

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

COMITÉ DE RÉDACTION

Rédacteur en chef:

RADU CODREANU, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Rédacteur en chef adjoint:

OLGA NECRASOV, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie

Membres:

MIHAI BĂGESCU, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; dr. doc. PETRU BĂNĂREȘCU; NICOLAE BOTNARIUC, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; dr. ILIE DICULESCU; MIHAIL A. IONESCU, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; PETRE JITARIU, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; prof. dr. NICOLAE SIMIONESCU; GRIGORE STRUNGARU; dr. RADU MEȘTER -- secrétaire de rédaction.

La «Revue roumaine de biologie — Série de biologie animale» paraît deux fois par an. Toute commande de l'étranger (fascicules ou abonnements) sera adressée à ROMPRESFILATELIA, Département d'exportation-importation (Presse), Boîte postale 12—201, télex 10376, prsfi r, Calea Griviței 64—66, 78104, Bucarest, Roumanie ou à ses représentants à l'étranger. Le prix d'un abonnement est de \$ 38 par an.

Les manuscrits ainsi que toute correspondance seront envoyés à la rédaction. Les livres et les publications proposés en échange seront envoyés à Institutul de Științe biologice, Splaiul Independenței 296, 79651 Bucarest.

REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE
Série de biologie animale
Calea Victoriei 125
R—79717 București 22, România
Tel. 50 76 80

EDITURA ACADEMIEI
REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Calea Victoriei 125
R—79717 București 22, România
Tel. 50 76 80

P II 1469

REVUE
ROUMAINE
DE BIOLOGIE

SÉRIE DE BIOLOGIE ANIMALE

BIOL. INV. 88

TOME 32, N° 1

janvier — juin 1987



SOMMAIRE

MAGDA CĂLUGĂR, Nouvelles espèces d'oribates du Venezuela (<i>Acari: Oribatei</i>)	3
LEONTIN ȘTEFAN PÉTERFI, LAURA MOMEU, <i>Mallomonas trummenis</i> Gronberg (<i>Synuraceae, Chrysophyceae</i>) in Romania: electron microscopic study of silica armour	9
ANDY Z. LEHRER, Les nouveaux géocodes de la Roumanie avec l'exemple de la distribution géographique de l'espèce <i>Heptatoma pellucens</i> F. (<i>Diptera, Tabanidae</i>)	13
D. SCRIPCARIU, LOTUS MEȘTER, F. MARINESCU, R. MEȘTER, Intracellular localization of arylsulfatase in fish oocytes	17
I. GHIZDAVU, F. P. HODOȘAN, I. OPREAN, Attractifs sexuels spécifiques pour <i>Adoxophyes orana</i> F. v. R. et <i>Archips crataegana</i> Hb.	23
IULIANA POPOVICI, Bioenergetic parameters of soil nematode communities in coniferous forests in the Retezat Mountains	29
P. ROTINBERG, SMARANDA KELEMEN, AL. SAUCIUC, P. JITARIU, Further evidence of the antitumoral activity of A 12.3 biosynthesis antibiotic preparation	37
I. MADAR, NINA ȘILDAN, A. D. ABRAHAM, Glucose uptake and conversion into glycogen in isolated diabetic rat aorta under the influence of procaine, Aslavit and Gerovital H ₃	43
C. WITTENBERGER, RODICA GIURGEA, GH. FRECUȘ, D. COPREAN, I. MADAR, ANA ILONÇA, New data on tissue metabolism in rainbow trout ontogenesis	49
D. COPREAN, RODICA GIURGEA, V. MIÇLE, Effects of urea in foeder on some parameters of carbohydrate metabolism in ducks	53
RODICA GIURGEA, C. WITTENBERGER, Thyroidal influences on glucose and leucine absorption in the chicken jejunum	57

20631

VIORICA MANOLACHE et M. IONESCU VARO, Études cytophotométriques sur la spermatogenèse chez <i>Isophya speciosa</i> Frivaldsky (<i>Orthoptera-Phaneropteridae</i>)	61
FLORICA TRIPĂDUȘ, Chromosomal aberrations induced by tritiated water internal irradiation in rat bone-marrow cells	67
OCTAVIAN CIOLPAN, Zur Fortpflanzung von <i>Dikerogammarus villosus</i> (Sow.) Mart. (<i>Crustacea-Amphipoda</i>) im „Eisernes Tor“-Stausee (Bahna-Golf, 1983 — 1984)	71
DOINA IVAN, MARIA SUCIU et MARIA NĂSTĂSESCU, Académicien RADU CODREANU, personnalité proéminente de la biologie roumaine (1904—1987)	75

NOUVELLES ESPÈCES D'ORIBATES DU VÉNÉZUELA (ACARI: ORIBATEI)

MAGDA CĂLUGĂR

The article describes two new species for science of the Family *Oribatellidae* (*Lamellobates nitidus* n.sp and *Oribatella jucunda* n.sp) discovered in Venezuela (lég Decu V.).

Cette étude est consacrée à la description de deux nouvelles espèces de la famille *Oribatellidae* Jacot, 1925 (*Acari: Oribatei*) provenant du Vénézuéla*.

1. LAMELLOBATES NITIDUS n.sp.

Matériel étudié. Sept adultes ont été récoltés en novembre 1982, de la litière de la forêt tropicale du Parc National Rancho Grande (Province Araguà).

Tous les exemplaires ont servi à la description (série syntypique) et sont déposés chez l'auteur.

Dimensions. Idiosoma: L — 266 μm ; l — 180 μm . Volet génital: L — 37 μm ; l — 24 μm . Volet anal: L — 31 μm ; l — 28 μm . Poils du prodorsum: sensillus — 48 μm ; rostral — 40 μm ; lamellaire — 43 μm ; interlamellaire — 99 μm . Poils du notogaster: te — 37 μm p₂ — 24 μm .

Morphologie. La couleur est brune-jaunâtre. Le tégument est dépourvu de microsculpture, excepté la région épimérique, qui est ornée d'un réseau polygonal.

Prodorsum avec un rostre qui a deux cornicules disposés latéralement (fig. 1 a, 1 b, 2). Les poils rostraux barbelés sur leur bord antiaxial ont une position postérolatérale comme la plupart des *Oribatellidae*. D'ailleurs, ils ne sont visibles qu'en examinant l'animal de profil. Les lamelles arquées ont l'habitus caractéristique du genre. À noter que chaque lamelle a deux cuspis, dont celui paraxial est plus développé que l'autre. Entre les lamelles il y a, aussi, deux petites formations, c'est-à-dire des rubans étroits et fins de nature chitineuse, dont l'un est demi-circulaire. Ce dernier assure une jonction légère entre les lamelles. Les poils lamellaires droits, épais et barbelés s'insèrent entre les deux cuspis. Les poils interlamellaires peu convergents et barbelés sont disposés sur le bord extérieur des lamelles. Chaque poil s'articule dans l'angle formé par la bothridie avec la base de la lamelle. La bothridie est semblable à celle des autres *Lamellobates*. Les sensillus sont peu convergents, fusiformes et rugueux.

Le notogaster demi-oval a la suture dorsoséjugale acuminée vers l'avant (fig. 1 a). Les ptéromorphes minces ont les bords courbés vers le ventre et leur pointe antéro-latérale bifidée. Il y a neuf paires de poils

* Il m'est agréable de remercier le Dr. V. Decu, qui a collecté ce matériel.
L — longueur; l — largeur.

notogastraux fins et lisses, qui rappellent ceux de *L. hauseri* Mahunka, 1977. Comme les autres espèces du genre les poils *p* sont plus courts que les autres. Les quatre paires de pores sont à peine discernables. Les lyrifissures *im* sont situées latéralement, à l'avant du poil *r*₃.

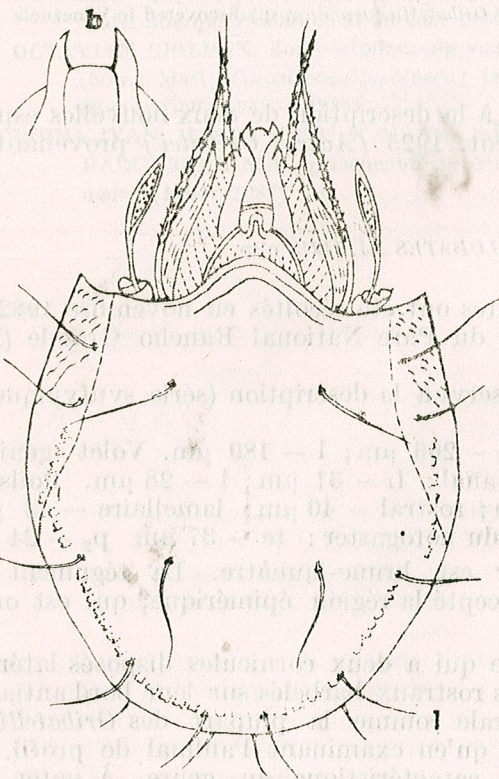


Fig. 1. — *Lamellobates nitidus* n. sp., adulte : a. Corps, vue dorsale. b. Rostrum, vue dorsale.

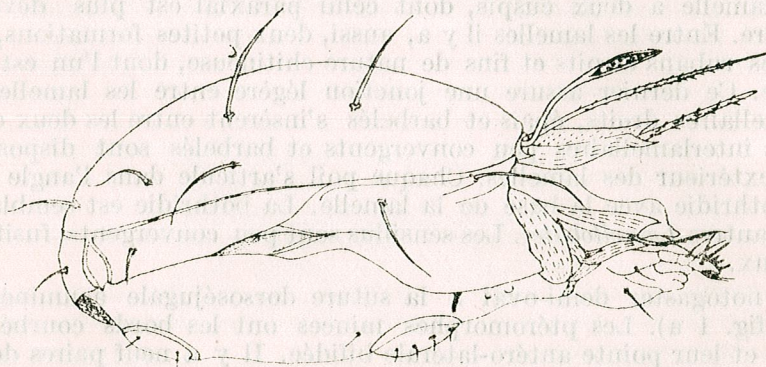


Fig. 2. — *Lamellobates nitidus* n. sp., adulte, corps, vue latérale.

