

COMITÉ DE RÉDACTION

Rédacteur en chef:

EUGEN A. PORA, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Rédacteur en chef adjoint:

R. CODREANU, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Membres:

MIHAI A. IONESCU, MIHAI BĂCESCU, OLGA NECRASOV, GRIGORE ELIESCU, membres correspondants de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL, secrétaire de rédaction.

La « Revue roumaine de Biologie — Série de Zoologie » paraît six fois par an.

Toute commande de l'étranger (fascicules ou abonnements) sera adressée à ROMPRESFILATELIA, Boite postale 2001 — telex 011631 — Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger.

Les manuscrits, les livres et les revues proposés en échange, ainsi que toute correspondance, seront envoyés à la rédaction: 296, Splaiul Independenței, Bucarest, Roumanie.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

Str. Gutenberg 3 bis, București, Roumanie

REVUE ROUMAINE DE
BIOLOGIE

BIOL. INV. 93

— SÉRIE DE ZOOLOGIE —

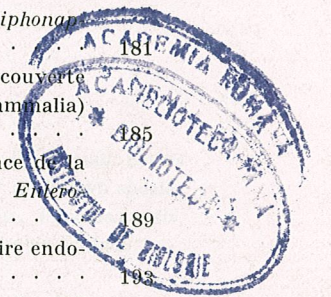
TOME 18

1973

N° 3

SOMMAIRE

	Page
MIHAI BĂCESCU, <i>Anisomysis levi</i> n. sp. from the Red Sea and the dichotomic key of the species belonging to the genus, with description of a new taxon, <i>Paranisomysis</i> n. sg.	173
MARIA SUCIU, <i>Ctenophthalmus agyrtes romanicus</i> n. ssp. (<i>Siphonaptera</i> : <i>Hystrihopsyllidae</i>) from Romania	181
COSTIN RADULESCO et PETRE SAMSON, Sur la découverte d'une espèce nouvelle de Muridé (Rodentia, Mammalia) dans le Pléistocène moyen de Roumanie	185
DOÎNA CODREANU-BĂLCESCU, Sur la mise en évidence de la sexualisation cytoplasmique chez les Grégarines <i>Enterozoocystidae</i> à l'aide des colorations vitales	189
ELENA TRACIU, Sur le comportement du tissu glandulaire endocrin des Insectes greffé chez les Araignées	193
MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL, Annulate lamellae in fish oocytes	197
ANCA PETRESCU-RAIANU, Structure of chromaffin cells in the adrenal gland of <i>Phalacrocorax carbo</i> L.	203
MÁRTA GÁBOS, E. A. PORA, CARMEN ANDREA-POPU, HERTA FLATZ, Der Einfluß des Thyroxins (T ₄), Thio-urazils (Tu) und des TSH auf die Gewebeatmung des Karpfens	211
RADU MEȘTER, STELIAN NICULESCU et DRAGOȘ SCRIPCARIU, L'activité de la pyrophosphatase et de la nucléotide-pyrophosphatase du foie des loches d'étang (<i>Misgurnus fossilis</i> L.) aux températures basses	217
RODERICH BRANDSCH, Embryogenetic and genetic consequences of the treatment of <i>Tubifex</i> eggs with magnetic field	221
P. JITARIU, C. R. SCHNELLER-PAVELESCU et R. K. BRANDSCH, Les champs électromagnétiques constituent-ils un facteur écologique?	227
EUGENIA MILOVAN and I. GRANCIU, Study on biochemical polymorphism in Holstein and Pinzgau breeds	235
I. MOISA, Study on some strains of influenza virus with double antigenicity: A ₂ and B	241



REVUE ROUMAINE DE
BIOLOGIE
SERIE DE ZOOLOGIE

ANISOMYSIS LEVI n. sp. FROM THE RED SEA
AND THE DICHOTOMIC KEY OF THE SPECIES
BELONGING TO THE GENUS, WITH DESCRIPTION
OF A NEW TAXON, *PARANISOMYSIS* n. sg.

BY

MIHAI BĂCESCU

A new species of *Anisomysis* (*A. levi* n. sp.) commensal with Gorgonian corals from the Red Sea is described. A dichotomic key is given for all known species belonging to the *Anisomysis* genus, separating a new subgenus, *Paranisomysis*, including all species with flageollate tubercles on the mandibular palpus.

In a supplemental lot of Malacostraca collected by Prof. Lev Fishelson from the Red Sea, in 1972, I found the following two species of Mysidae:

Siriella brevicaudata Pauls., 1 ♀ (St. NS 9847, Ras-el-Kanisa-Gulf of Suez, 17.X.1972) and a new species of

Anisomysis (gulf of Aquaba) which I describe here as:

A. *Anisomysis levi* n.sp.

(Fig. 1, A-L)

Material examined: 40 females, all marsupiphore, and 7 males, sexually mature. St. NS 9601 Dahab, dredged.

Description. Mysids slender, well adapted to swimming, with unusually long uropod setae and broad basis at peraeopod exopodites, even in females.

Carapace frons ending with short rostrum obtuse, triangular, not exceeding the basis of ocular peduncles (Fig. 1, A). Eyes huge, pear-shaped; cornea — representing 2/3 of their volume — exceeds cephalo-

thorax margins. A_1 in ♂ exceeds length of A_2 scale; it presents a lobe ♂ distally tapering, curved, with long hairs. A_2 scale with long apical segment (almost $1/3$ of entire plate), always outwardly curved (Fig. 1, B); in ♀ it exceeds the distal part of A_1 , by the length of this segment. Mandibular palpus with second segment foliated (♂ ♀), hardly twice as long as broad (ratio 6.5 : 3), with very few phanera, only on the antero-ventral edge (Fig. 1, C); distal segment also broad, does not reach half the length of the former. Palpus of maxilla II egg-shaped, with only 2 setae; maxilliped I and II do not differ from the general line of the genus.

Eyes very large, pear-shaped, corneal portion brown, fairly exceeding peduncle both in breadth and volume (Fig. 1, A), prefiguring those of *A. megalops* (Illig) or of *A. lamellicauda* Hansen. They exceed carapace edges: commissure where peduncles cling is wholly visible, as rostrum does not cover them.

Peraeopod I and II always present a bisegmented propodus (Fig. 1, D). The other pairs present a unisegmented propodus (Fig. 1, E) carpus with 3–5 pennate setae with the first ones and only one thick seta with the others. Exopodites at least as long as endopodites with broad bases, the length hardly exceeding breadth.

All pleopods, both in females and males, of the type presented in figure 1, I and J, i.e. reduced to minute plates, even smaller than in Hansen genus type (*A. laticauda*).

Only pleopod IV ♂ (Fig. 1, F) exhibits the structure specific to the genus; huge filiform exopodite 4-segmented, slightly exceeding by distal setae (Fig. 1, G) the statocysts level (left arrow, figure 1, L); proximal segment slightly longer than the other three together. Their ratio being 11.6 : 4.8 : 5.4 : 0.3, it distinguishes this species from all other known species; exopodite, minute plate hardly visible, with 2–3 setae (Fig. 1, H).

Uropods very long and thin; exopodites inwardly curved, so that "tail" usually as shown in figure 1, L. Endopodite spineless, but with long pennate setae; exopodites with short setae on the margins and 4–5 huge distal setae (nearly the uropod length) also very characteristic.

Telson tongue-shaped, short, hardly half the length of supporting pliomere; distal portion armed with 12–16 spines, depending on mysid size; the latero-distal spines are the longest, delimiting a small truncate portion (Fig. 1, K).

Colour, after several months of preservation, ivory on the upper part and the abdomen; eyes and especially buccal parts and maxilliped

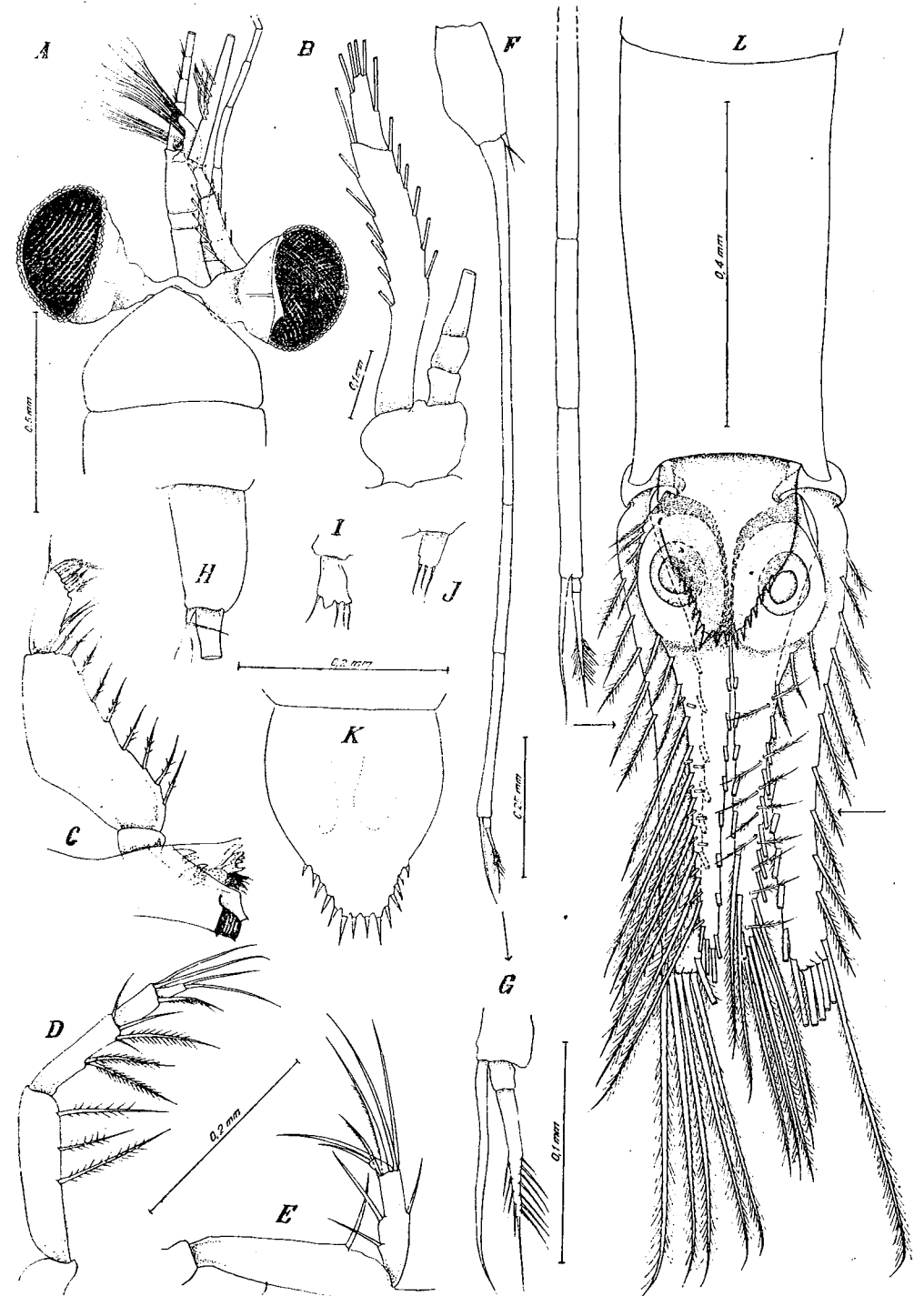


Fig. 1. — *Anisomysis levi* n. sp. ♂ and ♀. A, cephalic portion with right antennae; B, A_2 ♀; C, mandible with palpus (♀); D and E, peraeopods 1 and 3; F, pleopod IV ♂; G, its distal part magnified; H, basis of another plp IV ♂ to render visible the reduced endopodite; I and J, pleopod II and III belonging to the same ♂, drawn with the same magnifier as H; K, telson ♀; L, caudal appendages and abdominal segment bearing them (♂). Left arrow indicates upper limit of reaching for the tip of pleopod IV ♂. Right arrow indicates area where uropods are usually drawn together. (Orig).

Fig. 1. —

II, intensely brown; likewise brown the peraeopod bases, while on sternites and oostegites, large coffee-tinted spots.

Size: 3 — 4.5 mm. (♂ ♀); one ♂ adult is only 2.7 mm. long, ♀♀ with 3 — 5 eggs; apparently the month when they had been taken (24. VII.1972) was a month of full reproduction, as all specimens had their marsupium with eggs and in ♂♂ the appendix mascula was fairly covered with hairs.

Locality and material: Red Sea, Gulf of Aquaba; St. NS 9601; *A. levi* was collected from Gorgonian corals growing in a half cave north of Dahab, 6 m. deep.

Holotype ♂ no. 218 Crustacea Coll. of the "Gr. Antipa" Museum; allotype ♀, *ibid.*, no. 218 a, and paratypes ♀♀ (20 specimens), *ibid.*, no. 219, plus 6 in the Zoology Laboratory of the Tel-Aviv University.

Remarks. *Anysomysis levi* n. sp. presents a telson different from all known species, capable of being included only in group II, with whole telson, ± tongue-shaped (Fig. 2, *F*).

Breadth and shortness of palp segments recalls those of *A. hanseni* Nouvel, except for the phanera of the latter, also present on the upper edge of segment.

Ratio of exopodite segments of pleopod IV ♂ is also a good specific feature.

It was the second species of the genus found in the Red Sea and the third one established for the western Indian Ocean.

In this genus the telson shape is variable to the same extent as the structure of peraeopods and pleopods is constant. The former have a bi-segmented propodus at the pair I or I — II (III) pairs and unisegmented at the last peraeopods, in both sexes; all pleopods are reduced to a minute plate unisegmented, both in ♀ and in ♂, except for the pleopod IV ♂, which has a long 4-segmented exopodite and an endopodite reduced to a minute plate with 2 — 3 setae or totally absent (in *A. bifurcata*).

B. DICHOTOMIC KEY FOR THE KNOWN UNITS OF THE GENUS
ANISOMYSIS L.S.

(Fig. 2)

Twelve species are known for certain within this genus and a 13th, *A. mixta australis* (Zim.), which should be lowered to the statute of sub-

Fig. 2. — Evolution of telson and of mandibular palpus in the known species of the genus *Anisomysis* Hansen 1910. A, *Anisomysis lamellicaudata* (Hansen 1912); B, *A. ijimai* Ii 1964; C, *A. maris rubri* Băcescu 1972; C', its mandibular palpus; D, *A. bipartoculata* Ii 1964; E, *A. mixta* Nakazawa 1910 (somewhat resembling telson of *A. mixta australis* Zimmer 1919); F, *A. levi*, mihi; F', its mandibular palpus; G, *A. aikawai* Ii 1964; G', its mandibular palpus; H, *A. hanseni* Nouvel 1967; I, *A. laticauda* Hansen 1910; J, *A. incisa* W. Tattersall 1936; K, *A. pelewensis* Ii 1964; L, *A. bifurcata* W. Tattersall 1911; M, *A. megalops* (Illig 1930). C, C' and F, according to Băcescu; the others, according to original descriptions, with the figures brought up to about the same size, for a ready comparison.

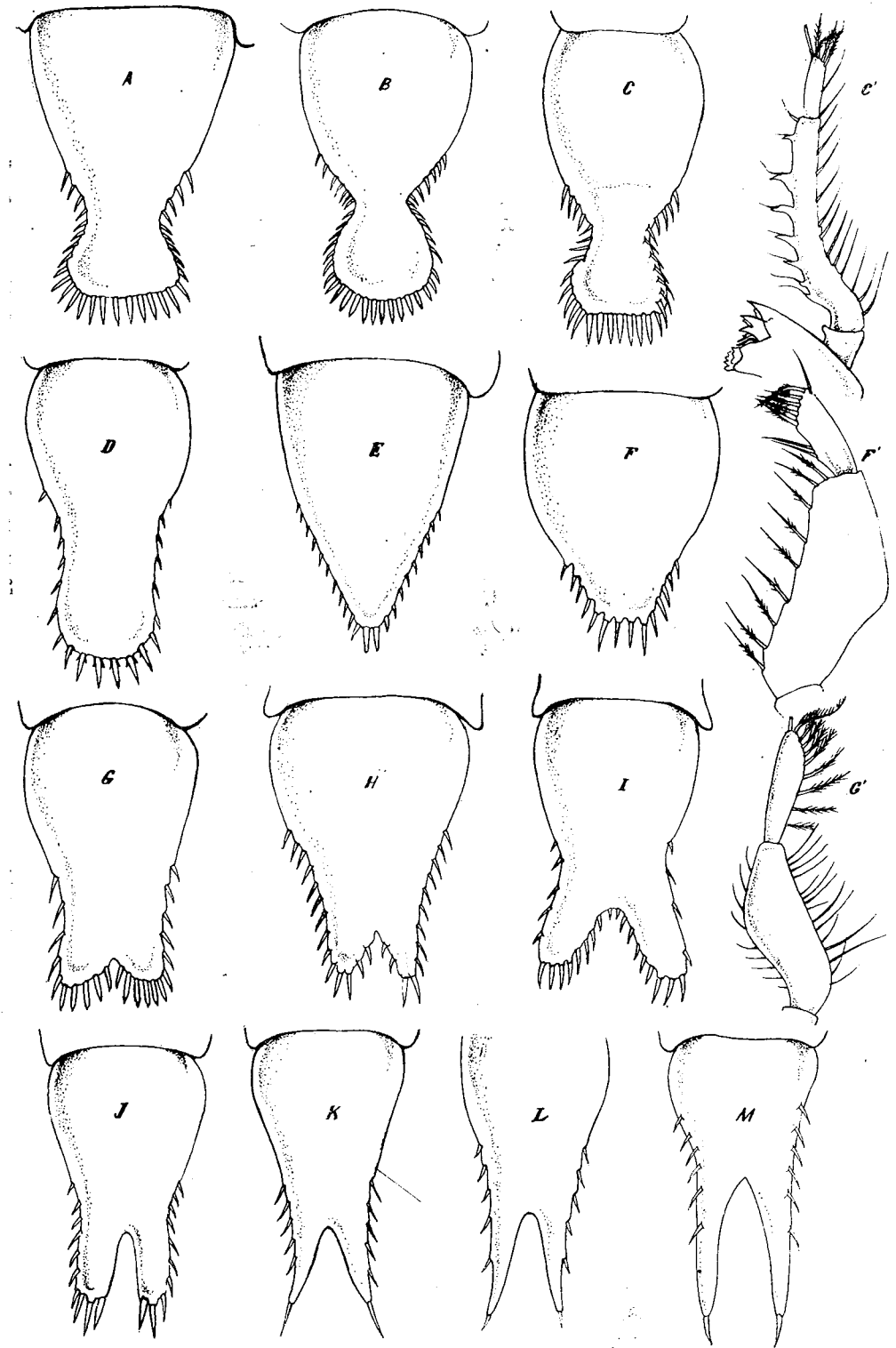


Fig. 2.

species, all of them from the Indo-West Pacific. They may be distinguished by:

- 1 (6) Mid-segment of mandibular palpus long, \pm cylindrical, with 7–13 flagellate tubercles on the inward curve (Fig. 2, C'); telson medal-shaped (Fig. 2, A – C) 2
 subgenus **Paranisomysis** n. sg.
- 2 (3) Mid-segment of palpus with 13 flagellate tubercles 2
 1. **A. lamellicauda** (Hansen)
 (Syn. **Criptomysis lamellicauda**
 Hansen 1912)
 Japan waters, Fiji, Sumatra
- 3 (2) With only 5 – 7 flagellate tubercles (Fig. 2, C') 4
- 4 (5) Telson distally truncate (Fig. 2, C); size 6 mm. 2
 2. **A. maris rubri** Băcescu 1972
 Red Sea. Gulf of Aquaba
- 5 (4) Telson rounded at the end (Fig. 2, B); size over 7 mm. 3
 3. **A. ijimai** Ii 1964
 Japan
- 6 (1) Mid-segment of palpus broadened, sometimes foliate, without trace of tubercles (Fig. 2, F). Telson tongue-shaped (Fig. 2, D – F) or distally hollow in different ways (Fig. 2, G – M) 7
 subgenus **Anisomysis**
 (Hansen)
- 7 (12) Telson tongue-shaped, second segment of mandibular palpus foliate; terminal segment short, broad (ratio = 2.0).
- 8 (9) Telson distally rounded, with apical spines lamellate at the basis (Fig. 2, D); corneal portion of eyes with horizontal groove 4
 4. **A. bipartoculata** Ii 1964
 Japan, S China
- 9 (8) Telson distally sharp, with 2 large apical spines (Fig. 2, E), eyes non barred 10
- 10 (11) Ratio of long segment of pleopod IV δ exopodites 26.5 : 15 5
 5. **A. mixta** Nakazawa 1910
 Japan
- 11 (10) Segments of pleopod IV δ have the ratio 35 : 9 : 12 6
 6. **A. levi** n. sp.
- 12 (7) Telson \pm hollow; second segment of mandibular palpus less broad; terminal one long (length ratio of mid-segment : terminal = 1.5) 13
- 13 (19) Telson sinus armed with spines 14
- 14 (15) Distal lobes of telson non diverging, armed with usual spines (Fig. 2, H); segments of pleopod IV δ exopodites are as follows : 65 : 15 : 35 7
 7. **A. hanseni** Nouvel 1967
 Madagascar
- 15 (14) Distal lobes of telson diverging (Fig. 2, G and I) 16
- 16 (17) Apical spines as nails with abruptly triangular points (Fig. 2, G); exopodite of pleopod IV thick (diameter representing the 15th

- part of the length). Segments ratio = 20 : 7 : 15 8
 8. **A. aikawai** Ii 1964
 Japan
- 17 (18) Apical spines usual (Fig. 2, I). Exopodite of pleopod thin and long (ratio length : diameter = 29), segments being of 26 : 9 : 7 9
 9. **A. laticauda** Hansen 1960
 Australia, E India
- 19 (13) Sinus of telson without spines 20
- 20 (21) Two or three spines, on the apex of the telson two lobes (Fig. 2, J) 10
 10. **A. incisa** W. Tattersall 1936
 N. E. Australia
- 21 (20) A single distal spine on each lobe (Fig. 2, K – M) 22
- 22 (23) Sinus extending over half the length of telson (Fig. 2, M). Triangular rostrum of carapace does not cover eyes basis 11
 11. **A. megalops** (Illig 1930)
 Syn. **Creagromysis megalops** (Illig 1930)
 Sumatra
- 23 (22) Sinus covering at the most 1/3 of telson (Fig. 2, K, L) 24
- 24 (25) Apical spines very long, almost 1/3 of the distal lobe length, with lateral spines only in the posterior half of telson (Fig. 2, K). Rostrum round, does not exceed eyes commissure 12
 12. **A. pelewensis** Ii 1964
 Japan
- 25 (24) Apical spines short (1/6 of lobe length) (Fig. 2, L). Carapace rostrum long, triangular, distinctly exceeding eye basis 13
 13. **A. bifureata** W. Tattersall 1911
 Chagos and Farquhar Islands (Indian Oc.)

REFERENCES

- BĂCESCU M., 1972, *Contribution à la connaissance des mysidés benthiques de la mer Rouge; description de deux espèces nouvelles: Anisomysis maris rubri n. sp. et Kainomatomysis schieckei n. sp.*, Rapp. Comm. int. Mer Médit., **21**, 3.
- HANSEN H.J., 1910, *The Schizopoda of the Siboga Expedition 1899 – 1900*. Monogr. 37, Siboga Exp., Leyden, 1–124.
- 1912, *The Schizopoda. Reports on the Sc. Results of the Expedition to the Tropical Pacific in charge of Alex. Agassiz . . . „Albatros” XXVII. The Schizopoda*, Mem. Mus. Comp. Zool., **35**, 175–296.
- II N., 1964, *Mysidae. Fauna Japonica*, Tokyo, 1–610.
- ILLIG G., 1930, *Die Schizopoden der Deutschen Tiefsee-Expedition*, Wiss. Erg. Deutsch. T-Exp. „Valdivia” 1898–99, **22**, 6, Jena, 399–625.
- NAKAZAWA K., 1910, *Notes on Japanese Schizopoda*, Annot. Zool. Jap., **7**, 247–261.
- NOUVEL H., 1967, *Mysidacés récoltés par S. Frontier à Nosy-Bé. IV. Mesacanthomysis pygmaea n. gen., n. sp. et Anisomysis hanseni n. sp.* Bull. Soc. Hist. Natur. Toulouse, **103**, 1–2, 105–121.

- TATTERSALL W. M., 1911, *On the Mysidacea and Euphausiacea collected in the Indian Ocean during 1905*, Trans. Linn. Soc., Ser. 2 Zool., 15, 119–136.
 — 1936, *Mysidacea and Euphausiacea*, Great Barrier Reef Expedition, Sc. Rep., 5, 4, 143–163.
 ZIMMER C., 1918, *Neue und wenig bekannte Mysidaceen des Berliner Zoologischen Museum*, Mitt. Zool. Mus. Berlin, 9, 15–27.

The "Gr. Antipa" Museum of Natural History
 Bucharest 63, Șoseaua Kiseleff nr. 1

Received December 25, 1972

CTENOPHTHALMUS AGYRTEs ROMANICUS n. ssp.
 (SIPHONAPTERA : HYSTRICHOPSYLLIDAE)
 FROM ROMANIA

BY

MARIA SUCIU

Ctenophthalmus agyrtes romanicus is described on the basis of an abundant material (151 specimens : 60 ♂♂, 91 ♀♀). This subspecies is characterized in the male by the structure of the dorsal lobe (dP¹) and ventral lobe (dP², dP³) of the clasper and also by the ventral aedeagal lamella; the female is indistinguishable from that of related subspecies. This flea is parasitic of the small mammals (Rodentia : Muridae and Microtidae) and is spreading mainly in the southern and eastern half of Romania (Muntenia); its eastern limit is reached at Buciumeni (Moldova).

