electroporative pulse.

Electrofusion was adequately obtained and monitored only on protoplast suspensions of density higher than 10^5 cells/ml. For some preparative variants, the viable protoplast suspension obtained following the purification procedure was further concentrated by centrifugation (5 min at $100\times g$).

Table 2 summarizes the optimal values for the dielectrophoresis electrical field and the fusion electrical pulses for the investigated samples as well as the fusion yields observed through several minute intervals (10 min) after the end of pulses sequence.

After applying the electrical pulse between the electrodes, two or multi-cell fusion bodies were observed.

In Figs 1–2 the stages of the electrofusion process can be seen showing multi-cell giant bodies from the protoplasts obtained by the sequen-

Table 2

Optimal experimental parameters for electrofusion of plant protoplasts obtained by different isolation methods

Protoplast isolation method	Protoplast source	Alternating electrical field	Fusion electrical pulse	Number of pulses	Maximum fusion yield	Obs.
Sequential method (14) 4–5 h	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	1 MHz 150 V/cm	0.9–1.4 kV/cm 40 μ s	1–3	80%	Multicellular fusions. Relaxation time of the fusion products 1–2 min.
	<i>N. alata</i>	1 MHz 200 V/cm	0.9–1.3 kV/cm 40 μ s	1–3	75%	
Direct method (13)	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi	1 MHz 200 V/cm	1.4–2 kV/cm 38 μ s	2–3	40%	Two – three cell fusions. Relaxation time of the fusion products 15– 20 min.
	<i>N. alata</i>	1 MHz 200 V/cm	1.4–2 kV/cm 38 μ s	3	40%	

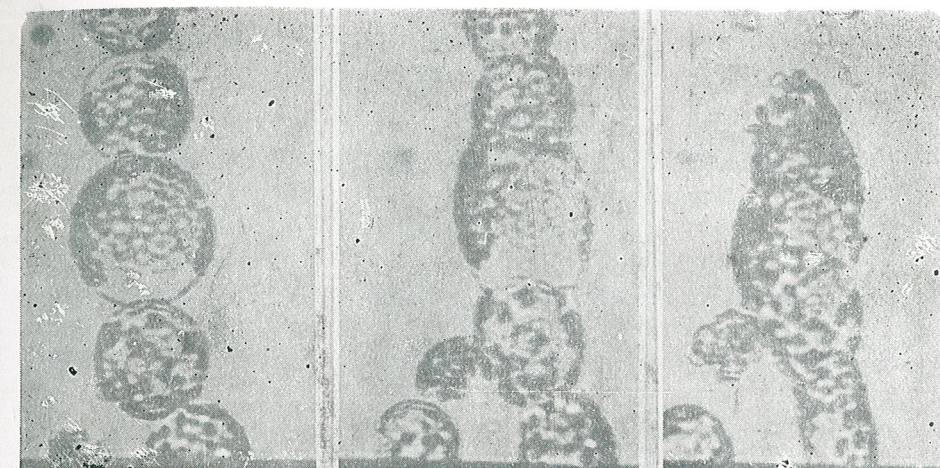


Fig. 1. — Multi-cell electrofusions of *N. tabacum* protoplasts isolated by the sequential method (14): (a) pearl chain formation in dielectrophoretic field, $E_d = 230$ V/cm, $f = 1$ MHz; (b) 5 sec after 2 electrical pulses $E_f = 1.2$ kV/cm, $\tau = 40$ μ s; (c) 1 min after pulse.

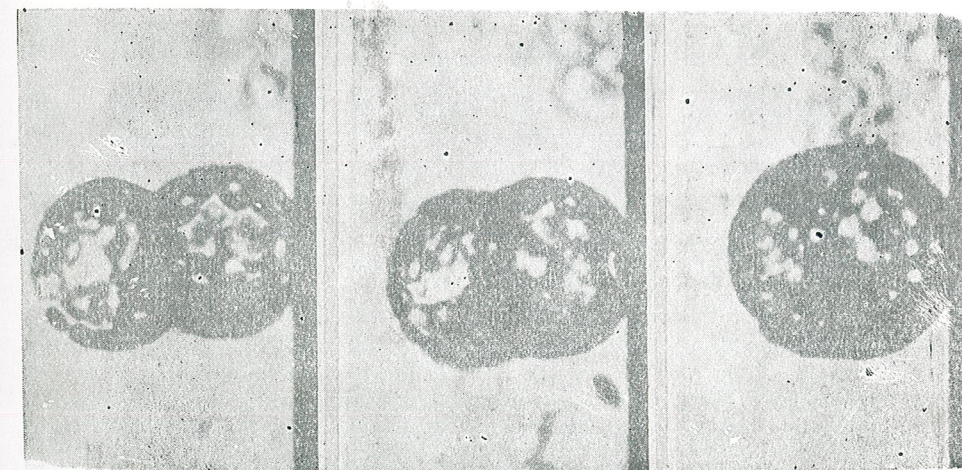


Fig. 2. — Stages of two cell electrofusions of *N. tabacum* protoplasts isolated by the direct method (13); electrical pulse characteristics $E_f = 4.3$ kV/cm, $\tau = 50$ μ s, $N = 2$ pulses: (a) 6 min after pulse; (b) 13 min after pulse; (c) 20 min after pulse.

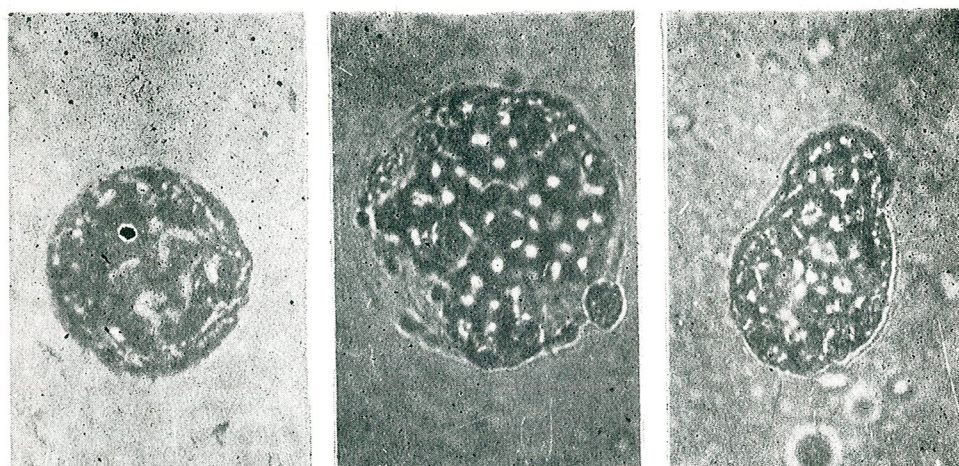


Fig. 3. — Fused and unfused protoplasts 48 h after their cultivation in liquid medium; (a) unfused protoplasts; (b — c) fused cellular bodies.

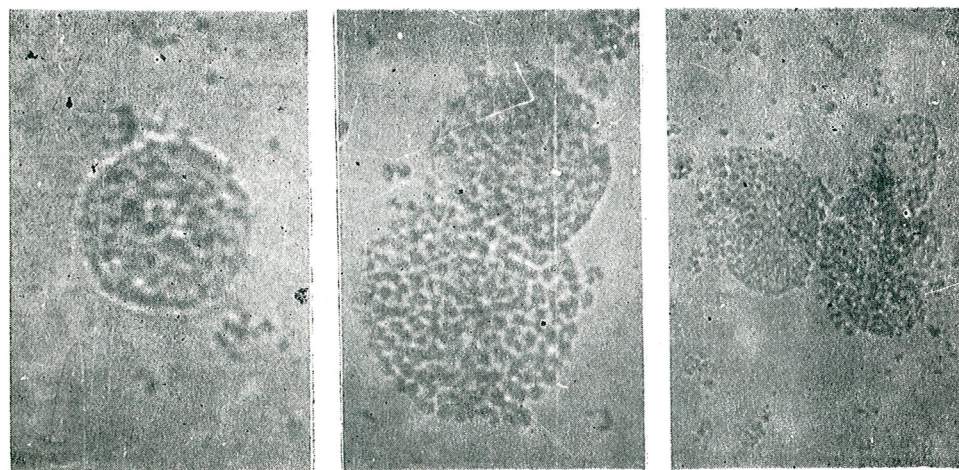


Fig. 4. — Fused and unfused protoplasts 48 h after their cultivation on agarose solidified media; (a) unfused protoplast; (b — c) fused cellular bodies.

tial method and two-cell bodies from the protoplasts separated by the direct method.

An important aspect revealed by our experiments was the different reactivities under electrical field of the protoplasts obtained by means of the two extraction methods. The sequential method proved to be the most efficient, its yield being around 80%.

It is worth noting that it is the method yielding the highest number of protoplasts per gram of fresh vegetal material.

Another noticeable result concerns the direct extraction method; in this case the relaxation process of the fused product is slower, the time requested to reach the spherical shape being longer than 20 min.

The difference in reactivity behaviour under fusion-generating electrical field as evidenced by the protoplasts separated by the two methods could be related to different physiological states of the protoplasts and modified electrical properties of the cell membrane. It also follows that, by shortening the duration of the contact between the cells and the enzymes, the physiological state of the protoplasts was positively influenced, raising their reactivity under the electrical field. The best results were obtained after at least 3—4 washings (in 0.6 M mannitol) to remove any enzyme traces.

The experiments also pointed out that in order to obtain high fusion it is essential to maintain an as-short-as-possible interval for the application of the dielectrophoretic field before triggering the fusion pulse. In this way the duration of the action of alternating electrical field was reduced to the minimum necessary for the cell pearl chain formation. Its optimal value proved to be 10 sec.

For experiments on the subsequent evolution of fusion products, a lower cell density (around 10^4 cells/ml) was chosen. In this way the formation of multi-cell fusion bodies, with small chances of regeneration and evolution in the culture, was avoided.

The presence of fusion products was assessed by the size and structural complexity of the cells in suspension.

Our work showed that no difference exists between the two species concerning cell reactivity under electrical field. In the case of both *N. tabacum* and *N. alata*, the sequential method, which proved to be optimal for separation, ensured also a high fusion yield: 60 to 90% as against 30 to 50% in case of the direct method (Table 2).

The optimal experimental conditions concerning the electrical field parameters were: frequency 1 MHz, intensity 200 V/cm for the alternating electrical field and 1—2 kV/cm, duration 40 μ s for porative electrical pulses; series of 2—3 pulses at 1 sec interval were applied.

As regards the influence of the osmotic stabilizer we would mention that any negative effects of mannitol was evidenced, contrary to some recent opinions (16) which suggest the use of sorbitol. Sorbitol alone, or in association with MES (2-(N-Morpholino) ethane-sulfonic acid) and $MgCl_2$ was not able to ensure the isolation of a sufficient amount of protoplasts so as to allow a comparative investigation of their reactivity in fusion generating electrical fields (Table 1).

With respect to the behaviour of the fusion products in the culture, the cytological analysis after 12 and 48 hours (Figs 3—4) evidenced an

optimal physiological state allowing a satisfactory subsequent evolution. Our data do not permit to assess whether the fusion products observed in culture after 48 hours are the result of bi- or multi-cell fusions.

The cell wall regeneration of the fusion products was achieved after 48 hours of culture, being assessed by means of their shape modification from spheroidal to asymmetrical.

Visible cellular aggregates, possible microcolonies appeared after 3 days of incubation under microdroplets on agarised medium culture conditions.

The experimental data obtained lead to the following conclusions:

— The methods of protoplast isolation of both plant species play an essential role on their reactivity in fusogenic electrical field. The sequential method, faster and more efficient, proved more suitable also by its fusion yield.

— The physiological state of the protoplasts and the density of cell suspension greatly influenced fusion yield.

— The fusion yield was significantly increased by shortening the time intervals of alternating the electrical field action below 30 sec, the optimal duration being 10 sec.