La partie latérale du podosoma fait remarquer le tutorium, qui est comme une carène longue et pointue à l'avant (fig. 2). La dent génale, assez étroite, protège latéralement le camérostome. Le pédotectum *I*

est une lame élargie, disposée obliquement et avec la pointe libre arrondie. Par contre, le pédotectum *II* est réduit et a le sommet arrondi. À côté, il y a le custodium, qui est moins distinct. Le sommet du discidium, bien visible, est aigu. Toutes ces dernières formations ne sont observables que par l'examen de la partie ventrale à cause des ptéromorphes (fig. 3).

En même temps, sur la partie ventrale on voit les apodèmes, courts, disposés obliquement. Les épimères bien individualisés ont des poils lisses sauf *1c* qui est un peu barbelé. La formule des poils épimériques paraît donc être (3 - 1 - 2 - 2). Il existe de chaque côté six poils génitaux, un poil aggénital, deux poils adanaux et deux poils anaux. Tous sont fins, lisses et ont une disposition qui semble être commune aux espèces connues de ce genre. La lyrifissure *iad*, difficilement observable, est tangente à l'anneau périanal.

Les pattes sont monodactyles.

Observation. Cette espèce diffère des autres cinq espèces, déjà décrites du genre *Lamellobates* Hammer, 1958 par l'ensemble des caractères suivants : corps sans ornementation ; rostre avec une paire de cornicules ; lamelles péculières ; les cuspis paraaxiaux les plus développés ; sensillus fusiformes et rugueux ; neuf paires de poils notogastraux fins et lisses ; pédotectum *II* arrondi.

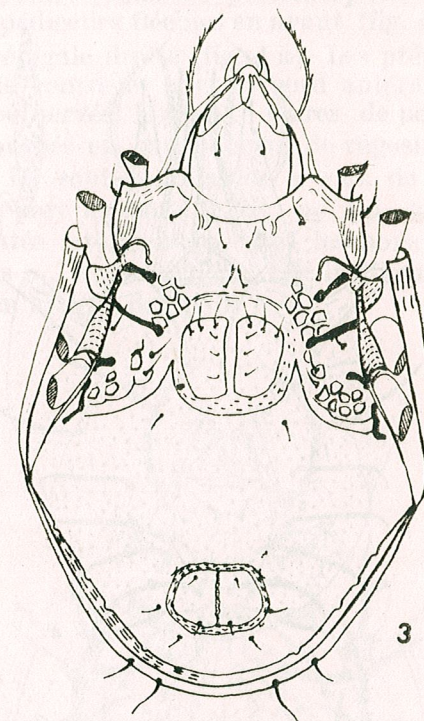


Fig. 3. — *Lamellobates nitidus* n. sp., adulte, corps, vue ventrale.

2. ORIBATELLA JUCUNDA n. sp.

Matériel étudié. Deux adultes récoltés en novembre 1982, de la litière de la forêt tropicale du Parc National Rancho-Grande (Province Araguà) sont déposés chez l'auteur.

Dimensions. Idiosoma : L - 410 μ m ; l - 260 μ m. Volet génital : L - 37 μ m ; l - 31 μ m ; Volet anal : L - 43 μ m, l - 35 μ m. Poils du prodorsum : sensillus - 77 μ m ; rostral - 82 μ m ; lamellaire - 98 μ m ; interlamellaire - 167 μ m. Poils du notogaster : 80 - 86 μ m, sauf *ps*₂ et *ps*₃ - 30 μ m.

Morphologie. La couleur est brune à reflets rouges.

Le tegument a une cuticule à fossettes, excepté celui de la région épimérique, qui a des ornements polygonaux.

Le prodorsum présente le rostre pourvu d'une incision profonde. Le rostre est si courbé en bas, qu'il n'est visible que par l'examen de l'animal de profil (fig. 4a, 5, 6 a). Les poils rostraux sont longs, convergents et barbelés latéralement (fig. 5). Les lamelles disposées presque

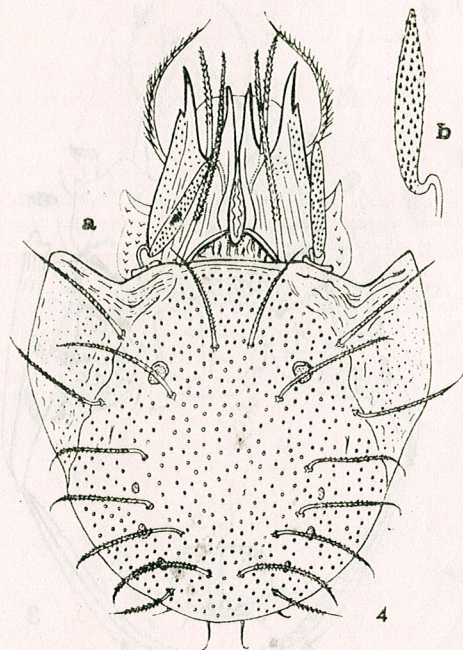


Fig. 4. — *Oribatella jucunda* n.sp., adulete
a. Corps, vue dorsale. b. Sensillus.

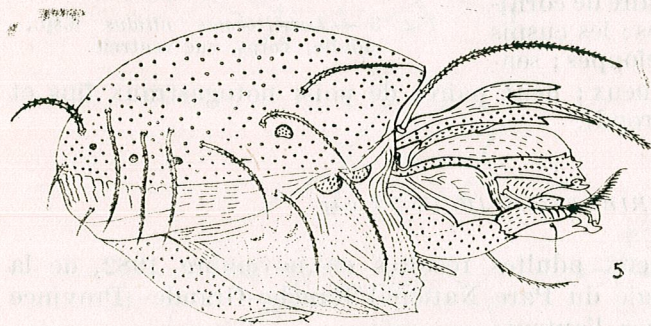


Fig. 5. — *Oribatella jucunda* n.sp., adulte, corps, vue latérale.

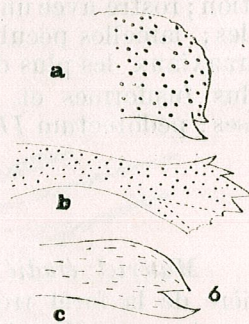


Fig. 6. — *Oribatella jucunda* n.sp., adulte, détails:
a. Extrémité du rostre. b. Tutorium. c. Dent génale.

parallèlement ont leur bord intérieur entièrement séparé en longueur. Cependant, les lamelles à leur base sont unies par un pont étroit et concave. Chaque lamelle a deux cuspidés longs et inégaux, dont celui anti-axial le plus grand est muni d'une dent située extérieurement. Les poils lamellaires robustes et droits sont plutôt rugueux que barbelés.

Leur origine est entre les cuspidés. Les poils interlamellaires droits et aussi rugueux sont fixés sur les parties basales des lamelles. Tous les poils mentionnés dépassent en longueur le prodorsum. Les bothridies orientées vers l'avant sont presque cachées sous les ptéromorphes. Le sensillus fusiforme et rugueux a des pédicelles fléchies en avant (fig. 4b)

Le notogaster a la suture dorsoséjugale droite (fig. 4 a). Les ptéromorphes sont grandes, courbées vers le ventre et avec le bord antérieur nettement dentelé. Leur surface est peu nervée. Il y a 11 paires de poils notogastraux de taille inégale, peu courbés en bas, pourvus de rugosités pareilles à celles des poils *la* et *in*. Ils sont semblables à ceux de *O. serrata* Balogh and Mahunka, 1969, à part les poils *p*₂ et *p*₃ qui sont plus courts. Tous les poils sont orientés latéralement, sauf les poils *ti*, qui sont dirigés vers l'avant et les poils *p*₁, vers l'arrière. Les lyrifissures *im* sont disposées longitudinalement, en arrière des poils *te*.

Le système octotaxique notogastral est représenté par quatre paires d'aires poreuses arrondies et inégales. C'est l'aire *Aa*, qui est la plus grande.

Quant aux aires poreuses sousalaires, elles ne sont bien visibles qu'en observant l'animal de profil.

La partie latérale du podosoma met en relief surtout les caractères suivants: tutorium comme une lame allongée avec le bout libre élargi et denté; dent génale bifidue, grande et orientée vers l'avant; pédotectum *I* comme une lame disposée obliquement, large et sinueuse (fig. 5, 6 b, 6 c).

Sur la partie ventrale, on voit pédotectum *II*, le custodium et le discidium qui n'ont rien à part par rapport aux autres espèces d'*Oribatella* (fig. 7).

Les apodèmes saillants marquent bien les épimères. Les poils épimériques barbelés sont les plus longs poils ventraux. Parmi eux, on distingue le poil *4c* qui est le plus long, touchant le pédotectum *I*, comme celui de la plupart des *Oribatella*. La formule des poils épimériques est (3-2-3-3), donc il y a un poil supplémentaire sur l'épimère *II*.

Les volets génitaux ont six paires de poils effilés et disposés circulairement. Il existe une paire de poils aggénitaux petits et lisses. Les

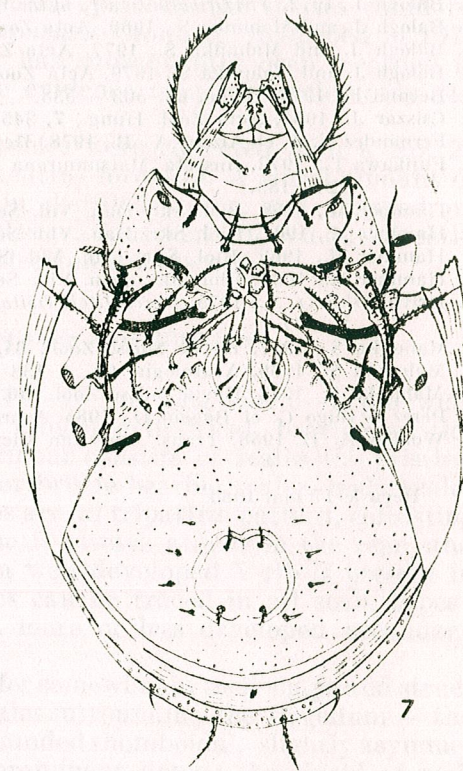


Fig. 7. — *Oribatella jucunda* n.sp., adulte, corps, vue ventrale.

trois paires de poils adanoux peu barbelés se trouvent à l'arrière de la lyrifissure *iad*. Les deux paires de poils anaux sont fins et barbelés.