We mentioned in our thesis the occurrence in Romania of four subspecies of *Ctenophthalmus agyrtes* Heller : *C. agyrtes serbicus* Wagner, *C. agyrtes kleinschmidtianus* Peus, *C. agyrtes peusianus* Rosický, *C. agyrtes eurous* Jordan and Rothschild [8]. Further studies, however, showed, that actually the following five subspecies exist in this country : *C. agyrtes serbicus*, *C. agyrtes kleinschmidtianus*, *C. agyrtes pelikani* Rosický, *C. agyrtes eurous* and *C. agyrtes romanicus* n. ssp.

Type material. Bilcești, 1963, 5 ♂♂, 5 ♀♀ from *Microtus arvalis* (Pallas) (nest), 7.XI.1966 1 ♂ from *Apodemus sylvaticus* (L.), 2 ♂♂, 1 ♀ *Microtus arvalis* (leg. M. Hamar); Buciumeni, 3.XII.1964, 2 ♂♂, 1 ♀ from *Arvicola terrestris* (L.), 3 ♂♂, 15 ♀♀ from *Microtus arvalis* (leg. M. Hamar); Cernica, 20.IX.1968, 5 ♂♂, 2 ♀♀ from *Apodemus sylvaticus*, 4 ♂♂, 9 ♀♀ from *Pitymys subterraneus* (de Selys Longchamps) (leg. M. Suciú); Cheia, 13 – 14 V. 1972, 1 ♂, 1 ♀ from *Clethrionomys glareolus* (Schreber) (leg. M. Suciú); Fundulea-Lizica, 11.VII.1965, 1 ♂, 2 ♀♀ from *Pitymys subterraneus* (nest), 11.V.1967, 1 ♂, 1 ♀ from *Apodemus microps* Krat. and Ros., 13.VI.1967, 1 ♀ from *Mus musculus*, 28.XI.1968, 1 ♀ from *Apodemus flavicollis* (Melchior) (leg. M. Hamar); Măgurele, 4.XII.1964, 1 ♂, 2 ♀♀ from

Microtus arvalis, 27.III.1965, 1 ♀ from *Microtus arvalis* (nest) (leg. M. Hamar); Mărculești, 3.XII.1964, 1 ♂, 1 ♀ from *Microtus arvalis* (nest) (leg. M. Hamar); Mogoșoaia, 27.III.1962, 1 ♂ from *Microtus arvalis* (leg. M. Hamar); Muntele Roșu, 14.V.1968, 1 ♂, 4 ♀♀ from *Apodemus sylvaticus*, 1 ♂, 1 ♀ from *Clethrionomys glareolus* (leg. M. Suci); Podul Dîmbovicioarei, 28.IX.1969, 2 ♂♂ from *Apodemus flavicollis*, 1 ♂, 2 ♀♀ from *Apodemus sylvaticus* (leg. Al. Popescu); Rucăr, 27.IX.1969, 2 ♂♂, 4 ♀♀ from *Apodemus sylvaticus* (leg. Al. Popescu); Runcu, 15.VIII.1965, 2 ♂♂, 1 ♀ from *Mus musculus* (leg. M. Hamar), paratypes; Sinaia, 18.VII.1961, 1 ♂ from *Apodemus sylvaticus*, 2.IX.1961, 1 ♂ from *Clethrionomys glareolus*, VIII.1962, 1 ♀ from *Clethrionomys glareolus*, 1.XII.1962, 1 ♂ from *Apodemus sylvaticus* (leg. St. Negru); IV.1962, 1 ♂, 1 ♀ from *Arvicola terrestris* (leg. G. Sin), 22 – 24.IX.1963, 2 ♀♀ from *Apodemus sylvaticus* (leg. P. Barbu), 11.VII – VIII.1965, 2 ♂♂, 3 ♀♀ from *Apodemus flavicollis* (leg. St. Negru), 27.II.1965, 1 ♀ from *Clethrionomys glareolus* (leg. M. Suci), paratypes, 4.VII.1966, 2 ♂♂ (one holotype), 4 ♀♀ (one allotype) from *Apodemus sylvaticus* (leg. M. Suci), 8 – 11.VII.1967, 2 ♂♂, 7 ♀♀ from *Apodemus flavicollis*, 1 ♀ from *Apodemus sylvaticus* (leg. M. Suci), 6 ♀♀ from *Apodemus sylvaticus* (leg. Al. Popescu), 12 – 13.VII.1968, 1 ♂ from *Apodemus sylvaticus*, 11 ♂♂, 7 ♀♀ from *Clethrionomys glareolus* (leg. M. Suci), 20 – 22.VII.1969, 2 ♂♂, 3 ♀♀ without hosts (leg. Al. Popescu); Zărnești, 29.IX.1969, 1 ♀ from *Apodemus sylvaticus* (leg. Al. Popescu), paratypes.

This material is in our collection, except for six males and five females which have been donated to the British Museum (Natural History).

DESCRIPTION

Male (Figs 1, 2). The dorsal lobe of the fixed process of clasper is coniform, the two bristles are spaced out and the posterior one is at some distance from the apex of dP¹; 5 – 6 fine apical setae. The ventral lobe is separated from the dorsal one by quite a deep sinus. The ventral lobe resembles that of subspecies *Ctenophthalmus agyrtes kleinschmidtianus* and *pelikani*, but differs from these by a large and deep sinus between dP² and dP³ and also by a smaller inclination of dP³. The apex of dP² forms a distinct hook. The apex of the distal arm of sternum IX resembles the blade of a grafting knife. The ventral aedeagal lamella is large, long and squamose, with a scalloped, rounded, ventral margin. Among the known subspecies of *Ctenophthalmus agyrtes*, this presents the most developed aedeagal lamella.

Female. This does not differ from related subspecies of *Ctenophthalmus agyrtes*. Posterior margin of sternum VII without a lateral lobe.

There are intermediate forms between *romanicus* × *pelikani* (1 ♂, Mărculești, XII.1964) and *romanicus* × *kleinschmidtianus* (1 ♂, Sinaia, VII.1968); they occur in districts between the ranges of the subspecies concerned.

Ctenophthalmus agyrtes romanicus parasitizes small mammals (Rodentia) of the families *Muridae* and *Microtidae*. This flea has a great ecological valence as regards hosts, vegetation zones and microclimate. It

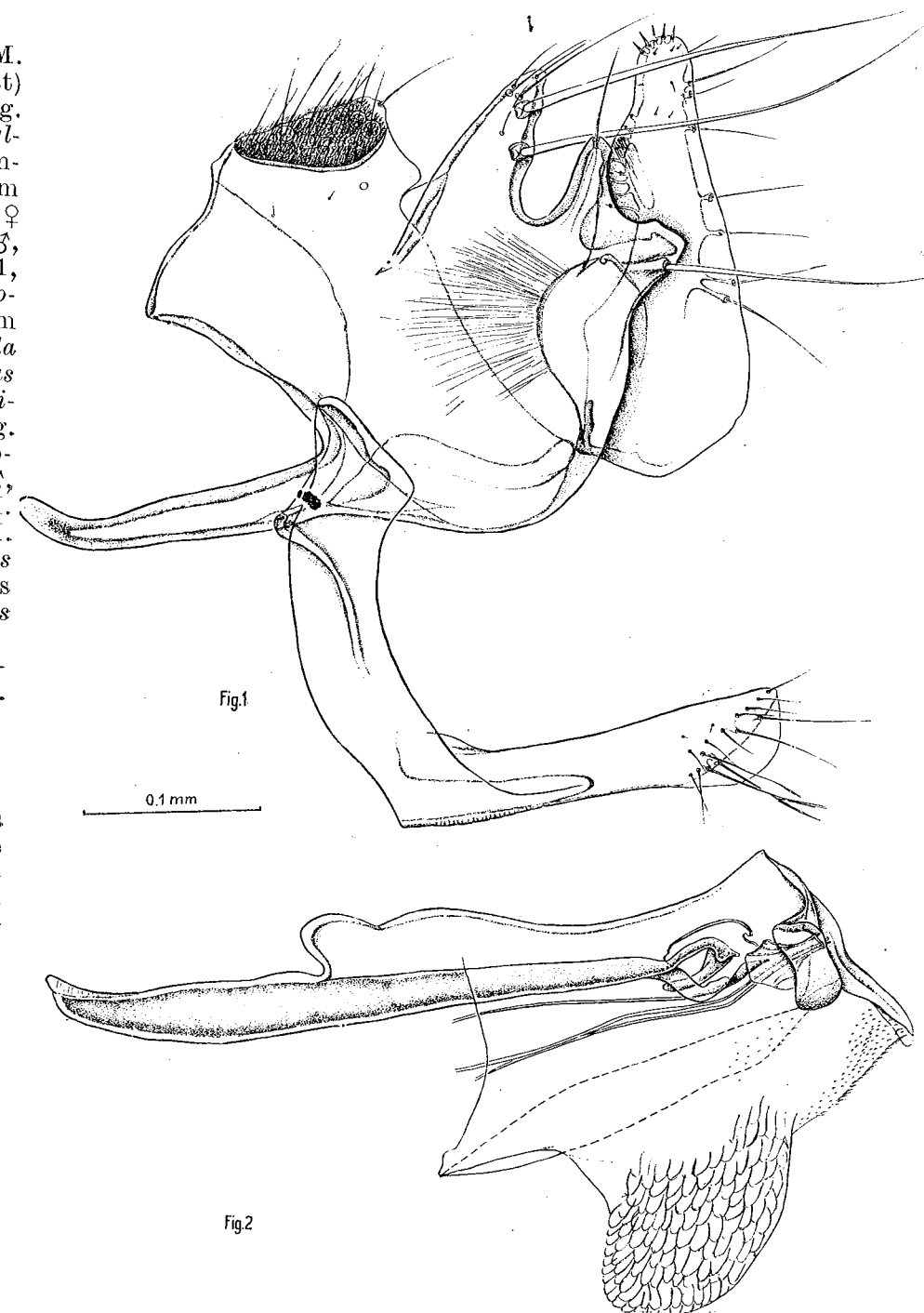


Fig. 1, 2. — *Ctenophthalmus agyrtes romanicus* n. ssp. Genitalia of male: 1, clasper and sternum IX; 2, aedeagus.

is frequent on *Apodemus sylvaticus* in the deciduous forests (Cheia, Rucăr, Sinaia) and coniferous forests (Muntele Roșu — 1200 m). *Microtus arvalis* is also a common host for this flea.

The frequency of occurrence of this flea depends on the population density of rodents in the different periods of the year and on their annual fluctuations. E.g., in the same locality (Sinaia) *Apodemus flavicollis* was prevalent in July 1967, but in July 1968 *Clethrionomys glareolus* prevailed.

Ctenophthalmus agyrtes romanicus is found mainly in the southern and eastern half of the country (Muntenia) and its eastern limit is reached at Buciumeni (Moldova).

We hope that further collecting will enable us to delimit the ranges of the various subspecies of *Ctenophthalmus agyrtes* in Romania.

Acknowledgements. I am much indebted to all colleagues who so kindly placed their collection at my disposal.

I express my thanks to Mr. F. G. A.M. Smit (British Museum, Natural History) for his critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. HOPKINS G. H.E., ROTHSCHILD MIRIAM, 1966, *An Illustrated Catalogue of the ROTHSCHILD Collection of Fleas (Siphonaptera) in British Museum (Natural History)*. IV, Trust of the British Museum, London.
2. PEUS F., 1950, *Syllegonema Biologica. Festschrift Kleinschmidt*, Lutherstadt, Wittenberg, p. 286—318.
3. ROSICKÝ B., 1959, Brněnské Základny Československé Akademie Věd, **30**, 7, 321—354.
4. — 1967, Československá parasitologie, **4**, 291—298.
5. SMIT F.G.A.M., 1966, Entomologische Berichten, **23**, 216—221.
6. — 1967, Ann. Naturhistor. Mus. Wien, **70**, 255—275.
7. SMIT F.G.A.M., SZABÓ I., 1967, Ann. Hist. Nat. Musei Nationali Hungarici, Pars Zoologica, **59**, 345—351.
8. SUCIU MARIA, 1970, *Contribuțiuni la studiul sistematic, ecologic și zoogeografic al sifonapterelor (Siphonaptera Latreille) din România* (thesis).

Received December 25, 1972

Faculty of Biology
Bucharest 35, Splaiul Independenței 93—95

SUR LA DÉCOUVERTE D'UNE ESPÈCE NOUVELLE DE MURIDÉ (RODENTIA, MAMMALIA) DANS LE PLÉISTOCÈNE MOYEN DE ROUMANIE

PAR

COSTIN RADULESCO et PETRE SAMSON

A new Murid species (*Rattus casimeensis* n. sp.) discovered in the Upper Mindel deposit from Gura-Dobrogei Cave (Department of Constanța) is described.

Dans une note préliminaire [3] concernant la découverte de faunes de Mammifères du Pléistocène moyen (Mindel), nous avons indiqué la présence du genre *Rattus* dans le dépôt mindélien final de la grotte de Gura-Dobrogei (département de Constantza). L'analyse du matériel nous a permis de reconnaître que nous avons affaire à une espèce nouvelle de Rat. Les données bien rudimentaires que nous possédons sur la physiologie et l'histoire phylétique des grands Muridés se réduisent, aux latitudes moyennes de notre Continent, à l'indication de l'existence du Rat noir [*Rattus rattus* (L.)] pendant le Pléistocène supérieur et l'Holocène dans un nombre très restreint de localités [1], [2]. Il convient de mentionner que l'introduction de *R. norvegicus* Berkenhout en Europe est très récente.

La découverte en Dobrogea d'une espèce de Rat datant du Mindel final élargit sensiblement nos connaissances relatives aux Muridés et nous fournit de nouveaux éléments dans une interprétation plus cohérente de l'écologie du Rat et des relations bio-géographiques établies entre les faunes de Roumanie et celles des régions de la Méditerranée orientale, depuis la Grèce jusqu'au Proche Orient.

Fam. MURIDAE GRAY, 1821

Genre : *Rattus* Frisch, 1875

Rattus casimeensis n. sp.

Type : mandibule dext. avec M₁₋₂ (Coll. Inst. Spéol.) (fig. 1).

Paratypes : deux mandibules (dext. avec M_{1-3} , sin. avec M_{1-2}), M_2 sin. (Coll. Inst. Spéol.).

Age géologique : Pléistocène moyen, phase plus tempérée du Mindel supérieur (phase de Gura Dobrogei-2) [3].

Localité : grotte de Gura Dobrogei (dép. de Constantza).

Derivatio nominis : d'après la rivière de Casimcea dans le bassin de laquelle se trouve la grotte de Gura Dobrogei.

Diagnose : espèce primitive de taille forte ; mandibule massive au diastème raccourci et branche horizontale assez haute ; molaires inférieures à couronne relativement basse avec lobes transversaux à pointe mésiale atténuée ; dissymétrie du chevron distal, l'hypoconide étant situé à un niveau bien postérieur à l'entoconide ; tubercule terminal modérément développé, déplacé vers le côté interne.

Mensurations (en mm) :

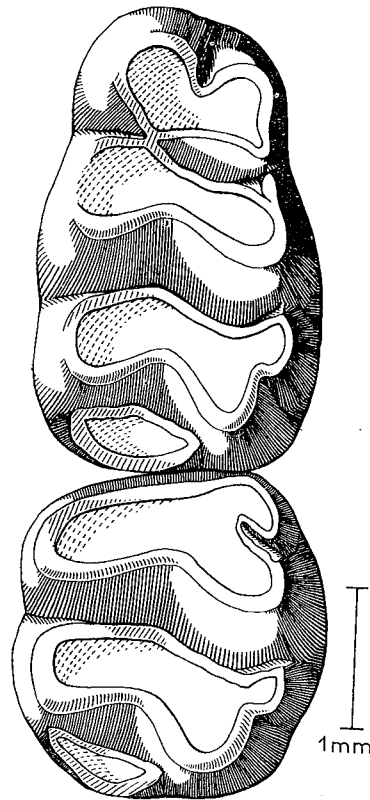


Fig. 1. — *Rattus casimcensis* n. sp. du Mindel supérieur de la grotte de Gura Dobrogei. M_{1-2} dext. (type) en vue occlusale.

marquée des chevrons postérieurs. La taille plus grande le distingue de *R. rattus* en même temps que la mandibule à diastème plus raccourci et branche horizontale plus haute le sépare de *R. norvegicus*. Comparativement à *R. haasi* Tchernov (Pléistocène supérieur d'Israël) [4], *R. casimcensis* présente, à une taille aussi forte, M_1 proportionnellement plus longue, M_3 beaucoup plus développée, le tubercule terminal des molaires plus large à position plus médiale et la dissymétrie des chevrons plus manifeste.

La découverte à Gura Dobrogei de *R. casimcensis* associé à *Crocidura*, *Sorex*, *Clethrionomys*, *Apodemus* et *Arvicola*, mais aussi en compagnie de *Lagurus* et *Eolagurus*, semble indiquer l'installation, après une

phase sèche et froide, d'une certaine humidité et l'adoucissement du climat. Cette phase plus tempérée paraît avoir permis l'avancement vers le Nord de quelques formes, parmi lesquelles aussi le Rat, du réservoir faunique des régions méditerranéennes orientales.

BIBLIOGRAPHIE

1. GROMOV I. M., 1961, Tr. kom. iz. tchetvert. per., **17**, 95-97.
2. JANOSSY D., 1961, Z. Säugetierkd., **26**, 1, 40-50.
3. SAMSON P., RĂDULESCO C., 1972, Trav. Inst. Spéol. «Emile Racovitza», **11**, 317-326.
4. TCHERNOV E., 1968, *Succession of Rodent Faunas during the Upper Pleistocene of Israel*. Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin, 69-71.

Rccu le 13 février 1973

Institut de Spéologie «Emile Racovitza»
Bucarest 35, Str. Dr. Capșa 8

	Type		Paratypes	
	dext.	dext.	dext.	sin.
longueur alvéolaire de M_{1-3}	7,7	7,65	7,6	
longueur de M_1	3,28	3,07	3,12	
longueur de M_2	2,35	2,07	2,07	
longueur de M_3	—	2,00	—	
longueur du diastème	6,15	—	—	
hauteur de la mandibule sous M_1	7,25	—	7,40	

Diagnose différentielle : *R. casimcensis* n. sp. s'écarte de *R. rattus* et *R. norvegicus* par ses molaires inférieures à couronne plus basse et par la dissymétrie

SUR LA MISE EN ÉVIDENCE DE LA SEXUALISATION
CYTOPLASMIQUE CHEZ LES GRÉGARINES
ENTEROCYSTIDAE À L'AIDE DES COLORATIONS
VITALES

PAR

DOÏNA CODREANU-BĂLCESCU

The different tinctorial reactions obtained with various vital stains on the cytoplasm of gamonts associated in syzygy were studied in four gregarines species of the genus *Enterocystis*, which is characterised by a marked morphological difference of the two conjugants.

The changes of vital staining was noticed with regard to the pairs age and cytoplasmic areas.

The cytoplasmic sexualisation processes are obvious but the cellular mechanisms of the differential vital staining has to be elucidated.

En même temps que la connaissance de leur cycle de reproduction, il a été montré que les Grégarines présentent dès leurs stades de syzygies, donc avant les phénomènes nucléaires de la gamogonie, des différences de sexualisation cytoplasmique, se manifestant par des affinités tinctoriales différentes entre le primite et le satellite (Léger et Duboscq, 1909, p. 43, pl. 1, 3). C'est D. Mühl [5], qui en y appliquant les colorations vitales au rouge neutre, a essayé d'expliquer cette diversification par des différences de pH entre les cytoplasmes des gamontes de sexe opposé.

Joyet-Lavergne (1924—1931) a le mérite d'avoir analysé sur une grande échelle ces phénomènes chez les plantes et les animaux pour définir la notion de « sexualisation cytoplasmique », qu'il fonde plus spécialement sur l'étude des Sporozoaires (Grégarines et Coccidies). Mais selon lui, il s'agirait surtout de différences de potentiels d'oxydo-réduction intracellulaires chez les deux sexes. Il admet que le cytoplasme femelle, généralement celui du primite, possède une capacité réductrice plus grande

que le cytoplasme mâle du satellite vis-à-vis des colorants vitaux qui pénètrent sous la forme de leucodérivés et sont réoxydés par la suite.

Cependant Rey [6] [7], en mesurant effectivement les potentiels d'oxydo-réduction des conjoints d'un même couple, les trouve équivalents, de même que leur pH intracellulaire, ce qui le porte à croire que les différences de colorabilité seraient dues à d'autres facteurs.

Il nous a semblé intéressant de reprendre ce problème à propos de quelques espèces de la famille des *Enterocystidae*, Grégarines parasites de l'intestin des larves d'Ephémères, parce qu'elles s'associent de très bonne heure en syzygies et acquièrent des différences notables de forme entre le primate et le satellite au cours de leur croissance. Ceci d'autant plus que Joyet-Lavergne (1931, p. 192—193) posait le problème des rapports entre la sexualisation cytoplasmique et les différences morphologiques des partenaires d'une même syzygie.

Tableau 1

Réaction différentielle des syzygies des Grégarines du genre *Enterocystis* à l'égard de quelques colorants vitaux

Colorant	Espèce et stade	Primate	Satellite
Bleu de Nil	<i>E. palmata</i> (jeunes)	bleu	bleu
	<i>E. palmata</i> (âgés)	violet bleuâtre devenant bleu de plus en plus foncé, par le bord frontal	rose jaunâtre, rose violacé, devenant bleu bleu
	<i>E. fungoides</i> (jeunes)	bleu	rose violacé définitif
	<i>E. fungoides</i> (adultes)	rose violacé devenant bleu intense par le bord frontal	
	<i>E. fungoides</i> (âgés)	bleu	rose
Bleu de méthylène	<i>E. fungoides</i> (âgés)	bleu	rose violacé
	<i>E. fungoides</i> (jeunes)	bleu	bleu
Bleu de crésyl	<i>E. fungoides</i> (adultes)	violacé devenant bleu	violet
	<i>E. palmata</i> (adultes)	bleuâtre	rose violacé
Vert Janus	<i>E. fungoides</i> (adultes)	bleu foncé	vert

Nous avons effectué des colorations vitales au rouge neutre et vert Janus, au violet de méthyle, bleu de méthylène, bleu de Nil, violet Dahlia, bleu de crésyl chez les espèces *Enterocystis fungoides*, *E. racovitzai* parasites de *Baëtis vernus*, *E. palmata* de l'intestin de *Baëtis buceratus* et *E. rhithrogenae* parasite de *Rhithrogena semicolorata* des ruisseaux de la haute vallée de Prahova.

Le tableau ci-joint réunit les principaux résultats obtenus.

Nos observations nous conduisent aux conclusions suivantes :

1. La coloration vitale comporte plusieurs phases, la première montrant le colorant qui vire et colore de la même manière les deux conjoints de la syzygie, où sa réoxydation se produit assez vite mais à des intervalles différents chez les deux sexes, en commençant par le primate, considéré

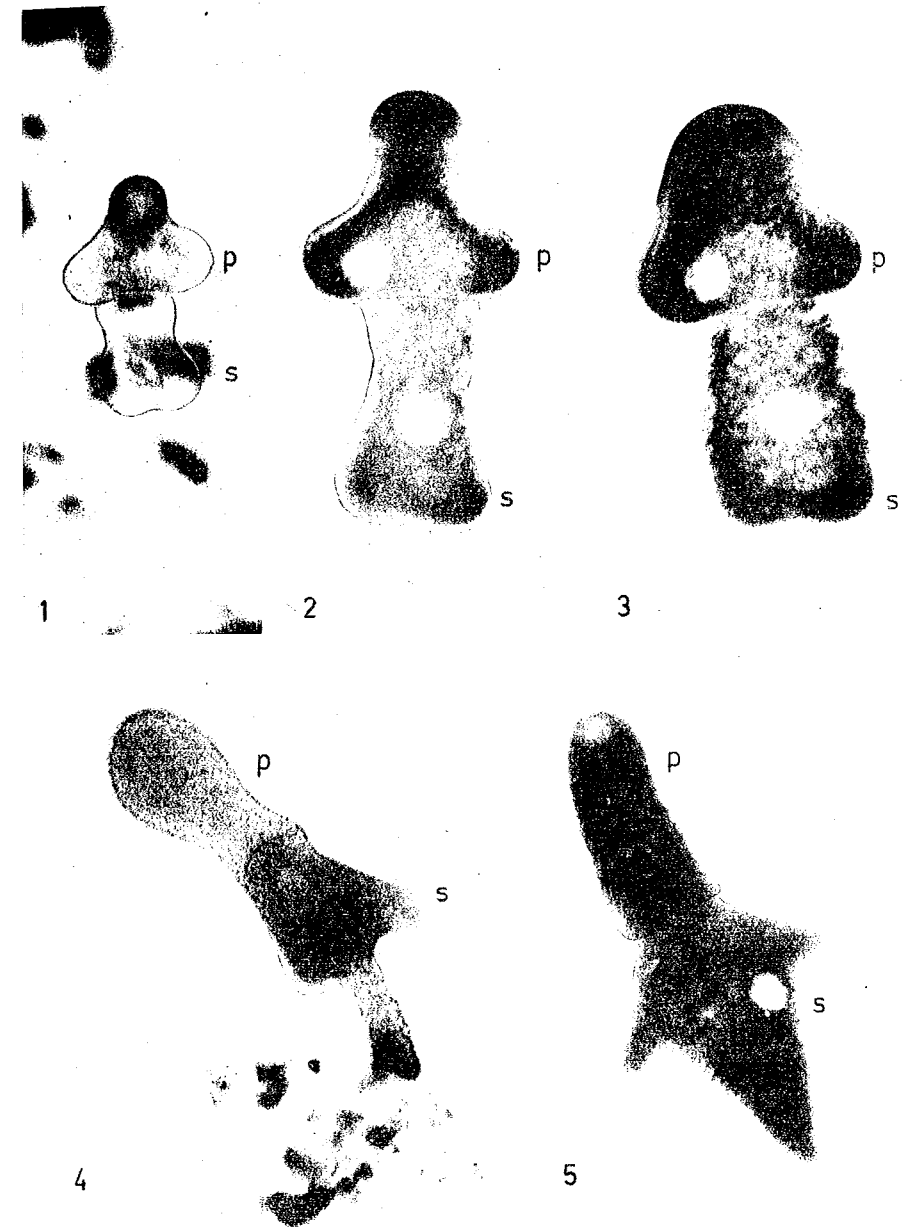


Fig. 1—3. — *Enterocystis fungoides*. Syzygies adultes, coloration vitale progressive au bleu de méthylène; primate (p) en bleu, satellite (s) en rose violacé.