REFERENCES

1. Zimmermann U., Biochim. Biophys. Acta, 1982, **694**, 227—277.
2. Senda M., Takeda J., Abe S., Nakamura T., Plant Cell Physiol., 1979, **20**, 1441—1443.
3. Zimmermann U., Scheurich P., Planta, 1981, **151**, 26—32.
4. Kao K. N., Michayluk M. R., Planta, 1974, **115**, 356—367.
5. Bates G. W., Hasenkampf C. A., Theor. Appl. Genet., 1985, **70**, 227—233.
6. Rakosy Tican L., Cachița Cosma D., Achim F., Lucăci M. C., Turcu I., Morariu V. V., Palada Nicolau M., Bul. Soc. Naț. Biol. Cel., 1988, **15**, 36.
7. Halfmann H. J., Emeis C. C., Zimmermann U., Arch. microbiol., 1983, **134**, 1.
8. Pinaz C., Lefevre A., Teissie J., Exp. Cell. Res., 1984, **150**, 477—482.
9. Kohn H., Scheider R., Scheider O., Plant Science, 1985, **38**, 121—128.
10. Morikawa H., Sugino K., Hayashi J., Senda M., Hirai A., Yamada A., Biotechnology, 1986, **4**, 57—60.
11. Petcu I., Mocanu N., Radu M., Brezeanu A., Vassu Dimov T., in "Microbiol. Ind. Biotehn." Iași, 1031—1039, 1988.
12. Petcu I., Radu M., Mocanu N., Vassu Dimitrov T., Brezeanu A., Bul. Soc. Naț. Biol. Cel., 1988, **15**, 119.
13. Power J. B., Cocking E. C., J. Exp. Bot., 1970, **21**, 64.
14. Takebe I., Nagata T., in "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants", 1984, **1**, 328—339, Acad. Press.
15. Potrycus I., Lartz J., Theor. Appl. Genet., 1977, **54**, 209.

Received 10 April, 1989

* Institute for Physics and Nuclear Engineering, Bucharest, MG-6
 ** Institute of Biological Sciences, 77748, Bucharest

RECHERCHES ÉCOPHYSIOLOGIQUES SUR LES ESPÈCES LIGNEUSES DU MASSIF CĂLIMANI

ANCA LIDIA ANTOHE, ALICE PISICĂ-DONOSE, ALEXANDRINA MURARIU

The wood species from the Călimani range of mountains are exposed to some pressures owing to some peculiar conditions of temperature, humidity, light, effects, vegetation span etc. at the uppermost border of the forest.

Consequently, these plants develop a set of features. Analysing the behaviour of the species *Pinus cembra*, *Picea abies*, *Pinus mugo* we have come to trace some outstanding adaptable metabolic peculiarities under the circumstances in which the climate gets rougher, according to the higher altitude.

L'accroissement et le développement des espèces ligneuses à la limite supérieure de la forêt ont lieu dans des conditions particulières de température, humidité, facteurs stressants qui déterminent une série de particularités spécifiques.

Nous avons analysé le comportement des conifères dans ces conditions, durant cinq années, en contribuant à éclaircir certains processus physiologiques et à montrer leur développement dans les conditions d'un climat rude lorsque l'altitude s'accroît.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les recherches ont eu lieu sur le versant du Nord des montagnes Călimani, les stations d'étude étant placées sur le versant N—NV de la montagne Rățițiș, dans trois types de forêt:

— la station du pin rampant des montagnes (genévrier) placée sur le sommet Rățițiș, à l'altitude de 1800 m, où nous avons travaillé sur l'espèce *Pinus mugo*;

— la station plantée d'épicéas aux aroles à la limite de l'altitude supérieure placée sur le sommet Rățițiș, dans l'endroit nommé Piciorul Iancului à l'altitude de 1750 m, où nous avons travaillé sur les espèces *Pinus mugo*, *Pinus cembra* et *Picea abies*;

— la station plantée d'épicéas aux aroles de la forêt définitivement établie d'une unité de production forestière, placée dans la zone des sources de la rivière Neagra, à l'altitude de 1460 m, où nous avons travaillé sur *Pinus cembra* et *Picea abies*.

Pour chaque espèce on a récolté des échantillons de cinq à huit individus. On a travaillé sur les organes: feuilles (annuelles ou pluriannuelles) et branches (annuelles et pluriannuelles). Pour les résultats on a calculé la moyenne.

Pour le contenu de substance sèche, on a séché le matériel à l'étuve à une température de 105 °C et on a rapporté à un poids constant. Les résultats ont été calculés en pourcentage.

Les pigments chlorophylliens (la chlorophylle «a» et «b») et les pigments caroténoïdes ont été déterminés de manière spectrophotométrique selon les méthodes décrites par Smidh et Näger, avec les adaptations faites par Stirban et Fărcaș, en utilisant comme solvant l'acétone 85% et en neutralisant le suc des vacuoles au carbonate de calcium.

Le matériel pour le dosage des glucides a été fixé en vapeurs d'eau à la température de 105 °C. Les glucides totaux et par formes ont été déterminés selon la microméthode Bertrand-Iljin.

Le contenu en éléments minéraux a été déterminé de cette manière : l'azote total selon la méthode Kjeldahl ; le phosphore colorimétrique à l'acide sulfomolybdénique ; le potassium et le sodium au flamphotomètre.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

La dynamique des substances sèches. Dans les feuilles annuelles en cours de formation et de croissance, l'accumulation de la substance sèche a une évolution ascendante jusqu'en automne (fig. 1).

Pour *Picea abies* (espèce qui entre plus tard en végétation) dans les feuilles annuelles, la substance sèche a les plus grandes valeurs au mois de septembre, dans la région d'épicéas de la limite supérieure.

Chez *Pinus mugo* l'accumulation de la substance sèche a lieu jusqu'au mois d'octobre, ce qui suggère une maturation plus tardive de ces organes.

La dynamique de l'accumulation de la substance sèche dans les feuilles pluriannuelles reflète leur activité métabolique. Les feuilles des populations de *Picea abies* de la forêt définitivement établie ont la plus grande activité métabolique aux mois de juin, juillet et septembre. Probablement, l'effort métabolique de ces populations représente une particularité d'adaptation aux conditions de l'altitude. La croissance évidente de la substance sèche chez *Pinus cembra* au mois de juillet dans la forêt de la limite supérieure et chez *Pinus mugo* dans les buissons de genévrier, peut être mise en corrélation avec la perte de l'eau dans le processus de transpiration (d'une part) et avec un approvisionnement insuffisant en eau (d'autre part).

Dans les branches annuelles la substance sèche s'accumule dans des quantités plus grandes que dans les feuilles. Les courbes de variation indiquent une évolution ascendante jusqu'au mois de septembre chez *Pinus cembra* et jusqu'au mois d'octobre chez *Picea abies* et *Pinus mugo*. Ce phénomène suggère une maturation plus tardive des branches annuelles de ces espèces.

Dans les branches pluriannuelles des espèces de la forêt de la limite supérieure a lieu une baisse évidente de la substance sèche au mois de juillet. Probablement, une série de transformations métaboliques commencent qui ont pour résultat l'utilisation des substances accumulées dans certains processus énergétiques et de synthèse.

Dans la forêt définitivement établie et dans les endroits plantés de pin rampant des montagnes (genévrier), l'amplitude de l'accumulation de la substance sèche est moindre. L'espèce *Picea abies*, entrant plus tard en état de végétation, prolonge la durée d'accumulation de la substance sèche par une photosynthèse active plus longtemps.

La biosynthèse et l'accumulation des pigments assimilateurs. Chez *Pinus cembra* (fig. 2), les feuilles annuelles—organes en formation et croissance—synthétisent et accumulent des quantités plus petites de pigments, les valeurs enregistrées représentant environ la moitié de celles des feuilles pluriannuelles. Dans les feuilles annuelles, les pigments s'ac-

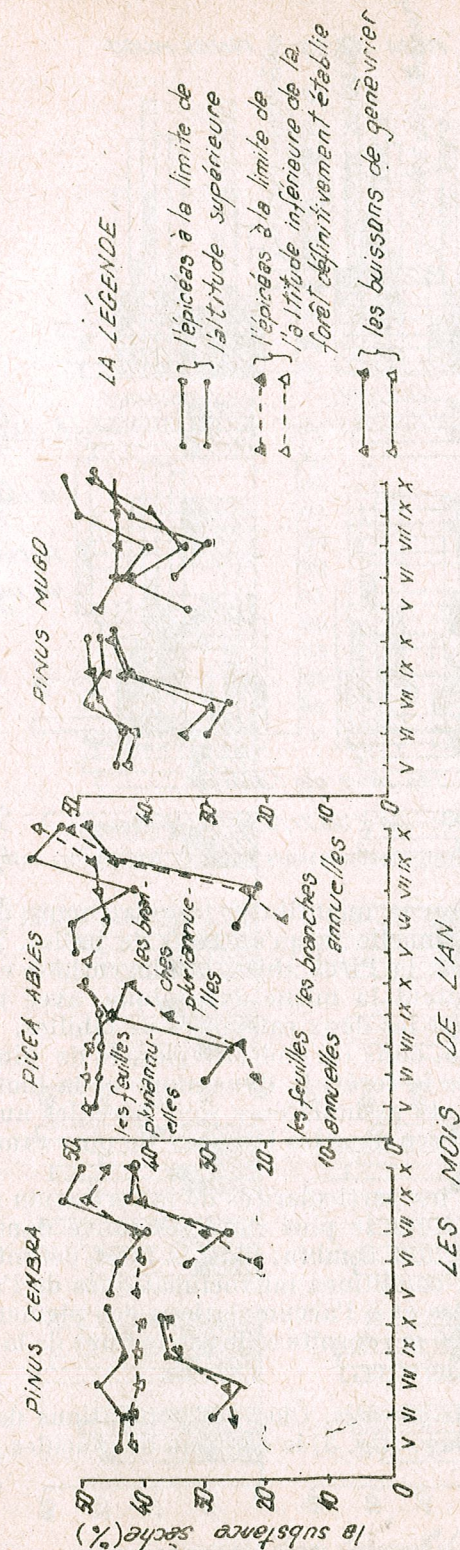


Fig. 1.— La variation saisonnière du contenu de la substance sèche dans les feuilles et les branches.

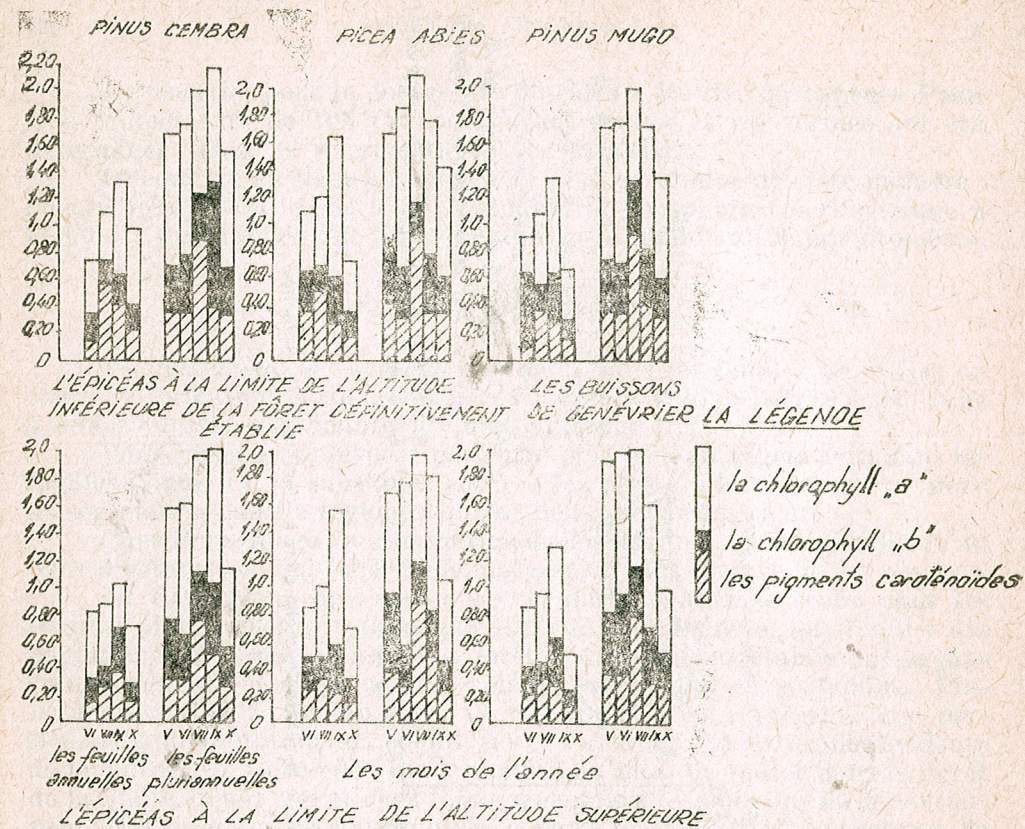


Fig. 2.—La variation des pigments assimilateurs dans les feuilles des arbres du Massif Călimani.

croissent du point de vue quantitatif jusqu'au mois de septembre, et dans les feuilles pluriannuelle jusqu'au mois de juillet.

Pour ce qui est de la *Picea abies*, la biosynthèse et l'accumulation des pigments représentent la même dynamique, avec un maximum au mois de septembre pour les deux catégories de feuilles.

Chez *Pinus mugo*, dans les endroits plantés de pins rampants et à la limite supérieure de la forêt, la dynamique et la biosynthèse de l'accumulation des pigments assimilateurs sont pareilles aux espèces précédentes avec un taux accru dans les buissons de pins rampants (de genévriers).