Les pattes sont monodactyles.

Observation. La nouvelle espèce diffère des autres espèces du genre *Oribatella* Banks, 1895 par les caractères suivants: rostre très courbé en bas a une incision; cuspis éloignés, celui antiaxial plus grand que l'autre et muni, latéralement, d'une dent; sensillus fusiforme, rugueux avec un pédicelle fléchi en avant; 11 paires de poils longs et rugueux sauf les paires de poils *p* (spécialement ceux du p_3 qui sont très courts et lisses); aspect particulière du tutorium et de la dent génale; lyrifissure *iad* sur un alignement de poils adanoux; pattes monodactyles.

BIBLIOGRAPHIE

- Balogh J., 1972, *The Oribatid Genera of the World*. Akad. Kiado. Budapest, 1—188.
- Balogh J. and Mahunka S., 1969, Acta Zool. Acad. Sci. Hung., **15**, 1—2, 1—21.
- Balogh J. and Mahunka S., 1977, Acta Zool. Acad. Sci. Hung., **23**, 3—4, 247—265.
- Balogh J. and Mahunka S., 1979, Acta Zool. Acad. Sci. Hung., **25**, 1—2, 35—60.
- Bernini F., 1978, Redia, **61**, 503—538.
- Csiszar J., 1961, Acta Zool. Hung., **7**, 345—366.
- Fernandez N. A. et Alzuet A. B., 1978, Rev. Soc. Ent. Argentina, **37**, 1—4, 61—65.
- Fujikawa T., 1972, Insecta Matsumurana Journ. Fac. Agric. Hokkaido Univ., **35**, 3, 127—183.
- Hammer M., 1958, Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk., **10**, 1, 1—127.
- Hammer M., 1961, Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk., **13**, 1, 1—157.
- Hammer M., 1962, Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk., **13**, 2, 1—97.
- Hammer M., 1962, Biol. Skr. Dan. Vid. Selsk., **13**, 3, 1—35.
- Krivolutskii D. A., 1975, *Opređeliteli Obitaiusheikh v pocive Kleschecey*, Nauka, Moskva, 1—377.
- Mahunka S., 1977, Revue Suisse Zool., **84**, 1, 247—274.
- Mahunka S., 1969, Acarologia, **21**, 1, 133—142.
- Mahunka S., 1983, Revue Suisse Zool., **90**, 2, 269—298.
- Perez — Inigo C. et Baggio D., 1985, Acarologia, **26**, 2: 183—199.
- Woolley A. T., 1958, Trans. American Microscop. Soc., **77**, 2, 135—145.

Reçu le 17 mai 1986

Centre de recherches biologiques
Iasi, Calea 23 August 20A

MALLOMONAS TRUMMENSIS CRONBERG (SYNURACEAE, CHRYSOPHYCEAE) IN ROMANIA: ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY OF SILICA ARMOUR

LEONTIN ȘTEFAN PÉTERFI and LAURA MOMEU

The silica armour of *Mallomonas trummensis* Cronberg (*Synuraceae*, *Chrysophyceae*) has been reinvestigated by transmission electron microscopy and described in detail. New findings are added to its first description. The species was sampled from populations occurring in the eutrophic ponds of Sintionlunca (Sf. Gheorghe, Transylvania); it has not been recorded in Romania so far. Differences and possible relationships with other species are also discussed.

Plankton samples collected in April 1982, from the eutrophic ponds of Sintionlunca, south-eastern Transylvania near Sf. Gheorghe, revealed the occurrence of a relatively small *Mallomonas* species with anterior bristles. According to its fine structural pattern the species could be readily identified as *Mallomonas trummensis* Cronberg, described in 1975 in Sweden (1). To our knowledge, it has subsequently been recorded in Canada, Holland and Japan, on the evidence of a few scales only (4), (7), (8).

The samples containing this species were collected with a No. 28 plankton net and preserved in 4% neutral formalin. A small amount of cell suspension, repeatedly washed in distilled water, was dropped on formvar-coated grids and dried. The observations were carried out directly under a Tesla BS-100 transmission electron microscope.

ULTRASTRUCTURE OF SCALES AND BRISTLES

The cells are relatively small, 14—16 μm long and 5—6 μm wide (without bristles), elongate ovoid to almost cylindrical, bearing bristles on their anterior end only. The cell armour consists of scales and bristles. The scales are of three types: anterior bristle-bearing scales, body scales and rear scales (Figs 1,2). All the scales are of tripartite pattern, consisting of dome, shield and flange. The dome is always absent in the rear and non-bristle-bearing body scales, but a well developed V-rib is present in all scales. The basic pattern of scales can be traced in all scale types: finely perforated basal plate with a more or less developed secondary layer of ribs and raised dots.

The anterior scales differ somewhat in their shape and structure according to their location. The scales surrounding the flagellum — the so-called collar scales — (Fig. 5) are rounded rhomboidal, slightly asymmetrical, with a relatively small but prominent dome; the shield of such scales has no secondary layer (ornamentation). In some respect these scales are very similar to those of *Mallomonas tonsurata*. The collar scales bear short, unilaterally serrated bristles forming a front tuft (Figs 1, 2, 5). The scales situated next to the collar ones display a large dome (Figs 4—6) covered with small raised conical papillae; their shield is decorated

with 5–7 transversal ribs. These scales are provided with longer bristles which are serrated towards their distal ends only.

The body scales are elliptical or slightly rounded rhomboidal. They lack the dome, instead the thin basal plate is anteriorly ornamented with 2–3 rows of raised dots, running parallel to the rim of scales. The shield is readily provided with 4–7 transverse, sometimes slightly oblique, parallel ribs (Figs 5, 7).

The rear scales are similar to the body ones, except for being smaller, less elaborate and possessing short, conical spikes (Figs 1–3). The shield of the rearmost scales is smooth, without ribs or any other structures (Fig. 3).

Dimensions: 3–4 μm in length and 2–3 μm in breadth; the bristle-bearing scales are the largest.

The bristles are distributed in the anterior third of the cell. They are of two, slightly different types. There are about 8 short (up to 10 μm) unilaterally serrated front-bristles attached to the collar scales and forming an anterior tuft (Figs 1, 5). The next row of scales with dome exhibits longer bristles, up to 18–20 μm in length, which are serrated only towards their distal end. The long bristles are terminated in long, slender tips (Fig. 1). Some of the cells (Fig. 5) lost the long bristles, exhibiting the front tuft only.

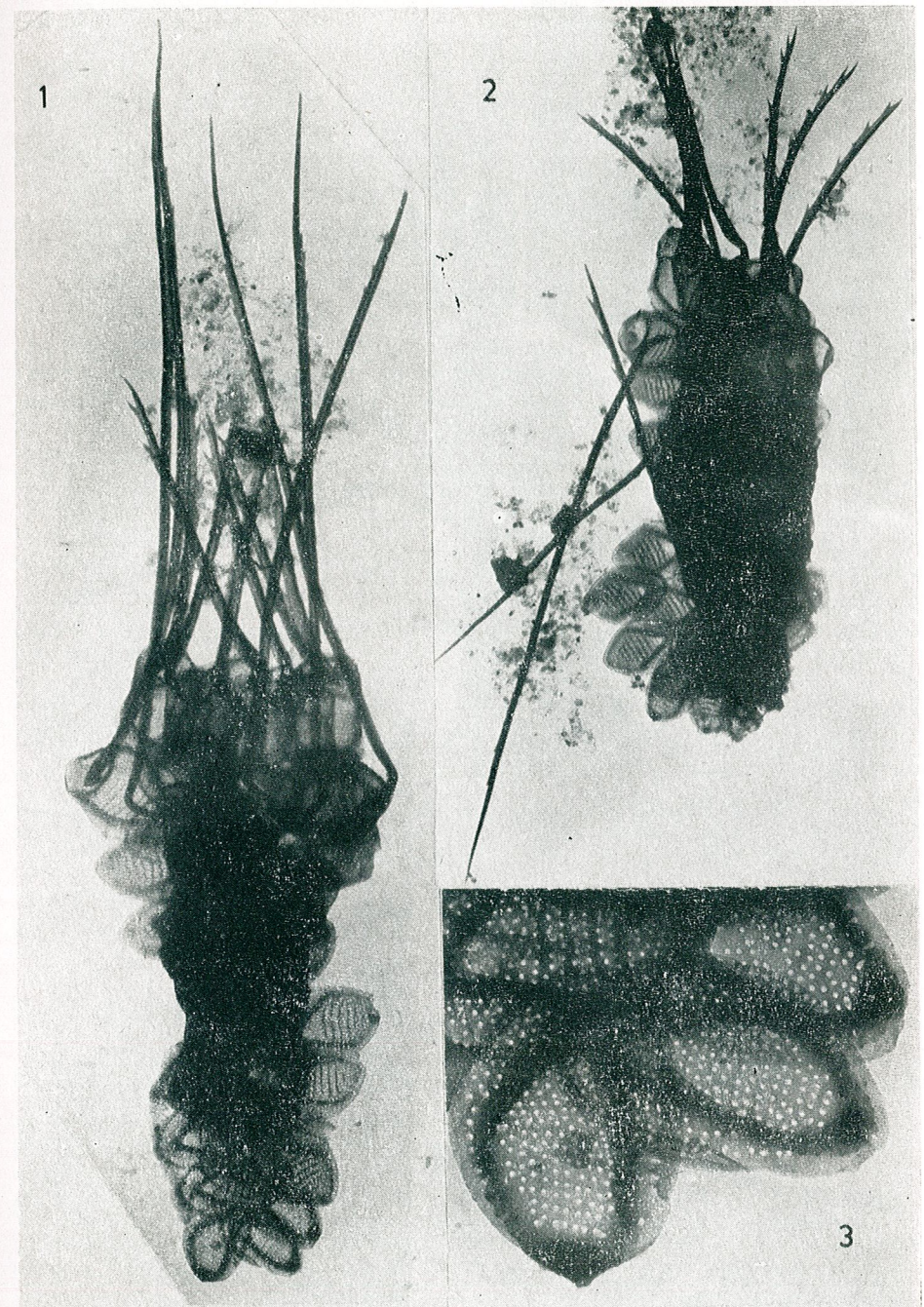
TAXONOMICAL REMARKS

Mallomonas trummensis was described by Cronberg in 1975 ((1), p. 69, Figs 1–2) using both transmission and scanning electron microscopes. Some of her micrographs were republished in 1980 ((2), Figs 108–111). Direct micrographs and carbon replicas of scales labelled by Takahashi ((8), Figs 87, 88, 90, 94) as *Mallomonas tonsurata*, according to their pattern, undoubtedly belong to Cronberg's species. Roijackers ((7), p. 184, Fig. 28) recorded *Mallomonas trummensis* from Holland, on the evidence of a single body scale. The Canadian records of Nicholls ((4), p. 106, Figs 63, 64) were similarly based on isolated scales.