Fig. 4—5. *Enterocystis palmata*. Syzygies adultes, coloration vitale au bleu de crésyl; primate (p) en bleu violacé, satellite (s) en violet.

comme étant femelle. L'absorption du colorant, de même que sa réoxydation, a lieu à partir de certains points, situés aux extrémités libres des deux gamontes. Par exemple, pour le bleu de méthylène, dans la première phase, le cytoplasme réduit le colorant en rose, alors que dans la seconde phase celui-ci se réoxyde en bleu, en commençant par le bord frontal du primite.

2. Les Grégarines d'un même hôte ne réagissent pas d'une manière synchrone et uniforme par rapport au colorant employé.

3. On constate selon les stades, des affinités différentes pour les colorants vitaux. Les très jeunes stades ne font pas virer le colorant, ce qui montrerait que leur cytoplasme ne serait pas encore sexuellement différencié, malgré leur détermination génétique initiale.

Il s'ensuit que les considérations de Joyet-Lavergne et de Rey sont susceptibles de plus de nuances, car les Grégarines offrent une gamme de réactions tinctoriales variables selon leur âge et le niveau cytoplasmique.

Si la coloration différentielle des deux gamontes ne s'explique effectivement pas par des différences de pH ou de potentiel d'oxydo-réduction, elle n'est pas moins réelle, se rattachant peut-être à des propriétés de perméabilité cellulaire ou d'activité enzymatique des constituants cytoplasmiques, que des recherches à venir sont appelées à élucider.

BIBLIOGRAPHIE

1. GÖHRE E., 1943, Arch. f. Protistenk. **96**, 295.
2. JOYET-LAVERGNE P. H., 1926, *Recherches sur le cytoplasme des Sporozoaires*. (Thèses), Paris.
3. — 1931, *La physico-chimie de la sexualité*. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
4. LÉGER L. et DUBOSCQ O., 1909, *Etudes sur la sexualité chez les Grégarines*. Gustav Fischer, Jena.
5. MÜHL D., 1921, Arch. f. Protistenk. **13**, 496.
6. REY P., 1931, C. R. Soc. Biol. Paris, **107**, 611.
7. — 1931, C.R. Soc. Biol. Paris, **107**, 1508.

Reçu le 30 janvier 1973

Institut de Biologie « Traian Săvulescu »
Laboratoire de Morphologie Animale



SUR LE COMPORTEMENT DU TISSU GLANDULAIRE
ENDOCRIN DES INSECTES GREFFÉ AUX
ARAIGNÉES

PAR

ELENA TRACIUC

The paper gives of account of the results obtained on the compatibility of transplants from Insects to Spiders and on the evolution of transplanted tissue during 21 days. The transplantation was followed by an intensive activity of blood cells from the hemolymph of the spiders and by structural modifications of these cells.

Nous avons décrit, dans une note antérieure, les effets extérieurs qui se sont manifestés après la greffe de glandes endocrines de l'insecte *Naupheta cinerea* à quelques espèces d'araignées. Ces effets sont d'ailleurs la preuve que l'on a réussi la greffe d'un groupe d'Invertébrés (insectes) à un autre groupe (araignées). Dans la littérature on mentionne des données sur le transfert d'hormones entre des espèces appartenant à un même groupe systématique, ou bien d'un groupe à un autre, mais pas d'insectes aux araignées, en utilisant la méthode des injections d'extraits d'hormones, de même que l'implantation de glandes endocrines [1] [2] [3] [4].

Dans la note présente on décrit l'évolution des glandes greffées, durant 21 jours après l'implantation. Les résultats obtenus nous permettront d'aborder à l'avenir le problème de l'immunité non spécifique chez les Arthropodes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

On a extirpé par dissection dans de la solution Ringer les glandes du système rétro-cérébral chez *Naupheta cinerea* et on a implanté sous la cuticule de chaque araignée deux glandes (*Corpora cardiaca* et *Corpora alata*). Les greffes ont été effectuées dans le thorax,

de même que dans l'abdomen d'exemplaires juvéniles et adultes des deux sexes, appartenant aux espèces suivantes d'araignées :

- | | | | | | |
|--------------------------------|---|---|-----------|---------------------------------|--|
| 1. <i>Xysticus cambridgei</i> | } | ♀ | stade IV | (21 jours après l'implantation) | |
| | | ♂ | stade III | (17 jours " ") | |
| 2. <i>Agelena labyrinthica</i> | } | ♀ | adulte | (15 jours " ") | |
| | | ♂ | stade V | (4 jours " ") | |
| 3. <i>Araneus diadematus</i> | | ♂ | adulte | (6 jours " ") | |
| 4. <i>Drassodes pubescens</i> | | ♂ | stade V | (2 jours " ") | |

Les animaux ont été narcotisés avant l'opération. Après l'intervention chirurgicale, les individus ont été maintenus dans la température de la chambre et fixés 2-21 jours, conformément au schéma ci-dessus pour chaque espèce. On a fait les fixations en solution Bouin et les inclusions à la paraffine. Les coupes ont été faites à 7 μ et colorées à l'hémalum Mayer pour les noyaux et à érythrosine orange G, molybdique pour le cytoplasme. On a fait ensuite des microphotographies.

MODIFICATIONS SUBIES PAR LE GREFFON

Quoique les glandes aient été introduites sous la cuticule abdominale dans des régions très différentes du corps des araignées (ventrale, dorsale, latérale), le tissu implanté a évolué en fonction du temps (de la durée de la greffe) et non de la région où il a été greffé. Malgré leur petite taille, les glandes du système rétrocébral sont pourvues d'une gaine qui leur permet de garder leur intégrité anatomique au moment de l'implantation.

Nous devons mentionner dès le début que, à partir du moment qu'on a fait la greffe, l'on constate une véhuculation plus intense de cellules sanguines appartenant à deux types, qui sont plus petites et plus rares chez les témoins. Le premier type est représenté par des cellules éosinophiles de très grande taille (à peu près 20 μ), à cytoplasme dense et à noyau petit, basophile et excentrique. Ces cellules présentent des mouvements amœboïdes et dans certains cas leur volume augmente (Pl. I, fig. 2).

Le second type comprend des cellules plus petites, basophiles, dont le cytoplasme contient de nombreuses granulations et le noyau est grand par rapport à la cellule et riche en chromatine (Pl. I, fig. 2).

Deux jours après l'implantation, on observe des cellules sanguines basophiles dans le voisinage des glandes implantées. La gaine des glandes est intacte et les cellules gardent leur intégrité tant en ce qui regarde le cytoplasme que le noyau, qui est sphérique et chargé de granulations basophiles. Selon son aspect, la glande semble continuer son activité fonctionnelle pendant 48 heures dans le corps étranger (Pl. I, fig. 1).

Après quatre jours, les cellules de la glande conservent encore leur forme, mais parmi elles commence à circuler l'hémolymphe de l'araignée parce que dans certains endroits le tissu conjonctif de la gaine glandulaire a été lysé. La glande ne garde plus son intégrité mais revêt, sur les coupes, l'aspect de cordons cellulaires espacés (Pl. I, fig. 3). Parallèlement à la

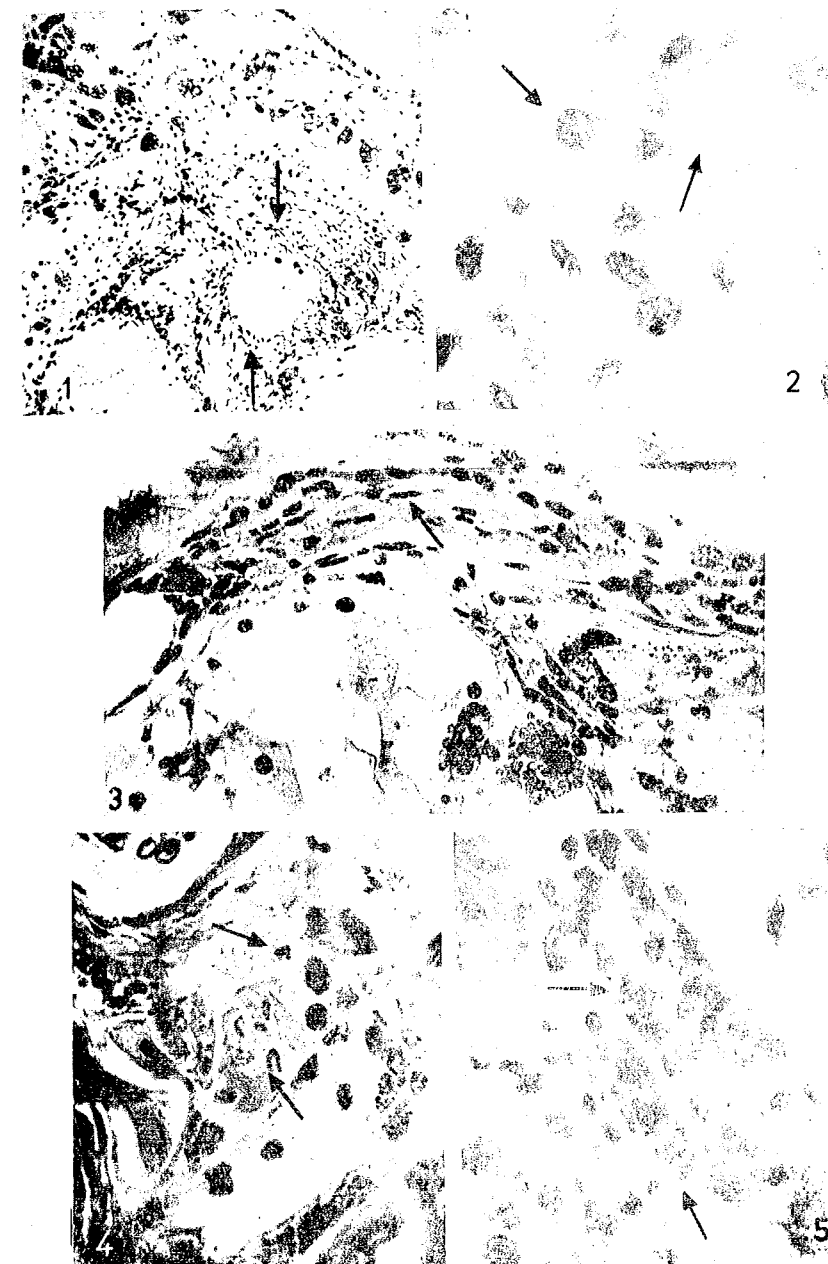


Fig. 1. — Aspect général des glandes implantées, après 48 heures.
 Fig. 2. — Véhiculation de cellules sanguines basophiles et éosinophiles.
 Fig. 3. — Noyaux comprimés — commencement de pycnose, après 6 jours.
 Fig. 4. — Cordons cytoplasmiques éosinophiles à noyaux pycnotiques, 15 jours après l'implantation.
 Fig. 5. — Activité des cellules sanguines basophiles à l'intérieur de la glande implantée.

disparition de la gaine glandulaire on constate aussi la lyse de la membrane de certaines cellules glandulaires. Dans les espaces séparant les cordons cellulaires de la glande on observe des agglomérations de cellules sanguines basophiles (Pl. I, fig. 5).

Après six jours, quoique les glandes greffées gardent encore une intégrité d'ensemble, conservant leur position d'implantation, leurs cellules perdent l'aspect caractéristique. Leur cytoplasme étant homogène, contracté et concentré en bandes denses alternant avec des bandes claires, sans limites cellulaires, nous pensons que les cellules sont mortes et qu'elles n'ont plus l'aspect de cellules fonctionnelles. L'aspect général du cytoplasme rappelle celui des fibres du tissu conjonctif sclérosé. Les noyaux sont disposés sur ces bandes cytoplasmiques denses, leur taille a diminué, ils sont comprimés et ratatinés et gardent encore des granulations basophiles intenses. Ces modifications semblent indiquer que les noyaux commencent à dégénérer.

Dans la partie de la glande profondément implantée on observe une invasion de cellules sanguines éosinophiles, dont le rôle pourrait être celui de phagocytes (Pl. I, fig. 2).

Après 15 jours les cordons cytoplasmiques sont fragmentés; dans les coupes histologiques ils ont l'aspect de masses compactes fortement éosinophiles, entre lesquelles circule l'hémolymphe de l'abdomen. Une activité intense semble avoir lieu à la limite des masses glandulaires et de l'hémolymphe chargée de cellules sanguines (Pl. I, fig. 4).

Après 17 jours il ne reste de la glande implantée qu'une masse cytoplasmique désorganisée, éosinophile, contenant peu de noyaux pyknotiques. Cette masse cytoplasmique contractée est fragmentée en plusieurs portions entre lesquelles circule l'hémolymphe de l'abdomen et tous ses éléments (Pl. II, fig. 1,2).

21 jours après la greffe on ne constate plus de traces du tissu implanté sur les coupes histologiques chez certains animaux, tandis que chez les autres il n'en reste qu'une cicatrice (Pl. II, fig. 3).

CONCLUSIONS

Comme suite à l'incision, la couche active du tégument se régénère totalement après quatre jours. Les cellules de cette couche ne sont plus cubiques, la nouvelle couche ayant un aspect pavimenteux.

Après six jours on constate à la surface du tégument une masse chitineuse pluristratifiée, couvrant toute la région où le tégument a été coupé.

Les glandes greffées semblent continuer leur activité physiologique pendant 48 heures; durant cette période leurs hormones sont actives.

Après 48 heures commence le processus de dégénérescence des glandes qui débute avec le cytoplasme, non pas avec les noyaux.

Nous pensons qu'à ce processus de dégénérescence participent au commencement des cellules sanguines, véhiculant des enzymes, tandis que les cellules amœboïdes à rôle phagocytaire interviennent plus tard.

PLANCHE II



Fig. 1. — Fragments des cordons cytoplasmiques sclérosés, à noyaux pyknotiques; 17 jours après l'implantation.

Fig. 2. — Noyaux des cellules glandulaires dispersés dans une masse cytoplasmique diffuse, entourée de cellules sanguines basophiles; 17 jours après l'implantation.

Fig. 3. — Section dans la cicatrice du greffon, 21 jours après l'implantation. Cuticule chitineuse épaissie, à couche tégumentaire basale pavimenteuse.

Fig. 4. — Section par la cuticule du témoin.

Vers la fin, le processus dégénératif est parfois rapide, quoiqu'à commencement il semble se dérouler assez lentement.

BIBLIOGRAPHIE

1. LUTZ H., 1969, *Cultures d'organes d'invertébrés*. Univ. Clermont Ferrand, Paris.
2. NOVÁK V. J. A., 1966, *Insect Hormones*. Methuen & Co. L.T.D., London.
3. SEHNAL F., 1971, *Endocrines of Arthropodes*. Chemical Zoology, **6**, 307-345.
4. TRACIUC E., 1973, Rev. roum. biol.-Série de Zoologie, **18**, 1, 45-47.

Reçu le 24 novembre 1972

*Institut de Biologie « Traian Săvulescu »
Laboratoire de Morphologie animale*

ANNULATE LAMELLAE IN FISH OOCYTES

BY

MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL

The investigation of the ultrastructure of sturgeon and teleost young oocytes has revealed some morphological evidence regarding the origin and development of the annulate lamellae. The nuclear origin of these organelles has been confirmed and the folds of the nuclear envelope have to be involved in their formation. Annulate lamellae may be observed within the nucleus and in the perinuclear region, in late oocyte stage the stacks of annulate lamellae taking place in any region of the ooplasm.

Morphological relationships of the annulate lamellae with other cell structures in fish oocytes provided information on their functional significance.

Lamellar structures, present especially in the cytoplasm and called annulate lamellae, were found with increased frequency in a considerable variety of cell types. They have been described in the cytoplasm of germinal, somatic cells [23], [27] and in the cells undergoing pathological alterations. More rarely they were recorded within the nucleus [10], [13], [17]. This suggests that annulate lamellae play a more important role in the cell activity, representing a phase in its evolution. They appear best developed in young cells during the development and differentiation [23]. In the female sexual cells these organelles have been described in invertebrates: *Ilyanasa* [28], *Thyone* [13], *Styela* [14], *Potamoceros* [7], *Boltenia* [10], *Spisula* and *Otala* [22], and in vertebrates: teleosts [1], [6], amphibians [11], [12], [30], reptiles [21], birds [3], mammals [8], [26], being especially evident in human oocytes [9], [29], [32].

There is an agreement between authors concerning the shape of these formations, but not concerning their evolution. Studies carried out on oocytes belonging to different animal groups — ascidians [10], [14], holothurians [3], amphibians [12], [32], mammals [8], [29] — have shown that annulate lamellae originate from vesicles appearing in the

outer nuclear membrane from interannular zones; yet Merriam [17] believes that the above-described process actually may represent the degenerescence, not the formation of annulate lamellae. Afzelius [1, 2] thinks that annulate lamellae may originate through the fragmentation of the nuclear membrane which takes place after the metaphase. According to the opinion of many other authors, the annulate lamellae originate from the folds of the nuclear membrane [4], [22], [27], separate from the nucleus and become free in the cytoplasm.

In fish oocytes these formations were only briefly mentioned. During a recent investigation of the fine structure of some fish oocytes, morphological evidence has been accumulated on the origin and development of the annulate lamellae and the relationships of these organelles with other cell structures.

MATERIAL AND METHODS

Portions of the ovary containing oocytes in different phases of development were obtained from two quite distinct groups of fishes: sturgeons (*Acipenser guldensadtii* Brandt, *Acipenser ruthenus* L.) and teleosts (*Syngnathus* sp., *Gobius* sp., *Enophrys bubalis* L.). For light microscope investigations usual fixations (Bouin, Carnoy, Zenker) and usual coloration methods (Azan, APS-picro-indigo-carmin, hematoxylin, etc.) were used. For electron-microscopical investigations the pieces of ovary were prefixed in cacodylate-buffered 2% glutaraldehyde and postfixed in either 1% or 2% solution of osmium tetroxide buffered with sodium cacodylate or phosphate. Subsequent to rapid dehydration and treatment with propylene oxide, the oocytes were embedded in araldite and epon-812. Ultrathin sections were stained after Reynolds and examined at a JEM-7 electron microscope.

RESULTS

In the young oocytes of both sturgeons and teleosts the ooplasm is relatively undifferentiated. The structural components consist of relatively few mitochondria, numerous particles similar to ribosomes as well as a great number of vesicles distributed throughout the ooplasm. The nucleus has a regular shape and shows, clearly marked, the two osmophile membranes, at whose level a dense granular material is concentrated (Pl. I, fig. 1). As the oocytes develop, the numerous annuli begin to form in the nuclear envelope and the dense granular material is passing through them (Pl. I, fig. 2).

The annuli have a round shape. A homogeneous matrix of moderate density may be observed inside and between them. This material also seems to be continuous with the nuclear complex at the inner surface of the nuclear envelope.

In the late oocyte stage the nuclear envelope undergoes a considerable folding. The folds appear in the outer membrane of the nuclear envelope, gradually becoming independent of, and parallel with it (Pl. II, figs 3, 4, 5). Lamellar formations can be seen also within the nucleus (Pl. II, figs 3, 4). The intranuclear annulate lamellae occur singly rather than grouped in stacks. Their structural characteristics appear essentially similar to those of the nuclear envelope.

In sturgeon oocytes the nuclear envelope undergoes a considerable folding (Pl. III). The numerous small mitochondria are located in the perinuclear cytoplasm or near the nuclear envelope. Some of the numerous folds of the nuclear envelope can separate and remain independent within the cytoplasm (Pl. III, figs 6, 7). A more advanced phase of the previtellogenesis is not accompanied, in sturgeons, by an increase of the number of annulate lamellae within the oocyte cytoplasm. The usual structures found are the mitochondria, a great number of ribosomes and Golgi complexes disposed especially in the peripheral region of the ooplasm. The lamellae of the rough endoplasmic reticulum are lacking. The existing vesicles belong to the smooth endoplasmic reticulum and their size is variable.

The development of teleost oocytes is accompanied by an increase of the number of annulate lamellae which form the stacks. These are present in the perinuclear region as well as throughout the whole cytoplasm. Both the length of the lamellae and the number of lamellae comprised in a single stack are variable. The number of lamellae may vary from two to a few dozen. These organelles are persistent but they are prominent or best developed in the ooplasm at the beginning of vitellogenesis (Pl. IV, figs 8, 9). Annulate lamellae present the already described classical characters. They possess certain structural characteristics of both the nuclear envelope and the granular endoplasmic reticulum. The lamellae are equally distant from one another and their regular disposition is evident both in longitudinal and in transversal sections (Pl. IV). In each lamella, the annuli are separated from each other by a distance varying with the inclination degree of the section plane. A dense granular electronic material is present in the lumen of the annuli; between the annuli there are, besides the granular material, also fine filaments (Pl. II, fig. 4; Pl. IV, fig. 9). This dense material is associated with that from the annuli of the nuclear envelope and it was suggested that it may represent ribonucleoprotein in non particulate form [17].

The annulate lamellae are connected with the ribosomes which are arranged along the outer surface of the lamellae as well as in the ooplasm between the lamellae. These organelles may be continuous. The lamellar elements of the endoplasmic reticulum appear in the developing teleost oocyte before and after indication of yolk deposition. This configuration of the annulate lamellae demonstrates that their function is similar to that of annulate lamellae described in that oocytes of other animal groups.

DISCUSSION

The morphological variations of the oocytes in different stages of development consolidate the conclusion that annulate lamellae originate, in teleosts, through the undulation and delamination of the nuclear envelope; in sturgeons also a fragmentation of the nuclear envelope may occur. Their formation is similar to that described by Bol et al. [4] in *Arbacia punctulata*, and differs from that described by Kessel in *Styela* [14], *Thyone* [13] and *Necturus* [12], according to which the annulate

lamellae derive from a blebbing of the outer nuclear envelope. The morphogenesis of these organelles suggests that the regular disposition of annuli is a result of the fusion of vesicles of similar sizes.

I found but few vesicles in the ooplasm of the examined species of sturgeons and teleosts and they were neither grouped together, nor fused.

In the teleost oocytes, these lamellae are present already in the early stages, their number increases as the oocytes develop and they are well differentiated in the first stages of the vitellogenesis. In sturgeons they can appear in previtellogenic oocytes, characterized by an intense undulation of the nuclear envelope and their shape is not constant.

The close relations between this structure and the rough endoplasmic reticulum justify the opinion, accepted by most authors, that annulate lamellae represent specialized forms of the ergastoplasm [11], [15], [16]. Besides, the variation of the number of lamellae during the vitellogenesis in *Triton* was considered by Humeau and Temple [11] a consequence of the transformation of the reticulum into lamellae; the phenomenon could be reversible.

Observing the dilatations of terminal sacculi of the annulate lamellae and their continuity with the endoplasmic reticulum systems in the oocytes of *Triton*, Wischnitzer [31] believes that annulate lamellae are structural precursors of the reticulum.

The functional significance of annulate lamellae is not yet clear. Their morphological similarity and close relations with the nuclear envelope, as well as the high content of RNA suggest that they play an important role in the selections and transfer of material from the nucleus to the cytoplasm [24], [27]. Humeau and Temple [11] even think that the metabolic role of the annuli of annulate lamellae is identical to that of the nucleus.

Many authors, including myself, appreciate that the fine filaments in the annuli and their association with the granular dense material are similar with those of the nucleolar material. In early development stages of the oocytes, the nucleolar material has direct contact with the annuli of the nuclear envelope. In late oocyte stages the precursors are stored in annulate lamellae and can arrive in the peripheral zone of the ooplasm where they remain in a masked form. This opinion is justified by the data obtained by Kessel [15] in *Ophioderma* and by Bol et al. [4] in *Arbacia punctulata*. The presence of masked messengers was noticed also by Spirin [25] in sea urchin eggs. Kessel and Beams [16] suggest that annulate lamellae may furnish to the reticulum an informational material (RNA-protein for the biosynthesis of the special proteins during some periods of differentiation and growth of the oocyte.

Moyer and Verhey [18] think that the beginning of intense protein synthesis after the egg fecundation may be, partially, a consequence of the synthesis of new ribosomes by annulate lamellae. This seems probable, as far as the activity of the nucleolus and the synthesis of RNA-r do not begin till the stage of gastrula is reached; the phenomenon was described in echinoderms by Nemer [19].

Other interesting findings in fishes confirm also in teleost oocytes most of the published data about the close relationships between annulate lamellae and the rough endoplasmic reticulum [15], [16], etc.

PLATE I



Fig. 1. — The appearance of a sector in the adrenal gland of *Phalacrocorax carbo* with islets of chromaffin cells distributed amongst interrenal cords (Bouin-Hollande; hemalum-eosin).

Fig. 2. — Chromaffin islet with the dark cells confined especially to the periphery of islet (Bouin-Hollande; hemalum-eosin).