Selon le type et les particularités de la formation de végétation, le potentiel photosynthétique le plus élevé se trouve dans les populations de *Picea abies* et de *Pinus cembra*, dans la forêt définitivement établie.

Par rapport aux conditions microclimatiques de l'altitude, les plus favorables à la synthèse et à l'accumulation des pigments sont celles de l'altitude de 1600–1500 m; ensuite celles de la forêt de la limite supérieure et des buissons de genévrier.

La dynamique des glucides. Chez les populations de *Pinus cembra*, *Picea abies* et *Pinus mugo* (fig. 3) le contenu de glucides solubles et inso-

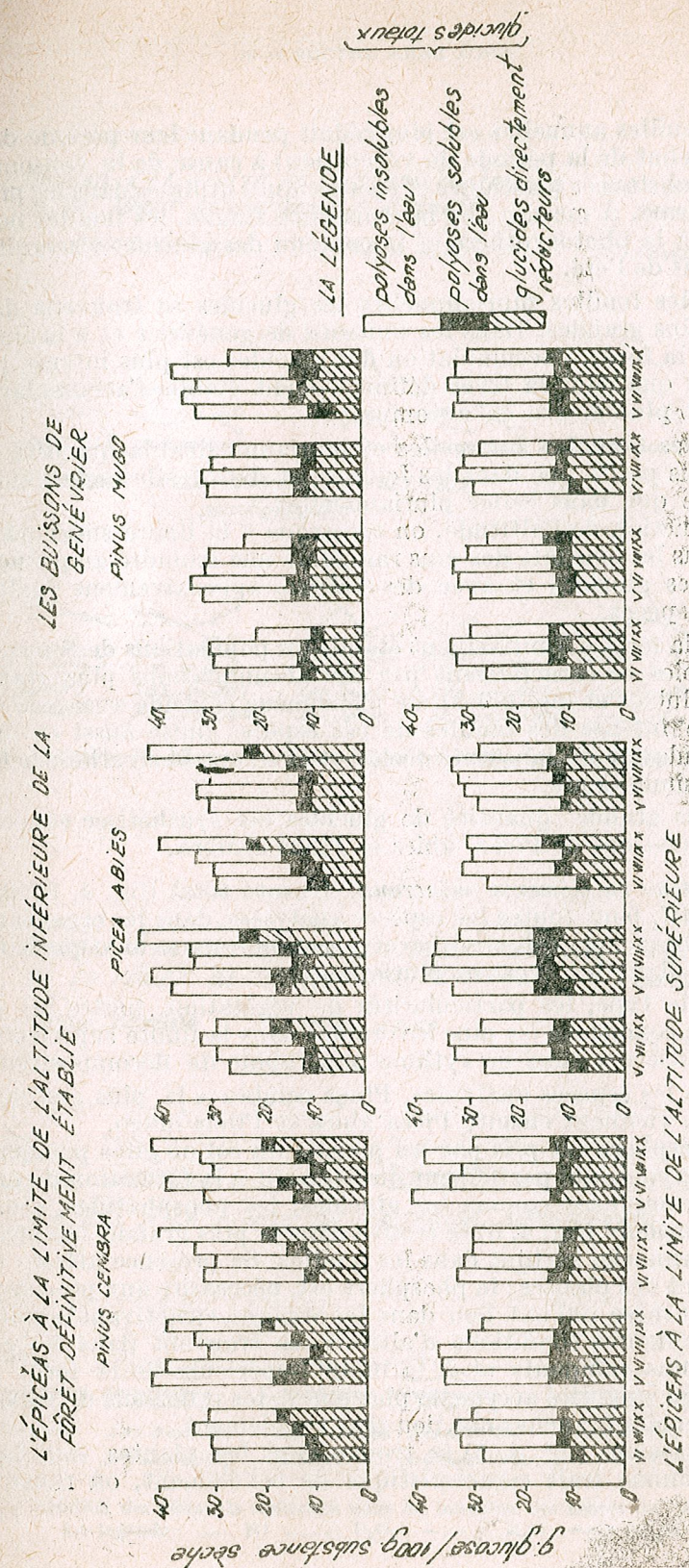


Fig. 3.— La variation des glucides totaux et par formes des arbres du Massif Călimani.

lubles des feuilles annuelles est plus réduit pendant leur période de croissance (au début de la période de végétation) à cause de la consommation intense de substances plastiques et énergétiques utilisés dans les processus de métabolisme. À mesure que la croissance stagne, les feuilles nouvelles participent à la photosynthèse et le contenu des glucides s'accroît peu à peu aux mois de l'été.

Dans les feuilles pluriannuelles les glucides se trouvent dans des quantités plus grandes. Dans les buissons de genévrier et à la limite supérieure de la forêt, l'accumulation des glucides est plus intense pendant l'été, tandis que dans la forêt définitivement établie l'accumulation des glucides est plus active en automne.

Dans les branches (annuelles et pluriannuelles) la quantité de glucides est plus petite que dans les feuilles, et dans les branches annuelles, plus réduite que dans celles pluriannuelles.

En fonction de l'altitude, on remarque à la limite supérieure de la forêt et dans les endroits des pins rampants une moindre amplitude de la variation des glucides et avec des valeurs approximativement égales pour toutes les espèces.

Dans la forêt définitivement établie les populations de *Pinus cembra* et *Picea abies* se caractérisent par des accumulations plus grandes de glucides (solubles et insolubles). Ce phénomène coïncide avec une activité métabolique intense des feuilles de ces espèces (mise aussi en évidence par l'accumulation de substance sèche) et avec une biosynthèse active des pigments assimilateurs.

La plus grande quantité de glucides est synthétisée et accumulée dans les populations de *Picea abies* et *Pinus cembra*.

Le contenu en éléments minéraux. L'azote total (fig. 4, 5) dans un cycle végétatif, pour toutes les espèces analysées, dans les organes annuels (feuilles et branches) est absorbé et accumulé dans une quantité plus grande que dans les organes pluriannuels.

Selon le type, les particularités de végétation, toutes les espèces trouvent les conditions les plus favorables dans la limite supérieure de la forêt où la litière a aussi un rythme plus rapide de décomposition.

Parmi les espèces analysées, *Pinus cembra* a la plus grande quantité d'azote ; viennent ensuite *Picea abies* et *Pinus mugo*.

Le phosphore est pris par les plantes du sol où elles poussent sous la forme d'oxydes, qui participent directement à la formation de quelques substances complexes comme les glucides, les phosphatides, etc.

Le phosphore (fig. 4, 5) se trouve dans la plus grande quantité dans les organes annuels, surtout dans les feuilles. Sa présence atteste un bon ravitaillement des plantes ; le phosphore est nécessaire aux processus complexes de synthèse qui ont lieu dans les organes, en activant la croissance.

Les meilleures conditions d'altitude se trouvent dans les endroits plantés de pins rampants et à la limite supérieure de la forêt où, en présence d'une quantité accrue de phosphore, les processus de maturation des feuilles et des branches ont lieu plus rapidement.

Le potassium (fig. 4, 5) se trouve dans les plantes sous la forme d'ions et, comme trait caractéristique de cet élément, on remarque sa

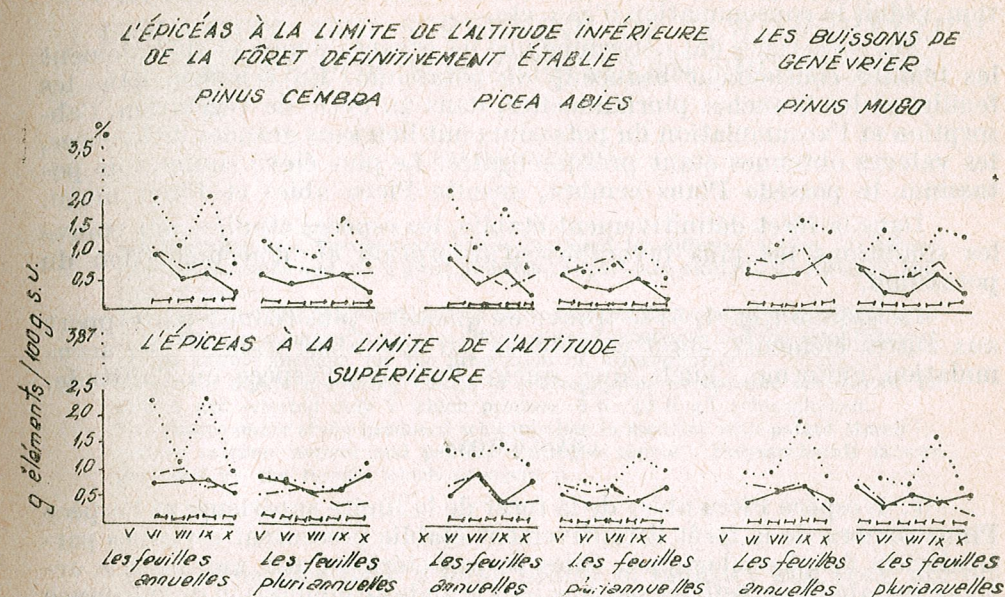


Fig. 4.—La variation des éléments minéraux dans les feuilles des arbres du Massif Călimani.

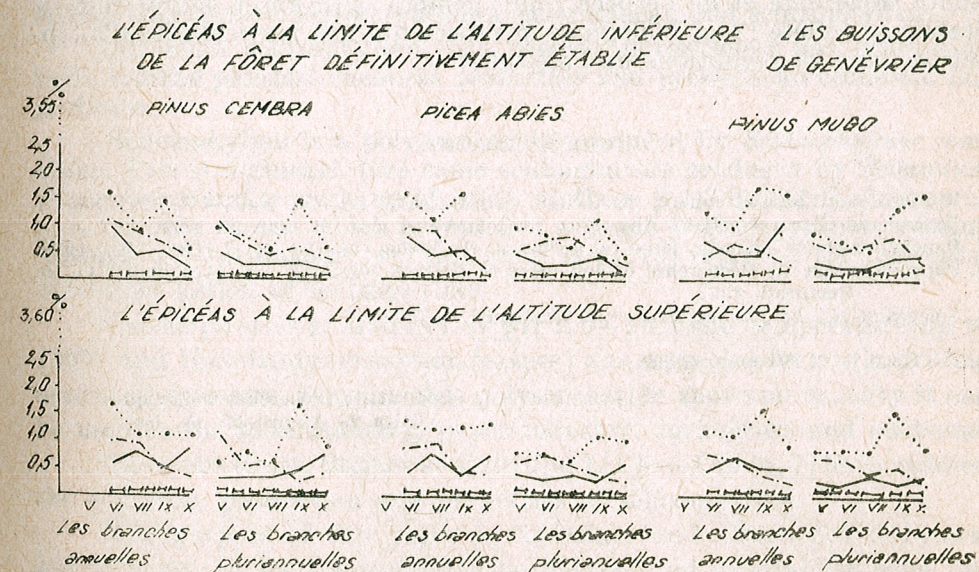


Fig. 5.—La variation des éléments minéraux dans les branches des arbres du Massif Călimani.
La légende: — N; P₂O₅; -.-.- K₂O; === Na₂O

grande mobilité. Il intervient dans la photosynthèse, participe à la synthèse et au transport des glucides, exerce une influence sur la transpiration, réduit la consommation d'eau, etc.

Nos recherches ont déterminé que les organes jeunes et spécialement les feuilles contiennent beaucoup de potassium. En échange, dans les feuilles et les branches pluriannuelles, dans un cycle de végétation, l'absorption et l'accumulation du potassium ont lieu sans grandes différences, les valeurs obtenues étant presque égales. Le plus élevé contenu de potassium le possède *Pinus cembra*, ensuite *Picea abies* et *Pinus mugo*.

Dans la forêt définitivement établie, les espèces étudiées ont trouvé les conditions les plus favorables d'absorption et d'accumulation du potassium.

Le sodium (fig. 4, 5) se trouve en quantité plus réduite par rapport aux autres éléments, étant caractérisé par une absorption et une accumulation uniforme, quels que soient l'organe, l'espèce ou l'altitude.

CONCLUSIONS

1. L'espèce *Picea abies* de la forêt de la limite supérieure et l'espèce *Pinus cembra* de la forêt définitivement établie présentent certaines particularités écophysiologiques. Elles se caractérisent par une intense activité métabolique, reflétée par une plus grande accumulation de substance sèche, une biosynthèse active des pigments assimilateurs, de même qu'une accumulation des glucides et de potassium en quantités accrues.

2. L'espèce *Picea abies* qui entre plus tard en végétation, augmente la durée de son activité métabolique par une photosynthèse plus active qui dure plus longtemps.