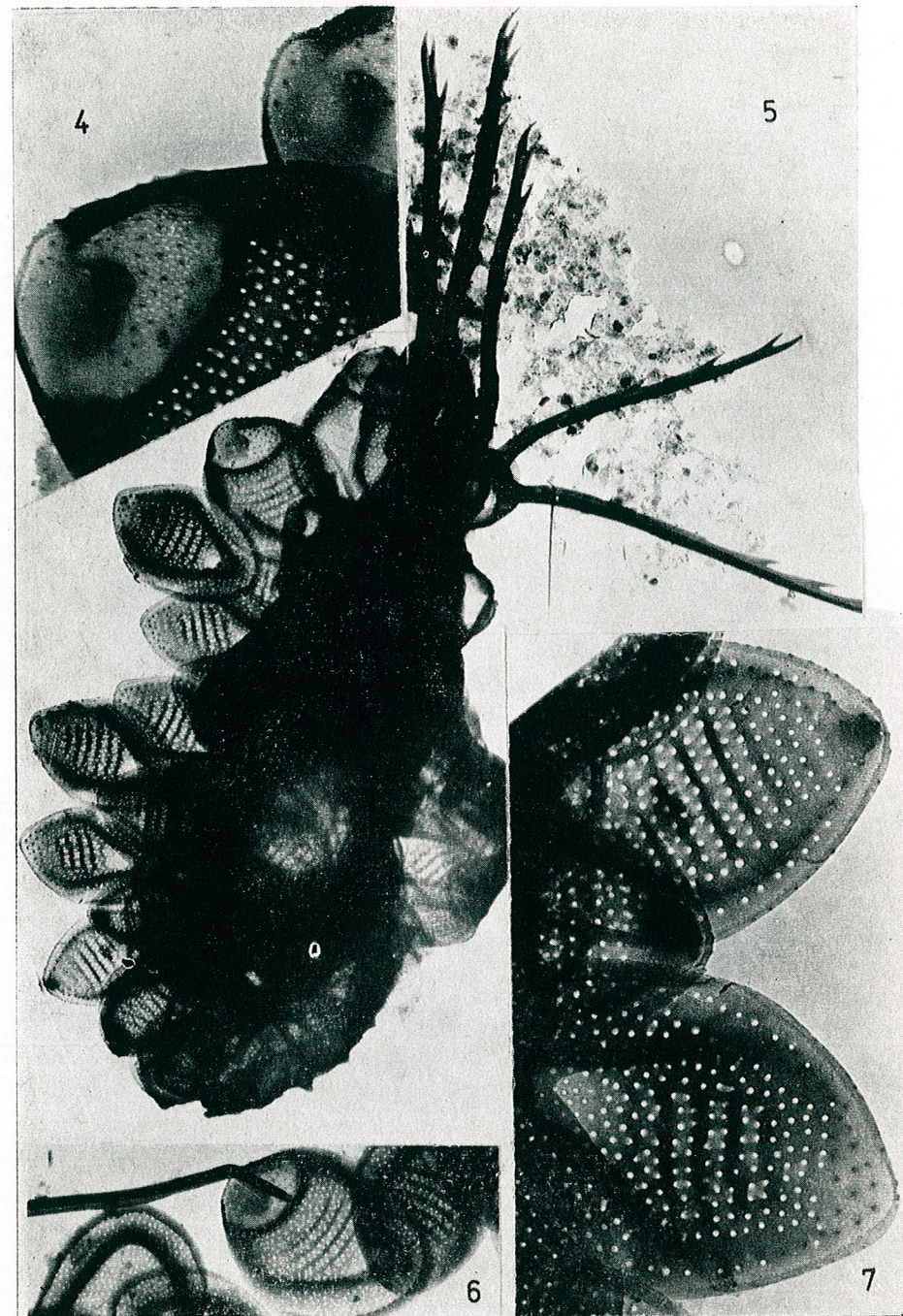
Recently, Kling and Kristiansen ((3), p. 279, Fig. 43) have published some *Mallomonas* scales from Canada, provisionally identified as *M. trummensis*. A closer examination of the micrographs showed that they undoubtedly belong to *Mallomonas robusta* (Matvienko) Péterfi et Momeu ((6) p. 141–143, Figs 8–9, 12, 16).

Mallomonas trummensis somewhat resembles *M. tonsurata*, having only bristles restricted to the anterior portion of the cells and occurring in habitats with similar trophic status. Nevertheless, it readily differs in the structure of scales, decorated with a few transverse ribs on the shield.

It is worth mentioning that both species possess two types of bristles. The differences in the structural pattern of bristles are evident by close examination only. Collar and rearmost scales of *Mallomonas trummensis* sometimes lack the ribbed pattern, therefore isolated scales of these types might be misleading and eventually mistaken for *M. tonsurata*.



Figs 1–3. *Mallomonas trummensis* Cronberg (direct electron micrographs). 1, 2. Whole cell armours showing the distribution and variation of scales and bristles: anterior, body and rear scales; the front tuft of short bristles surrounded by longer ones, $\times 5,200$; $\times 4,400$. 3. Rear scales with short spikes, but lacking transverse ribs, $\times 16,000$.



Figs 4—7. *Mallomonas trummensis* Cronberg (direct electron micrographs). 4. Part of anterior scales showing the structure of dome and shield, $\times 20,000$. 5. Whole cell armour with short bristles only, showing the variation of scales, $\times 7,200$. 6. Anterior body scale with bristle, $\times 10,000$. 7. Part of domeless body scales, showing the structure of shield and flange, $\times 20,000$.

Cronberg's species should be compared with *Mallomonas portae-ferrae* Péterfi et Asmund (5), having a somewhat similar fine structural pattern of scales, i. e. shield decorated with transverse ribs. However, the latter species (5) markedly differs in having cells and scales about twice as large and bristles distributed over the whole cell. The shield of *M. portae-ferrae* has 7—12 transverse ribs.

ECOLOGICAL PREFERENCES

Mallomonas trummensis has seemingly a wide distribution though up to the present it has been recorded only in Canada (North Wildcat Lake, Echo Lake and Pine Lake (4)), Holland (Lake Geuldert (7)), Japan (8) and Sweden (Lake Trummen, Södra Bergundasjön, Ryssbysjön (1)).

The Romanian populations of *Mallomonas trummensis* have been found in small eutrophic ponds. The sampling sites, formerly old river beds of the "Riu Negru", are partly overgrown, during summer, by a typical eutrophic vegetation consisting of *Glyceria maxima*, *Sagittaria sagittifolia*, *Schoenoplectus lacustris*, *Alopecurus aequalis*, *Oenanthe aquatica*, *Potamogeton gramineus* and *Nuphar luteum*. The phytoplankton is characterized mainly by euglenoid flagellates and chlorococcalean algae; in spring the algal community is usually dominated by dinoflagellates and scaly chrysoomonads.

In Sweden this species was found under ice ($t = 0.5 - 2.8^{\circ}\text{C}$), from February to April. The Romanian populations were recorded at temperatures which did not exceed 12°C , in April 1982.

According to Cronberg (1), all lakes in which *Mallomonas trummensis* has been identified are highly eutrophic and polluted to a certain degree. The Romanian sampling sites are equally eutrophic and somewhat polluted by cattle.

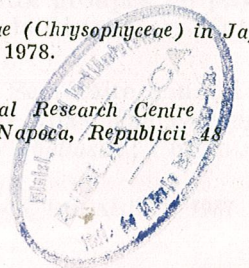
The pH of waters in all findings was almost neutral, ranging between 7.0 and 7.5.

REFERENCES

1. Cronberg G., Bot. Notiser, 1975, **123**, 69—72.
2. Cronberg G., *Phytoplankton changes in lake Trummen induced by restoration. Long-term whole-lake studies and experimental biomanipulation*, Ed. Univ. Lund, Lund, 1980.
3. Kling H. J., Kristiansen J., Nord. J. Bot., 1983, **3**, 269—290.
4. Nicholls K. H., Nova Hedwigia, 1982, **36**, 89—124.
5. Péterfi L.S., Asmund B., Studia Univ. Babeş-Bolyai, Cluj, 1972, **1**, 11—18.
6. Péterfi L. S., Momeu L., Pl. Syst. Evol., 1981, **139**, 137—145.
7. Roijackers R.M.M., Hydrobiologia, 1981, **76**, 179—189.
8. Takahashi, E., *Electron microscopical studies of the Synuraceae (Chrysophyceae) in Japan. Taxonomy and ecology*, Tokai Univ. Press, Tokyo, 1978.

Received August 6, 1986

Biological Research Centre
3400 Cluj-Napoca, Republicii 18



LES NOUVEAUX GÉOCODES DE LA ROUMANIE AVEC
L'EXEMPLE DE LA DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE
DE L'ESPÈCE *HEPTATOMA PELLUCENS* F.
(DIPTERA, TABANIDAE)

ANDY Z. LEHRER

For the Romanian biogeographical research and analysis, there are given the actual geocodes of the districts from Romania and there are presented the geographical distribution of the species *Heptatoma pellucens* F. (Diptera, Tabanidae) in the UTM grid.