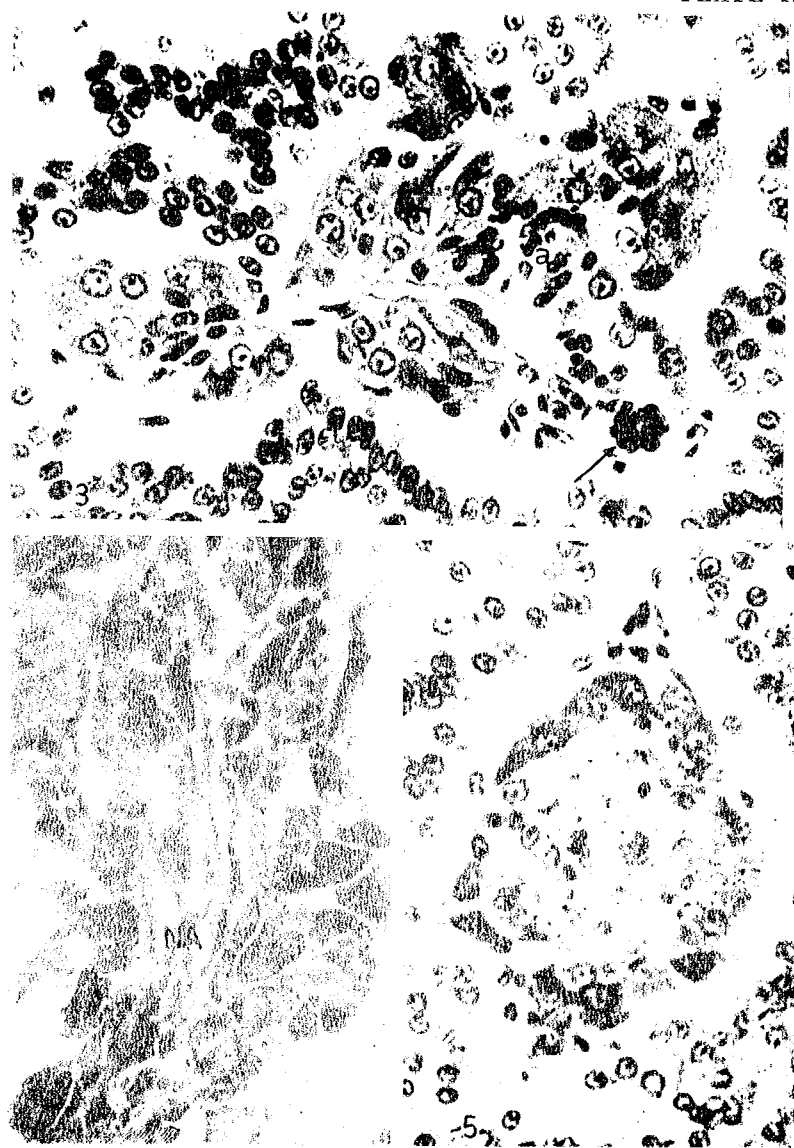
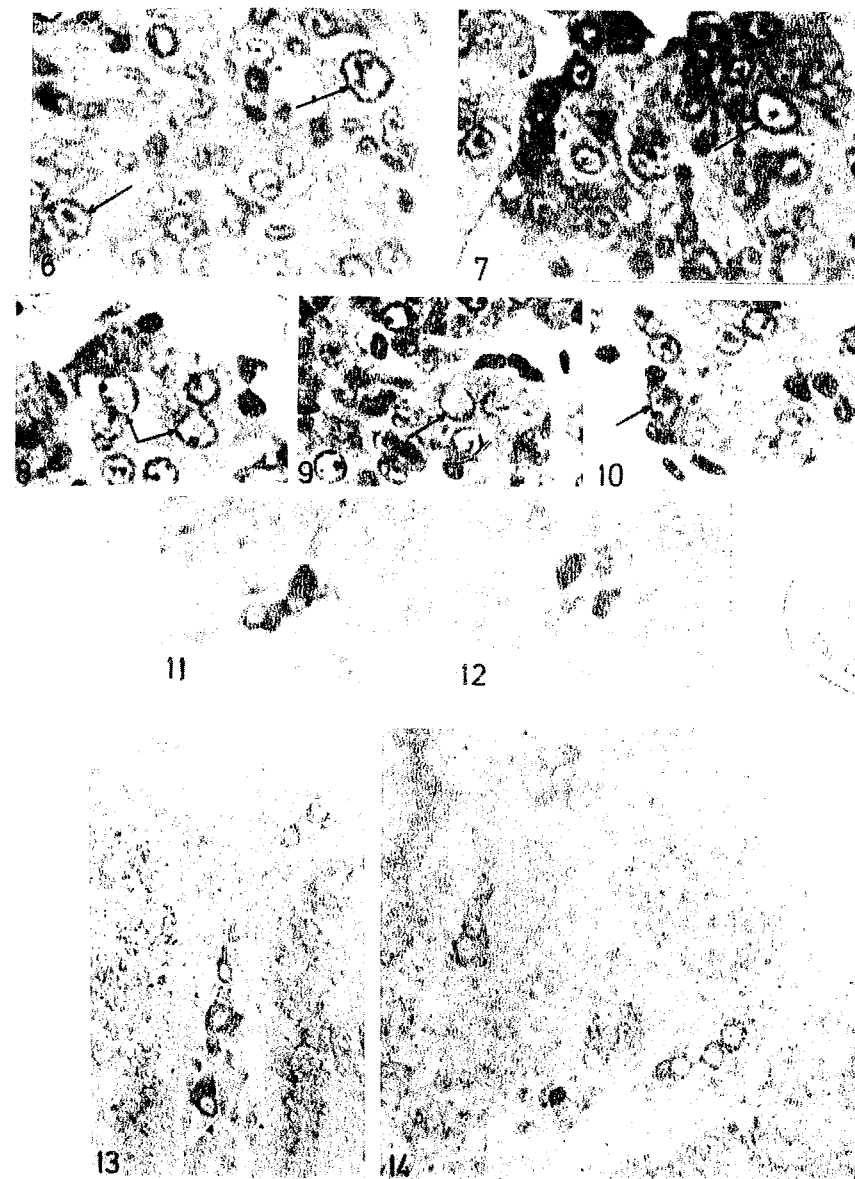


Fig. 3. — Chromaffin islet with a little artery (*a*) and a group of lymphocytes (arrow). (Bouin-Hollande; hemalun-eosin).

Fig. 4. — Chromaffin islet in which adrenaline-containing cells (dark), noradrenaline-containing cells (light, denoted *NA*) as well as intermediate cells were revealed (potassium chromate and potassium bichromate; Mallory).

Fig. 5. — Chromaffin islet exhibiting the dark cells confined to the periphery of islet (Bouin-Hollande; hemalun-eosin).



Figs 6 and 7. — Hypertrophic nuclei in the chromaffin cells (Bouin-Hollande; hemalun-eosin).

Figs 8, 9 and 10. — Eosinophilic drops included in the nuclei of some chromaffin cells (Carnoy; hemalun-eosin).

Figs 11 and 12. — Clusters of neurons, small in size, located among the chromaffin cells in the deeper zone of the adrenal gland (Bouin-Hollande; thionine blue).

Figs 13 and 14. — Big neurons located among the chromaffin cells in the peripheral zone of the gland (Bouin-Hollande; thionine blue).

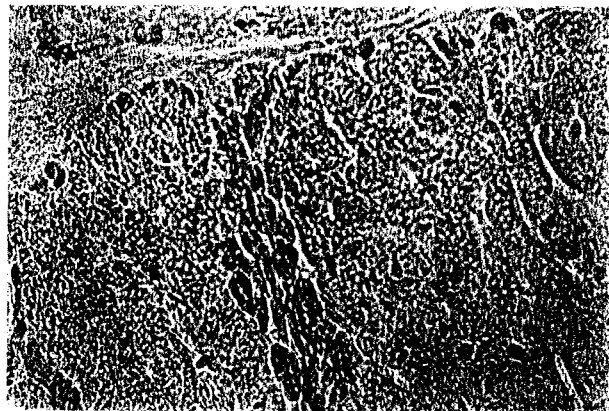
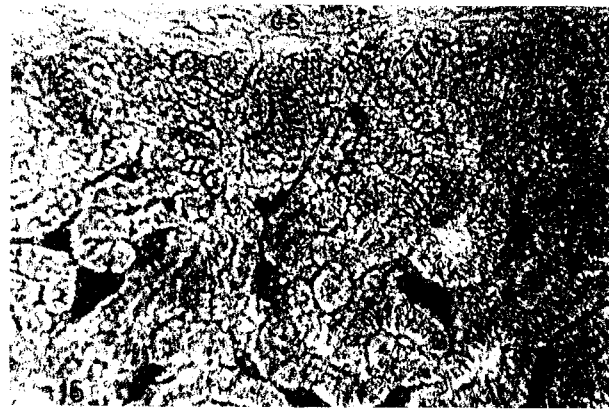
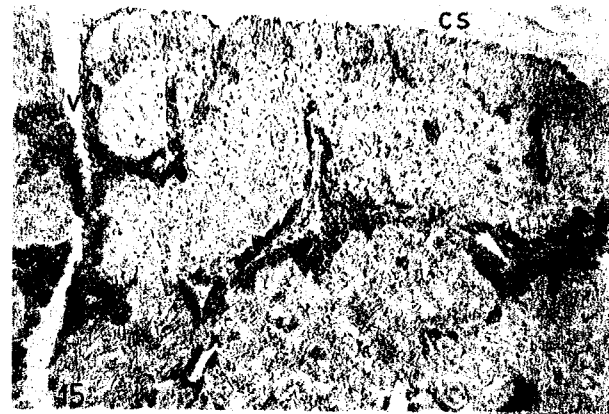


Fig. 15. — Part of the adrenal gland exhibiting chromaffin islets accompanying blood vessels (*v*). Note that the islets in the subcapsular zone are small in size; *cs*, conjunctive capsule (chromaffin reaction according to Hillarp and Hökfelt).

Fig. 16. — Part of adrenal gland exhibiting the subcapsular zone without chromaffin cells; *cs*, conjunctive capsule (chromaffin reaction according to Hillarp and Hökfelt).

Fig. 17. — Part of adrenal gland exhibiting a few chromaffin cells located under the conjunctive capsule (*cs*) (chromaffin reaction according to Hillarp and Hökfelt).

In the young sturgeon oocytes, both vesicular and lamellar rough endoplasmic reticulum are absent, a fact which suggests different functional relations between annulate lamellae and other cytoplasmic structures.

REFERENCES

1. AFZELIUS B. A., 1955, *Exp. Cell Res.*, **8**, 147.
2. — 1957, *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, **45**, 660.
3. BELLAIRS R., 1967, *J. Embr. exp. Morphol.*, **17**, 267.
4. BOL A. K., JOUBINVILLE F., COUSINEAU G. H., INOUÉ S., 1968, *J. Ultrastruct. Res.*, **25**, 15.
5. DHAINAUT A., 1970, *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **95**, 511.
6. GOTTING K. J., 1966, *Helgol. wissensch. Meeresunt.*, **13**, 118.
7. GWYNN I. A., BARTON R., JONES P.C.T., 1971, *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, **112**, 390.
8. HADEK R., 1963, *J. Ultrastruct. Res.*, **8**, 170.
9. HERTIG A. T., 1968, *Amer. J. Anat.*, **112**, 107.
10. HSU W. S., 1967, *Z. Zellforsch.*, **52**, 376.
1. HUMEAU C., TEMPLE D., 1969, *C. R. Soc. Biol.*, **163**, 1897.
2. KESSEL R. G., 1963, *J. Cell Biol.*, **19**, 391.
3. — 1964, *J. Ultrastruct. Res.*, **10**, 498.
4. — 1965, *J. Cell Biol.*, **24**, 471.
5. — 1968, *J. Cell Biol.*, **36**, 658.
3. KESSEL R. G., BEAMS H. W., 1969, *J. Cell Biol.*, **42**, 185.
7. MERRIAM R. W., 1959, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 117.
3. MOYER F. H., VERHEY C. A., 1965, *Amer. Zoologist*, **5**, 199.
9. NEMER M., 1965, *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, **50**, 230.
0. PALADE G. E., 1955, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**, 567.
1. PORTE A., ZAHND J. P., 1961, *C. R. Soc. Biol.*, **155**, 1058.
2. REBHUN L. I., 1961, *J. Ultrastruct. Res.*, **5**, 208.
3. ROSS M. H., 1962, *J. Ultrastruct. Res.*, **7**, 373.
1. RUTHMANN A., 1958, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 267.
5. SPIRIN A. S., 1966, *Current Topics Develop. Biol.*, **1**, 1.
3. STEGNER H. E., 1967, *Ergeb. Anat. Entw. gesch.*, **39**, 1.
7. SWIFT H., 1956, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 415.
3. TAYLOR G., ANDERSON E., 1969, *J. Morphol.*, **129**, 211.
3. WARTENBERG A., STEGNER H. E., 1960, *Z. Zellforsch.*, **52**, 450.
1. WISCHNITZER, S., 1964, *J. Ultrastruct. Res.*, **10**, 14.
1. — 1970, *Wilhelm Roux Archiv.*, **164**, 279.
2. ZAMBONI L., MISHALL D. R., BELL J. H., BACA M., 1966, *J. Cell Biol.*, **30**, 579.

Received January 26, 1973

The Institute of Biological Sciences
Ultrastructure Department
Bucharest 17, Splaiul Independenței nr. 296

STRUCTURE OF CHROMAFFIN CELLS IN THE
ADRENAL GLAND OF *PHALACROCORAX*
CARBO L.

BY

ANCA PETRESCU-RAIANU

Adrenal gland in *Phalacrocorax carbo* is built up according to the general pattern described for birds. Chromaffin cells are distributed as islets spread amongst the interrenal cords and may be divided into three classes: adrenaline-containing cells, noradrenaline-containing ones and intermediate cells containing both catecholamines. Most chromaffin islets contain cells belonging to each of the three types. Adrenaline is the preponderant amine within the gland. Large quantitative variations of the two amines occur from one individual to another. No sex-related peculiarity was found as to the morphology of chromaffin cells or the distribution of catecholamines.

Chromaffin cells in the adrenal medulla of mammals were approached in many works, detailed data in the literature being concerned with their structure at the optic as well as electronic level [7], [19], [25], [27]—[30], [37]—[42], [45], with their function and the effect of different factors that influence it [5], [6], [9], [20], [23], [25], [43], with their chemical constituents [7], [9], [15], [19], [32], [33], [39], [40] and so on. The differences in the structure of adrenal gland between birds and mammals, mainly the different relationships between chromaffin and cortical (interrenal) tissues in these two classes of vertebrates, might result in the occurrence of morpho-functional features specific for each of the two groups. As different viewpoints occur in the literature as to the specificity of the cells producing adrenaline and noradrenaline, as well as to their interrelationships, their demonstration and quantitative estimation in the adrenal gland of *Phalacrocorax carbo* appear to be of the highest interest.

REV. ROUM. BIOL. — ZOOLOGIE, TOME 18, No 3, p. 203—209, BUCAREST, 1973

MATERIAL AND METHODS

Adrenal glands from 6 males and 11 females of adult *Phalacrocorax carbo*, captured in the Danube Delta during September and October, were fixed in the following mixture: Bouin-Hollande, Carnoy, Orth, potassium chromate + potassium bichromate at pH 5.6 (according to Hillarp and Hökfelt) and potassium bichromate + formaldehyde. Sections were stained with hemalun-eosin and trichrom Azan (for the study of chromaffin cells structure) and with a 0.1 p.c. solution of thionine (for the selective demonstration of neurons). In order to demonstrate catecholamines, Hillarp and Hökfelt chromaffin reaction was performed, with a staining procedure using a mixture of aniline blue, orange G and phosphomolybdic acid according to Mallory, was used in order to distinguish between adrenaline and noradrenaline. For the quantitative estimation of the two amines, cell countings were performed on preparations with distinctly stained cells by this last method, the results being expressed in p.c. values.

RESULTS

The adrenal gland in *Phalacrocorax carbo* consists of interrenal cells disposed as cords which enclose chromaffin cells groups of different size (Figs 1 and 2). The chromaffin islets are separated from the interrenal cords by a thin layer of conjunctive tissue (Figs 2 and 3). The number of chromaffin cells in an islet ranges from three to several ten, occasionally reaching values higher than one hundred per islet. In the peripheral zone of the gland, chromaffin islets are much smaller as compared to those in the inner part. Close below the conjunctive capsule interrenal cords occur with only rare small islets consisting of 3—6 chromaffin cells (Figs. 15—17). Subcapsular islets are not often larger size.

The chromaffin islets contain sinusoid capillaries and, sometimes, venules and arterioles, too (Fig. 3). In several preparations the chromaffin cells appear to border blood vessels along a major part of their length (Fig. 15).

Most chromaffin cells are polyhedric, but sometimes they are elongated. The nuclei are spherical in shape, vesicular, scarcely chromatin and exhibiting as a rule one nucleolus. The nuclei are central in location, only rarely being located at one pole of the cell. In several individuals nuclei of unusual large size, sometimes giant ones, were recorded, the frequency, as well as their maximum size depending upon the given individual (Figs 6—7).

The chromaffin cells belong to two classes according to their appearance: some are light, clear, the remaining ones being darker, basophilic. The latter are less frequent and generally confined to the periphery of the islets, close to the interrenal cords (Figs 2 and 5). The cytoplasm of several chromaffin cells shows a vacuolization, the extent of which depends upon the individual under study (Figs 3 and 5). In several individuals, nuclei of chromaffin cells were observed to contain one or more eosinophilic drops included in a perfectly clear vacuole, which displaces the chromatin and the nucleolus towards the periphery of the nucleus, sometimes resulting in distortions of this latter (Figs 8—10).

These drops were not often seen to leave the nucleus or to occur in the cytoplasm. The low occurrence of these drops in the cytoplasm suggests some rapid alteration of this product in the cytoplasm.

The neurons included in the chromaffin islets in *Phalacrocorax carbo* could be ascribed to two types: the first type consists of big neurons with vesicular, scarcely chromatic nuclei, an abundant cytoplasm and well marked Nissl bodies, located in the islets of the outer part of the gland (Figs 13 and 14); the other type consists of neurons much smaller in size, with a highly basophilic cytoplasm, located either as single cells, or in clusters of 2—3 neurons dispersed among the chromaffin cells of the islets belonging to the central part of the adrenal gland (Figs 11 and 12).

Using the chromaffin reaction according to Hillarp and Hökfelt we failed to distinguish with certainty the two types of chromaffin cells. However, a successful distinction became possible by the Mallory staining applied to sections fixed in bichromate-containing solutions. Thereby, a clear-cut distinction was made between adrenaline-containing cells, stained in blue, noradrenaline-containing cells, stained in yellow-orange and a third type—intermediate cells (Fig. 4). As to their distribution within the gland, exclusively mixed islets consisting of adrenaline-cells,

Table 1
Number of the adrenaline-containing cells (A-cells), noradrenaline-containing cells (NA-cells) and intermediate cells (I-cells) in the chromaffin tissue of *Phalacrocorax carbo* (males)

No.	Peripheral islets			Central islets		
	A-cells p.c.	NA-cells p.c.	I-cells p.c.	A-cells p.c.	NA-cells p.c.	I-cells p.c.
1	64.5	15.9	19.6	53.4	24.6	21.9
2	38.3	20.2	41.8	24.3	31.1	44.6
3	56.1	7.6	36.4	25.2	24.8	50.0
4	38.0	16.3	45.7	42.8	18.8	38.5
5	66.3	17.7	16.0	47.4	24.4	28.1

Table 2
Number of the adrenaline-containing cells (A-cells), noradrenaline-containing cells (NA-cells) and intermediate cells (I-cells) in the chromaffin tissue of *Phalacrocorax carbo* (females)

No.	Peripheral islets			Central islets		
	A-cells p.c.	NA-cells p.c.	I-cells p.c.	A-cells p.c.	NA-cells p.c.	I-cells p.c.
1	61.8	5.4	32.8	69.2	5.7	25.1
2	60.1	17.9	22.0	62.4	24.3	13.3
3	92.5	3.2	4.3	71.8	13.2	15.0
4	69.3	18.1	12.6	51.5	22.0	26.5
5	56.7	21.6	21.6	46.7	13.3	40.0
6	61.9	10.9	27.2	63.9	17.1	19.0
7	52.9	16.4	30.7	44.8	16.9	38.3
8	43.0	28.9	28.1	46.3	26.7	27.0
9	60.1	15.5	24.4	59.4	13.7	26.9
10	46.9	34.4	18.8	60.9	15.2	23.9
11	29.1	22.6	48.2	28.1	18.7	53.2

noradrenaline-cells and intermediate cells occur in the central part. The islets in the peripheral zone of the gland are generally mixed, too; however, islets consisting exclusively of one type of cells often occur. As seen from the two tables, adrenaline appears to be the preponderant catecholamine in the peripheral zone, as well as in the central one. Leaving aside the data recorded for the last female individual (Table 2), the conclusion might be drawn that in the peripheral islets the adrenaline percentage is higher than in the central ones (Tables 1 and 2). It should be noted that large quantitative variations of the two catecholamines occur from one individual to another, for both sexes.

DISCUSSION

Phalacrocorax carbo L. is a species in which the amount of chromaffin tissue in the adrenal gland does not exceed 9 — 25 p.c. of the total volume, depending on the sex-cycle phase [26]. In this respect it is quite similar to *Pelecanus occidentalis* in which chromaffin tissue covers 10 — 15 p.c. of the adrenal gland [18], [34]. For other bird species, high values of the chromaffin tissue volume are reported in the literature [3] [17], [24], [35], [36]. The location of chromaffin tissue within the gland seems to depend somehow upon its amount. In species exhibiting a larger volume of chromaffin tissue (*Columba livia*, *Heliornis fulica*, *Circus nigrolineata*, *Trogon curvii tenellus*, *Jocana hypomelaena*), the subcapsular region is usually occupied by strands of medullary cells which form a continuous layer below the capsule [16], [35]. In *Phalacrocorax carbo* not only the continuous subcapsular layer of chromaffin tissue is lacking but the chromaffin islets themselves in the peripheral zone are very small.

As to the location of the two catecholamines within the gland, marked differences occur not only between different bird species, but within reptilian and mammalian classes as well. The preferential location of a given catecholamine in a particular region of the gland seems not to be governed by a precise law. For several reptilian groups, the distribution of catecholamines was described by Gabe et al. [10]—[13]. In *Anas boschas* and *Gallus domesticus*, according to Arvy [1] and Sivaram [36], adrenaline is predominant in the peripheral zone and noradrenaline in the central one, while in *Columba livia*, according to Ray and Ghosh [31], noradrenaline is predominant in the subcapsular zone, in the central islets both catecholamines co-existing. In *Phalacrocorax carbo* our data indicate a preponderance of adrenaline both in the peripheral islets and in the central ones. The ratio between adrenaline and noradrenaline amounts is higher in the peripheral zone, for most individuals. This could be accounted for by the occurrence in the peripheral zone of some factor favourable to the methylation of noradrenaline; however, as in 6 out of 16 cases studied, the reverse situation occurs, a limitation should be kept in mind for this possibility. Thus, no precise law could be found so far, to govern the distribution and location of the cells with adrenaline and noradrenaline within the chromaffin tissue.

Another question not yet satisfactorily answered concerns the occurrence in different proportions of the two catecholamines in different

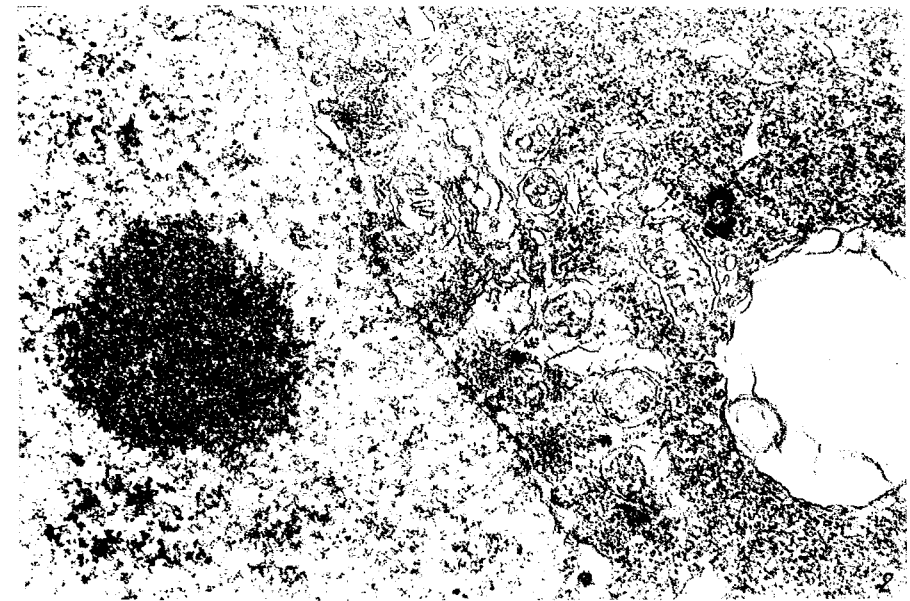
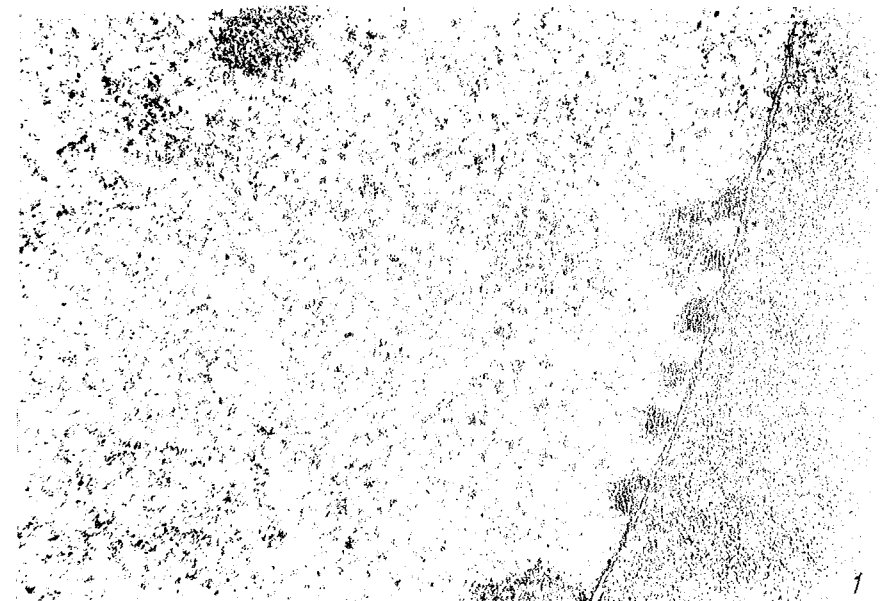


Plate I. Young oocytes in teleosts.