3. L'effort métabolique de l'espèce *Picea abies* de la forêt de la limite supérieure et de l'espèce *Pinus cembra* de la forêt définitivement établie en reflète l'état biologique et représente une particularité d'adaptation dans les conditions de l'altitude.

BIBLIOGRAPHIE

1. Antohe Anca Lidia et collab., Ann. Muz. Jud. Suceava, fasc. St. Nat., VII, 229, 1982.
2. Jeanrenaud Elena et collab., Ann. Muz. Jud. Suceava, fasc. St. Nat., 6, 1980.
3. Paucă-Comănescu Mihaela, Etud. et rech. de Biolog. végét., 31, 2, 129-141, 1979.
4. Popescu-Zeletin I., Recherches écolog. dans le Plateau Babadag, Ed. Academiei, 1-19, București, 1977.
5. Sălăgeanu N., La photosynthèse, Ed. Academiei, 1972.

Reçu le 14 décembre 1988

Institut de recherches biologiques
Calea 23 August 20, A, Iași

RESEARCHES FOR OBTAINING SCHIZOPHYLLAN I. ISOLATION AND SCREENING OF *SCHIZOPHYLLUM* COMMUNE FOR SCHIZOPHYLLAN PRODUCTION

IOANA GOMOIU

Schizophyllan is a homopolysaccharide produced by different strains of *Schizophyllum commune* and has a great industrial importance owing to its rheology and lack of toxicity.

The paper presents the investigations carried out on the isolation and screening of *Schizophyllum commune* strains on different wood substrates and the establishment of the culture medium for the production of schizophyllan.

To obtain highly producing strains of schizophyllan we isolated and tested 18 strains and selected only 7 which produce 5.0-10.0 g/l schizophyllan.

The strains under study produced schizophyllan in medium with potato starch + glucose (carbon source) and peptone (nitrogen source). Polysaccharide is not degraded by the fungus which produces it.

Polysaccharides have a large utility in industry and they are obtained by special methods from plants (starch, cellulose, pectin, guar, gum, gum arabic, etc.) or algae (agar, algin, carrageenan, furcellaran). To these sources of polysaccharides microorganisms are added which cultivated in special conditions produce a wide range of polysaccharides of great economic importance.

For the past thirty - forty years researches have been made of bacterial polysaccharides such as xanthan, curdlan, dextran, etc. and fungal polysaccharides like pullulan, scleroglucan and schizophyllan.

Although schizophyllan, has been it nevertheless has interesting little studied physical-chemical properties and presents an economic importance.

Schizophyllan is a polysaccharide produced by *Schizophyllum commune*. This is a glucane (the same scleroglucane produced by *Sclerotium glucanicum*) and is made up of units of three β -1,3-linked D-glucopyranose residues to one which is attached a single D-glucopyranose residue through a β -1,6 linkage (4). Komatsu et al. (3) reported the potential antitumor action of schizophyllan.

Pseudoplasticity, stability at pH 2.0-10.0 and temperature up to 130°C and thixotropy (exception feature) was suggested for use in drilling muds, oil recovery. Because this polysaccharide shows no toxicity it can be used in the food industry, paper industry, agriculture and medicine.

In recent times, Steiner et al (2) and Li Chao-Lan (6, 7) have studied the isolation, production and properties of schizophyllan.

The purpose of this paper is to isolate and screen *Schizophyllum commune* strains for schizophyllan production and to establish some optimum culture media.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were carried out on 18 strains of *Schizophyllum commune* isolated by beech wood (S. c. 2, S. c. 3, S. c. 6, S. c. 7, S. c. 15, S. c. 16, S. c. 17, S. c. 23), spruce fir (S. c. 4, S. c. 8), white willow (S. c. 1), oak wood (S. c. 5), robinia (S. c. 9), alder (S. c. 10, S. c. 12), poplar (S. c. 13) lime (S. c. 14) and an unidentified wood (S. c. 11). Isolation was achieved from the mycelium or fruit body on malt agar medium after an incubation at 28 °C, for 4–6 days.

Schizophyllan production was studied on 6 media. Media 1–4 contained a mineral solution (KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%, KCl 0.05%, yeast extract 0.2% to which we added specific components like :

- Medium 1: soluble starch 3%, peptone 0.3%
- Medium 2: glucose 3%, peptone 0.3%;
- Medium 3: soluble starch 3%, soybean meal 0.3%;
- Medium 4: glucose 3%, soybean meal 0.3%.

Medium 5 contains potatoe starch, glucose and peptone and in medium 6 peptone was replaced by soybean meal.

The culture media were inoculated with 2 ml inoculum and were incubated under stirring. After 9 days the incubation mycelium was removed by filtering and centrifugation and polysaccharide was precipitated with ethyl alcohol or acetone 1:2.

RESULTS AND DISCUSSION

Eighteen strains of *Schizophyllum commune* were tested on media having as carbon source soluble starch, potato-starch + glucose, glucose and peptone or soyabean meal as nitrogen source. Under stirring all strains develop central mycelial mass and hypha filaments radiate which produce true capsule of extracellular polysaccharide. A part of them is attached by the mycelium and another part is diffused in the medium and a gel arises with a different consistence depending on the strain. After precipitation the polysaccharide appears fibrous and white.

We studied schizophyllan production on media 1, 2, and 5 where carbon source was soluble starch, glucose and potato starch + glucose (Fig. 1) On these media S. c. 23, S. c. 8 and S. c. 2 were noted which produced 7.8–6.9 g/l (on medium 1), 10.0–7.2 g/l (on medium 5) and 4.5–4.0 g/l (on medium 2) polysaccharide. Excepting the strains S. c. 2, S. c. 5, S. c. 8, S. c. 9, S. c. 17 which produce polysaccharides in amounts comparable on both starches, the other strains produce a greater amount on medium with potato-starch + glucose.

Drawing a parallel between the ability of our strains to produce polysaccharide on medium 1 with peptone as nitrogen source and medium 3 with soybean meal we find that peptone is optimum in most cases excepting S. c. 7, S. c. 10–12, S. c. 14. Peptone was also an excellent nitrogen source in medium 6 in most strains.

The soybean meal was a very good nitrogen source on the medium with glucose for the biosynthesis of schizophyllan by S. c. 3–7, S. c. 9, S. c. 11, S. c. 17 (Fig. 2). On the same carbon source but with peptone as

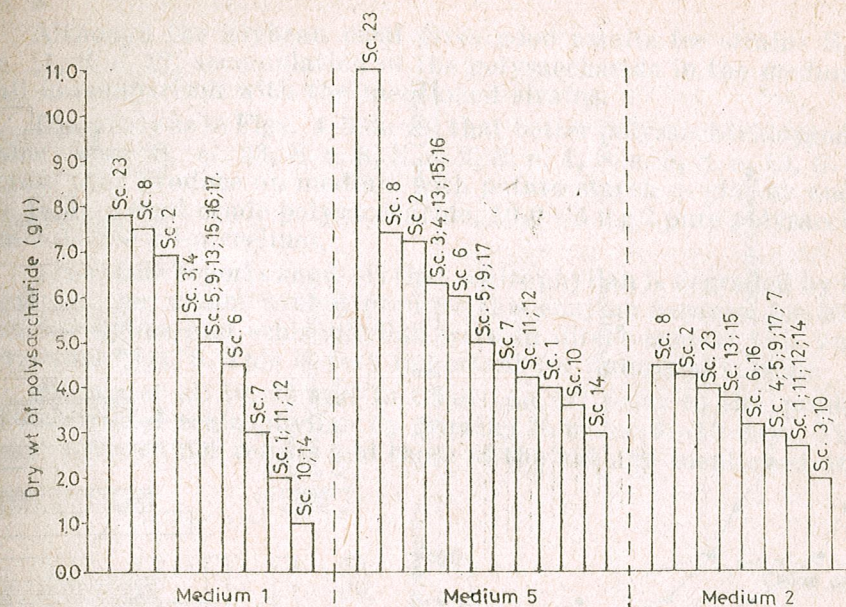


Fig. 1. — The yields of schizophyllan on media with different carbon sources and some nitrogen sources (peptone).

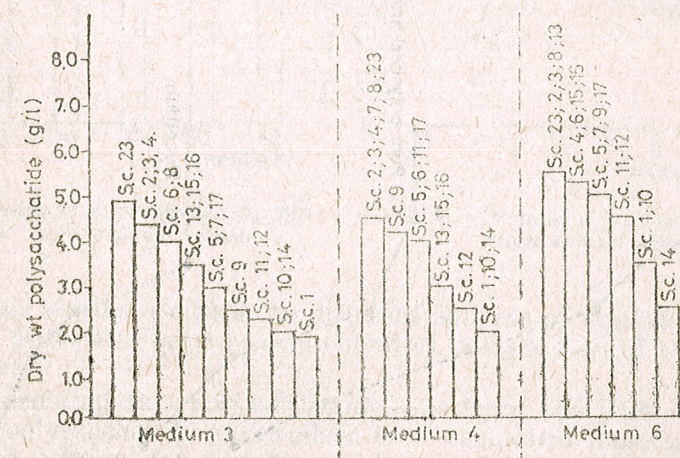


Fig. 2. — The yields of schizophyllan on media with different carbon sources and soybean meal as nitrogen source.

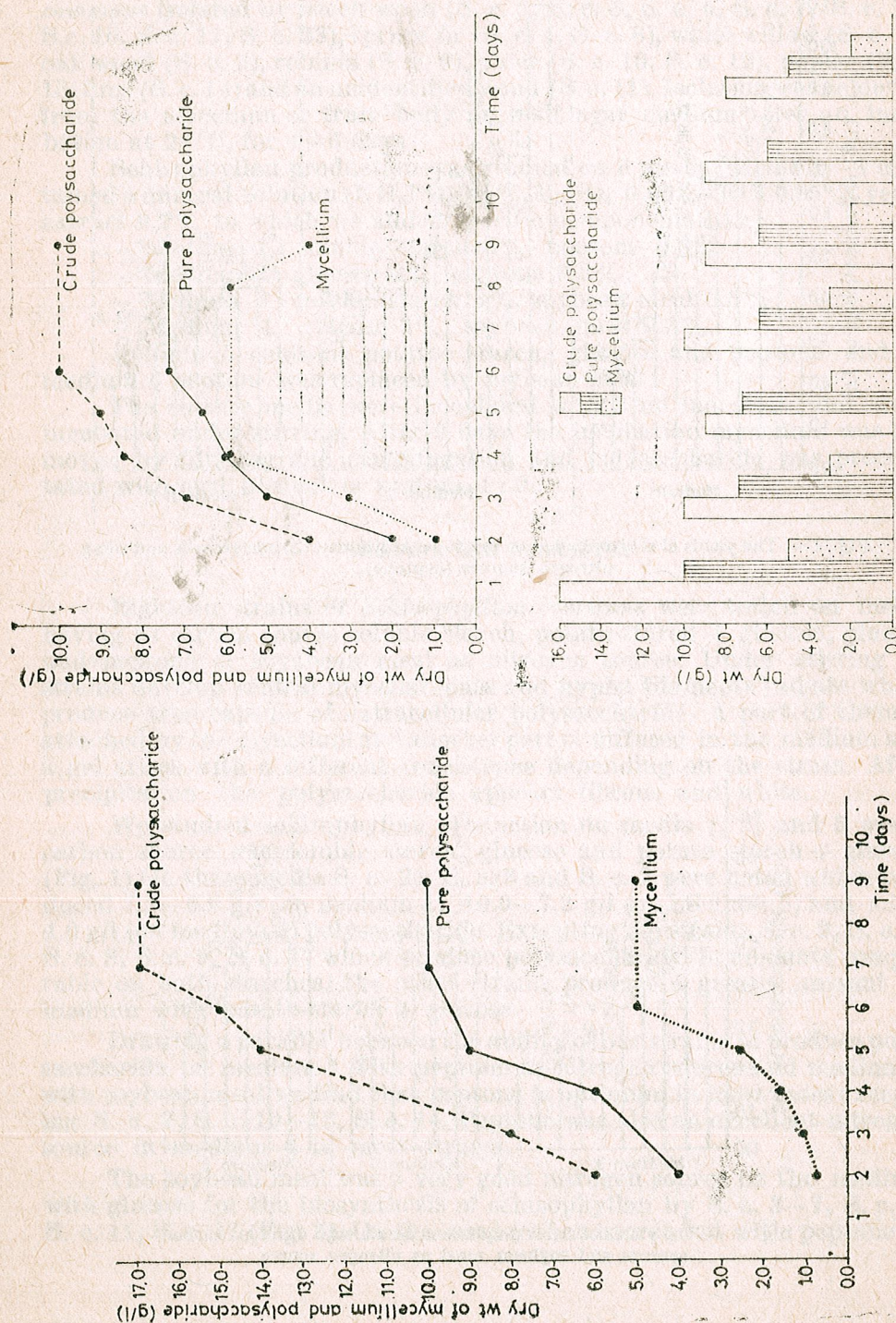
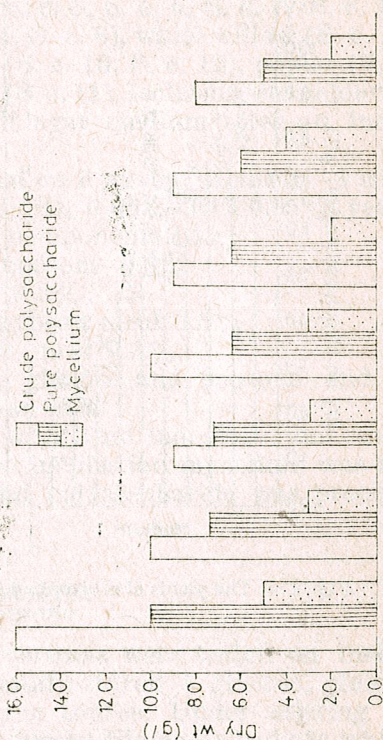


Fig. 3. — Biosynthesis of schizophyllan by *Schizophyllum commune* 23 on media with potato-starch + glucose and peptone.