En plus du réseau cartographique à mailles rectangulaires *Universal Transverse Mercator* (U. T. M.) comme système de référence géographique, quelques pays ou projets scientifiques utilisent aussi un deuxième système de représentation des surfaces territoriales. Ce dernier cherche à indiquer la hiérarchie des subdivisions politiques-administratives du monde, en se constituant implicitement dans un moyen de vérification des coordonnées kilométriques U. T. M. En même temps, il élimine les confusions qui surgissent souvent à cause soit de l'abondance des localités homonymes d'un même pays ou des pays différents, soit de l'étiquetage négligent et elliptique des collections ou, au contraire, trop pédant et chargé d'informations détaillées, mais inutiles, qui n'ont pas de place sur les étiquettes de dimensions normales. L'association de ces deux systèmes conduit donc à un repérage simple du lieu de la recherche scientifique et à son correcte transposition sur les cartes aréalographiques.

Jusqu'à présent il y a un certain nombre de variantes qui reflètent les unités territoriales. Clayton (1971) rappelle celle utilisée par les pays de N.A.T.O. qui *is based upon continents and regional subdivisions in a three-stage hierarchy* (p. 6), la version récente du code U. D. C., le *Geo-Code* élaboré par Sydney Gould (Connecticut Agricultural Experimental Station) et le système très sophistiqué *Global Reference Code* (G. R. C.) inventé par D. Piacesi et R. A. Creighton (Smithsonian Institution) en 1969, qui est basé sur le pouvoir de la mémoire et du calcul d'un computer.

Les projets biogéographiques internationaux actuels ont adopté le Géo-Code de Gould à cause de sa logique et de son caractère bien attractif. Étant en usage pour les problèmes économiques sur cartes perforées, il sert maintenant pour l'identification des unités et des sous-unités administratives seulement à l'aide de 4 lettres de l'alphabet latin, en utilisant donc un minimum de colonnes d'une carte à 80 colonnes. Ainsi, la première lettre du code est attribuée au continent (« M » pour l'Europe), la deuxième à la sous-zone continentale (aux groupes de pays), la troisième à un pays et la dernière pour désigner le district, le canton, la région etc.

D'après cette formule, J. Heath (le premier Secrétaire général du projet de la *Cartographie des Invertébrés Européens* alias *The European Invertebrate Survey* ou *Erfassung der Europäischen Wirbellosen* ; Promoteur

et Président d'honneur : le Prof. Dr. Jean Leclercq — Belgique) a établi en 1973 les géocodes des pays européens, à savoir :

Albanie	MZAE	Luxembourg	MOMZ
Autriche	MYDE	Monaco	MXKK
Belgique	MOME	Norvège	MLAE
Bulgarie	MVIE	Pologne	MUBE
Chypre	MZVE	Portugal	MSDE
Crète	MZUI	R. D. Allemande	MPFE
Danemark	MLGE	R. F. Allemagne	MPDE
Espagne	MSFE	Roumanie	MVCE
Finlande	MLIE	Suède	MLCE
France	MODE	Suisse	MTEE
Grèce	MZGE	Tchécoslovaquie	MUHE
Hollande	MOQE	Turquie	MZCE
Hongrie	MYFE	U.R.S.S. (p. europ.)	MCEE
Italie	MXEE	Yougoslavie	MVAE

Dans le cadre du projet C.I.E./E.I.S./E.E.W., qui a été reconnu par l'Union Internationale des Sciences Biologiques (I.U.B.S.) en 1976, à Bangalore, comme une « Commission of Invertebrate Survey within the Division of Zoology », nous avons adopté les géocodes de Gould (Lehrer, 1977) pour les districts existants jusqu'à la fin de l'année 1980. Mais, par suite de la réorganisation administrative-territoriale de la Roumanie, après le Decret du Conseil d'Etat no. 15 du 23 janvier 1981, le nombre et la position de certains de ceux-ci ont été modifiés. En conséquence, nous avons été obligés de formuler les nouveaux géocodes (fig. 1), conformes et fonctionnels pour les futures recherches et analyses biogéographiques roumaines. Ils sont :

Alba	MVMX	Hunedoara	MVQL
Arad	MVMS	Ialomița	MVRQ
Argeș	MVRO	Iași	MVNM
Bacău	MVNQ	Maramureș	MVML
Bihor	MVMO	Mehedinți	MVQT
Bistrița-Năsăud	MVMQ	Mureș	MVMU
Botoșani	MVNL	Neamț	MVNP
Brașov	MVNS	Olt	MVQV
Brăila	MVRN	Prahova	MVRL
Buzău	MVRM	Satu Mare	MVMK
Caraș-Severin	MVQO	Sălaj	MVMP
Călărași	MVRU	Sibiu	MVMY
Cluj	MVMT	Suceava	MVNK
Constanța	MVRV	Teleorman	MVRS
Covasna	MVNT	Timiș	MVQK
Dimbovița	MVRK	Tulcea	MVRR
Dolj	MVQU	Vaslui	MVNR
Galați	MVNV	Vilcea	MVQQ
Giurgiu	MVRT	Vrancea	MVNU
Gorj	MVQP	Sectorul Agricol Ilfov	MVRP
Harghita	MVNO	municipiul București 1	MVRP

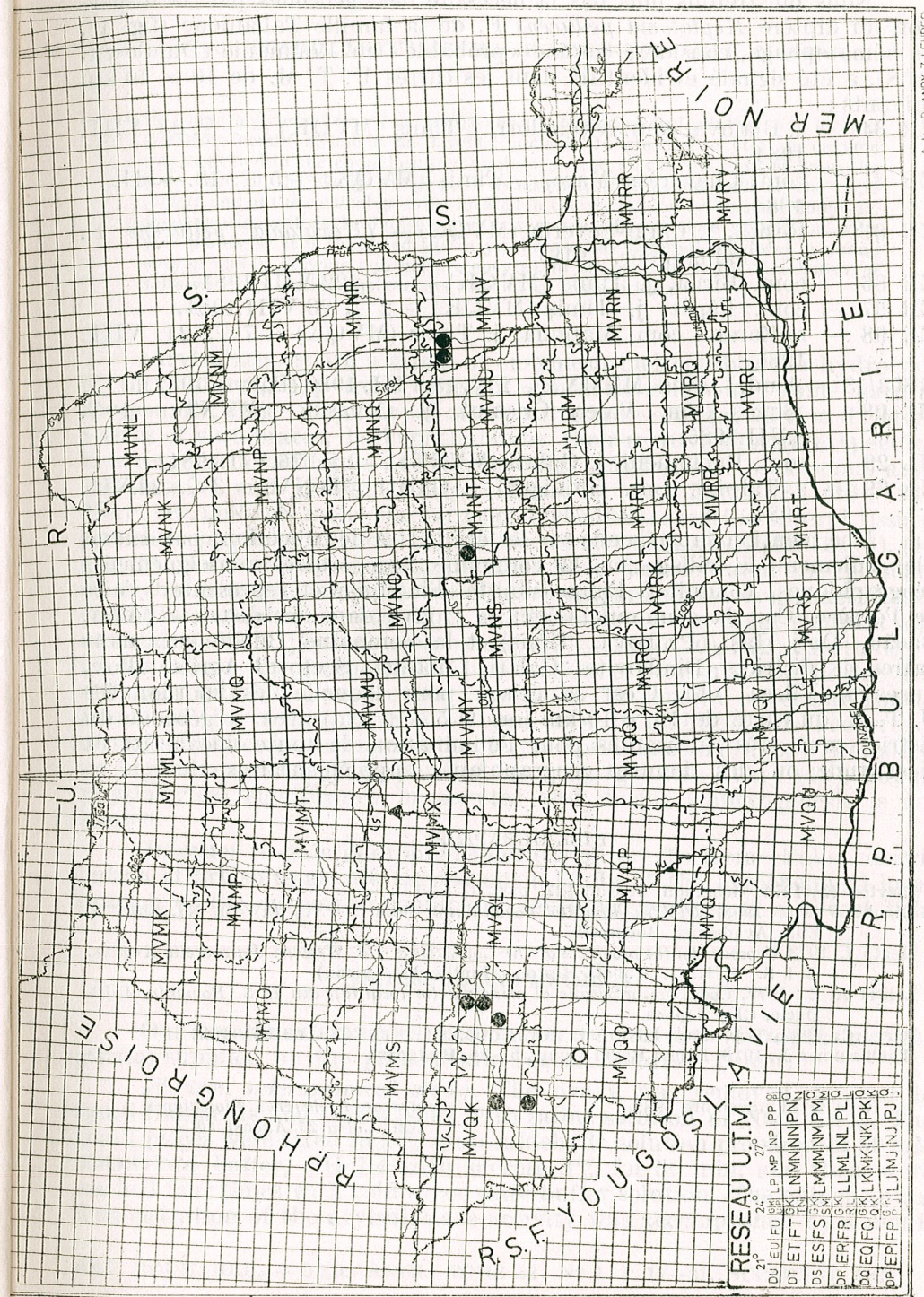


Fig. 1. — Les géocodes actuels de la Roumanie et la distribution géographique du hématoophage *Heptatoma pellucens* F. (Tabanidae). Rond vide : données tirées de la littérature non-confirmées par après (Thalheim, 1918); triangle noir : données tirées de la littérature (Pârvu, 1982); ronds tout noirs : données inédites de l'auteur. Orig.