Fig. 1. — Section through an oocyte of *Enophrys bubalis* L. One remarks the double nuclear membrane without annuli. A dense granular material is accumulated near the inner surface. $\times 24,500$.

Fig. 2. — Section through an oocyte of *Gobius niger* L. Annuli are present at the level of the nuclear membrane and the nucleolar material is passing through them. $\times 27,650$.

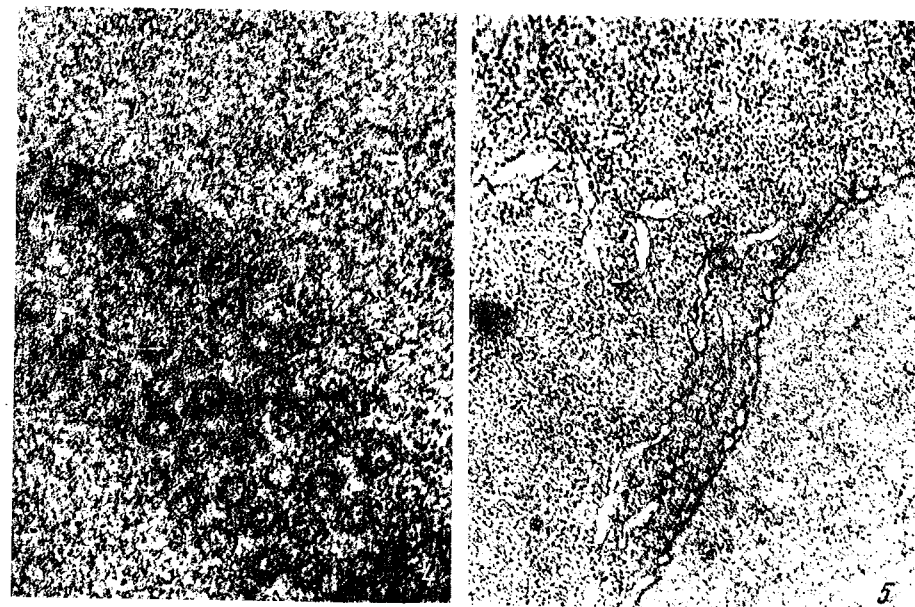


Plate II. Annulate lamellae developed in a young oocyte of *Syngnathus*.

Fig. 3. -- Annulate lamellae are present in the nuclear plasma and in the perinuclear ooplasm. $\times 15,600$.

Fig. 4. -- Structure details at the level of annuli in transversal section. Dense granular material and fine filaments are present in the inside of the annuli and between them. $\times 44,240$

Fig. 5. -- Structure details of lamellae in longitudinal section, resembling the nuclear membrane structure. $\times 27,650$.

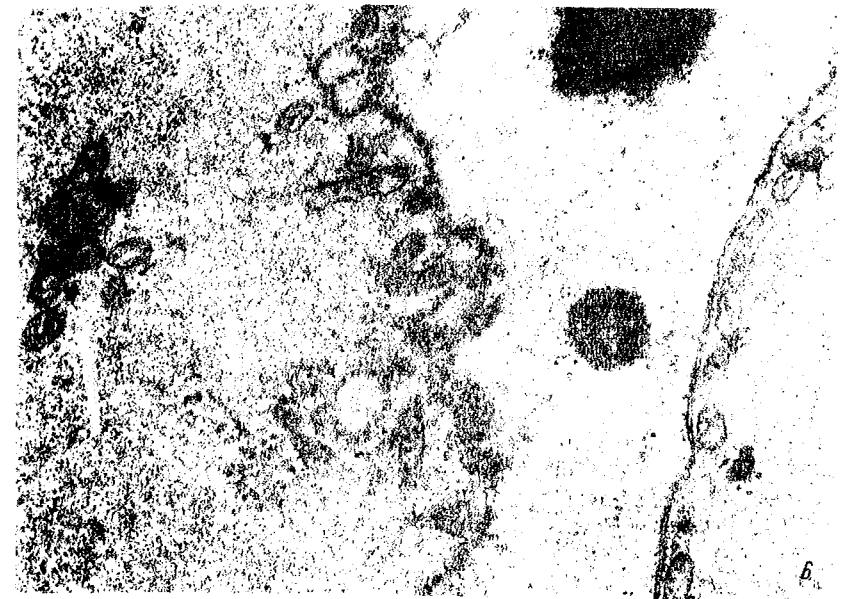


Plate III. Oocytes of *Acipenser ruthenus* L. during the previtellogenesis.

Fig. 6. -- The nucleus shape changes. Mitochondria are grouped near the nuclear membrane. $\times 17,100$.

Fig. 7. -- The ooplasm continues to be slightly differentiated. The nuclear membrane has numerous pores. Annulate lamellae are present in the perinuclear ooplasm. $\times 10,150$.

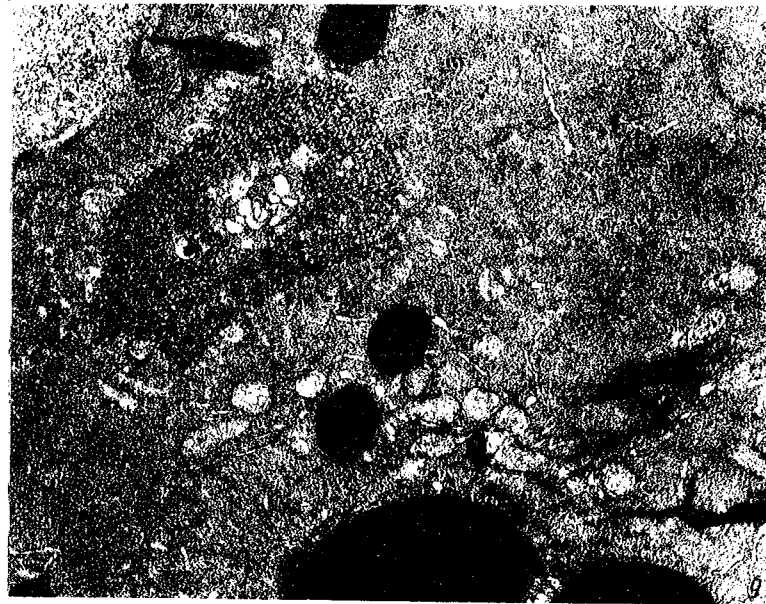
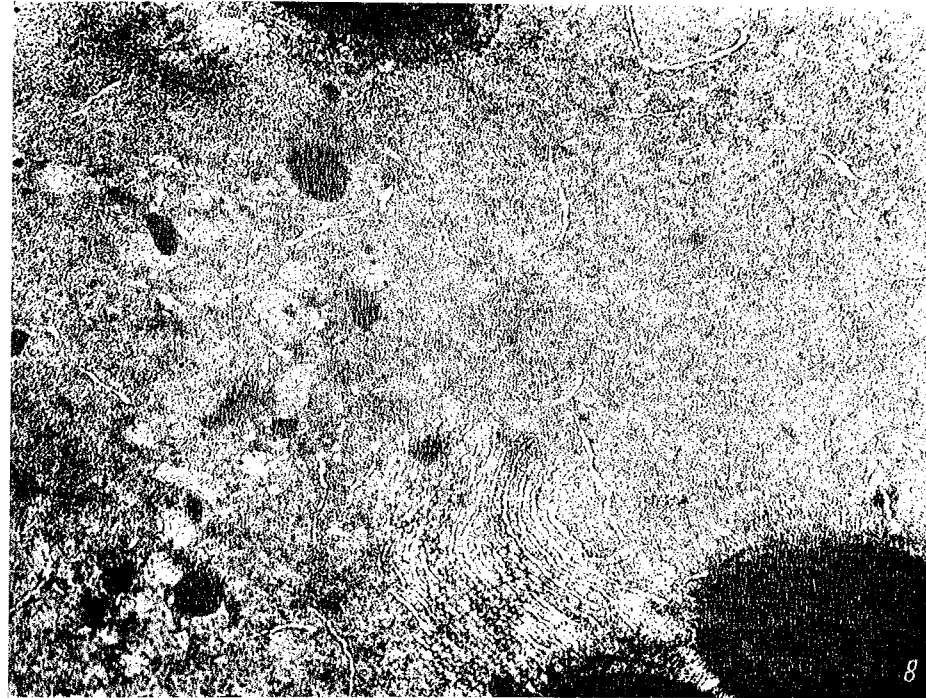


Plate IV. Oocyte of *Gobius* at the end of the previtellogenic and the beginning of the vitellogenic periods.

Fig. 8. — Annulate lamellae in the ooplasm. One remarks the regular disposition of lamellae and of the annuli. $\times 13,100$.

Fig. 9. — Group of the annulate lamellae. Transversal sections. $\times 7,000$.

species. Species were found, such as the rabbit and the guinea-pig [7], [30], which practically lack noradrenaline; in other species, the noradrenaline amount reaches considerable values. The same is true for birds and reptiles. The differences in the relative proportion of the two amines were tentatively explained by the behaviour of the animals, the aggressive ones containing larger amounts of noradrenaline [15]. Ghosh and Ghosh suggest a relation between the relative proportion of the two catecholamines and the phylogenetic evolution, based upon the fact that representatives of the genera *Anas* and *Gallus* (as primitive ones) synthesize mainly noradrenaline, while the Passeriformes (as a more recent group) display a higher percentage of adrenaline [14]. Our data do not support either of the above hypotheses. *Phalacrocorax carbo* is a carnivorous, predatory species and phylogenetically, a primitive one. According to both hypotheses, noradrenaline is expected to be the predominant amine in the adrenal glands of the cormorants, but the highest values recorded by us range between 28 and 31 p.c. In spite of the broad individual variation indicated by our data, in no case noradrenaline was the preponderant amine.

A very exciting point related to the chromaffin cells is the ability to synthesize both catecholamines in the adrenal gland of vertebrates. The question arose whether there are two types of chromaffin cells with distinct morphological and biochemical features, sometimes with locational specificity, each of which secretes a particular amine, or whether there is a single type of chromaffin cells, able to synthesize both amines ascribable to different morphological appearances, corresponding to successive phases within a secretory cycle? The observations indicating a precise location of the cells with adrenaline or noradrenaline in different parts of the gland in mammals [7], [19], [37], [38], [42], as well as in birds [1], [31], [35] and reptiles [2], [4], [10]—[13], [21] seem to support the former opinion. Picard Vitry et al. claim that the cells with adrenaline (hyalochromic) and those with noradrenaline (ragiochromic) are two morphologically distinct aspects of chromaffin cells, corresponding to different stages of the secretory cycle [6], [27]—[29], [39]—[41]. The above assumption is based upon the occurrence of cells with intermediate features between hyalochromic and ragiochromic cells, which were not mentioned so far by most investigators, but which were clearly demonstrated by us in the chromaffin tissue of *Phalacrocorax carbo* with a considerable frequency (20 — 30 p.c.). If the occurrence of intermediate cells is kept in mind in relation with the mechanism of adrenaline biosynthesis, namely with its terminal phase (i.e. methylation of noradrenaline), the conclusion that the cells with adrenaline and those with noradrenaline are two phases of the same secretory cycle seems reasonable. A further support to the above assumption is provided by the conclusion of Wurtman et al., namely that all the chromaffin cells are potentially able to transform noradrenaline in adrenaline, but only under certain conditions [44]. However, we do not agree with Cotte et al., which simply consider noradrenaline only as a precursor of adrenaline [6]. Since in many species the noradrenaline amount is a considerable part of the total amine content, since it was found in the effluent adrenal blood under normal conditions, and since during the early developmental stages nor-

adrenaline is the only amine detectable in the adrenal gland, noradrenaline should be considered as a genuine hormone required for the normal functioning of the organism.

CONCLUSIONS

1. The adrenal gland in *Phalacrocorax carbo* is built up according to the general pattern described in birds, except for several peculiarities such as the ratio between interrenal and chromaffin tissues, which is higher than in other species, the location of chromaffin tissue mainly in the central part of the gland and less in the peripheral zone.

2. The chromaffin cells in the adrenal gland of *Phalacrocorax carbo* may be divided into three classes: adrenaline-containing cells, noradrenaline-containing cells and intermediate cells, containing both catecholamines.

3. Though large individual variations occur as to the relative amount of the two catecholamines, adrenaline appears as the preponderant amine in the adrenal gland of *Phalacrocorax carbo*.

4. No sex-related peculiarity was found as to the morphology of chromaffin cells and the distribution of adrenaline and noradrenaline within the gland.

REFERENCES

1. ARVY L., 1961, C. R. Soc. Biol., **155**, 1, 69 — 71.
2. BENEDECZKY I., PUPPI A., TIGYI A., 1965, Acta biol. Acad. Sci. Hung., **15**, 3, 271 — 284.
3. BHATTACHARYA T. K., GHOSH A., 1965, Acta biol. Acad. Sci. Hung., **16**, 1, 69 — 77.
4. BIGARDI A. M., DONOSO A. O., 1967, Life Sci., **1967**, **6**, 1, 79 — 83.
5. BRUDIEUX R., DELOST P., 1967, C. R. Soc. Biol., **161**, 10, 1982 — 1986.
6. COTTE C., MONNERON A., MICHEL-BICHET M., PICARD D., 1964, Bull. Ass. Anat., **49**, 485 — 493.
7. COUPLAND R. E., PYPER A. S., HOPWOOD D. A., 1964, Nature, **201**, 4925, 1240 — 1244.
8. DEGAN C., MIHAIL N., ASANDEI A., 1960, Studia Univ. Babeş-Bolyai, Ser. 2, **2**.
9. ERÄNKÖ O., LEMPINEN M., RAISAINEN L., 1966, Acta physiol. scand., **66** 253.
10. GABE M., MARTOJA M., 1961, Arch. Anat. Micr. Morph. exp., **50**, 1, 1 — 34.
11. — 1962, Arch. Anat. Micr. Morph. exp., **51**, 107 — 123.
12. GABE M., MARTOJA M., SAINT-GIRONS H., 1964, Ann. Biol., **3**, 7 — 8, 303 — 376.
13. GABE M., RANCUREL P., 1964, Arch. Anat. Micr. Morph. exp., **53**, 3, 225 — 240.
14. GHOSH I., GHOSH A., 1964, Ztscht. Biol., **114**, 5, 400 — 404.
15. GOODALL M. C., 1951, Acta physiol. scand., **24**, Suppl. 85.
16. HARTMAN F. A., ALBERTIN R. H., 1951, Auk, **68**, 202 — 209.
17. HÖHN E. O., 1961, *Biology and Comparative Physiology of Birds*, Ed. by A. J. Marshall, Acad. Press, New York—London, vol. II, p. 87 — 114.
18. KNOUFF R. A., HARTMAN F. A., 1951, Anat. Rec., **109**, 161 — 167.
19. LANZA G., 1962, Bull. Ass. Anat., **112**, 322 — 326.
20. LEACH C. S., LIPSCOMB H. S., 1966, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **130**, 2, 448 — 451.
21. LOFTS B., PHILLIPS J. G., 1965, J. Endocrinol., **33**, 2, 327 — 328.
22. MARINESCU V., PĂUŞESCU E., IONESCU M., 1965, *Catecholaminele*, Ed. Acad. Bucharest.
23. MILCU S., LUNGU A., 1963, *Hormonii și viața*, Ed. științifică, Bucharest.
24. MILLER R. A., RIDDLE O., 1942, Amer. J. Anat., **71**, 311.
25. MONNERON A., PICARD D., VITRY G., 1963, J. Physiol., **55**, 2, 302 — 303.
26. PETRESCU-RAIANU A., 1971, Rev. roum. Biol. — Zool., **16**, 6, 375 — 381.

7. PICARD D., CHAMBOST G., VITRY G., 1953, C.R. Soc. Biol., **147**, 460 — 462.
8. PICARD D., VITRY G., 1959, C. R. Ass. Anat., **56**, 599 — 608.
9. — 1964, Arch. Biol., **75**, 3-4, 453 — 496.
10. PICON R., 1964, Arch. Anat. Micr. Morph. exp., **53**, 4, 343 — 356.
11. RAY I., GHOSH A., 1961, Acta histochem., **11**, 1 — 4.
12. ROFFI J., 1968, Ann. Endocrinol., **29**, 3, 277 — 300.
13. ROFFI J., JOST A., REDON A., 1966, C. R. Acad. Sci., D, **263**, 1992.
14. SHERIDAN M. N., BELT W. D., HARTMAN F. A., 1963, Acta anat., Suisse, **53**, 55 — 65.
15. SINHA D., RAY I., GHOSH A., 1959, Nucleus, **2**, 2, 171 — 178.
16. SIVARAM S., 1965, Can. J. Zool., **43**, 6, 1021 — 1031.
17. SMOLLICH A., 1967, Endokrinologie, **52**, 1-2, 110 — 119.
18. — 1967, Z. Mikroskop. Anat. Forsch., **7**, 1, 73 — 89.
19. VITRY G., 1964, Ann. Histochem., **9**, Suppl. 1.
20. — 1967, Arch. Anat. Micr. Morph. exp., **56**, 1, 31 — 42.
21. VITRY G., COTTE C., CHAU HUU H., CHAMBOST G., 1964, C. R. Soc. Biol., **5**, 1109.
22. WOOD J. G., 1963, Amer. J. Anat., **112**, 3, 285.
23. WURTMAN R. J., 1966, Endocrinology, **79**, 608 — 614.
24. WURTMAN R. J., AXELROD J., TRAMEZZANI J., 1967, Nature, **215**, 5103, 879 — 880.
25. YATES R. D., 1964, Anat. Rec. **149**, 2, 237 — 250.

Received Decembre 15, 1972

The Institute of Biological Sciences
Department of Animal Morphology
Bucharest 17, Splaiul Independenței nr. 296

DER EINFLUß DES THYROXINS (T_4), THIOURAZILS (Tu)
UND DES TSH AUF DIE GEWEBEATMUNG
DES KARPSENS

VON

MÁRTA GÁBOS, E. A. PORÁ, CARMEN ANDREA-POPÚ
und HERTA FLATZ

The effect of thyroxine (T_4), TSH and thiouracyl (Tu) treatment on the oxygen consumption of the white muscle (WM), red muscle (RM), liver (L) and kidney (K) was followed in carp.

T_4 -acute induces a significant decrease of oxygen consumption while the chronic treatment leads to a significant increase in all of the investigated tissues, excepting the K. The TSH produces an increase of the oxygen consumption only in RM, in the 3-days variant, while in that at 6-days variant it elicits a highly significant increase in WM, RM and K. Tu-acute had no effect upon this parameter and at the same time the chronic treatment determines a significant rise of the oxygen consumption in WM, RM and L, without modification in K.

Es ist bekannt, daß die Schilddrüse in der hormonellen Kontrolle des Sauerstoffverbrauches des Körpers eine Hauptrolle spielt. Die biochemischen Beweise der experimentellen Befunde zeigen den Einfluß der Schilddrüse in der Regelung der Oxydations- und Atmungsprozesse. Der Wirkungsmechanismus ist noch ungeklärt. In dieser Hinsicht sind mehrere Hypothesen aufgestellt worden. [12 — 15], [18], [19].

Der wärmebildende Einfluß der Schilddrüse ist bei den Warmblütern allgemein anerkannt [13], [14], [23], [26]. Dieser Einfluß ist bei den Kaltblütern schwer oder unmöglich zu beweisen. Wie Matty [16] und Hoar [10] behaupten, ist die Kontrolle des Atmungsstoffwechsels bei Kaltblütern nicht vom Thyroxin abhängig. Das Eingreifen der Schilddrüse in die Gewebeatmung ist bei den Fischen noch ungenügend erforscht. Die, bis nun, bei verschiedenen Arten erzielten experimentellen Befunde sind zum Teil widersprüchlich [1], [3], [7—10], [16], [17]. Von diesen

Voraussetzungen ausgehend, verfolgten wir den Sauerstoffverbrauch verschiedener Gewebe, sowie die nach Behandlung mit T₄, Tu und TSH auftretenden Veränderungen des Sauerstoffverbrauches beim Karpfen.

MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche wurden an zweijährigen Karpfen ausgeführt, die in mit Frischwasser durchströmten Becken ohne Nahrung gehalten wurden. Die Tiere wurden in 7 Versuchsgruppen eingeteilt:

1. Kontrollgruppe mit Schriever-Serum injiziert
 2. akut-0,24 mg/kg Körpergewicht
Behandlung mit T₄ (L-tiroxine sodium Salz Serva)
 3. chronisch - 0,96 mg/kg Körpergewicht im Laufe von 7 Tagen verabreicht (0,24 mg den 1-ten Tag und je 0,12 mg/kg 6 Tage lang)
Behandlung mit Tu (2-Thiouracylum puriss, SERVA)
 4. akut - 3 mg/kg Körpergewicht
 5. chronisch - 9 mg/kg Körpergewicht im Laufe von 7 Tagen verabreicht (3 mg den 1-ten Tag und je 1mg/g 6 Tage lang).
Behandlung mit TSH (Thyreotrophinum e gland. pituit, lyophilisat AMBINON)
 6. 1 I. E./kg Körpergewicht - 3 Tage vor dem Töten der Tiere verabreicht
 7. 1 I.E./kg Körpergewicht - 6 Tage vor dem Töten der Tiere verabreicht
- Alle zu injizierenden Substanzen wurden in Schriever-Serum [20] gelöst. Die Verabreichung der oben angegebenen Dosen erfolgte intramuskulär. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet (Gruppe 1-5).

Die Bestimmungen wurden mit Hilfe des Warburg-Apparats [11] durchgeführt wobei der Sauerstoffverbrauch folgender Gewebe (200 mg/Tiegel) bestimmt wurde: weißer Muskel (WM), roter Muskel (RM), Leber (L) und Niere (N). Als Inkubationsmedium diente Schriever-Serum, pH 7,4 (3 ml/Tiegel). Um sicher zu gehen, daß das Schriever-Serum zusammen mit dem gewebeeigenen Substratum für eine optimale Atmung ausreichend ist, wurde in einigen experimentellen Varianten dem Inkubationsmedium Natriumpiruvat beigegeben. Da keine Veränderungen des Sauerstoffverbrauches verzeichnet wurden, hat man schlußgefolgert, daß gewebeeigene Substrat für eine normale Atmung der Gewebe hinreichend ist. Die Temperatur des Wasserbades war auf $21 \pm 1^\circ\text{C}$ geregelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde eine Stunde lang verfolgt, die Ablesungen von 10 zu 10 Minuten vorgenommen. Die Ergebnisse wurden in ml O₂/g/h Frischgewebe ausgedrückt und statistisch gewertet.

ERGEBNISSE

Tabelle nr. 1 gibt die Kennwerte der Gewebeatmung an, nach Behandlung mit T₄, TSH und Tu.

Die Befunde zeigten bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsvarianten - akut und chronisch. Die einmalige Gabe von Thyroxin bewirkt einen statistisch wesentlichen Abfall des Sauerstoffverbrauches im RM und einen bedeutenden Abfall in der L, während der Sauerstoffverbrauch der anderen Gewebe unverändert bleibt. Die chronische Thyroxinbehandlung hingegen, führt zu einem statistisch wesentlichen

Tabelle Nr. 1
Veränderungen des Sauerstoffverbrauches des weißen Muskels (WM), roten Muskels (RM) der Leber (L) und der Niere (N) als Folge einer Thyroxin-(T₄) Thiourazil-(Tu) und TSH-Verabreichung

Erfolgte Behandlung		WM	RM	L	N
Kontrollen	\bar{X}	96,6	253,2	173,6	553,1
	\pm Es	8,1	14,8	12,0	29,5
	n	13	13	10	6
T ₄ -akut	\bar{X}	101,2	176,0	127,9	649,5
	\pm Es	4,9	26,0	24,5	35,7
	n	6	8	8	6
T ₄ -chronisch	\bar{X}	167,9	360,2	220,7	510,7
	\pm Es	17,5	37,1	9,5	32,3
	n	5	7	6	6
Tu-akut	\bar{X}	112,7	242,6	146,0	465,7
	\pm Es	16,3	42,3	17,3	27,3
	n	6	6	5	5
Tu-chronisch	\bar{X}	142,9	360,6	237,0	515,0
	\pm Es	11,1	40,0	17,6	21,5
	n	7	10	10	5
TSH 3 Tage	\bar{X}	119,0	341,2	198,8	559,4
	\pm Es	22,5	27,9	11,1	35,3
	n	7	5	5	5
TSH 6 Tage	\bar{X}	109,3	257,0	229,3	495,5
	\pm Es	1,0	10,0	14,9	22,3
	n	7	10	10	10
Kontrollen TSH 6 Tage	\bar{X}	72,1	180,0	215,4	404,8
	\pm Es	9,7	14,6	8,7	5,9
	n	9	10	11	10

lichen Anstieg des Sauerstoffwechsels in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Niere.

Durch Behandlung mit TSH ist nach 3 Tagen ein statistisch wesentlicher Anstieg des Sauerstoffverbrauches im RM zu verzeichnen. Die Behandlung mit TSH 6 Tage vor dem Töten der Tiere, hingegen, bewirkt einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches, außer im roten und weißen Muskel, auch in der Niere.