Fig. 4. — Biosynthesis of schizophyllan by *Schizophyllum commune* 8 on media with potato-starch + glucose and peptone.



nitrogen source good results were obtained with strains S. c. 23, S. c. 1, S. c. 3.

Although the soybean meal gives good results for strains S. c. 7, S. c. 11, S. c. 12, accumulation of the polysaccharide in the medium was small in comparison with the mentioned strains.

The analysis in Figs. 4, 5 shows that better polysaccharide producing strains were S. c. 23, S. c. 8, S. c. 2, S. c. 4, S. c. 5, S. c. 15, S. c. 16, because they produce on medium with potato starch + glucose and peptone 16.0–8.0 g/l crude polysaccharide, 10.0–5.0 g/l pure polysaccharide from 5.0–2.0 g/l mycelium.

Literature reports show (4) that schizophyllan is degraded by β -1,3 glucanase. Our strains cannot produce this enzyme because, for 60 days, when the hypha and schizophyllan were in direct contact this was not degraded Figs. 6. This is very important for industrial reasons.

Steiner et al. (6, 7) and Li Chao-Lan (2) point to the production and isolation of schizophyllan by growing S. c. for 6–15 days. The difference between our results and those of the authors mentioned are due

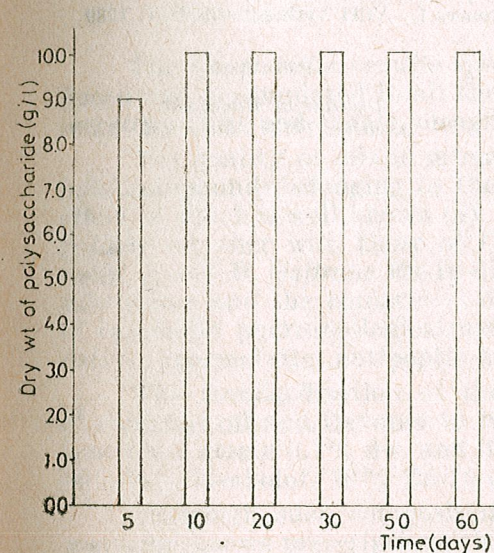


Fig. 5. — The yields of schizophyllan by different strains of *Schizophyllum commune*.

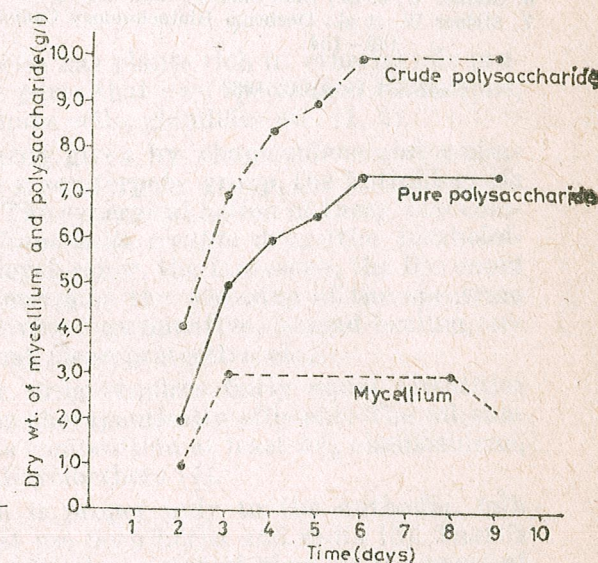


Fig. 6. — Maintaining schizophyllan after prolonged contact with the hypha.

to different strains used also to different sources of wood to isolate S. c. Also, the difference between the chemical composition of the media can be a cause.

We isolated this polysaccharide also from the fruit body. In our opinion, polysaccharide as exudate is of ecological importance because it can be a nutrient for bacteria and fungi which can produce β -1,3 glucanase in process of wood colonisation.

CONCLUSIONS

1. *Schizophyllum commune* strains produce polysaccharide but in amounts specific for every strain.
2. A suitable medium for schizophyllan production contains potato-starch + glucose and peptone.
3. The strains which produce schizophyllan present industrial interest because they do not degrade it.

REFERENCES

1. Cottrel I. W., ACS Symposium series, 1980, **26**, 251—270.
2. Chao-Lan L., Acta Mycologica Sinica, 1987, **6**, (3), 170—177.
3. Komatsu N. et al., Gann, 1969, **60**, 137—144.
4. Kikumoto S. et al., NiponNogei Kagaku Koishi, 1971, **45** (4), 162—168.
5. Miyajima T. et al., Seito Gijutsu Kenkaishi, 1970, **22**, 35—44.
6. Steiner W. et al., Biotechnology and Bioengineering, 1987, **30**, 2.
7. Steiner W. et al., Dechema Biotechnology Conferences L—VCH Verlagsgesellschaft, 1989, 149—154.

Received 11 April, 1989

Institute of Biological
Sciences, 77748, Bucharest

THE COMPARATIVE STUDY OF THE COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS PRODUCED BY *CHAMOMILLA RECUTITA* (L.) RAUSCHERT IN GENERATIVE CULTURES AND "IN VITRO"*

ECATERINA T. TÓTH, TATIANA ONISEI, ELVIRA GILLE, G. I. GHIORGHITĂ,
F. FLORIA

A great number of camomile samples were analysed and oil was extracted by means of dichlormethane or water vapour distillation. Quantitative assessments were made gravimetrically, the azulene content was photocolometrically determined and the oil components were rendered evident by means of TLC. The comparative study was performed on lots of plants cultivated in different conditions, parts of the same plant (flores, herba, radix), callus of different origins and plants regenerated "in vitro". We noticed that the essential oils are present in all the categories of samples, the quantity and quality differing from one to the other.

The *Chamomilla recutita* species has plants rich in etherial oils produced and accumulated in all the parts that own specialized formations, secretory hairs and canals, oleaginous cells, glandules etc. (1, 2).

The quality of oils is primarily given by chamazulene and α -bisabolol compounds belonging to the sesquiterpene group, the antiphlogistic effect of which is well known (3). The synergical action of these two compounds together with those of *Chamomilla recutita* drug (the bisabolol-oxide A and B, *cis/trans* En-In-dicycloether, the farnesene, the flavonoid substances and the cumarines) determine the widening of the spectrum of camomile pharmacological activity: carminative, wound-healing, sedative, spasmolytic, antipeptic and ulceroprotective etc.

The standardization of the drug requires fairly equal quantities of essential oil and flavones to be therapeutically efficient. The oil content must attain 0.7% dw. and its composition at least 5% chamazulene, 20—30% bisabolol, 10% En-In-dicycloethers (4).

Although such composition is proper only to the anthodia, folk medicine knows prescriptions that use both herba and radix (5). That is why we investigated from the biochemical point of view all the parts of the plants obtained through generative and "in vitro" cultures.

MATERIAL AND METHODS

We used seeds of the tetraploid Zloty-lan cultivar.

From two lots self-sown in the period August-September 1985 there resulted two relatively homogeneous populations (P_1 — at C.A.P. and

*Paper presented at the Symposium on "Medicinal Plants — Achievements and Perspectives" Piatra Neamț, Romania, October 17—18, 1986.

P₂ at the "Stejarul" Research Station Piatra Neamț). The plants quickly started vegetation in April 1986 and flowered at the end of June.

With 26 variants (representing seeds from each a single plant, selected through bioproductivity criteria: branching number, number and size of the anthodia) we sowed two lots on the experimental field of the "Stejarul" Research Station on April, 4 (12 variants, representing lot A) and on April, 16, 1986 respectively (14 variants, forming lot B).

Starting with May, 25, 1986 we initiated a plot with "in vitro" regenerated plants (lot C) which had progressively been completed up to July, 20.

For the tissue cultures we used anthodium explants and camomile seedling, which produced calli and regenerated plants (6), (Table 1).

Table 1

The composition of the MS—medium and the morphogenetic reaction of camomile explants

No.	Explants	Growth Hormones				Callus Characteristics	Morphogenetic reaction
		2,4D	NAA	K	BAP		
1	Seedlings	1	0.5	2	—	compact, green	callus
2	Callus	—	—	—	2.5	compact, green	callus and shoots
3	Anthodium	1	—	—	1	compact, yellow	callus and shoots
4	Regenerants	—	—	—	—	—	roots

The biochemical analyses were done on callus samples and on different parts of the mature plants (root, shoot, anthodia) dried and ground.

The essential oil was distilled with water vapours (100 g dw./sample) with dichloromethane (2g dw./sample). After dehydration and benzene resolving we performed the TLC on G₆₀ Kieselgel plates. The oil compounds were visualised by spraying with anisic-aldehyde (7, 8, 9). The azulenes were photocolorimetrically determined (10, 11).

2 g dw. samples were used for the flavones; the extraction was performed with methanol and the colour reaction determination with reagents specific to the flavones, namely AlCl₃ and KOH, NaOH and NH₄ OH (12).

RESULTS AND DISCUSSIONS

After dry anthodia distilling, the difference in content and the essential oil spectrum of the analysed samples was established.

Lot A, sowed on April, 4 and harvested on July, 20, 1986, provided a good quality material, with 1.22% dw. essential oil, out of which 8.11% azulenes, equaling a content of 98.57 mg azulenes % dw. (Fig. 1; 4). In the composition of oil we can also find bisabololoxide A and B, α bisabolol, cis-En-In-dicycloethers and farnesene.

Lot B, sowed on April, 16 and harvested on August, 20, 1986 established a lower oil content (0.67% dw.) out of which 8.89% azulenes, equaling 59.36 mg azulenes % dw. The oil spectrum did not suffer any changes (Fig. 1; 1).

The positive correlation noticed (13) between the essential oil production and the quantity of water in the soil is probably the cause of the differences registered in the behaviour of the plants from the two lots (the "Stejarul" Research Station). The fortnight interval between the sowing of lot A and B caused a flowering delay of nearly a month and a reduction of about 50% of the oil quality produced. Thus, in the anthodia of the plants that received, before flowering, high amounts of precipitations we found 1.22% dw. oil (lot A), while the plants that suffered of dryness synthesized and accumulated only 0.68% dw. oil (lot B).

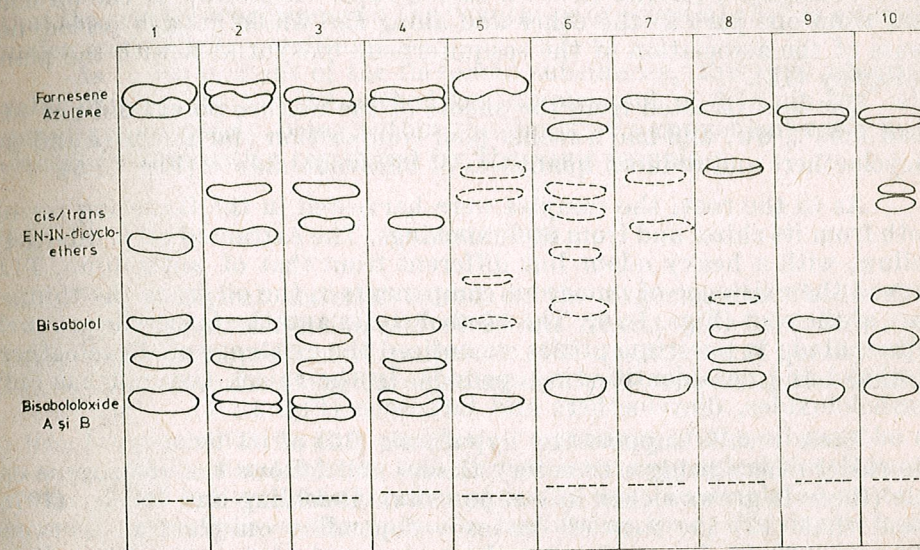


Fig. 1.— Chromatograms obtained from Chamomilla samples: 1. Lot B; 2. Lot P₂; 3. Lot P₁; 4. Lot A; 5. Shoots; 6. Roof branchings; 7. Rhizel; 8. Callus; 9. "In vitro" regenerated plant; 10. Anthodia of "in vitro" regenerated plants.