Nous illustrerons plus bas la nécessité des géocodes par la dispersion du diptère *Heptatoma pellucens* F. de la famille Tabanidae (fig. 1). Ce hématophage, considéré comme « probable » en Roumanie (Dinulescu, 1958), a été signalé et identifié dans les carrés U. T. M. de 10×10 km suivants :

- ER 34 — s. Blajova, com. Nițhidorf, j. Timiș (MVQK) — 2 ♀, 25. VIII. 1984.
 ER 3 — com. Chevereșu Mare, j. Timiș (MVQK) — 5 ♀, 18. VIII. 1984.
 ER 61 — Reșița, j. Caraș-Severin (MVQO) — (*Heptatoma pellucens* F. — Thalhammer, 1918).
 ER 86 — com. Birna, j. Timiș (MVQK) — 1 ♀, 22.VIII.1984.
 ER 97 — com. Făget, j. Timiș (MVQK) — 2 ♀, 23.VIII.1984.
 ER 98 — s. Zorani, com. Margina, j. Timiș (MVQK) — 7 ♀, 24. VIII. 1984.
 GS03/13 — Aiud, j. Alba (MVMX) — 2 ♀, 18.VIII.1980 (Pârvu, 1982).
 ML 08 — Șugaș, com. Valea Crișului, j. Covasna (MVNT) — 1 ♀, 8.VII.1985.
 NL 29 — com. Buciumeni, j. Galați (MVNV) — 2 ♀, 26.VII.1984.
 NL 39 — s. Tâlpigi, com. Ghidigeni, j. Galați (MVNV) — 3 ♀, 29.VII. 1984.

Une mention superficielle sur les étiquettes de collection, par exemple seulement le village ou la commune, sans autres renseignements géographiques, conduit à l'impossibilité d'indiquer et représenter l'aire de l'espèce. Car, la commune Făget se trouve dans six districts (Alba, Bacău, Dolj, Iași, Prahova, Timiș) et la commune Buciumeni dans autres six districts (Dimbovița, Galați, Călărași, Sectorul Agricol Ilfov, Suceava, Vilcea) etc. C'est la raison pour laquelle les coordonnées U. T. M. du carré de 10×10 km (ou de 5×5 km) avec le géocode du district sont très suffisantes pour l'élimination de toute inexactité et incertitude ou des données géographiques supplémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. Clayton K., 1971, Geograph. Journ., **137**, part, 1, 1—13.
2. Dinulescu Gh., 1958, *Diptera. Familia Tabanidae*. Fauna R.P.R., *Insecta*, XI, fasc. 2. Edit. Academiei, București.
3. Heath J., 1973, *Geocodes for the provinces of the Countries of the Western Palaearctic Region*. E. I. S., B. R. C., Abbots Ripton, Huntingdon (xerox).
4. Lehrer A. Z., 1977, *Codul biocartografic al principalelor localități din R. S. Romania*. Edit. Dacia, Cluj-Napoca.
5. Pârvu C., 1982, *Trav. Mus. Hist. nat. « Gr. Antipa »* (1981), XXIII, 155—162.
6. Thalhammer J., 1918, *Fauna Regni Hung.*, 5—76, Budapest.

Reçu le 11 novembre 1985

Centre de Recherches Biologiques
Iași, Calea 23 August 20 A

INTRACELLULAR LOCALIZATION OF ARYLSULFATASE IN FISH OOCYTES

D. SCRIPCARIU, LOTUS MEȘTER, F. MARINESCU and R. MEȘTER

In young oocytes of fish (*Carassius auratus gibelio*), arylsulfatase was located in plasma membrane and at the level of nucleoli. In growing oocytes, the enzyme was identified in the endoplasmic reticulum, in the stacks and vesicles from the trans face of the Golgi complex, in lysosomes, in the microvilli of the zona radiata and in the cortical granules located in the peripheral cytoplasm. Moreover, small vesicles with arylsulfatase activity were identified in close association with yolk platelets. It is suggested that arylsulfatase has different functions in young oocytes and in growing and mature oocytes, in the control of the metabolism of sulfated esters during the process of oocytes maturation.

Arylsulfatases are a group of enzymes which catalyse the hydrolysis of the sulfate group from different synthetic esters and some natural compounds. Three major types of arylsulfatase were identified in different tissues of vertebrates, distinguishable by their relative substrate specificities, response to inhibitors and intracellular localization: microsomal arylsulfatase C and lysosomal arylsulfatase A and B (2), (8), (16), (21). Moreover, multiple molecular forms of arylsulfatase exist in several tissues, but their physiological role has not been well established so far (1), (3), (4), (7), (9). Results of cytochemical studies have demonstrated the presence of arylsulfatase in several intracellular compartments: lysosomes, mitochondria, endoplasmic reticulum, small vesicles of the Golgi complex and associated with plasma membrane (12), (19), (20), (22). Nothing is known about the intracellular localization of arylsulfatase in oocytes, although sulfated glycoproteins appear to be general molecular constituents of the cortical alveoli of eggs (14). In addition, the occurrence of arylsulfatases in the mammalian testes is well known (5), (23). Recently, an arylsulfatase has been purified from the goldfish ovary (13), but its physiological significance in oocytes and during embryogenesis is not known.

In order to gain additional information on the intracellular distribution of arylsulfatase we carried out a study of the cytochemical localization of the enzyme in young and developed oocytes of a teleost fish.

MATERIALS AND METHODS

Our experiments were carried out on crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) supplied by the piscicultural research station Nucet.

Electron microscopical study. The ovary was removed, minced in small fragments and was washed with saline solution of NaCl 0.6%. The small pieces were fixed in 2% glutaraldehyde solution prepared in 50 mM cacodylate buffer, pH 7.4 with sucrose 3% for 30 min, and then were washed four times with cold cacodylate buffer solution. The cytochemical demonstration of the arylsulfatase activity was accomplished by a modi-

REV. ROUM. BIOL. — BIOL. ANIM., TOME 32, N° 1, P. 17—21, BUCAREST, 1987

fication of the method of Zucher-Franklin et al. (22). The pieces were incubated in an incubation medium consisting of sodium acetate buffer 0.1 M, pH 5.0, lead acetate 1 mM and p-nitrocatechol sulfate 5 mM. Incubation was carried out for one hour at 37°C. After incubation, the pieces were washed five times for 10 min in veronal acetate buffer pH 5.0, containing sucrose 3% and were postfixed in 1% osmium tetroxide in acetate-veronal buffer, for two hours at cold. The pieces were dehydrated and embedded in Epon 812 resin. Ultrathin sections were examined either unstained or stained with uranyl acetate and lead citrate in a Philips EM 201 electron microscope.

Histochemistry. For light microscopy study, the pieces of ovary were processed similarly as for electron microscopy, but were embedded in paraffin. For the visualization of the enzyme, the thin sections were treated with 2% aqueous ammonium sulfide for 10 min and the excess of ammonium sulfide was removed by four washes in veronal acetate buffer.

RESULTS

Histochemical localization of arylsulfatase. Histochemical localization of arylsulfatase was followed up in young oocytes and growing eggs. In young oocytes, the enzymatic reaction product appears, mainly, in the plasma membrane of the oocytes and at the level of nucleoli (Pl. I, A). A weak cytochemical reaction for arylsulfatase was identified in the cytoplasm of some young oocytes, especially at the level of some granules located in the peripheral area of the oocytes (Pl. I B, arrow).

At the light microscopic level, the distribution of arylsulfatase in growing oocytes appears different. The reaction product of arylsulfatase was identified in the cortical cytoplasm under the form of small positive granules spread among cortical alveoli (Pl. I A) and at the periphery of the cortical alveoli (Pl. I A, arrow). The lead sulfate reaction product of the enzyme was found also at the periphery of the yolk platelets and in the cytoplasm between these structures (Pl. I A, arrows). Small foci of arylsulfatase reaction product were identified on the surface of the growing oocytes, at the level of the microvillus-like projections of zona radiata (Pl. I A, arrow head). Moreover, arylsulfatase activity appears to be present in the cytoplasm of the follicular cells.

Electron microscopy. In the growing oocytes, arylsulfatase was identified as thin electron-dense precipitates in membranes of the endoplasmic reticulum (Pl. I Da and Pl. II A, arrow). Tiny sites of the reaction product of the enzyme were associated with the Golgi complex, especially on the trans face of the organelle (Pl. II A). In the cortical cytoplasm, that is often in close proximity with the Golgi stacks, small lysosomal structures with arylsulfatase activity are seen (Pl. II A and B, arrow head). However, the reaction product of the enzyme was not found in mitochondria.

Apart from this localization, the reaction product of arylsulfatase was also demonstrated in the vicinity of the yolk platelets. Some, but not

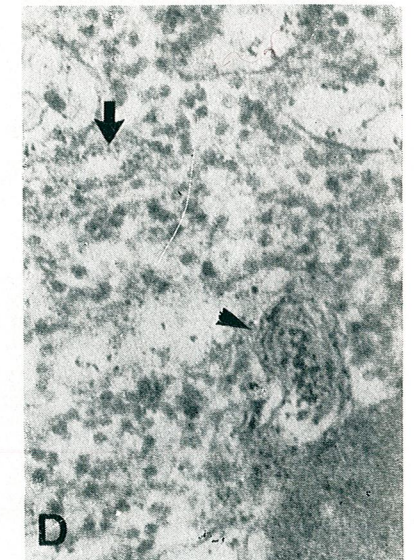
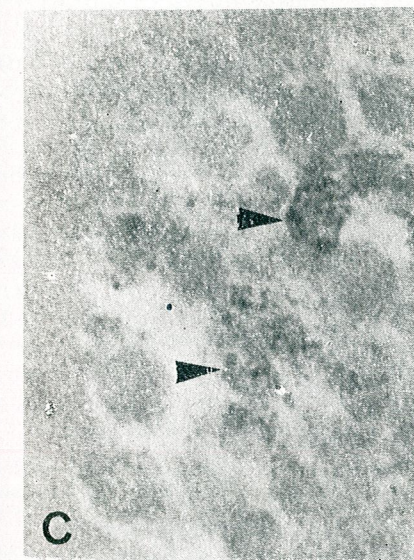
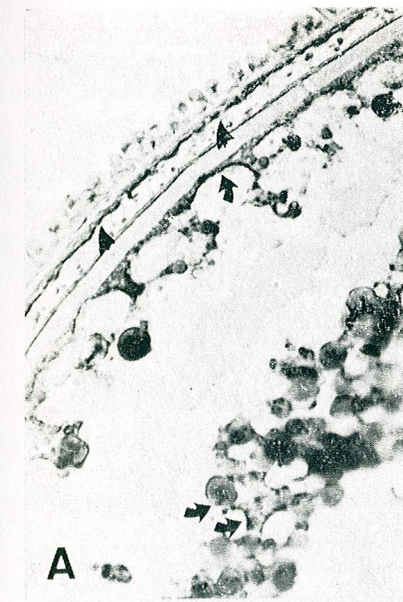


Plate I

- A — Light microscopic image from a growing fish oocyte. The reaction product for arylsulfatase is seen in zona radiata (arrow heads), at the periphery of the cortical alveoli (arrow), in the cytoplasm and concentrated around the yolk platelets (arrows).
- B — Young oocytes. The reaction product for arylsulfatase is seen in the plasma membrane, in the peripheral cytoplasm (arrow) and at the level of nucleoli.
- C — Electron micrograph of fish oocyte (unstained section). It should be noted that the reaction product for arylsulfatase is concentrated in vesicles located at the periphery of the yolk platelets. $\times 45,000$.
- D — Electron micrograph of fish oocyte illustrating the presence of arylsulfatase in endoplasmic reticulum (arrow) and in dense bodies associated with yolk platelet (arrow head). $\times 32,000$.