Die einmalige Tu-Verabreichung verursacht keine statistisch wesentliche Veränderung, die Kennwerte zeigen jedoch einen gewissen Abfall des Sauerstoffverbrauches, mit Ausnahme des WM. Die chronische Tu-Verabreichung bedingt einen wesentlichen Anstieg des Sauerstoffverbrauches im WM, RM sowie in der Leber, ändert aber den Sauerstoffverbrauch der Niere nicht.

Im allgemeinen weist die Niere eine große Stabilität gegenüber Behandlungen auf. Einzig das TSH bedingt, 6 Tage nach der Verabreichung, in der Niere einen wesentlichen Anstieg des Sauerstoffverbrauches.

DISKUSSION UND SCHLUBFOLGERUNGEN

Anhand dieser Ergebnisse kann man behaupten, daß das Thyroxin im Falle einer chronischen Behandlung die Atmung fördert, ein Effekt der dem bei höheren Wirbeltieren beschriebenen Effekt gleichzusetzen ist [4], [13], [14], [23], [26]. Die einmalige T₄-Verabreichung bedingt einen entgegengesetzten Effekt welcher von der Art des untersuchten Gewebes abhängig ist. So wird im RM und in der L durch die einmalige

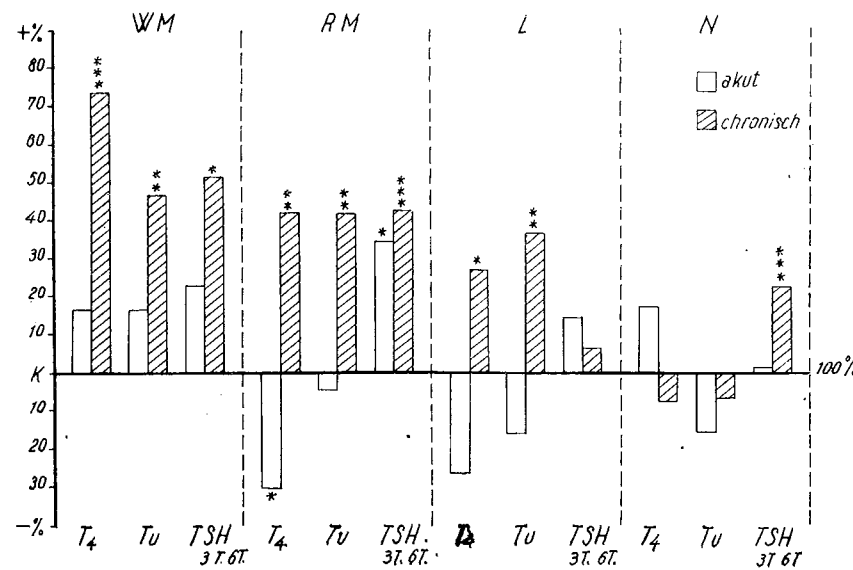


Abbildung. nr. 1. Prozentuelle Veränderungen des Sauerstoffverbrauches den Kontrollen gegenüber im weißen Muskel (WM), roten Muskel (RM), Leber (L) und Niere (N), nach einer akuten und chronischen Thyroxyn (T₄), Thiourazil (Tu) Behandlung und einer einmaligen TSH-Gabe (3 und 6 Tage).

T₄-Gabe ein Abfall des Sauerstoffverbrauches bewirkt, im WM hingegen werden keine Veränderungen verzeichnet. Diese Resultate sind im Einklang mit der von Braekkan [2] aufgestellten Hypothese, sowie mit den von Wittenberger [24], [25] durchgeführten Untersuchungen bezüglich der metabolischen Unterschiede zwischen dem WM und RM, sowie auch den Ähnlichkeiten zwischen RM und L. vergleichbare Resultate erzielt Taylor (21) bei *Triturus torosus* durch Schilddrüsenimplantation. Der Sauerstoffverbrauch fällt zuerst ab, um erst nach einiger Zeit einen Anstieg aufzuweisen.

Gorbman [7], Fontaine [5] und andere haben bei Fischen das Vorhandensein des TSH und sein Eingreifen in die Regelung der Schilddrüsenfunktion nachgewiesen. Fontaine weist darauf hin, daß das Eingreifen des TSH der Säugetiere nicht mit dem der Hypophysenextrakte der Knochenfische verglichen werden kann. Auf Fische hat das TSH der Säugetiere einen ähnlichen Einfluß wie die Hypophysenextrakte der Knochenfische, hingegen scheinen die Hypophysenextrakte der Knochenfische keinen Einfluß auf Säugetiere zu haben. Der Wirkungsgrad des TSH ist von der Menge und der Wirkungsdauer abhängig. Die Veränderung des Sauerstoffverbrauches beim Karpfen ergab, daß diese Kenngröße erst 6 Tage nach der TSH-Verabreichung eine signifikante Zunahme zu verzeichnen [6]. Die Tatsache, daß das TSH 3 Tage nach der Verabreichung nur im RM zu einem wesentlichen Anstieg des Sauerstoffverbrauches führt, könnte auf eine unzulängliche Wirkungsdauer dieses Stoffes zurückgeführt werden. 6 Tage nach der Verabreichung des TSH ist in allen untersuchten Geweben ein signifikanter Anstieg des Sauerstoffverbrauches zu verzeichnen.

Substanzen wie Thiourazil und Thioharnstoff hemmen die Synthese der Schilddrüsenhormone. Thiede [22] hat die Tatsache hervorgehoben, daß der Thioharnstoff bei den Knochenfischen die Schilddrüsenfunktion nicht vollständig zu unterbinden vermag, selbst bei sehr großen Dosen und selbst nach 14-tägiger Behandlung sondert die Schilddrüse noch kleine Thyroxinmengen ab. Wir haben nach akuter und chronischer Thiourazil Behandlung beim Karpfen keine wesentliche Veränderung des Sauerstoffverbrauches verzeichnet [6]. In der vorliegenden Arbeit haben wir einen Anstieg des Sauerstoffverbrauches nach chronischer Tu-Behandlung, beobachtet.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Taylor [21] und Auerbach [1] durch Behandlung mit Thioharnstoff. Sie weisen auf eine unterschiedliche Wirkung, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, hin. Die Untersuchungen Auerbachs (1), den Sauerstoffverbrauch des Muskelgewebes von *Xiphophorus helleri* betreffend ergaben, daß bei Fischen die Tage mit Thioharnstoff behandelt wurden der Sauerstoffverbrauch um 18% ansteigt, jedoch bei den 22 Tage behandelten eine 12% Abnahme aufweist. Es kann also schlußgefolgert werden, daß der Anstieg des Sauerstoffverbrauches in unseren experimentellen Verhältnissen auf eine unzulängliche Wirkungsdauer dieser Substanzen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

1. Nur die chronische Behandlung mit Thyroxin führt zu einer signifikanten Steigerung der Gewebeatmung.
2. Die spezifische Wirkung des TSH kann nur bei seiner Verabreichung 6 Tage vor den Bestimmungen beobachtet werden.
3. Thiourazil bewirkt einen dem Thyroxin ähnlichen Effekt, welcher auf die ungenügende Wirkungsdauer dieser Substanz zurückzuführen ist.

LITERATUR

AUERBACH M., 1957, Zeits. für Fisch. und deren Hilfswiss. 6, N.F. 8, 605-620.
 BRAEKKAN O. R., 1956, Nature (Lond.), 178, 747-748.
 CHAMBERS H. A., 1953, Bull. Bingham. Oceanogr. Collection, 14, 2, 69-94.

4. EVANS E. S., CONTOPOULOS A. A., SIMPSON M. E., 1957, *Endocrinology*, **60**, 403.
5. FONTAINE M., FONTAINE Y. A., 1962, *Gen. and Comp. Endocrin.*, suppl. **1**, 63-74.
6. GÁBOS M., PORÁ A. E., RÁU L., 1973, *St. cerc. Biol. ser. Zool.*, **25**, **1**, 41-45.
7. GORBMAN A., 1958, *Comparative Endocrinology*, red. A. Gorbman, John Wiley a S. New York, 266-282.
8. GORBMAN A., BERG O., 1955, *Endocrinology*, **58**, 86.
9. HASLER A. D., MEYER R. K., 1942, *J. Exper. Zool.*, **91**, 391-404.
10. HOAR W. S., 1958, *Can. J. Zool.*, **36**, 113-121.
11. KOVÁCH A., 1958, *A kísérleti orvostudomány vizsgálo módszerei*, Akad. Kiadó, Budapest.
12. KRIPKE B. J., BEVER A. T., 1956, *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 320-328.
13. LARDY H., 1954, *The Thyroid*, Brookhaven National Laboratory, 90-97.
14. LARDY H. A., MALEY G. F., 1954, *Recent. Progr. Horm. Res.*, **10**, 129.
15. LEIN A., 1958, *Endocrinology*, **63**, 237-241.
16. MATTY A. J., 1957, *J. Endocrin.*, **15**, 1-8.
17. MÜLLER J., 1953, *Z. vergleich. Physiol.*, **35**, 1-12.
18. NIEMANN C., MEAD J. F., 1941, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2685-2687.
19. NIEMANN C., REDEMANN C. E., 1941, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 1549-1552.
20. SCHRIEVER K., 1935, *Pflügers Archiv.*, **235**, 774.
21. TAYLOR A., 1939, *J. Exp. Zool.*, **81**, 135.
22. THIEDE W., 1965, *Zeits. für Wissens. Zool.*, **172**, **3-4**, 305-346.
23. TOMICH E. G., WOOLETT E. A., 1954, *J. Endocr.*, **11**, 134.
24. WITTENBERGER C., 1967, *Rev. Roum. Biol.-Zool.*, **12**, 139-144.
25. —, 1972, *St. și cerc. Biol. ser. Zool.* **24**, **1**, 69-77.
26. WOLFF E. C., BALL E. G., 1957, *J. Biol. Chem.*, **224**, 1083.

Eingegangen am 30. Januar 1973

„Babeş-Bolyai” Universität
Lehrstuhl der Tierphysiologie
Cluj, Str. Clinicilor nr. 5-7

L'ACTIVITÉ DE LA PYROPHOSPHATASE ET DE LA NUCLÉOTIDE-PYROPHOSPHATASE [DU FOIE DES LOCHES D'ÉTANG (*MISGURNUS FOSSILIS* L.) AUX TEMPÉRATURES BASSES

PAR

RADU MEȘTER, STELIAN NICULESCU
et DRAGOȘ SCRIPCARIU

Dans les extraits protéiques totaux du foie des loches d'étang adaptées au froid (0°- +1°C) et aux températures élevées (22°C), on a déterminé l'activité de la pyrophosphatase et de la nucléotide-pyrophosphatase. La pyrophosphatase présente une activité plus élevée chez les poissons adaptés au froid. La nucléotide-pyrophosphatase emploie mieux l'UTP, l'ATP et l'ADP comme substrat, quand l'enzyme a été obtenu des poissons adaptés au froid. On suppose que l'adaptation à la température basse induit la formation d'un état plus actif au point de vue catalytique de l'enzyme.

La pyrophosphate-phosphohydrolase et la nucléotide pyrophosphate-phosphohydrolase peuvent contribuer à la libération de l'énergie nécessaire aux processus métaboliques cellulaires, tant du pyrophosphate que d'autres di- et trinucleotides. Bien qu'assez intensément étudiées chez les plantes [3] [14], les microorganismes [7] [12] et les animaux [1] [6] [3], leur rôle physiologique est très peu connu. De plus, ces enzymes ont très peu connus chez les poissons. Krishnan et Appaji [8] ont étudié une nucléotide-pyrophosphatase qui hydrolyse le FAD, le pyrophosphate et d'autres trinucleotides du foie de poisson *Walago attu*.

Des recherches récentes ont mis en évidence le fait que les préparations enzymatiques purifiées de pyrophosphatase ont des activités nucléotide-pyrophosphatasiques [1] [6]. Ces données suggèrent qu'il est assez difficile de séparer l'activité pyrophosphatasique de celle nucléotide-pyrophosphatasique [2], [5], [14].

L'adaptation des poissons à des températures basses conduit à une diminution de l'activité des enzymes glycolytiques [10] [11]. Dans ce

sens, la capacité de synthèse de l'ATP au moyen de la glycolyse anaérobie et aérobie est réduite. La question qui se pose est : est-ce possible de trouver les poissons adaptés à des températures basses, l'énergie nécessaire à l'entretien des processus métaboliques cellulaires ?

Dans ce sens, il nous a semblé intéressant d'étudier l'activité pyrophosphatase et nucléotide-pyrophosphatase des extraits tissulaires hépatiques des loches d'étang adaptées aux températures basses (0°-1°) et élevées (22°C).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les loches d'étang ont été réparties en deux lots (8-10 exemplaires) et adaptées au laboratoire à la température de 0°-1°C, et respectivement 22°C, pendant 45 jours. Pendant tout le temps d'acclimatation, les deux lots n'ont pas reçu de la nourriture. Les poissons furent sacrifiés 45 jours après l'adaptation et les tissus hépatiques prélevés. Le foie a été homogénéisé au moyen d'un homogénéisateur en verre (modèle Potter), en eau distillée, proportion de 1/10 (g/v). Les extraits protéiques ont été centrifugés à 10 000 x g, pendant 15 min et les supernatants obtenus ont été utilisés pour les déterminations ultérieures.

L'activité pyrophosphatase de l'homogénat a été déterminée en mesurant l'orthophosphate libéré par l'enzyme, selon la méthode de Fiske et Subbarow [4]. Le milieu de réaction (5 ml) était le suivant : 2,5 ml tampon Tris HCl 0,01 M, pH 7,0, 1,0 ml MgCl₂ 0,01 M, 0,5 ml extrait enzymatique (dilué cinq fois avec du tampon Tris HCl 0,01 M), 1,0 ml substrat (pyrophosphate, UTP, ATP et ADP préparés en tampon Tris HCl 0,01 M, pH 7,0). Les déterminations ont été effectuées à 22°C et respectivement 0°C, pendant 15 min. La réaction était stoppée par addition de TCA 10%. L'orthophosphate libéré in vitro a été déterminé dans le milieu d'incubation après filtration. Pour chaque échantillon on a effectué des épreuves témoins qui étaient stoppées avec du TCA 10%, immédiatement après l'addition de l'extrait enzymatique.

Les protéines ont été déterminées par la méthode de Lowry et collab. [9], en employant du sérum albumine bovine comme étalon.

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g P}_i$ par mg protéine/15 min.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'activité enzymatique pyrophosphate-phosphohydrolasique des extraits bruts du foie de loches d'étang, adaptées au froid (0°C) et aux températures élevées (22°C) a été déterminée à deux températures différentes correspondant à la température à laquelle les animaux ont été adaptés (fig. 1). En comparant l'activité de l'enzyme des poissons adaptés au froid et à la chaleur, on n'observe pas de modifications importantes. Les déterminations ont été effectuées à la température de leur adaptation (12,9 $\mu\text{g P}_i/\text{mg}/15$ min pour les poissons adaptés à 22°C et 11 $\mu\text{g P}_i/\text{mg}/15$ min pour les poissons adaptés à 0°C). Par la détermination de l'enzyme à une température donnée on constate des différences appréciables dans l'activité enzymatique, fort élevées pour l'enzyme obtenu des poissons adaptés au froid (colonnes hachurées) : 11 $\mu\text{g P}_i/\text{mg}/15$ min par rapport à 1,2 $\mu\text{g P}_i/\text{mg}/15$ min à 0°C et 49,2 $\mu\text{g P}_i/\text{mg}/15$ min par rapport à 12,9 $\mu\text{g P}_i/\text{mg}/15$ min à 22°C.

En comparant l'activité de la nucléotide-pyrophosphatase, par la détermination de l'enzyme à 22°C et 0°C, on constate des modifications de l'activité enzymatique (fig. 1). On remarque, dans ce cas également, des différences en fonction de la température de détermination, de la provenance de l'enzyme et du substrat utilisé. L'activité nucléotide-

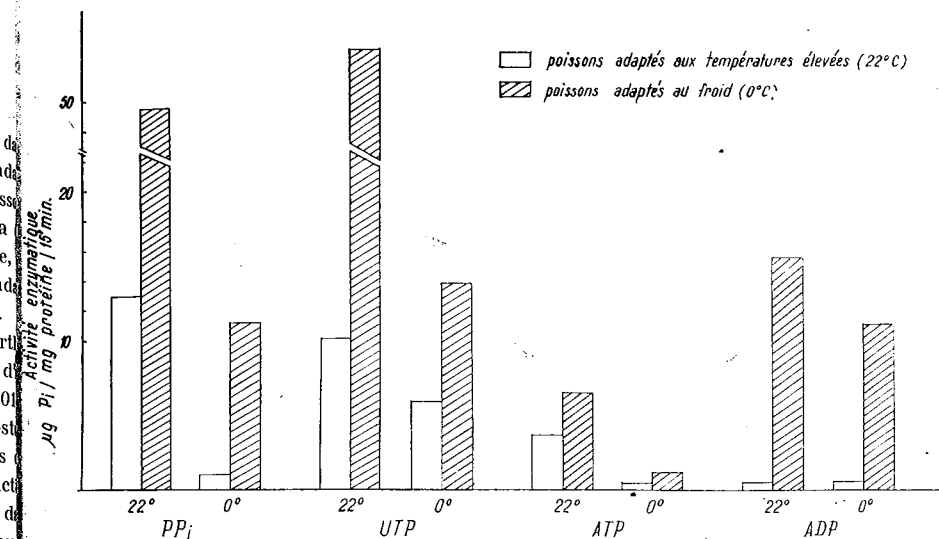


Fig. 1. — Les valeurs moyennes de l'activité pyrophosphatase (PP_i) et nucléotide-pyrophosphatase (UTP, ATP, ADP) des extraits totaux du foie de loches d'étang, adaptées à deux températures différentes. 22° et 0° représentent les températures de détermination de l'enzyme in vitro.

pyrophosphatase des extraits protéiques totaux du foie est plus intense chez les poissons adaptés au froid. On a enregistré les valeurs moyennes suivantes : 10 $\mu\text{g P}_i$ (22°C), 5,9 $\mu\text{g P}_i$ (0°C) chez les poissons adaptés aux températures élevées et 53 $\mu\text{g P}_i$ (22°C), 13,6 $\mu\text{g P}_i$ (0°C) chez les poissons adaptés au froid, quand on emploie l'UTP comme substrat ; 3,6 $\mu\text{g P}_i$ (22°C), 0,5 $\mu\text{g P}_i$ (0°C) et respectivement 6,4 $\mu\text{g P}_i$ (22°C), 1,3 $\mu\text{g P}_i$ (0°C), quand on emploie l'ATP comme substrat ; 0,9 $\mu\text{g P}_i$ (22°C), 0,6 $\mu\text{g P}_i$ (0°C) et respectivement 16,4 $\mu\text{g P}_i$ (22°C), 11 $\mu\text{g P}_i$ (0°C), quand on emploie l'ADP comme substrat.

Les résultats obtenus suggèrent que chez les loches d'étang, l'acclimatation au froid induit des modifications importantes de l'activité pyrophosphatase et nucléotide-pyrophosphatase. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la température basse induirait une modification de la conformation des enzymes, provoquant la formation d'un état plus actif au point de vue catalytique qui faciliterait l'augmentation de l'affinité de la pyrophosphatase envers les pyrophosphates et de la nucléotide-pyrophosphatase envers les trinucleotides. Le fait que la nucléotide-pyrophosphatase peut hydrolyser des di- et trinucleotides est bien connu

pour divers enzymes purifiés, de différentes sources biologiques [14–16].

Ainsi que l'on sait, les enzymes glycolytiques anaérobies et aérobies ont une activité diminuée à des températures basses [10], [11], qui présume une capacité réduite de la synthèse de l'ATP. Dans ces conditions, d'autres voies métaboliques de production d'énergie cellulaire sont forcées. Dans ce sens, la pyrophosphatase et la nucléotide-pyrophosphatase utilisent, dans la mesure de leurs possibilités, le pyrophosphate et d'autres nucléotides accessibles, précisément en vue de produire une énergie cellulaire supplémentaire. On sait que pendant l'hydrolyse de ces substrats se dégagent approximativement 7 Kcal (pour le pyrophosphate), qui peuvent être utilisées dans le contrôle de la vitesse des réactions enzymatiques de biosynthèse [15].

BIBLIOGRAPHIE

1. BRIGHTWELL R., TAPPEL A. L., 1968, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 333.
2. CLINTON C. N., OLIVER L. H., 1969, Biochim. Biophys. Acta, **191**, 579.
3. DUMITRU I. F., NICULESCU S., SCRIPCARIU D., 1970, C.R. Acad. Sci. Paris, **270**, 18.
4. FISKE C., SUBBAROW Y., 1925, J. biol. Chem., **66**, 375.
5. GRIFFIN M. J., 1969, Arch. Biochem. Biophys., **132**, 299.
6. IRIE M., YABUTA A., KIMURA A., SHINDO Y., TOMITA K., 1970, J. Biochem., (Tokyo) **67**, 47.
7. JOSSE J., 1966, J. biol. Chem., **241**, 1948.
8. KRISHNAN N., APPAJI RAO N., 1971, Indian J. Biochem. Biophys., **8**, 150.
9. LOWRY O. H., ROSENBROUGH M., FARR A. L., RANDALL R. I., 1951, J. biol. Chem., **193**, 265.
10. MEȘTER R., SCRIPCARIU D., NICULESCU S., 1972, Rev. roum. Biol. série Zool., **17**, 2.
11. MOON T. W., HOCHACHKA P. W., 1971, Biochem. J., **123**, 695.
12. SCHITO G. C., PESCE A., 1965, Giornale di Microbiologia, **13**, 31.
13. SCHLISELFELD L. H., VON EYS J., TOUSTER, O., 1965, J. biol. Chem., **240**, 811.
14. SRIPATI C. E., SARMA P. S., 1964, Indian J. Biochem., **1**, 173.
15. VANDERHEIDEN B. S., 1970, Biochim. Biophys. Acta, **215**, 555.
16. WARE D., POSTGATE J. R., 1970, Nature, **226**, 1250.

Reçu le 13 décembre 1972

Faculté de Biologie
Bucarest 35, Splaiul Independenței 93–95

EMBRYOGENETIC AND GENETIC CONSEQUENCES OF THE TREATMENT OF *TUBIFEX* EGGS WITH MAGNETIC FIELD

BY

RODERICH BRANDSCH

After exposure of *Tubifex* eggs to an inhomogeneous, localized magnetic field (intensity 16,000 G, gradient 8 kgG/mm), the embryogenesis of these eggs stops at different points of development, according to the duration of treatment with magnetic field. The stage at which embryogenesis is stopped depends also on whether the treatment with magnetic field is performed before or after the first mitotic division of the eggs. An analysis of the occurrence of lethal mutations and abnormal worms in the F1 and F2 generation of worms proceeded from eggs treated 5 min. with magnetic field shows no genetic modifications as against control worms.

In a previous paper [3] regarding the action of a homogeneous and an inhomogeneous magnetic field (MF) upon the first cleavage divisions of *Tubifex* eggs, we were able to show that an inhomogeneous MF of a certain gradient (at least 2 kG/mm) produces serious disorders in the proceeding of these divisions. Depending on the size of the gradient, the duration and time of application of the treatment along the cell cycle, the obtained response may vary between total block of cell division and deviation of the position of the cleavage plan.

As a continuation and completion of these data, in the present paper we tried to establish the consequences of different durations of the *Tubifex* eggs treatment with MF on embryogenesis and on the following generations of worms obtained from treated eggs. The results show a decreasing perturbation of development with the decreasing duration of treatment. The sensitivity of the eggs to the treatment with MF, however, and thus the stage obtained in embryogenesis, depend also to a great extent on whether the treatment was performed during the period

before the first mitotic division (1MD) or after the 1MD. But, on the other hand, a duration of treatment which permits a complete embryogenesis (5 min.), giving rise to worms able of reproduction, shows no genetic effect in the following generations, as indicated by the occurrence of lethal mutations and abnormal worms.

MATERIAL AND METHODS

Treatment and breeding of the eggs, freed of their cocoons, were performed in physiological solution after Lehmann [7]. In order to eliminate the influence on development to the procedure of liberating the eggs of their cocoons and breeding them in physiological solution, untreated eggs freed of their cocoons were bred in parallel in physiological solution. Table 1 compares the number of normal worms obtained from untreated eggs with

Table 1

Number of worms obtained from eggs bred in physiological solution after a 5 min. treatment with MF as compared with untreated eggs bred in physiological solution

	Eggs	Worms	Total
Control	20	13	33
Treated	18	6	24
Total	38	19	57

$$\chi^2 = 1.28$$

p = insignificant

those of normal worms obtained from eggs after a 5 min. treatment, both of them after breeding in physiological solution. According to the χ^2 -test there is no significant difference between the two groups. In order to find out the different sensitivity of the early cleavage stage to the treatment with MF, eggs were treated 20 min. either during the period before the 1MD or during the period after the 1MD.

Worms capable of reproduction obtained from treated eggs were left to multiply between themselves. Eggs and worms obtained from this parent generation were considered the generation. The percentage of lethal mutations was established on the ground of the number of undeveloped eggs and embryos stopped at a certain stage of development within a cocoon. The same percentage was established for the F2 generation. At the same time the number of normally and abnormally developed worms was established for both generations.

The treatment of the eggs was performed with an electromagnet described in a previous paper [3], which gives rise to a strong localized, inhomogeneous MF, with a gradient of approximately 8k G/mm. With this, MF eggs were treated 5 hours, 2 hours, 30 min. and 5 min. respectively, the treatment beginning before the 1MD.

RESULTS AND DISCUSSION

The relation between duration of treatment and stage reached during development is given in figure 1. After 5 hours of treatment the egg forms, if not already blocked at the first division, only an unorganized mass

cells. With the reduction of exposure to the magnetic field there is an increasingly better development. Two hours of treatment stop the embryogenesis either at a stage represented by an unorganized mass of cells or at that when the embryos reach gastrulation. After 30 min. of treatment they reach gastrulation and only a 5 min. treatment allows a complete embryogenesis with the formation of viable worms, capable of reproduction.