Analysing the behaviour of the plants from the two self-sown lots (P₁ and P₂) we noticed a similar phenotypic aspect and a massive flowering that took place at the end of June. In the plants cultivated at C.A.P. Piatra Neamț (P₁), the essential oil content reached 1.03%, out of which 9.32% azulenes equaling 95.54 mg azulenes % dw. (Fig. 1; 4); in those grown on P₂ oil represented 0.73% dw., out of which 10.64% azulenes, namely 77.46 mg azulenes % dw. (Fig. 1; 2). It is to be noticed that both samples showed an almost identical composition of the essential oil and the presence of both optical isomers (cis/trans) of En-In-dicycloethers.

As we used seeds of the same cultivar and the sowing took place at the same time, the quantitative and qualitative variations of the oils may be due to the influence of the pedoclimatic factors. We mention that the soil from Piatra Neamț collective farms is characterized by a normal-to-good supply of nourishing elements and humus, a neutral pH and a fairly great quantity of carbonates, a soil capable to provide the optimum growth of plants.

The soil of the "Stejarul" Research Station experimental field, although having a remarkable percentage of humus (6–12%) and a normal supply with nourishing elements is not yet homogenized and is still in formation and as such not suitable for intensive culture.

As the precipitation regimes of P_1 and P_2 were nearly the same, the quantitative differences in the analyzed oils may be due to the influence of every type of soil. It is generally known (13) that in nature this species is pushed towards the less fertile soils (because of its lesser competitive possibilities) but, when in culture, it registers maximum productions on more fertile soils.

Like other essential oil producing herbs (*Angelica*, *Thymus*, *Anthemis*) *Chamomilla recutita* shows a considerable variability of the oil content from one part to the other and along the whole growth period because of the association of the sesquiterpene biosynthesis with the plant ontogeny (14).

The oil extracted from the shoots of the mature plants did not exceed 0.06% dw. and had a rather poor composition: farnesene (α and β), dicycloethers and reduced quantities of bisabololoxide A (Fig. 1; 5).

As to the root, the samples were harvested in the flowering period both from its rhizel and from its branchings. The extracted oil is intensely yellow, with a heavy odour but different from that of anthodium. TLC proved the existence of numerous components in the oil from the thinner part of the root (Figs. 1; 6). The bisaboloxides and the farnesene are well represented; in lower quantities we noticed the existence of dicycloethers bisabolol and non-identified compounds. In the rhizel, the root has only bisabololoxides, dicycloethers and farnesene (Fig. 1; 7).

These results support the hypothesis (15) of oil being produced in the rhizel (there being a secretory tissue) and follows the schizogene canals (there it grows richer in components). Reichling and Becker (1978) found that (15) the root oil varies — depending on plant age — between 0.04 and 0.09% dw. predominantly containing substances with polinic links and farnesene. They also proved the existence of α -farnesene, of camomilesters and also of a sesquiterpenic alcohol typical of the root, called "camomilol". Irrespective of the cultivation conditions and of the harvesting time the root, the oil contained by it, did not possess azulenes.

The tissue cultures were initiated starting from the meristematic apex of the anthodium as well as from the seedlings.

The callus with a compact consistency and a green colour was analyzed from the point of view of the content and the quality of the essential oil and used for plant regeneration.

One may notice that the "in vitro" grown plants have a spectrum extremely poor in components (only bisaboloides and farnesene — Fig. 1; 9) as compared to the callus which has a greater number of components, although some are in low quantities and could not be identified (Fig. 1; 8). Reichling et al. (1984) found about 8 substances (2) in the callus oil: trans- α -farnesene (1%), trans- β -farnesene (5%), camomilol (9%), caryophyllenoxide (19%) and two camomilesters (35%). Szöke et al. (1977–1979) discovered particular components of the callus oil, high quantities in the callus kept in darkness. Because of their molecular mass, close to that

of the bisaboloides, these were considered to be bisaboloidic compounds, termed "14" and "17" (16, 17).

The data referring to the presence of the azulenes in the "in vitro" cultures are contradictory, the majority of the authors registering their absence and being of the opinion that they may be detected only after the occurrence of specialized structures. The analysis of the oils from the anthodium of the plants obtained "via callus" prove this situation; although the shoots grown "in vitro" did not present a complex oil, their flowers were capable to synthesize the specific components; bisabololoxides, bisabolol, En-In-dicycloethers, farnesene, azulenes (Fig. 1; 10).

Through the "in vitro" culture, the specific metabolic ways for *Chamomilla recutita* maintain and manifest themselves, a fact meaning that the genetic programme for the "synthesis of essential oils" is expressed under any culture conditions.

As to the content of the flavonoid substances, this was about the value of 0.5% dw., in the anthodium samples and of 0.1% in the callus samples respectively, being within the limits of a convenient ratio in the essential oil quantity registered by the same samples.

CONCLUSIONS

The biological material sowed on the experimental fields of the "Stejarul" Research Station and of Piatra Neamț collective farm, presented special bioproductive properties, the quantity and quality of the oil obtained from the anthodia equaling and even exceeding the admitted standards.

The quantitative and qualitative variations of the oil may be due to the quantity of water in the soil. Yet, we must not neglect the characters of the sowed cultivar, the number of sunny days accumulated up to the flowering phenophase, the anthodia harvesting time, the drying conditions of the material etc.

Although all the parts of the plant are capable to synthesize essential oil, its quantity and quality are markedly inferior in the case of the root and shoots.

The callus oil has a composition which is intermediary to that of the shoots and roots, lacking the components typical of the anthodia.

The "in vitro"-obtained plants produce an oil very poor in components, but their anthodia — at the complete flowering moment — contain the characteristic oil of the species.

Acknowledgement. The authors wish to thank Prof. Fr. J. Gille for the English version of this paper.

REFERENCES

1. J. Halászová, M. Repčák, P. Černaj, R. Hončariv, Zborn. ref. 3, Zjazd SBS, Zvolen, 279 1980.
2. J. Reichling, W. Bisson, H. Becker, *Planta medica*, 1984, 50 (4), 334.
3. J. Reichling, *Deut. Apoth. Z.*, 1981, 121 (23), 1285.
4. J. Reichling, *Cesra Saule*, 1985, 37, 23.

5. J. Reichling, H. Becker, Z. Naturforsch., 1978, **33**, 589.
6. T. Onisei, E. T. Tóth, I. Băra, St. cerc. biol. Biol. veget., 1986, **33** (2), 95.
7. G. Verzár-Petri, B. Hanh, N. Cuong, Sci. Pharm., 1977, **45** (3), 220.
8. J. Reichling, H. Becker, J. Exner, P. D. Dräger, Pharm. Z., 1979, **124** (41), 1998.
9. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, *Drogenanalyse Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983.
10. H. M. Péter, E. Rácz-Kotilla, G. Rácz, Probl. genet. teor. pract., 1982, **XIV** (6), 467.
11. Em. Grigorescu, U. Stănescu, A. Ionescu, *Lucrări practice de Farmacognozie*, 341 1984.
12. Abdel Kawy A. S. Wali, Herba Hung., 1980, **19** (3), 65.
13. J. Bernáth, Herba Hung., 1983, **22** (3), 49.
14. M. Repčák, B. Šmajda, P. Černaj, R. Hončariy, D. Podhradský, Biol. Plant., 1980, **22** (6), 420.
15. J. Reichling, W. Bisson, H. Becker, Z. Naturforsch., 1983, **38**, 159.
16. É. Szőke, G. Verzár-Petri, I. N. Kuzovkina, É. Lemberkovics, A. Kéry, *Use of tissue cultures in plant breeding*. Proceed. Intern. Symp. 6–11 Sept. Olomunc, Czechoslovakia, 1976.
17. É. Szőke, A. L. Shavarda, G. Verzár-Petri, I. N. Kuzovkina, Herba Hung., 1979, **18** (2), 7.

Received 25 December, 1988

“Stejarul” Research Station, 5600
Piatra Neamț, Romania

THE CONTRIBUTION OF WOOD VEGETATION LEAF MATERIAL TO THE PELOIDOGENESIS IN SALT, MEROMICTIC AND PELOGENOUS LAKE URSU-SOVATA (TRANSYLVANIA, ROMANIA)

V.-A.C. BULGĂREANU, VENERA IONESCU, EUGENIA IOANÎTESCU

Numerous early researches regarding the decomposition in water of lacustrine and circumlacustrine vegetation used the well-known litter-bag method; also the lentic and lotic environments (e. g. : (24), (16), (23), (12), (9), (13), etc.) were studied; a comparison of the lake sediments inorganic chemism with that of the vegetal remains ((2), (5)), allowed to estimate the contribution of the latter to the therapeutical mud-forming processes (= peloidogenesis).

This note makes a statistical analysis of the contribution of the leaf material belonging to the circumlacustrine vegetation to peloidogenesis in lake Ursu-Sovata.

Lake Ursu (surface = 40,200 m², maximum depth = 18 m), natural reserve in Sovata spa, Mureș county, is placed within Sovata depression, eastern Transylvania. Numerous studies and syntheses ((19), (25), (33), (27), (26), (2), (6), (8), (21)), centered especially around the heliothermic features of the lake (observed even in the last century) define it as a meromictic basin with a hypersaline, quasistagnant monimolimnion (TFR (total filterable residue) = 193.0–311.8 g. l⁻¹) and a low-salinity mixolimnion (TFR = 0.1–193.0 g. l⁻¹) fed by the fresh and hypo-saline waters (TFR = 0.38–4.22 g. l⁻¹) of the Toplița (with inputs denoted by TO₁, TO₂) and the Auriu (with inputs AU₁, AU₂) brooks (Fig. 1); the lake has a static-type stratification (or non-biochemical, according to Yoshimura's classification, (35), (36)); its meromixy seems to be both crenogenic (the massif salt was partially solved into the lake waters and the input from lake Verde into lake Ursu is saline) and biogenic (H₂S enrichment of monimolimnion at amounts of 5–54 mg. l⁻¹). The mesothermal régime (heliothermal, in summertime) entails temperatures of –3°... +43° in epilimnion, 12°... 41° in hypolimnion and 13°... min 43°C at the thermocline level (early measurements (30) mentioned the highest value of 69.5 °C!).

From the limnogenetic point of view, many researchers dealing with both submerged morphology and the circumlacustrine area (with exokarstic processes in the salt massif of Badenian age) suggested a karstosaline origin of the lake ((31), (25), (28), (27), (32)) based on the sinking and forming of a big doline in 1878 ((32)) or 1879 ((31)), about the confluence of the Toplița and the Auriu brooks; however, other researchers ((26)) contend that the lake is of anthroposaline origin in relation with the existence of old salt mines, worked in the 2nd – 5th and 12th – 17th cc.

The limnogeological, biological and enzymological studies ((2), (4), (17), (8)) define a lake with chloro-sodic waters (Table 1) and acid pH (5.5–6.5), and which contains pelogenous deposits (= therapeutic, unctuous, sapropelic muds) having acid pH, too (5.5–6.8). The peloidogenesis

Table 1

Chemical composition of epilimnetic and hypolimnetic lake Ursu waters (minimum and maximum contents in mg.l⁻¹ over 1976-1977) *

Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
41,600.0— 190,000.0 (contin.)	164.6— 1,291.8	147.0— 635.0	0.0004— 0.0018	0— 2.00	0— 10.0
Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Total Fe	COD
26,759.04— 122,942.40	25.1— 57.2	187.1— 577.5	27.8— 153.2	0— 0.12	39.8— 423.5

* Bulgăreanu et al. (1977) Research report, I. P. G. G., Bucharest.

processes *sensu lato* in lake Ursu ((4)) are influenced by the water chemical composition, implicitly by its meromixy ((8)) and include the sedimentation of yellow and sandy silts followed by peloidogenesis *sensu stricto*, namely the formation of pelogenous, black muds and of unctuous, black and gray muds, sometimes with sandy material. The distribution of these modern sediments is shown in Fig. 1.