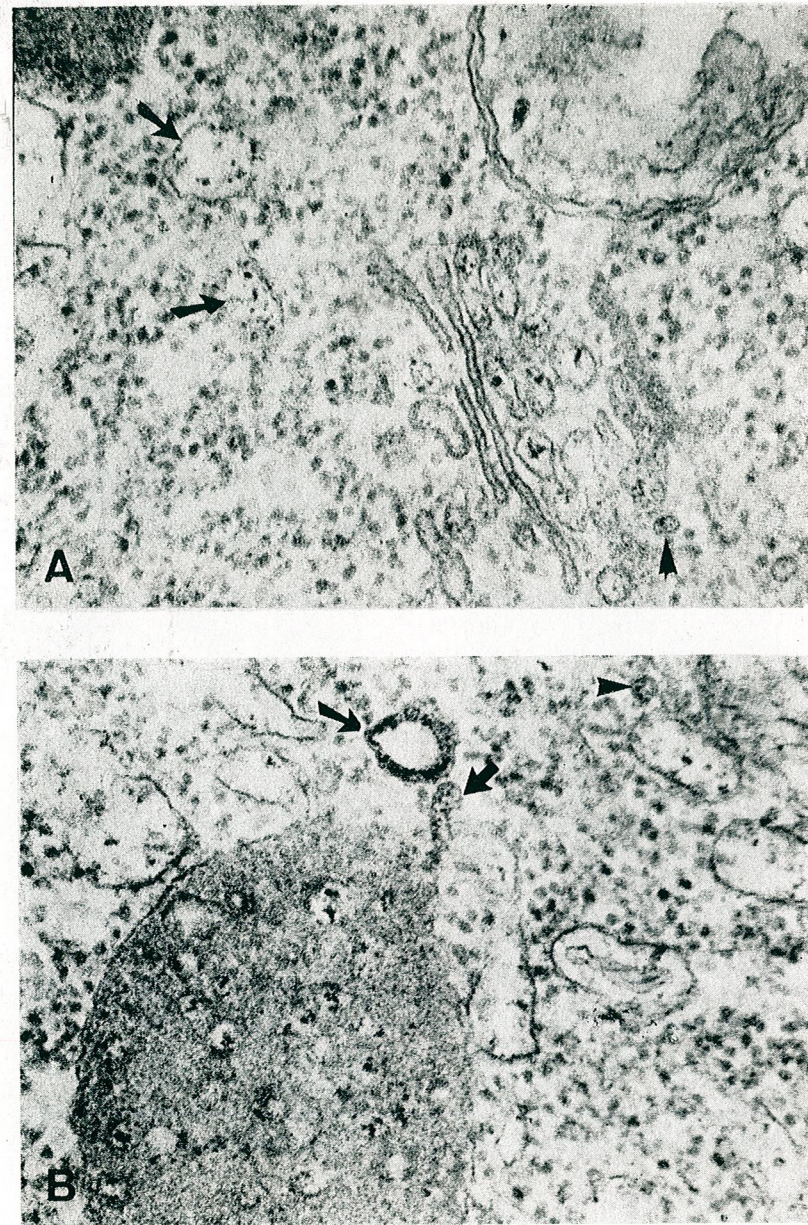


Plate II

- A — The Golgi region from a growing oocyte (fish). The reaction product for arylsulfatase is seen on the trans side of the Golgi complex. It should be noted that arylsulfatase is also seen in endoplasmic reticulum (arrows) and in a lysosome (arrow head). $\times 36,000$.
- B — Cortical cytoplasmic region from a growing oocyte (fish). The reaction product for arylsulfatase is present in the inner structure of the cortical granule, in the lysosome (arrow head) and in vesicles (arrow). $\times 32,000$.

all of the vesicles located in close contact with the platelets were positive for arylsulfatase (Pl. I C and D, arrow head).

In the growing oocytes of fish, a small number of granules occur in the cortical cytoplasm. They are composed of a homogeneous material and contain in their internal structure deposits of the reaction product for arylsulfatase (Pl. II B). Probably, the majority of them are in a process of new formation. Small and large vesicles (probably lysosomes) are seen around these structures, which show a positive reaction for arylsulfatase.

DISCUSSION

The histochemical and electron microscopical study of the intracellular localization of arylsulfatase in fish ovary revealed a heterogeneous distribution of the enzyme in oocytes. Cytochemical staining has provided suggestive evidence on the different intracellular location of arylsulfatase depending on the stage of oocyte development. Although arylsulfatase is not known to play a role in the oocyte function, several aspects of our cytochemical observations are of particular interest.

It has become evident that many molecules, such as glycolipids, glycoproteins, proteoglycans and steroid hormones are sulfated in the Golgi complex (6), (18). Less is known about the location of the enzymes involved in desulfation, but the biochemical information available indicates that a number of arylsulfatases are lysosome associated enzymes (2), (8). Cytochemical identification of arylsulfatase in the Golgi complex of growing oocyte suggests that desulfation, like sulfation, is partly a Golgi function. It is of interest that the reaction product of the enzyme is seen in the vesicles of the trans face of the Golgi complex, suggesting that this process is polarized, similar to other functions of the Golgi stacks. Similarly to other enzymes, the lead sulfate reaction product of the arylsulfatase was localized inside the cisternae, in the cisternal content. It is very likely that arylsulfatases are synthesized in the endoplasmic reticulum, and are transferred to the Golgi complex, where they may influence certain intracellular events. Subsequently, the enzyme reaches its correct intracellular destinations (6).

Recently, arylsulfatase has also been located cytochemically in small vesicles budding off the Golgi apparatus in a subpopulation of peripheral blood lymphocytes (22).

More surprising was the finding of the arylsulfatase in association with yolk platelets. It is likely that vesicles derived from Golgi stacks or lysosomes with arylsulfatase activity participate in the process of desulfation of some compounds which are probably deposited in this structure. However, the relationship of arylsulfatase with yolk platelets remains to be proved by biochemical studies.

Sulfated glycoproteins appear as main constituents of the secretory granules of several types of oocytes (14), but their functional significance is not well understood. The presence of arylsulfatase in some cortical granules and at the periphery of the cortical alveoli suggests the existence of a functional relationship between the enzyme and the sulfated

compounds in the initiation of cortical alveoli discharge in fish eggs at fertilization. Moreover, arylsulfatase may participate in the formation of the fertilization membrane of the future embryo or in the modulation of some biological processes that occur during multiplication and the first stages of development. In this context, it has been shown that arylsulfatase is involved in the cleaving of rat ovum (17).

The identification of arylsulfatase activity in the plasma membrane of young and growing oocytes is of particular importance for cell function. It is well known that steroid hormones from the follicular cells and circulating in the plasma are involved in inducing oocyte maturation in vivo (10), (15). If the sulfated steroids were to be the circulating form of steroids, then one would expect their desulfation to the free steroids in the specific areas of oocyte occurrence, where they perform their hormonal action. Recently, there has also been reported the localization of arylsulfatase in the plasma membrane of lymphocyte killer cells (22), but its role was correlated with the degradation of cerebroside sulfate esters. Evidence has been presented also that the arylsulfatase from rabbit testes facilitates the passage of the spermatozoon through the cumulus of the ovum during the fertilization process (5). These findings suggest that the enzyme's role is still poorly understood and point to the possibility that the arylsulfatase might not necessarily have the same significance in different types of cells.

The presence of arylsulfatase at the level of nucleoli is very intriguing and any statement relevant to its role can only be speculative. The extent to which arylsulfatase plays a role in the maturation of ribonucleoproteins requires further studies. However, a high activity of the oestrone sulfatase and arylsulfatase C in the nuclear fraction of mammalian neuronal cells (11) has been revealed. The physiological significance of the arylsulfatase C and oestrogen sulfatase is not clear at present.

In conclusion, our cytochemical findings indicate that arylsulfatase from the oocytes of fish could discharge several functions in the control of the metabolism of sulfated esters and point out its role in the maturation of oocytes, and probably, in the first stages of development.

REFERENCES

1. Draper R., Fiskum G. M., Edmond J., Arch. Biochem. Biophys., 1976, **171**, 525.
2. Farooqui A. A., Clin. Chim. Acta, 1980, **100**, 285.
3. Farooqui A. A., Roy A. B., Biochim. Biophys. Acta, 1976, **452**, 431.
4. Farooqui A. A., Arch. Int. Physiol. Biochim., 1976, **84**, 479.
5. Farooqui A. A., Srivastava N. P., Biochem. J., 1979, **181**, 331.
6. Farquhar M., Palade G., J. Cell Biol., 1981, **91**, 77.
7. Harzer K., Stinshoff K., Mraz W., Jatzkewitz H., J. Neurochem., 1973, **20**, 279.
8. Hess G., Eur. J. Biochem., 1983, **135**, 505.
9. Hook G., Dodgson K. S., Rose F., Worwood M., Biochem. J., 1973, **134**, 191.
10. Iwamatsu T., J. Exp. Zool., 1978, **204**, 401.
11. Laksmmi S., Balasubramanian A. S., J. Neurochem., 1981, **37**, 353.
12. Murata F., Nagota T., Spicer S., Histochemistry, 1975, **44**, 307.
13. Schell H. D., Iga D., IUPAC Macro Bucharest, 1983, 364.
14. Schuel H., Gamete Res., 1978, **1**, 299.