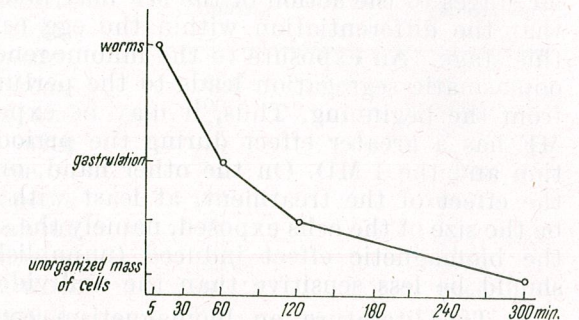


Fig. 1. — Graphic representation of the relation between duration of treatment and stage reached in development.

tion. That means that the disorders produced within the egg through the application of an inhomogeneous MF are increasing with the time the gradient of the magnetic field is permitted to act upon them.

But the stage reached in embryogenesis depends to a great extent also on which stage, namely before or after the 1MD, the treatment is performed. The results of a 20 min. treatment applied before or after the first mitotic division are shown in table 2. When applied before the 1MD,

Table 2

Relation between development and the moment of the application of treatment (20 min. inhomogeneous MF)

	Before 1 MD	After 1 MD	Total
Gastrulation	21	1	22
Abnormal worms	1	12	13
Total	22	13	35

$$\chi^2 = 27.8$$

p < 0.01

the treatment causes the standstill of development at the gastrulation stage. Embryos treated after the 1MD, however, form abnormal worms. Thus, the difference in sensitivity to the action of the MF between the unicellular stage and the embryo formed of a few blastomers is considerable. But the *Tubifex* egg being a typical representative of a spirally cleaving egg, the differentiation, during embryogenesis, of the different ooplasmic regions takes place already within the egg cell. This differentiation of the ooplasm in different morphogenetic regions, initiated after fertilization, becomes visible during the process of ooplasmic

segregation [8], [15]. As we could establish when investigating the determination of the position of the cleavage plan (unpublished data), the treatment with an inhomogeneous MF interferes even with this process of ooplasmic segregation. Before the onset of the first division the separation of functionally different regions within the egg cell is almost completed [15]. Thus, the first cleavage plan separates two already differentiated cells. The more reduced sensitivity of the bi- and tetracellular stages to the action of the MF may be explained probably by the fact that the differentiation within the egg cell has already taken place at this stage. An exposure to the inhomogeneous MF during the process of ooplasmic segregation leads to the perturbation of differentiation even from the beginning. Thus, it may be expected that the treatment with MF has a greater effect during the period comprised between fertilization and the 1 MD. On the other hand, one parameter which influences the effect of the treatment, at least with inhomogeneous MF, seems to be the size of the cells exposed, namely the smaller the cell size, the smaller the biomagnetic effect induced (unpublished data). Thus, blastomeres should be less sensitive than the undivided egg cell.

The literature on biomagnetism comprises some data concerning the action of MF on embryogenesis. An inhibition of the development of sea urchin eggs treated with an inhomogeneous MF of 8,800 G was observed by Perakis already in 1939 [13]. More recently, investigations of the action of a homogeneous MF of 140,000 Oe intensity on the cleavage of *Arbacia punctulata* eggs, Beischer [2] was able to establish also an inhibiting action of the MF used. In opposition with the above observations are a series of results regarding the action of variable electromagnetic fields of low intensity (300 Oe) on embryogenesis. Lazăr et al. [6] report an increased percentage of hatched chickens after treatment of eggs with such MF of low intensity. These data confirm previous one reported by Jitariu et al. [4] on the embryogenesis of chickens after exposure to variable MF of low intensity. In this case, besides an increased percentage of hatching, there was also a reduction up to 16–26 hours of the development time, together with a total disappearance of malformations leading to nonviable chickens. Neaga et al. [12] were able to show that a maximum of the stimulating effect of the MF is obtained if the treatment is applied during the first periods of incubation, these phases being particularly sensitive to the action of the MF. A shortening of the larval period and an increase in the production of cocoons are reported also by Luca et al. [10] following treatment of eggs and larvae of *Bombyx mori* with a MF of 3.5 Oe.

We believe that the differences between our results and the results obtained by the investigators working with variable MF of low intensities cannot be explained only by the differences in the reactivity to the magnetic field of the different animal organisms used in the experiments. There is accumulating evidence within the biomagnetic literature regarding the different ways of action of static magnetic fields and variable MF of low intensity [14], [1]. Therefore it is quite possible that the static magnetic fields of high intensity and strong gradients may have an inhibiting action on embryogenesis, whereas variable MF of low intensity may exert a stimulating action on the same process.

With regard to the genetic modifications followed up in the generations obtained by the multiplication of the worms resulted from eggs treated 5 min. with MF, there was

neither an increased percentage of lethal mutations nor an increased number of worms with malformations (Table 3), although Levengood [10], working with a very similar electromagnet and with similar times of exposure on *Drosophila melanogaster*, reported the occurrence of an increased number of lethal mutations and an increased number of flies with different malformations. Likewise on *Drosophila melanogaster* are reports by other investigators [11] about the occurrence of abnormal forms of eyes and wings after treatment with MF. The lack of induction of modifications in the genetic material in our case may be explained by the short period of treatment (5 min.). Since at longer times of exposure there were no viable worms formed,

Table 3
Percentage of eggs developed within a cocoon. Differences between control and F1 generation are insignificant

Control	F1 generation
66.6	100
100	66.66
75	100
100	0
75	50
100	100
50	75
0	83.34
66.66	66.66
50	16.66
100	50
100	60
100	62.50
50	0
t = 1.1	p > 0.05

we were unable to investigate possible genetic modifications after longer periods of treatment. Thus, it is possible that longer exposures to MF should induce, besides cytoplasmic alterations, which represent the principal causes in the stopping of embryogenesis in the case of the spirally cleaving egg of *Tubifex*, also genetic modifications.

REFERENCES

1. BARNOTHY J. M., 1966, Abstr. Third Intern. Biomagnetic Symposium, Univ. of Illinois, Chicago, Illinois, p. 1.
2. BEISCHER D. E., 1964, in *Biological effects of magnetic field*, ed. M. Barnothy, Plenum Press, New York, p. 201.
3. BRANDSCH R., 1972, Rev. roum. Biol.-Série Zool., **17**, 2, 121.
4. JITARIU P. ET AL., 1962, An. št. Univ. Iași, **8**, 3, 1.
5. JITARIU P., 1966, Rev. roum. Biol.-Série Zool., **11**, 1, 2.
6. LAZĂR M., ALDEA M., ROȘCA V., 1966, An. št. Univ. Iași, **14**, 2, 31.
7. LEHMANN F. E., 1946, Rev. suisse Zool., **53**, 468.
8. — 1958, Exp. Cell. Res., suppl. 6, 1.
9. LUCA L., ROȘCA O., CHITAN N., RUSU C., 1967, Lucr. št. Inst. Agron. Iași, **9**, 3, 381.
10. LEVENGOOD W. C., 1966, Nature (London), **209**, 872.
11. MULLAY I. L., MULLAY L. N., 1964, in *Biological effects of magnetic field*, ed. M. Barnothy, Plenum Press, New York, p. 146.
12. NEAGA N. ET AL., 1971, *Efectele cîmpurilor magnetice asupra puilor de găină bursectomizați și nebursectomizați*. Inst. Agron. Timișoara, Fac. Medicină Veterinară.
13. PERAKIS N., 1939, C. R. Acad. Sci., Paris, **208**, 1686.
14. TOPALĂ N., AILIESEI O., NIMITAN E., 1965, An. št. Univ. Iași, **11**, 2, 201.
15. WEBER R., 1965, *The biochemistry of animal development* Acad. Press, New York, 1.

Received January 17, 1973

Biological Research Centre
Jassy, B-dul Karl Marx 47

ES CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES CONSTITUENT-ILS UN FACTEUR ÉCOLOGIQUE ?

PAR

P. JITARIU, C. R. SCHNELLER-PAVELESCU
et R. K. BRANDSCH

The Authors discuss on the basis of facts known so far the effects on living organisms of electromagnetic fields, generated by electrical power stations, lighting mains, and radiations of radio and T.V. relay-networks.

Taking into account that this form of energy is continuously increasing, that it has reached immense quantities, it raises the problem whether this energy does not represent a new ecological factor, which must be deeply studied, in order to make us able to anticipate its effects.

La fin du XX^e siècle et du deuxième millénaire de notre ère, l'année 2000 dont nous séparant moins de trois décennies ne semble pas être un terme chronologique habituel employé pour séparer deux époques historiques qui, finalement, ne diffèrent pas tellement. C'est parce que la mutation qui a lieu actuellement dans la vie de l'homme a comme but de le ranger en vrai maître de la nature.

Dans ces dernières décennies de notre millénaire et dans les premières avec lesquelles le troisième millénaire commencera, l'homme a réussi à libérer les énergies immenses que les structures intimes de la matière enferment. Cette énergie lui donnera la possibilité de créer les conditions matérielles demandées par un standard toujours croissant et par les exigences de la civilisation et de la culture dans les conditions d'une égalité totale et de la disparition de toute discrimination.

En ce qui concerne l'énergie, elle devient le facteur décisif de l'évolution historique humaine. A ce point de vue, l'homme a opté depuis longtemps : il a choisi l'énergie électrique, car elle peut facilement être transformée en d'autres formes d'énergie, se transporte facilement par des câbles et peut être utilisée dans n'importe quel domaine d'activité.

La production d'énergie électrique a été largement modifiée à nos époques. En résumé, on peut dire que l'industrie productrice d'énergie électrique remplace l'utilisation des combustibles classiques par l'emploi des combustibles nucléaires [5].

Les combustibles classiques : le charbon, le pétrole et les gaz (naturels) deviendront des matières premières pour l'industrie chimique, qui sera l'un des plus grands consommateurs d'énergie électrique [15].

Le rythme de ce changement, révolutionnaire à tous les points de vue, n'a été connu par aucune autre mutation technique et s'explique par un facteur d'importance économique fondamentale : le prix, car le prix de l'énergie électrique d'origine nucléaire baisse continuellement. Cette baisse sera accélérée par le perfectionnement continu du processus de production.

Quant à l'énergie hydroélectrique, bien qu'elle soit bon marché, puisqu'elle ne consomme pas de combustible, est pourtant plafonnée par le potentiel d'aménagement qui dépend des conditions hydrologiques locales.

Nous considérons que ce n'est pas le cas de citer ici encore d'autres sources possibles de production de l'énergie parce que le rythme de croissance des nécessités énergétiques sera si grand que toute source d'énergie, à rendement réduit et surtout à prix élevé, sera éliminée de la composition industrielle [5].

La production d'énergie électrique sur le plan mondial ne peut être comparée dès maintenant qu'avec les deux grandes sources qui agissent continuellement sur la biosphère :

- 1) l'énergie solaire et
- 2) l'énergie géomagnétique, sur laquelle nous reviendrons.

On constate donc que la nouvelle méthode de produire l'énergie aura comme conséquence la construction des installations qui deviendront les sources de l'énergie, ensuite apparaîtront des réseaux de grande, moyenne et basse tension pour le transport de l'énergie au consommateur.

D'immenses quantités d'énergie électrique rendront possible l'électrification totale de l'industrie et par la suite de tous les secteurs d'activité de la vie humaine. Il y aura donc une grande densité de moteurs et machines électriques, une grande densité de réseaux. Les télécommunications seront étendues et, finalement, tout homme pourra communiquer avec n'importe quel autre, où qu'il se trouve. Il faut ajouter à tout cela les études qui se font aujourd'hui afin de résoudre le problème de transport de l'énergie électrique par voie électromagnétique; les dépenses diminueront, car l'installation et l'entretien des réseaux nécessitent de grands investissements. Il paraît que le laser, l'une des récentes acquisitions de la technique, aura une part considérable à la résolution de ce problème.

Dès maintenant se pose le problème de la croissance du nombre et de la puissance des postes de radio et de télévision qui émettent l'énergie électromagnétique sur tous les registres de longueur d'onde. L'évaluation approximative actuelle affirme qu'à présent il y a des postes qui fonctionnent avec une puissance totale de 30 000 Kw : c'est une immense énergie en continuelle croissance. A cela s'ajoute l'apparition de satellites de communication qui auront comme conséquence le fait

que la terre sera entourée d'un réseau de postes de réception — émission qui va constamment bombarder la surface de la planète [2].

L'apparition de tant d'éléments, sources et conduites nécessite la modification du champ de radiations électromagnétiques de la terre et par là, l'apparition d'un nouveau facteur écologique auquel la biosphère n'a pas encore pu s'adapter. Ce facteur devient de plus en plus important par le rythme de croissance des conduites et leur multiplication. Le problème deviendra encore plus difficile lorsque l'énergie même sera transportée par voie électromagnétique. Nous considérons d'une grande importance l'accélération du rythme de croissance car les éléments de la biosphère et surtout les organismes supérieurs ne peuvent s'adapter que difficilement et très lentement [1].

Nous connaissons, grâce à la théorie du champ électromagnétique, que chaque élément de courant et que chaque élément de charge produit dans son voisinage immédiat des ondes sphériques ($1/r$) qui se propagent à une vitesse limitée ($\exp. -jkr$). Ces ondes ont le caractère des ondes dipolaires et partent de certaines sources. C'est encore la théorie du champ qui établit les conditions de radiations, dans le voisinage de la source (l'onde ϕ) ainsi qu'à distance (l'onde ψ). On a constaté qu'à distance, la valeur de E et H dépend de ψ , car celle-ci dépend de ρ et τ' [17].

Toutes ces transformations d'énergie respectent les principes classiques de la thermodynamique : l'énergie de l'univers reste la même sauf le fait que, tandis que l'énergie potentielle (E) diminue, l'énergie cinétique (H) augmente.

De tout ce qu'on a dit ci-dessus, on constate que la croissance de la densité des sources et des réseaux aura comme conséquence la croissance de la densité des radiations pour chaque unité de volume. En conclusion, il y aura lieu une croissance de l'énergie électromagnétique qui agira sur la biosphère.

On doit encore consigner le fait que la radiation électromagnétique produite par l'homme se trouve sur toute la gamme des longueurs d'onde donc aussi des fréquences ($C = \lambda \nu$).

Pour mettre en évidence l'importance écologique de ce nouveau facteur, la radiation électromagnétique, qui se modifie continuellement, nous essaierons de comparer l'énergie produite par l'homme avec l'énergie solaire captée par la terre et avec l'énergie géomagnétique. Cette comparaison a comme but de nous orienter sur les dimensions de la production actuelle d'énergie électrique et se fonde sur le fait que ces deux sources d'énergie ont une grande influence sur la biosphère.

Nous commencerons par l'énergie géomagnétique [16].

On ne connaît pas encore la genèse de ce champ magnétique de la terre. Toutes les mesures qu'on a faites ont été fondées sur l'idée que l'écorce terrestre aurait une charge suffisante pour produire dans son mouvement de rotation un champ magnétique. On a fait des mesures du champ électrique à la surface de la terre et on a obtenu le chiffre de 100 V/cm. Th. Gamov considère que ce chiffre n'explique pas, étant insuffisant, le magnétisme terrestre global tel qu'il résulterait des mesures faites il y a longtemps et ce problème est encore une énigme [6]. Gamov juge plausible le fait que le noyau métallique de la terre, bon conducteur d'électricité, produirait ce champ, mais le problème est loin d'être clarifié. Peut-être

que la nouvelle ère disposera de moyens techniques, ainsi que de l'énergie nécessaire à l'exploration de l'intérieur de la planète et aux mesures à l'aide desquelles le calcul de la valeur exacte du champ magnétique terrestre deviendra possible. La comparaison souhaitée ne peut donc être faite faute de connaître les paramètres du champ magnétique de la terre.

Il nous reste donc à faire la comparaison avec l'énergie solaire. Sălăgeanu affirme que, bien que la terre ne capte que la six milliardième partie de l'énergie émise par le soleil, celle-ci représente pourtant 180 billions kWh par an, ou $180 \cdot 10^{12}$ kWh par an [20]. Moyer D. Thomas affirme que l'énergie solaire captée par la terre est 260×10^{21} cal par an, c'est-à-dire $302,286 \cdot 10^{15}$ kWh par an [19]. Pour rendre possible une évaluation comparative donnons les chiffres présentés à la VIII^e conférence mondiale d'énergie, qui a eu lieu à Bucarest en juillet 1971. Voilà ces chiffres :

A la fin de l'année 1970 et au début de l'année 1971 la puissance totale installée de toutes les centrales énergétiques dépassait un milliard kWh, la production annuelle étant de 5 trillions kWh. On prévoit pour l'année 2000 une production totale d'énergie de 30-32 trillions kWh.

Les centrales nucléaires atteindront en 1980 25% de la production mondiale d'énergie électrique et en 2000 50% de la production mondiale. Après l'année 2000, la production par voie nucléaire d'énergie électrique s'accroîtra encore, si bien que, en 2050, la production d'énergie électrique sera uniquement thermonucléaire.

Avant de passer à la comparaison annoncée, on spécifie que l'énergie solaire est presque dans sa totalité de l'énergie radiante car elle est formée en majorité des photons auxquels s'ajoute un nombre varié de particules dont l'électron occupe une place importante. Cette remarque veut insister sur le fait que la particule qui joue un rôle important dans l'action ainsi que dans l'interaction dans le cadre du champ électromagnétique est justement ce photon. L'énergie solaire est une énergie électromagnétique; la terre capte une quantité immense d'énergie solaire. Les immenses quantités d'énergie électrique qu'on produit actuellement et qui augmentent toujours dans des installations très complexes contiennent de nombreux éléments de charge et de courant qui constituent des sources de radiation électromagnétique. Les éléments susmentionnés produisent les deux composantes du champ: électrique et magnétique; nous voulons rappeler aussi que la composante magnétique a deux termes: l'un représente le champ magnétique élémentaire dont la baisse a lieu en proportion inverse du carré de la distance et le deuxième le champ de l'onde électromagnétique et il baisse en proportion inverse de la distance; ainsi donc aux grandes distances, il restera prépondérant. On admet aujourd'hui que l'émission des radiations a un mécanisme quantique, quel que soit le phénomène dans le cadre duquel on l'observe. On doit en même temps considérer la composante magnétique de la radiation comme une conséquence relativiste du champ électrique [12].

En employant les chiffres donnés à la Conférence mondiale d'énergie déjà mentionnée, on fera le rapport en kWh pour 1971, en utilisant le

chiffre de Thomas Moyer, transformé en son équivalent en kWh. Ce rapport est :

$$\frac{5 \cdot 10^{18} \text{ kWh/an}}{302,286 \cdot 10^{15} \text{ kWh/an}}$$

Le calcul nous donne le résultat : $1,65 \times 10$.

La production mondiale d'électricité pour l'année 1971 est donc de 16,5 fois plus grande que l'énergie solaire reçue par toute la surface du globe, c'est-à-dire $33 \cdot 10^{-9}$ kWh de l'énergie totale du soleil.

En considérant la production rappelée ci-dessus, il faut supposer aussi des pertes :

— des pertes totales dans les installations ainsi que sur le trajet des réseaux, sous diverses formes et qu'on considère comme étant de l'ordre de grandeur 10^{-3} :

— des pertes sous forme de radiation électromagnétique qu'on apprécie comme étant de l'ordre de grandeur 10^{-6} des pertes totales.

Nous avons évalué ces pertes, en admettant, peut-être un rendement plus grand que celui existant. La perte d'énergie sous forme de radiation serait donc de l'ordre de grandeur $= 5 \cdot 10^{12}$ kWh. C'est une énergie très grande, immense, considérée globalement. Si nous calculons la distribution du volume dans l'espace atmosphérique périterrrestre évalué par nous à la valeur de $5 \cdot 10^{10}$ km³, nous obtenons le résultat que, sur un km³ se distribuent 10^2 kWh par an.

Dans l'année 2000, la distribution du volume de l'énergie atteindra la valeur de 10^8 kWh/an/km³, ce qui nous montre que le rythme de croissance est suffisamment grand pour être pris en considération. Les données exposées plus haut servent seulement à une orientation dans ce problème.

Une interaction s'établira entre cette énergie et le champ propre des structures vivantes, le biochamp, notion créée par nous et sur laquelle on a déjà exposé un essai d'hypothèse dans un article antérieur [7]. Notre hypothèse sur le biochamp part de quelques considérations physico-chimiques aujourd'hui unanimement admises, que la matière vivante ou inerte est constituée de la même espèce d'atomes; l'étude de l'atome a montré que dans l'atome sont présentes les composantes primaires du champ électromagnétique. La relativité et la conception quantique ont aussi confirmé ces explications sur la base théorique. La molécule, à son tour, a son champ propre, qui dépend directement de la structure spatiale spécifique. Le champ électromagnétique représente à son tour de l'énergie à deux composantes: la composante électrique qui représente l'énergie potentielle et la composante magnétique qui représente l'énergie cinétique. La microphysique et la quantification de l'énergie sont d'une grande utilité pour la compréhension des phénomènes [8-11] [18] [21] [22].

En partant de ces considérations, nous avons estimé que les structures vivantes se distinguent de celles inertes seulement par la complexité structurelle. Pour cela, il a été nécessaire d'introduire la notion de « biochamp » qui découle de la notion de « biostructure ». Nous admettons ainsi que le phénomène biologique est lié à ce dualisme: biostructure-biochamp. La connaissance des paramètres du biochamp, lorsque sa réalisation

sera possible, apportera de grands services à la biologie et surtout d'importants éclaircissements [23].

On décrira plus bas les expériences qu'on fait dans notre laboratoire par l'introduction des œufs de Tubifex dans le champ électromagnétique. Nous avons considéré qu'il y a une ressemblance entre ces expériences et l'événement qui se produit dans la nature, car le champ pourrait être considéré comme l'élément du milieu de l'œuf de Tubifex comme un organisme vivant. L'avantage offert par ces expériences, au cours desquelles on suit la division d'une cellule-œuf, est que ce phénomène n'est pas influencé par les mécanismes de réglage neurohumoraux d'un organisme. La division peut facilement être suivie aussi en détail car cela est possible à cause des dimensions relativement grandes de l'œuf. L'étude mène à des conclusions importantes, car la division cellulaire est un processus fondamental. Les œufs de Tubifex ont été soumis à l'action d'un champ magnétique non homogène avec un gradient d'environ 2 kS [3] [4] [13].

Dans ces conditions on a obtenu des perturbations considérables de la segmentation menant parfois jusqu'au blocage complet de celle-ci. Il a été intéressant de suivre la dynamique de l'interaction du champ artificiel avec les biostructures de l'œuf et le propre biochamp. Les expériences ont conduit à quelques conclusions intéressantes qui relèvent le fait que le plus grand nombre de divisions anormales s'obtient si le traitement est appliqué dans les périodes I, II, et III qui correspondent aux phases d'entre les deux divisions réductionnelles et surtout à l'interphase de la première division segmentaire. Au cours de cette phase a lieu une activité biochimique accrue, ce qui a comme conséquence les perturbations, proportionnelles à l'intensité de l'activité biochimique. Cette interaction se manifeste dans un certain intervalle de temps, et les modifications produites par cette interaction sont permanentes et ne disparaissent pas, une fois le traitement interrompu, surtout si la durée de l'interaction a été suffisamment longue. On a constaté également que les modifications produites par cette interaction se transmettent au cours de plusieurs cycles cellulaires [4].

Les modifications obtenues peuvent encore s'expliquer par les changements dans la structure spatiale des protéines, par les modifications des divers rapports importants de la structure stéréochimique de la macromolécule protéique. Cette modification de structure s'accroît au cours de plusieurs cycles cellulaires, ce qui peut avoir comme conséquence le blocage partiel ou complet de la division cellulaire [14].

On a vu que l'ordre de grandeur de la radiation électromagnétique, grâce à l'immense production d'électricité, est désormais digne d'être pris en considération. Sa distribution en volume unitaire, assez réduite à présent, mais en continuelle croissance, deviendra importante dans les décennies suivantes.

Dans les conditions respectives, ce facteur est sur le point de devenir un facteur écologique. Nous considérons donc que tout biologiste doit se poser les questions suivantes :

1) Comment peut-on suivre cette activité et

2) Comment peut-on prendre les mesures adéquates pour protéger la biosphère des éventuels effets nocifs. On a employé le terme de nocif, car il se pourrait que certains effets soient favorables.

En tout cas, la biologie actuelle doit connaître cette situation en cours d'évolution continue.

L'écologie actuelle considère la lumière comme un facteur biologique fondamental; sauf le fait que la lumière qui est une oscillation transversale de nature électromagnétique, est à la base de l'établissement des rythmes biologiques; elle est un facteur énergétique d'importance fondamentale dans le monde végétal et animal.

La photosynthèse et la respiration, ces processus biologiques fondamentaux et en même temps complémentaires, dépendent de l'énergie solaire [20].

Parmi les facteurs de nature physique étudiés se trouve encore l'ionisation de l'air. Ce facteur doit être étudié attentivement, car on voit que les réseaux de haute tension produisent autour d'eux l'ionisation de l'air. Mais cette ionisation de l'air peut être produite non seulement par les réseaux mais encore par de nombreuses installations industrielles qui utilisent des courants de haute tension [5].

On a commencé encore l'étude du champ électrique au point de vue écologique. On a constaté que certains insectes réagissent davantage à la variation du champ qu'à un champ constant. Cela pourrait s'expliquer par la production des champs magnétiques par induction.

De même, en relation avec la sensibilité des animaux à l'action du champ électromagnétique, on pourrait rappeler le phénomène des migrations aussi bien chez les poissons que chez les oiseaux.