The massive presence of wood vegetation (*Pinus silvestris* L., *Picea abies* (L.) Karst, *Corylus avellana* L., *Carpinus betulus* L., *Alnus glutinosa* Gaertn., *A. incana* (L.) Mönch., *Fagus silvatica* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Q. robur* L., *Populus tremula* L., *Salix alba* L., *Sorbus torminalis* L. (Cr.), *Crataegus monogyna* Jacq., *Tilia cordata* Mill., *Acer campestre* L., *A. platanoides* L., *Rhamnus cathartica* L., *Cornus sanguinea* L., *Ligustrum vulgare* L., *Viburnum lantana* L.) brings about an organic matter input greater than that corresponding to the phytoplankton (in which quantitatively there predominate: *Pleurocapsa* sp., *Cryptomonas* sp., *Chryso-coccus* sp., *Chlamydomonas* sp., and *Lyngbya halophyla* Hansg.) or phyto-benthos (with maximum frequencies: *Fragilaria brevistriata* Grun, *Achnanthes brevipes* (Lyngb.) Ag., *A. lanceolata* (Breb.) Grun., *Surirella ovata* Kütz. var. *salina* (W. Sm.) Rabenh. and *S. striatula* Turp.); the biomass of aquatic macrophytes *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link and *Rhizoclonium hieroglyphicum* (Ag.) Kütz. is clearly subordinate (2).

MATERIAL AND METHOD

In autumn, 4 samples of fresh leaves belonging to *Carpinus betulus*, *Fagus silvatica*, *Quercus pedunculiflora* and *Salix alba* were collected from 1-2 trees around the lake Ursu (Fig. 1). After gross impurities were removed, the samples were dried at room temperature in netted plastic bags. Then, there followed oven-burning at 600 °C and ash analysis, by using laboratory techniques mentioned earlier ((3)). The sediment samples collected down to 30 cm depth below the water-sediment interface, from 27 core drillings mentioned in Fig. 1, were dried at 40° C and then analysed in a similar manner.

In order to estimate the contribution of the leaves to the sapropelic, unctuous mud formation, we compared the chemical composition of both

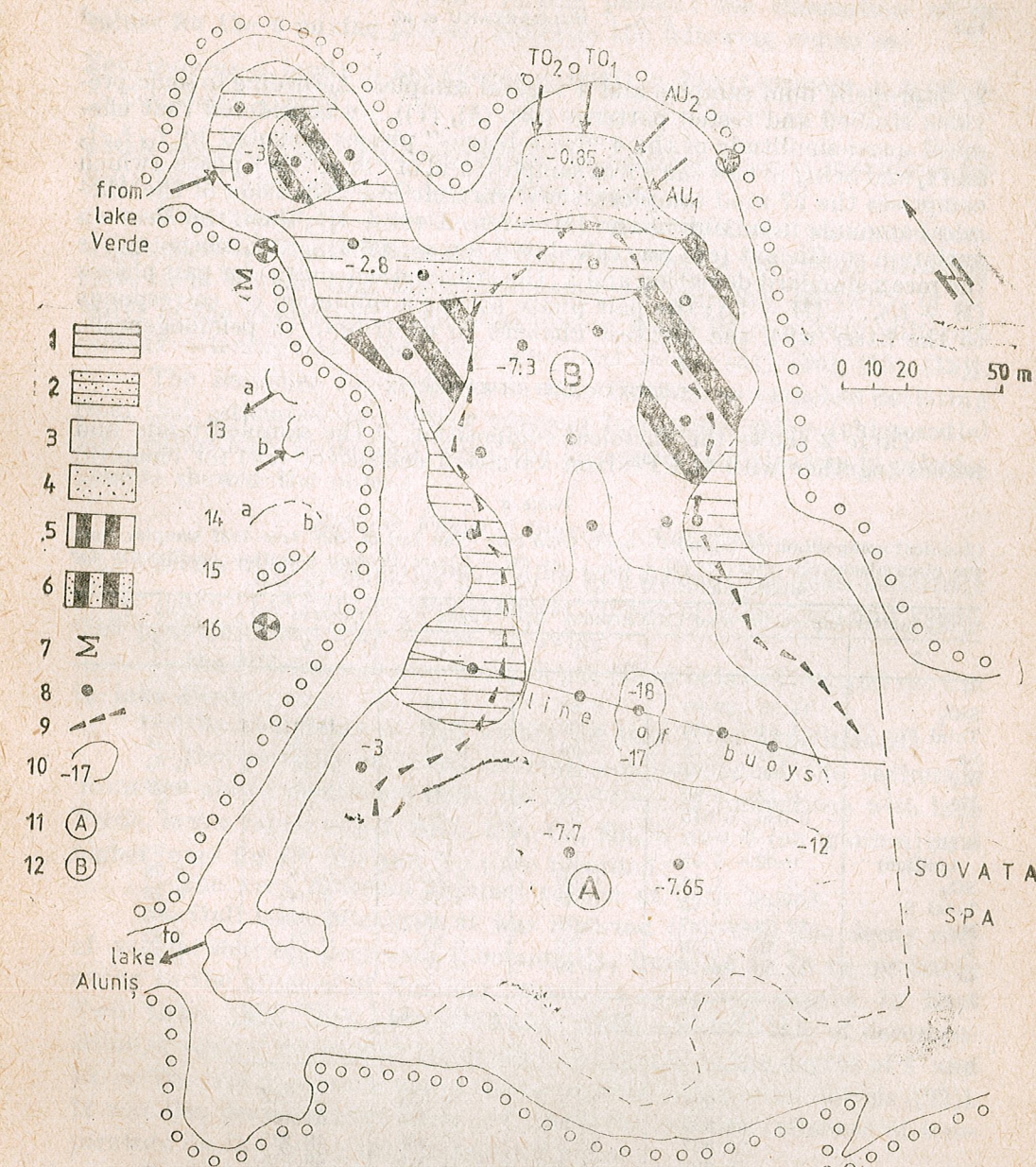


Fig. 1. — Limnogeological map of lake Ursu-Sovata: 1, black, pelogenous (with low viscosity) mud with *Alnus glutinosa*, *Quercus petraea* and *Q. robur* remains; 2, Idem, sandy; 3, black, sometimes with gray zones, unctuous muds with *Quercus robur* and *Aster tripolium* remains; 4, black, sandy mud; 5, grey, sometimes with black zones, unctuous muds with *Q. robur* and *A. tripolium* remains; 6, grey with lack of zones, sandy mud; 7, salt outcrop ("Muntele de sare"); 8, sediment samples (the negative value is the lake depth in m); 9, intersection of the halocline surface with the lake bottom surface; 10, lake depth contour isopleths (values in m); 11, bathing compartment; 12, non-bathing compartment (to protect heliotherapy); 13, output(a) and inputs(b); 14, lake shore (a, visible; b, masked by the timber platforms for sun-baths); 15, wood; 16, leaf sampling points.

27 sapropelic mud samples and 4 vegetal samples. According to some previous studied and tested patterns ((3), (5), (7)), we considered that chemical quasi-similitude of the 4 "fresh leaves" phases (denoted by f_1, f_2, f_3 and f_4 and being in fact the 4 leaf samples) and of "mud" (M) phase (which comprises the 27 mud samples), show variable low dispersion of the chemical amounts in mixing phases ($M + f_1, \dots, (M + f_4)$); then, the Pearson variation coefficient (cv) was calculated ($cv = 100 \sigma_{n-1} \bar{x}^{-1}$, where σ_{n-1} is the mean standard deviation and $\bar{x}$, the arithmetical mean) for pair phases ($M + f_1, \dots, (M + f_4)$); the pair phase having a minimum cv corresponds to the litter with the greatest chances to contribute to peloidogenesis.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Table 2 shows the chemical composition of the sampled muds and leaves together with the Pearson variation coefficient (cv) for chemical

Table 2

Chemical composition of sapropelic muds from lake Ursu and of four tree leaf samples from the circumlacustrine area; cv ($M + f_1, \dots, cv (M + f_4)$) are Pearson variation coefficients for mixing phases ($M + f_1, \dots, (M + f_4)$). For details, see text.

% dry matter	Sapropelic mud (M)	Carpinus (f_1)	Fagus (f_2)	Quercus (f_3)	Salix (f_4)
1	2	3	4	5	6
SiO ₂	11.35—28.90	0.80	0.96	0.76	0.13
Total Fe	1.54—6.30	0.09	0.08	0.05	0.04
Ca	1.50—3.10	0.96	0.70	0.56	1.34
Mg	0.06—1.14	0.20	0.11	0.16	0.35
Mn	0.12—0.96	0.08	0.06	0.04	0.03
Ti	0.030—0.045	0	0	0	0
S (by ignition)	0.02—1.55	0	0	0	0
SO ₄	0—1.14	0.09	0.12	0.14	0.78
Total S	0.40—1.55	0.03	0.04	0.04	0.26
Na	12.75—23.97	0.05	0.05	0.07	0.02
K	0.70—1.50	0.68	0.87	0.74	0.92
Cl	19.50—36.70	0.10	0.10	0.04	0.07
	cv ($M + f_1$)	cv ($M + f_2$)	cv ($M + f_3$)	cv ($M + f_4$)	
	7	8	9	10	
	30.923	30.812	30.952	31.399	
	44.537	44.580	44.710	44.753	
	20.927	22.230	22.985	19.295	
	70.668	71.960	71.209	69.112	
	59.649	60.020	60.406	60.605	
	230.006	230.006	230.006	230.006	
	58.707	58.707	58.707	58.707	
	59.708	59.255	58.967	55.977	
	41.509	41.344	41.344	38.285	
	22.954	22.954	22.937	22.978	
	24.247	23.543	23.958	23.462	
	22.666	22.666	22.698	22.682	
	$\Sigma = 686.501$	688.707	688.879	677.261	

Ash contents of leaves (%); *Carpinus* (5.50), *Fagus* (5.40), *Quercus* (4.70) and *Salix* (6.40).

compounds of "leaves + mud" mixing phases; the summation of cv values for the 4 mixing phases, indicates the following sequence:

$$\Sigma cv(Quercus + mud) > \Sigma cv(Fagus + mud) > \Sigma cv(Carpinus + mud) > \Sigma cv(Salix + mud),$$

which suggests that the contribution to peloidogenesis is maximum for *Salix* leaves and minimum for *Quercus* leaves.

If we accept the hypothesis according to which the maximum contribution of leaf material means at the same time a maximum decaying rate, then, we can find the above-mentioned sequence partially or totally, in the experiments and observations made in relatively different milieux — lentic, lotic and even terrestrial (e.g.: (24), (20), (15), (12)).

The sequence found by us in lake Ursu is nevertheless deviating from that estimated for another adjacent holomictic, saline (chlorosodic) lake, called lake Verde ((5)); here, the increasing participation in peloidogenesis showed the order:

$$Salix < Fagus < Quercus < Carpinus,$$

which seems to be unexplainable, taking into account the quasi-similitude of the majority of hydrochemical characteristics of lakes Ursu and Verde. The possible causes may be the following:

— the difference in maximum depth (18 m in lake Ursu and ca. 1 m in lake Verde);

— the abundance of H₂S within the lake Ursu hypolimnion;

— the partially different chemical composition of the sediments from the above mentioned lakes (in lake Ursu in comparison with lake Verde, lower values of pH, SiO₂, SO₄, Ca, Mg, K and S (on ignition) and higher ones for Cl, Mn and Na) are recorded;

— the very different thermal régime of both basins.

In Gull lake, Michigan, it was reported ((1)) that the decay rate of vegetal detritus decreases substantially, from 2.5 to 12 m, probably owing to the absence of shredder organisms at greater depths. In East Twin Lake, Ohio, they mentioned also ((29)) a double rate of decomposition of vegetal remains at 1m depth as compared to the depths of 4 and 12 m. The H₂S presence is one of the factors inhibiting cellulolysis ((22)). It was also demonstrated ((18), (34), (10)) the positive influence of temperature on the decay rate in aquatic milieu.

To the same effect of increasing contribution to peloidogenesis, and, therefore of decay rate, we remark for some chemical compounds of the 4 leaf species analysed (Fig. 2), both uniform variation tendencies (increases for ash and Ca and decrease of Na amounts) and quasi-uniform ones (increases for SO₄ and the total sulphur). In this case, the increased

decomposition rates of the litter may be correlated either with the absence of leaching inorganic soluble substances ((14)) or with the increased calcium hardness of waters ((11)).

CONCLUSIONS

The inorganic chemism of *Carpinus*, *Fagus*, *Quercus* and *Salix* leaves collected from the lake Ursu circumlacustrine area and the chemical composition of the sapropelic muds from the lake, compared by the dispersion method (Pearson variation coefficient, cv) indicate the contribution to peloidogenesis, in decreasing order, of the leaves belonging to the following genera:

Salix > *Carpinus* > *Fagus* > *Quercus*.

This order coincides with that cited in the literature for the sequence of decreasing values of decomposition rate. Thus, the comparison method of "vegetal remains + mud" mixing phases chemism reflects the differences in decay rate of the vegetal material in an aquatic milieu; the higher decomposition rate of a certain species (in our case, *Salix alba*), recommends it as a source of the fast-transforming organic matter into sapropelic mud. As a consequence, the *Salix* vegetation extension around the lake Ursu is considered to be a very justified solution.