Le transfert d'énergie occupe une place très importante en écologie : dans le monde des plantes a lieu la captation directe de l'énergie solaire. Par l'assimilation du charbon, il se produit une substance organique qui est ensuite utilisée pour la nutrition des animaux [20].

De tout ce qu'on a dit précédemment, on peut constater que la production d'énergie électrique est en continuelle croissance, la biologie ne connaît pas encore la modalité d'action du nouveau facteur. On doit commencer dès maintenant son étude pour pouvoir suivre tranquillement la façon dont il agit. En même temps, on doit étudier les éventuels moyens de protection.

De nos jours, où on étudie le problème de la pollution de l'atmosphère et on dépense des sommes énormes pour la purification de l'air, la croissance de la densité d'énergie radiante pourrait être considérée comme une variante de cette pollution et on pourrait l'appeler : pollution électromagnétique.

Le champ électromagnétique, ce constituant universel, est un important facteur écologique. Les éléments de la biosphère se sont adaptés car celui-ci a été permanent et a eu des paramètres invariables.

Le rythme accéléré de croissance des sources d'énergie électrique impose l'étude attentive de ce nouveau facteur car les équilibres de la biosphère ne peuvent subir de brusques changements sans réagir.

C'est pourquoi en conclusion, nous considérons que la croissance continue de la production d'énergie électrique peut constituer, dans

l'avenir, un facteur écologique, par l'interaction des radiations électromagnétiques et du champ propre des structures vivantes. Cette interaction peut et doit être étudiée pour devenir connue en biologie.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARNOTHY I. M., 1964, *Biological Effects of Magnetic Field*. Plenum Press, New York.
2. BEISCHER R.D.E., COWART G. S., 1970, U.S. Navy Aerosp. Med. Inst. Nami, **1**, 1105.
3. BRANDSCH R., JITARIU P., 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 3, 215.
4. BRANDSCH R., 1972, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **17**, 2, 121.
5. COGALNICEANU C., 1971, *Geografia energiei electrice*, Ed. științifică, Bucarest.
6. IONESCU TH., 1962, *Electricitatea*. Ed. Tehnică, Bucarest.
7. JITARIU P., SCHNELLER-PAVELESCU C., CHERA H., 1970, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **15**, 5, 335.
8. — 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 2, 125.
9. — 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 3, 203.
10. — 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 4, 273.
11. — 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 5, 325.
12. LANDAU L., LIFSIT E., 1963, *Teoria cîmpului*. Ed. Tehnică, Bucarest.
13. LEHMANN F. E., 1964, *Ergebn. Biol.*, **27**, 117.
14. LEVENGOOD J. M., 1966, *Nature (London)*, **209**, 872.
15. LUPEI N., BRANA V., 1971, *Zestrea minerală a lumii*. Ed. științifică, Bucarest.
16. MILEA N., 1959, *Elemente de geomagnetism*. Ed. Tehnică, Bucarest.
17. NICOLAU E., 1972, *Cîmpuri și unde electromagnetice*, Ed. Acad., Bucarest.
18. PAVELESCU C., CHERA H., JITARIU P., 1969, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 5, 325.
19. PLOTNIKOW J., 1936, *Allgemeine Photochemie*. Walter de Gruyter and Co., Berlin, Leipzig.
20. SĂLĂGEANU N., 1972, *Fotosinteza*. Ed. Acad., Bucarest.
21. SCHNELLER-PAVELESCU C., CHERA H., JITARIU P., 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 3, 211.
22. — 1971, Rev. Roum. Biol. Série de Zool., **16**, 4, 261.
23. SCHNELLER-PAVELESCU C., 1971, Referat la primul simposion național de biomagnetism, Iași.
24. SZENT-GYÖRGYI A., 1962, *Bioenergetica*, Ed. științifică, Bucarest.

Received January 17, 1973

Biological Research Centre
Jassy, B-dul Karl Marx 47

STUDY ON BIOCHEMICAL POLYMORPHISM IN HOLSTEIN AND PINZGAU BREEDS

BY

EUGENIA MILOVAN and I. GRANCIU

The Hb, Tf and Am alleles of 237 Holstein and 399 Pinzgau cattle were studied. In Pinzgau two Hb alleles were determined: Hb A (0.957) and Hb B (0.043), while in Holstein only Hb A.

At Tf locus 4 alleles were identified both in Holstein and in Pinzgau: Tf A (0.397 and 0.412), Tf D₁ (0.243 and 0.213), Tf D₂ (0.330 and 0.354) and Tf E (0.030 and 0.021) with 8 genotypes. Neither Tf EE nor Tf D₁E genotypes were found.

Two Am alleles were identified in these breeds: Am B (0.550 and 0.800) and Am C (0.450 and 0.200) with 3 genotypes.

By using starch gel electrophoresis [11] valuable observations were made on genetic polymorphism of several blood components in cattle. As was shown, these characters can reveal individual and breed differences. That is why research workers continue to be interested in knowing and using them. The study of serum protein polymorphism in Romanian cattle breeds was initiated during the last years [6]. Since 1971 certain protein variants are used, besides blood reagents, for paternity analysis.

In the present report haemoglobin, transferrin and amylase types are presented in Holstein and Pinzgau breeds from Romania

MATERIALS AND METHODS

Blood serum samples were collected from 237 Holstein-Friesian and 399 Pinzgau cattle.

The blood collected on anticoagulant was centrifuged. Red cells for Hb determination were immediately washed and used. The serum was stored at -20°C and used when it was possible. Blood samples were analysed by starch gel electrophoresis.

REV. ROUM. BIOL. - ZOOLOGIE, TOME 18, N° 3, p. 235-239, BUCAREST, 1973

For the separation of Hb, Tf and Am types usual methods were used [1], [9], [10]. Slight changes were made to these methods.

The gels were prepared from Romanian starch partially hydrolised in our laboratory. For each breed protein types and allele frequencies were determined.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Haemoglobin. Only Hb A type was identified at the Hb locus in Holstein breed. In Pinzgau breed two alleles, Hb A and Hb B, were determined. The Hb A showed the highest allele frequency (95.7%). The homozygous Hb AA genotypes (91.5%) prevail as against heterozygous Hb AB (8.2%). The Hb B has a very low frequency, as shown in table 1.

Table 1

Alleles and genotypes frequency in Holstein and Pinzgau breeds				
Type	Alleles frequency	Genotypes frequency	Phenotypes	
			observed	expected
Holstein (n = 237)				
Hb A/A	1.0000	1.000	237	237.0
Hb B/B	0.0000	—	—	—
Hb A/B	—	—	—	—
Pinzgau (n = 399)				
Hb A/A	0.957±0.007	0.9158	370	365.7
Hb B/B	0.043±0.007	0.0018	5	0.7
Hb A/B	—	0.0823	24	32.5

$$\chi^2_{1 \text{ d. f.}} = 26.03 \quad P < 0.001$$

The lack of variability at Hb locus in Holstein breed agrees with the findings of other research workers [7].

The indices of Hb allele frequency in Romanian Pinzgau are very close to those found in the Federal Republic of Germany [3] (Hb A 97.5%) in the same breed.

Transferrin. At Tf locus four alleles were identified in both breeds: Tf A, Tf D₁, Tf D₂ and Tf E.

The highest allele frequency was encountered in the Tf A type in both breeds (39.7% in Holstein and 41.2% in Pinzgau), as can be seen from table 2. The Tf D₂ is more frequent (33% and 35.4%, respectively) than Tf D₁ (24.3% and 21.3%).

The Tf E showed a very low distribution (3% and 2%). This situation is valid for the majority of cattle breeds.

In each of these two breeds 8 genotypes (out of 10 possible) were identified (Table 2). There were no animals with homozygous genotype Tf EE nor with heterozygous Tf D₁E. The highest genotype frequency in both breeds was for Tf AD₂ (26.2% and 29.1%), followed by Tf AD₁

Table 2

Tf alleles and genotypes frequency					
Allele	Alleles frequency	Phenotype	Genotypes frequency	Phenotypes	
				obs.	expect.
Holstein (n = 239)					
Tf A	0.397	AA	0.1579	35	37.7
		D ₁ D ₁	0.0588	14	14.0
		D ₂ D ₂	0.1092	23	26.1
Tf D ₁	0.243	AD ₁	0.1928	49	46.1
		AD ₂	0.2627	65	62.8
		AE	0.0232	6	5.5
Tf D ₂	0.330	D ₁ D ₂	0.1604	39	38.3
		D ₂ E	0.0193	8	4.6
				$\chi^2_{7 \text{ d. f.}} = 3.36$	
Pinzgau (n = 397)					
Tf A	0.412	AA	0.1697	78	67.4
		D ₁ D ₁	0.0453	27	18.0
		D ₂ D ₂	0.1253	48	48.0
Tf D ₁	0.213	AD ₁	0.1755	51	50.0
		AD ₂	0.2917	112	115.8
		AE	0.0003	8	7.8
Tf D ₂	0.354	D ₁ D ₂	0.1508	64	60.5
		D ₂ E	0.0149	9	6.9
				$\chi^2_{7 \text{ d. f.}} = 13.4$	

(19.2% and 17.5%). No significant differences were noticed between observed and expected genotypes.

It seems obvious that allele genotype frequencies of Tf differ between these two breeds as concerns the values of these indices, although the direction of their evolution is at a great extent similar. The Tf E, for instance, shows a tendency to disappear, being found in these breeds only under the heterozygous form.

The predominance of Tf D₂ over D₁ is also similar in these two breeds. This aspect of the relationships between the Tf types is characteristic also of other Romanian breeds, e.g. Bruna and Bălțata românească, whose indices were the following: Tf D 0.90 and 0.70, and Tf E 0.01 and 0.004, respectively [6].

Tf D₂ seems to be more frequent than Tf D₁ in most of the breeds where they were separated [8].

Amylase. The Am types of Holstein and Pinzgau are shown in table 3. Two types, Am B and Am C, were determined at Am locus and three genotypes, Am BB, Am BC and Am CC, in both breeds.

In Holstein allele frequency is almost equal for these two types: Am B = 55% and Am C = 45%. Am BC has the highest genotype frequency (49%), followed by the homozygous forms Am BB (30%) and Am CC (20%).

Table 3
Amylase alleles and genotypes frequency

Allele	Alleles frequency	Phenotype	Genotypes frequency	Phenotypes	
				obs.	expect.
Holstein (n = 234)					
Am B	0.550	BB	0.3025	68	70.7
Am C	0.450	BC	0.4950	121	115.8
		CC	0.2025	45	47.3
				$\chi^2_{1 \text{ d. f.}}$	= 0.455
Pinzgau (n = 390)					
Am B	0.800	BB	0.6400	250	249.6
Am C	0.200	BC	0.3200	124	124.8
		CC	0.0400	16	15.6
				$\chi^2_{1 \text{ d. f.}}$	= 0.016

In Pinzgau the situation is quite different: Am B has a much higher allele frequency (80%) than Am C (20%). The genotypes ratio is likewise different, their frequency being to the advantage of homozygous Am BB (64%), followed by heterozygous Am BC (32%). The homozygous Am CC (4%) has the tendency to disappear.

There is also a good agreement in both breeds between observed and expected genotypes at Am locus.

Data on amylase polymorphism in Pinzgau breed are very few. The indices in Holstein are generally close to those found by other authors in the same breed in different regions of the world. In Hollstein-Friesian of America, for instance, there was determined an allele frequency of 52% for Am B, while in Italy a 56% one for the same Am type. A somewhat different aspect was observed in Canadian Holstein [8], whose Am C frequency was 56%, the same as that found by Gasparski and Stevens [5]. Canadian research workers also found 10–19% individuals with Am A not described by other researchers.

Our results give an image of the actual genetic structure of Holstein and Pinzgau breeds from Romania at Hb, Tf, and Am.

REFERENCES

1. ASHTON G. C., 1963, *Nature (Lond.)*, **198**, 1117.
2. — 1966, *Proc. Xth. Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph.*, Paris, p. 289–292.
3. BUSHMANN H., SCHMID D. O., 1968, *Serumgruppen bei Tieren*. Paul Parey, Berlin–Hamburg.
4. CRIMELLA C., CERUTTI, REGNONI G., 1972, *XIth Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph.*, Budapest, p. 173.
5. GASPARIKI J., STEVENS C. W. R., 1968, *Can. J. Genet. Cytol.*, **10**, 148.
6. GRANCIU I., 1972, *XIth Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph.*, Budapest, p. 229–231.

7. KOVACS G., SOOS P., NEMESI M., 1972, *XIth Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph.*, Budapest, p. 159–162.
8. KRAAY J. G., 1972, *XIth Europ. Conf. Anim. Blood Groups Biochem. Polymorph.*, Budapest, p. 155.
9. KRISTJANSSON F. K., 1963, *Genetics*, **48**, 1059.
10. POULIK M. D., 1957, *Nature (Lond.)*, **180**, 1477.
11. SMITHIES O., 1955, *Biochem. J.*, **61**, 629.

Received December 6, 1972

Research Institute for Cattle Breeding
Genetics Laboratory
Corbeanca—Ilfov

STUDY ON SOME STRAINS OF INFLUENZA
VIRUS WITH DOUBLE ANTIGENICITY: A₂ AND B

BY

I. MOISA

Two strains of influenza viruses with double antigenicity — A₂ and B — were investigated. One of these strains (A₂B/Romania 54/68) proved to be formed by the physical mixture of elemental corpuscles of the A₂/England 12/64 and B/Singapore 3/64 type.

The A₂B/Romania 11/68 strain proved to be a phenotypical mixture of the A₂ and B type, the A₂ component being predominant. This antigenic structure of the virions seems to be codified in the viral genome.

The possibility to isolate some mixed strains of influenza virus A + A₂ has been recorded by various authors, which pointed to the existence of heterogeneous viral populations made up of elemental corpuscles belonging to different antigenic subtypes [1]—[4], [6].

Derevici et al. [3] have pointed out the existence of three categories of strains during the influenza epidemic of February—March 1959: type A/PR₈, A₂/Singapore 1/57 and mixed type A + A₂. Portocală et al. [6] have studied the morphologic aspect of these mixed strains by electron microscopy and have reached the conclusion that these strains should be considered as a physical mixture of these two types of virus.

Zardi et al. [7] have isolated type A and B strains from the same group of patients during the February — March 1967 epidemic of Italy, without revealing the existence of mixed strains A₂ and B.

During the preepidemic of 1968 (beginning of February), we isolated a strain of influenza virus with double antigenicity: A₂ and B.

During the influenza epidemic of February — March 1968 in Bucharest [5], we succeeded in isolating two influenza virus strains which gave positive results in the HAI reaction both to specific sera of A₂ type and to those of B type.

In the present work, we have aimed at studying two of the strains of influenza virus with double antigenicity, A₂ and B (a preepidemic and an epidemic one), following up in the case of a viral mixed infection, a possible genetic recombinant or a rare mutation.

MATERIAL AND METHOD

Virus strains. We have used two strains of influenza virus with double antigenicity, A₂ and B:

- one isolated during the preepidemic period: A₂ B/Romania 11/68, found in the Xth passage on the embryonate chick egg aged 10 days, infective titer: 10^{5.25}, Ha titer: 1/1280;
- another one isolated during the epidemic period: A₂ B/Romania 54/68, Xth passage on the embryonate chick egg aged 10 days, infective titer: 10^{6.25}, HA titer: 1/1280.

Strains typing. It has been carried out by crossed HAI reactions to the following specific antisera: A₂/Singapore 1/57, A₂/England 12/64, A₂/Taiwan 1/64, A₂/Romania 59/68, A₂/Polyvalent, B/Singapore 3/64, B/England 1/64, B/Massachusetts 3/66, B/Romania 1/63, B/Polyvalent.

HA, HAI reactions and removal of nonspecific inhibitors were carried out according to WHO indications [8].

Separation of A₂ or B type influenza virus from the mixed viral population. The separation of both investigated virus strains was attempted by several methods:

1. by seriated passages to the infecting limit dilution on the embryonate chick egg aged 10 days. After each passage on the embryonate egg, influenza virus strains were re-typed by crossed HAI reactions to the 10 specific immunosera used;

2. by mixing equal volumes of viral suspension (represented by the infected allantoic fluid of embryonate chick egg) and specific antiserum (A₂/England 12/64, A₂/Polyvalent, B/Singapore 3/64 and B/Polyvalent). Mixtures were maintained for 30 minutes at a temperature of 37°C and then decimal seriated dilutions were made in veronal buffer; each dilution was inoculated intraamniotically on 5 developing embryonated chick eggs.

After a 48-hours incubation at a temperature of 35°C, inoculated eggs were sacrificed by being maintained for 2 hours at -30°C and the amniotic fluid was removed.

The HA capacity to fowl erythrocytes 0.5% was followed up for each inoculated dilution of antigen and serum.

In the case of a positive HA reaction, the respective strains were followed up in their HAI reaction to specific immunosera A₂/Polyvalent and B/Polyvalent;

3. By mixing equal volumes of decimal seriated dilutions in veronal buffer of the viral suspension with nondiluted antisera of A₂ type (A₂/England 12/64, A₂/Polyvalent) or of B type (B/Singapore 3/64, B/Polyvalent). Mixtures were maintained for 30 minutes at a 37°C temperature, after which they were intraamniotically inoculated on five 10-day-old embryonate chick eggs. Further on, things proceeded as in the previous experimental model.

The control used were the strains of influenza virus A₂/England 12/64 and B/Singapore 3/64, processed in a similar way with the strains with double antigenicity.

RESULTS AND DISCUSSIONS

— The typing of influenza virus strains, isolated in 1968 (either during the preepidemic or during the epidemic period), carried out by HAI reactions to 10 specific immunosera, revealed the fact that the hem-

Table 1

Study by HAI reaction of influenza virus strains with double antigenicity: A₂ and B

SERUM \ ANTIGEN	A ₂ /Sing. 1/57	A ₂ /Taiwan 1/64	A ₂ /England 12/64	A ₂ /Rom. 59/68	A ₂ /Polyvalent	B/Rom. 1/63	B/Sing. 3/64	B/England 1/64	B/Massachusetts 3/66	B/Polyvalent
	A ₂ B/Romania 11/68	40	320	1280	1280	1280	40	320	80	20
A ₂ B/Romania 54/68	160	640	1280	1280	1280	10	320	160	40	320

agglutination of these strains was inhibited both by the A₂ specific sera and by the B type ones (Table 1).

Astonished by these results, we thought of an alternative:

— either in the population two strains of influenza virus were circulating at the same time in the same individual: A₂ type and B type (mixed infection);

— or a new strain of influenza virus has appeared in the population, having mixed antigenic properties: A₂ and B (genetic recombination).

In order to elucidate this phenomenon we carried out several passages on the embryonate chick egg, at the limit infective strain dilution, with a view to separating either the A₂ type influenza virus or the B type one, in case there existed a mixed viral population.

After 10 such passages, the preepidemic strain (A₂ B/Romania 11/68) continued to have a mixed antigenic character (A₂ and B) in the HAI reaction.

In the case of the A₂B/Romania 54/68 strain, isolated during the epidemic period, 6 passages carried out at the limit infective dilution resulted in the separation of a strain of influenza virus which evinced positive HAI reaction only to specific antiinfluenza sera of the B type. This B type influenza virus strain (B/Romania 54/68) proved to be stable and maintained constant antigenic characteristics in subsequent passages carried out on the 10-day-old embryonate chick egg. Its typing carried out by HAI cross reactions to 7 antigens and influenza immunosera of A₂ and B type, proved that it is antigenically identical with its variant B/Singapore 3/64 (Table 2).

These results pointed to the existence of a mixed infection with A₂ and B type influenza viruses in the same host.

The A₂ B/Romania 54/68 strain is formed, therefore, of a mixture of elemental corpuscles of A₂/England 12/64 and B/Singapore 3/64 type; the component of B type can be separated from the heterogeneous population by passages at the limit infective dilution.

After 10 passages at the limit infective dilution, the A₂ B/Romania 11/68 strain, which maintained its double antigenicity (A₂ and B), was treated with a series of specific immunosera of A₂ and B type, according to experimental methods described in detail in the section material and methods (models 2 and 3).

Table 2

Study by HAI cross reactions to collection influenza antigens and sera of the B/Romania 54/68 strain

ANTIGEN \ SERUM	SERUM						
	B/Rom. 1/63	B/Sing. 3/64	B/Engl. 1/64	B/Massachusetts 3/66	B/Polyvalent	A ₂ /Engl. 12/64	A ₂ /Polyvalent
B/Romania 1/63	1280	320	320	160	160	0	0
B/Singapore 3/64	320	1280	1280	320	320	0	0
B/England 1/64	320	640	1280	160	160	0	0
B/Massachusetts 3/66	80	320	320	1280	160	0	0
A ₂ /England 12/64	0	0	0	0	0	2560	1280
B/Romania 54/68	80	1280	640	80	320	0	0

The results are recorded in table 3.

In both experimental models used, the A₂ B/Romania 11/68 strain, was completely neutralized by A₂ antisera and very slightly by B type

Table 3

Treatment of A₂ B/Romania 11/68 strain with A₂ and B type antisera

Antigen dilution	HA Antigen + antiserum				Antigen	HAI	
	A ₂ /England 12/64	A ₂ /Polyvalent	B/Singapore 3/64	B/Polyvalent		A ₂ /Polyvalent	B/Polyvalent
10 ⁻¹	0	0	512	512	256	512	256
10 ⁻²	0	0	1024	2048	1024	1024	256
10 ⁻³	0	0	2048	256	2048	1024	64
10 ⁻⁴	0	0	0	0	1024	—	—
10 ⁻⁵	0	0	0	0	256	—	—
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	—	—

ones. The virus obtained by inoculation of the embryonate egg of the respective strain after treatment with B type immunosera continued to evince a double antigenicity (A₂ and B), being inhibited both by the A₂/Polyvalent serum and by the B/Polyvalent one. This virus, mixed with B type antisera, was used in the carrying out of another 14 passages on the embryonate chick egg, by the same experimental models, obtaining similar results. This means that it is not neutralized by B type antisera

and maintains after treatment its capacity to inhibit both A₂ and B type sera.

The A₂ B/Romania 11/68 strain probably consists of elemental corpuscles, representing an A₂ and B type phenotypical mixture. The A₂ component is predominant. This might account for the neutralization of the A₂ B/Romania 11/68 strain by A₂ type antisera (by the neutralization of the predominant phenotypical component), while B type antisera do not neutralize the virus as such, acting only on the minor phenotypical component. The question arises whether this phenotypical mixture is or not the expression of genetical changes, namely of a possible genetic recombination or of a recessive mutation.

After treatment with B type antisera the elemental corpuscles obtained after inoculating the A₂ B/Romania 11/68 strain on the embryonate chick egg go on evincing a double antigenicity (A₂ + B) after 14 passages. This suggests that the antigenic structure of virions is codified in the viral genome.

CONCLUSIONS

1. During 1968, two strains of influenza viruses with double antigenicity — A₂ and B — were isolated.
2. One of the strains with double antigenicity: A₂ and B (A₂ B/Romania 54/68) proved to be formed by the physical mixture of elemental corpuscles of A₂/England 12/64 and B/Singapore 3/64 type.
3. The A₂ B/Romania 11/68 strain proved to be a phenotypical mixture of A₂ and B type, the A₂ component being predominant. This antigenic structure of the virions seems to be codified in the viral genome.

REFERENCES

1. ANDREWES C. H., *Viruses of vertebrates*, Baillière, Tindall and Cox, London, 1965.
2. HOYLE L., *The influenza viruses*, Springer-Verlag, Vienna — New York, 1968.
3. DEREVICI A., BRONIȚKI AL., PETRESCU ALEX., *Gripa*, Ed. medicală, Bucharest, 1959, p. 82.
4. MOISA I., St. Cerc. Inframicrobiol., 1969, 20, 5, 413.
5. MOISA I., POPESCU ANA, BRONIȚKI AL., MARINESCU G., St. Cerc. Inframicrobiol., 1970, 21, 1, 7.
6. PORTOCALĂ R., DUMITRESCU S., IONESCU N. I., BRONIȚKI AL., *Gripa*, Ed. medicală, Bucharest, 1959, p. 112.
7. ZARDI O., LUCEHEȘI M., PANĂ A., SULLI E., NOBILI G., Scampato M., Ann. Ist. Carlo Forlanini, 1968, 28, 1, 91.
8. * * * W.H.O., *Tech. Report Series*, 1959, 170.

Received December 18, 1972

The Institute of Biological Sciences
Department of Microbiology
Bucharest 17, Splaiul Independenței nr. 296

Kaslo -
Varna - L. Roum

AVIS AUX AUTEURS

La « Revue Roumaine de Biologie — Série de Zoologie » publie des articles originaux d'un haut niveau scientifique, de tous les domaines de la biologie animale : morphologie, physiologie, génétique, écologie, taxonomie, etc. 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, conseils, etc. 2. Comptes rendus des livres de spécialité parus en Roumanie.

Les auteurs sont priés d'envoyer leurs articles, notes et comptes rendus dactylographiés à double intervalle (31 lignes par page) en deux exemplaires.

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

Les tableaux et les illustrations seront numérotés avec des chiffres arabes. La répétition des mêmes données dans le texte, les tableaux et les graphiques sera évitée. Les références bibliographiques citées par ordre alphabétique des auteurs comporteront le nom de l'auteur, l'initiale, l'année, le titre de la revue, abrégé conformément aux usances internationales, le tome, le numéro, la page. Les travaux seront accompagnés d'un court résumé, en anglais, de maximum 10 lignes. Les textes des travaux ne doivent pas dépasser 15 pages dactylographiées (y compris les tableaux, la bibliographie et l'explication des figures).

Les auteurs ont droit à 50 tirés à part gratuits.

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

La correspondance relative aux manuscrits, à l'échange de publications, etc. sera adressée au Comité de rédaction, 296, Splaiul Independenței, Bucarest.