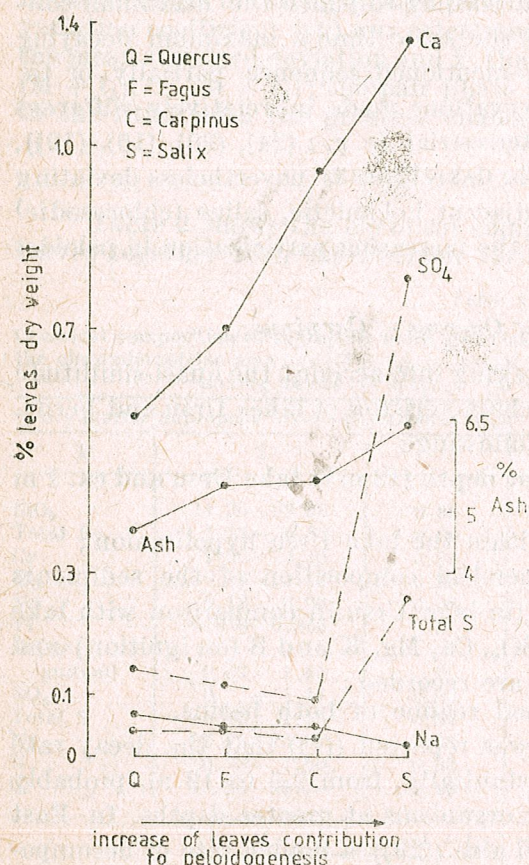


Fig. 2. — Uniform and quasi-uniform variation tendency of same leaf chemical compounds in terms of their contribution to peloidogenesis.

Acknowledgements. We would like to extend our thanks to Dr. Ștefan Kiss, Reader at Cluj-Napoca University, Romania and Dr. Francisco A. Comin, University of Barcelona, Spain for obtaining some published papers and for some suggestions made.

Received 20 March, 1989

Enterprise for Geological
and Geophysical Prospections,
Bucharest, 1, Caransebeș Str.
University of Bucharest,
Faculty of Biology,
Bucharest, 1, Alea Portocalilor

REFERENCES

- Barnes J. R., Ovink R., Cummins K. W., Verh. Internat. Verein. Limnol., 1978, **20**, 475—479.
- Bulgăreanu V. - A. C., Ionescu-Teculescu V., Hannich D., Demeter F., Acta Botanica Horti Bucurestiensis, 1978, 89—113.
- Bulgăreanu V. - A. C., Ionescu-Teculescu V., Ioanățescu E., Hannich D., Rev. Roum. Biol., Biol. Végét. 1980, **25**, 65—77.
- Bulgăreanu V. - A. C., Kiss S., Rădulescu D., Drăgan-Bularda M., Hannich D., Studia Univ. Babeș-Bolyai, Biologia, 1981 **XXVI**, 68—72.
- Bulgăreanu V. - A. C., Ionescu-Teculescu V., Ioanățescu E., Stoica A., Tintilă D., Rev. Roum. Biol., Biol. Végét., 1983, **28**, 101—107.
- Bulgăreanu V. - A. C., Sitaru M., Hannich D., Theoretical and Applied Karstology, 1985, **2**, 165—174.
- Bulgăreanu V. - A. C., Pop I., Ianc R., Ioanățescu E., Opriș E., Urcan T., Rev. Roum. Biol., Biol. Végét. 1986, **31**, 51—59.
- Bulgăreanu V. - A. C., Bulgăreanu M. - E., In: Z. Brandl, V. Straškrabova (Eds), International Conf. on Reservoir Limnology and Water Quality, 15—20 June 1987 (Abstracts), České Budějovice, 1987, 22.
- Edberg N., Scripta Limnologica Upsaliensia, 1977, **443**, 3—18.
- , Scripta Limnologica Upsaliensia, 1978, **464**, 1—42.
- Egglishaw H. J., J. Appl. Ecol., 1968, **5**, 731—740.
- Gasith A., Ławacz W., Ecol. pol., 1976, **24**, 421—430.
- Godshalk G. L., Wetzel R. G., Aquatic Botany, 1978, **5**, 301—327.
- Gopal B., Verh. Internat. Verein. Limnol., 1984, **22**, 947—950.
- Hart S. D., Howmiller R. P., Verh. Internat. Verein. Limnol., 1975, **19**, 1665—1674.
- Hodkinson I. D., J. Ecol., 1975, **63**, 131—142.
- Ionescu-Teculescu V., Bulgăreanu V. - A. C., Năstăsescu M., Valda V., Hannich D., Acta Botanica Horti Bucurestiensis, 1982, 185—196.
- Iversen T. M., Verh. Internat. Verein. Limnol., 1975, **19**, 1687—1692.
- Kalecsinski A., Ann. der Physik, 1901, **4**, 408—416.
- Kaushik N. K., Hynes H. B. N., Arch. Hydrobiol., 1971, **68**, 465—515.
- Kirkland D. W., Bradbury J. P., Dean W. E., Arch. Hydrobiol., Suppl., 1983, **65**, 1—60.
- Klust G., Mann H., Arch. Fisch. Wiss., 1955, **6**, 249—275.
- Mason C. F., Bryant J. R., J. Ecol., 1975, **63**, 71—95.
- Mathews C. P., Kowalczewski A., J. Ecol., 1969, **57**, 543—552.
- Maxim I., Rev. Muz. Geol.—Mineral., Univ. Cluj, 1929, **III**, 50—83.
- Panait I., Boșeică A., Hidrot. gospod. ape meteorol., 1968, **13**, 289—297.
- Pișota I. T., Probl. geogr., 1960, **VII**, 179—191.
- Popa Gh., Probl. geogr., 1960, **VII**, 283—291.
- Reed F. C., Hydrobiologia, 1979, **64**, 195—197.
- Roth, Telegdi von, Föld. Közl., 1899, **29**, 41—44.
- Schafarzik F., Föld. Közl., 1908, **38**, 437—455.
- Sfârlac I., Bul. Soc. Stiințe Geogr., new series, 1973, **III** (LXXIII), 157—161.
- Sturza M., Die Kochsalzwässer Rumäniens. Balneologisch-balneotherapeutische Studie, 1930, Ekklektika Verlag, Wien.
- Suberkropp K., Klug M. J., Cummins K. W., Verh. Internat. Verein. Limnol., 1975, **19**, 1653—1658.
- Yoshimura S., Jap. J. Astr. Geophys., 1936, **13**, 61—120.
- , Proc. Imp. Acad. Japan, 1937, **13**, 316—319.

LIMA-DE-FARIA, A., 1988, Evolution without Selection. Form and Function by Autoevolution, Elsevier, Amsterdam, 372 p.

Professor A. Lima-de-Faria, head of the Molecular Cytogenetics Department of the Lund University (Sweden), an authority of world notoriety for problems of structure and molecular organization of chromosomes, has elaborated an original hypothesis relative to evolutionary process, radically different from the known theories.

Of nondarwinian nuance, his hypothesis incites to discussions, being a critical analysis of neodarwinian theories. This new hypothesis argues the biological traits of structure and function by autonomous existence at three organization levels (primeval matter and energy, chemical elements, minerals). These three levels, in the author's opinion, have their autonomous evolutions which canalized and directed the terminal process of biological evolution.

The author insists on the autoevolution of genes and chromosomes structure and functions, the autoevolution criteria being continuously argued in opposition with neodarwinian theory.

In fact, this new hypothesis elaborated by Lima-de Faria does not pass beyond the boundaries of reductive conceptions, the complexity of biological processes being considered equal to those of physico-chemical order. We think it is a very simple point of view, which ignores the principles of integrality, selfprogramming, selfregulation etc. of antientropic biological systems.

Undoubtedly, this book can offer a lot of valuable data for theoreticians, but cannot be a redutable alternative for modern evolutionary theories. It is true that none of the existent theories offers, an exhaustive explanation for the complicated proces of evolution. However, to exclude completely the role of selections, to reduce the complexity of biological processes to physico-chemical rules, it is not only hazardous but insufficiently argued.

Ion I. Băra
Elena Truță

C. BÎNDIU, N. DONIȚĂ, Molidișurile presubalpine din România (Presubalpine spruce fir forests in Romania), Ed. Ceres, Bucharest, 1988, 137 p., 26 figs, 43 tables

The book is structured into 6 chapters, the first four of which (introduction, physical and geographical conditions, the biocenosis and the ecosystems) have a general introductory and the following two (ecosystemical processes and the administration of boundary spruce fir forests) present the authors' special investigations made over a five-year (1978-1982) in the same areas using the relevé ecological method mainly for 3 massives (Retezat, Bucegi, Călimani) with extension by itinerant researches over the whole Romanian Carpathians. Excepting the spruce fir forests with closed canopy from the upper boundary of the forest, defined by the authors as "presubalpine" taking into account geographical (geomorphological, climatical, pedological, typological), phytocenological (structure vertical zonality) and ecological (pre-ecoton, biomorphical) criteria, useful and interesting researches were also made in the neighbouring mountainous areas belonging to the subalpine belt, namely in the glade of spruce fir forests (monodominant or mixed with various other wooden species from the subalpine) as well as in the *Pinus mugo* communities. The purpose of these collateral researches was a more precise knowledge of the laws which govern the upper boundary of the forest, with a view to highlighting the ecological determination by means of application of the comparison method on a large scale.

Following this direction the authors wish to underline — even from the first chapter — the fact that by the boundary spruce fir forest (preecotonic and ecotonic) they under-

stand more than a simple object of study, rather a tensional space with multiple ecological valences in which the forest is not the only occupying element.

A series of complex regional unities of environment is established in chapter two after the analytical presentation of the geographical area, geological substratum of the soils and specific climate of the great altitudes in which spruce fir areas from "closed" forests (preecotonic) or glades (ecotonic). They are named geotypes and, in our opinion, they are most useful theoretically (to focus other researches), and practically, thus underlying the administration programmes.

The analyses in chapter 2.2.1. are of great importance and with deep implications in the ecology of the upper boundary of the forests, as they concern the influence of high altitude relief (alpine and subalpine) upon the hydrothermic condition and upon the dynamics of air masses (the atmosphere fronts) which cross the mountains carried away by baric centers. These considerations pave the way for the readers' better understanding of the subchapters and chapters that follow (the thermic regime, the water regime, rainfalls included, the evapotranspiration and the water balance regarded both as a biotope level — static — and as a function — dynamic). A great number of figures and tables are meant to render the material easily accessible.

Chapters three and four present biocenoses (plant populations and, to a lesser extent animal populations, as well as the vegetal communities in the studied area) and the characteristic ecosystems. Two plant associations are described on a geobotanical releve basis (*Piceetum subalpinum* Br. Bl. 59 and *Cembretum-Piceetum Chifu* et al. 84), of which the second is new to Romania. A forward step is made in the ecosystematics field as four types of new ecosystems are described and presented for the first time: a) subalpine spruce fir forests, poorly productive with moder humus and *Oxalis* — *Soldanella* type of flora; b) subalpine spruce fir forests with crude-peat humus and *Vaccinium* — *Hylocomium* type of flora; c) *Pinus cembra* — *Picea abies* mixed forest with crude-peat humus and *Calamagrostis* — *Luzula* type of flora; d) *Pinus cembra* — *Picea abies* mixed forest with crude-peat humus and *Vaccinium* — *Calamagrostis* type of flora.

The ecosystemic processes of the subalpine spruce fir forests make the subject of chapter 5 which is the most ample (58 pages) and also the most complex.

The three subdivisions (ecosystemic functions, ecophysiological processes and stresses) the main aspects of the interaction organism-environment present both synthetically (as population) and individually (the tree). Remarkable scientific contributions are made in each of the mentioned directions.

Subtle and important differentiations are made between *Picea abies* *Pinus cembra* and *Pinus mugo* in the subchapter "ecophysiological processes" both as concerns the water circuit in the plant-soil system (humidity — evaporation) and among other substances (essential for plant life (CO₂, O₂, assimilatory pigments). Pride of place is given in the work to the stress analysis and the analysis of the disfunctions that occur at high altitudes and which affect the spruce fir seedlings.

The last chapter puts forward a series of economic and forestry recommendations, both for the maintenance and the restoration of the ecological balance in the presubalpine and subalpine belt.

With scientific probity and justified cautionsness the authors do not recommend insufficiently verified methods (for example "the conservation cutting").

The work stands out through its originality, a deep ecological vision, very rich scientific information and the unusual density of ecological concepts expressed in a most concise manner and in a singular style which manages to combine harmoniously the metaphor with scientific rigour.

Mihaela Paucă-Comănescu

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 seront 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, 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, en anglais. 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.