15. Schuetz A. W., Biol. Reprod., 1974, **10**, 150.
16. Shapira E., Nadler H. L., Arch. Biochem. Biophys., 1975, **170**, 179.
17. Stastna J., Folia Morphol., 1979, **27**, 83.
18. Tartakoff A. M., Intern. Rev. Cytology, 1983, **85**, 221.
19. Thyberg J., J. Ultrastruc. Res., 1972, **38**, 332.
20. Vitaoli L., Bandi A. M., Menghi G., Materazzi G., Acta histochem., 1983, **73**, 193.
21. Waheed A., Van Etten R. L., Arch. Biochem. Biophys., 1979, **194**, 215.
22. Zucker-Franklin D., Grusky G., Yang J. S., Proc. Natl. Acad. Sci., 1983, **80**, 6977.
23. Yang C. H., Srivastava P. N., Biochem. J., 1976, **159**, 133.

Received March 30, 1986

Faculty of Biology
Laboratory of Cell Biology
Bucharest, Splaiul Independenței 91—95

ATTRACTIFS SEXUELS SPÉCIFIQUES
POUR *ADOXOPHYES ORANA* F. v. R. ET *ARCHIPS*
CRATAEGANA Hb.

I. GHIZDAVU¹, F. P. HODOȘAN² et I. OPREAN²

In tests carried out in an apple orchard, mixtures of Z9- and Z11-14 : OAc, applied on rubber stoppers, displayed the best attractancy and selectivity to the males of *Adoxophyes orana* at the 80/20 ratio, and to those of *Archips crataegana* at the ratio of 25/75. As in our zone the two species are sympatric, partially occupy the same ecological niche, and the unique flight of *A. crataegana* overlap the first flight of *A. orana*, they probably use as sex-attractants the same two compounds, and their reproductive isolation is assured by different blendings of both compounds by the females and by different sensitivity of the males to these blends.

Dans les vergers de la Transylvanie les tordeuses nuisibles *Adoxophyes orana* F.v.R. et *Archips crataegana* Hb. sont sympatriques, occupent la même niche écologique (en avril-mai les larves s'attaquent aux bourgeons, aux boutons floraux et aux jeunes feuilles) et le vol de la seconde espèce se superpose sur le premier vol de la première (fin mai — mi-juillet).

Au cours des études antérieures, ayant comme but la mise au point des appâts pour la capture des mâles d'*Adoxophyes orana* (5), quelques formulations contenant des mélanges d'acétate de Z9-tétradécène-1-yl (Z9-14 : OAc) et d'acétate de Z11-tétradécène-1-yl (Z11-14 : OAc), en proportions différentes de celles qui ont capturé les mâles d'*Adoxophyes orana*, ont manifesté une importante attractivité envers les mâles d'*Archips crataegana* Hb.

Ayant en vue que, selon nos informations (1, 4, 8, 12), la composition de la phéromone sexuelle ou de l'attractif sexuel d'*Archips crataegana* n'était pas connue et pour disposer d'appâts spécifiques permettant la surveillance séparée des tordeuses des bourgeons présentes dans les vergers de notre zone, nous avons poursuivi les recherches, leurs résultats formant l'objet de cet article.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a testé l'attractivité et la sélectivité de 21 types d'appâts contenant 1 mg de matière active, représentée par Z9-14 : OAc, Z11-14 : OAc, ou par des mélanges de ces substances en différentes proportions (voir le tableau 1). Les substances, synthétisées selon des méthodes originales et soigneusement purifiées (> 99,6 p. 100), ont été adsorbées sur des capsules de caoutchouc (type bouchon de flacon d'antibiotiques).

Les appâts ont été placés dans des pièges adhésifs (produits par l'Institut de Chimie Cluj-Napoca), suspendus dans la couronne des arbres à 1,8 — 2,0 m du sol. La distance entre deux pièges voisins a été de minimum 100 m en 1983 et minimum 50 m en 1984—1985.

Les campagnes de piégeage se sont déroulées entre 25 mai et 10 septembre, dans un verger de pommiers abritant une riche faune de lépidop-

Tableau 1

L'attractivité et la sélectivité des appâts testés envers les mâles d'*Adoxophyes orana* et *Archips crataegana* (Cluj-Napoca, 1983—1985)

Appât	Composition de la matière active		Captures d' <i>Adoxophyes orana</i>						Captures d' <i>Archips crataegana</i>					
	µg Z9-14 : OAc	µg Z11-14 : OAc	1983		1984		1985		1983		1984		1985	
			Mâles /piège	% du total des lépidoptères	Mâles /piège	% du total des lépidoptères	Mâles /piège	% du total des lépidoptères	Mâles /piège	% du total des lépidoptères	Mâles /piège	% du total des lépidoptères	Mâles /piège	% du total des lépidoptères
C1	1000	—	0,0d	0,0	0,0f	0,0	—	—	0,0c	0,0	0,0g	0,0	—	—
C2	950	50	—	66,8	0,8ef	57,4	7,6e	—	—	—	0,0g	0,0	0,0h	0,0
C3	900	100	12,2b	71,3	4,8e	83,2	18,0b	—	0,0c	0,0	0,0g	0,0	0,0h	0,0
C4	850	150	—	93,6	15,6b	94,6	20,0b	—	—	—	0,0g	0,0	0,0h	0,0
C5	800	200	—	98,4	20,8a	96,8	30,0a	—	—	—	0,0g	0,0	0,0h	0,0
C6	750	250	—	90,1	11,4c	88,4	14,0c	—	—	—	0,0g	0,0	0,0h	0,0
C7	700	300	22,2a	68,3	6,2d	73,6	11,0d	6,9	2,0c	6,9	3,0f	12,1	0,3h	6,8
C8	650	350	—	51,2	2,8ef	61,4	9,0de	—	—	—	6,2e	27,1	3,0f	20,6
C9	600	400	—	24,0	1,4ef	34,0	3,6f	40,3	—	—	6,8e	32,4	3,0f	31,4
C10	550	450	—	18,2	0,6ef	34,0	2,0f	34,0	—	—	11,6d	36,7	5,3c	38,2
C11	500	500	8,8c	16,6	0,4ef	21,4	0,3g	21,4	7,0b	24,1	12,0cd	41,2	5,3c	54,4
C12	450	550	—	11,2	0,2f	18,2	0,3g	18,2	—	—	12,2cd	46,3	5,6e	61,0
C13	400	600	—	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	—	—	21,6b	69,0	9,0c	75,3
C14	350	650	—	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	—	—	24,4b	88,4	10,6b	87,4
C15	300	700	0,0d	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	12,2a	90,6	35,0a	91,4	15,3a	96,3
C16	250	750	—	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	—	—	37,0a	98,2	16,3a	97,3
C17	200	800	—	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	—	—	14,4c	90,3	7,6d	92,4
C18	150	850	—	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	—	—	13,2cd	84,3	7,3de	88,6
C19	100	900	0,0d	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	7,8b	74,5	12,0cd	79,2	6,3e	81,2
C20	50	950	—	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	—	—	4,8ef	80,6	1,0gh	74,3
C21	—	1000	0,0d	0,0	0,0f	0,0	0,0g	0,0	0,0c	0,0	0,0g	0,0	—	—

Les différences entre les captures moyennes marquées par la même lettre ne sont pas significatives au seuil de 95 %.

tères. Les parties adhésives des pièges ont été changées toutes les deux semaines et les appâts toutes les six semaines. Pour assurer aux pièges des possibilités égales de capture, on a entrepris une permutation circulaire dans le cadre de chaque répétition, à l'occasion des observations, effectuées trois fois par semaine.

L'attractivité des divers types d'appâts a été appréciée par le nombre moyen des captures et la sélectivité par la proportion des mâles des espèces étudiées dans le total des papillons capturés. La signification des différences entre les captures moyennes réalisées par les divers types d'appâts a été déterminée par l'analyse de la variance.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Après l'analyse des genitalia on a constaté que tous les papillons appartenant aux espèces *Adoxophyes orana* et *Archips crataegana* capturés ont été des mâles, les matières actives testées ayant agi comme des attractifs sexuels.

Le tableau 1 contient une synthèse des résultats obtenus. De l'analyse des données du tableau il s'ensuit que :

— Les mâles des deux espèces ont été capturés seulement dans les pièges appâtés avec des mélanges Z9/Z11—14 :OAc, les deux composants seuls n'exerçant aucune attractivité.

— Les mâles d'*Adoxophyes orana* ont été attirés par les mélanges Z9/Z11—14 :OAc compris entre 95/5 et 45/55 avec un optimum à 80/20. Ces résultats confirment ceux obtenus antérieurement dans d'autres biotopes (5) et diffèrent légèrement de ceux obtenus en Hollande (attractivité optimale à 90/10) (6, 10, 11) mais diffèrent en assez grande mesure de ceux obtenus en France (attractivité optimale à 50/50) (3). Les différences peuvent être attribuées aux particularités biologiques des populations autochtones et/ou à la différence dynamique de l'émission des deux composants à partir des capsules de caoutchouc en comparaison avec celle réalisée par les capsules de polyéthylène, expérimentées en Hollande.

— Les mâles d'*Archips crataegana* ont été attirés par les mélanges Z9/Z11—14 :OAc compris entre 70/30 et 5/95, l'attractivité optimale étant à 25/75 (proportion presque inverse). Nous remarquons qu'*Archips crataegana* est, à côté d'*Archips argyrospilus* et *A. mortuanous*, une espèce qui utilise dans le « bouquet phéromonal » le Z9—14 :OAc comme composant mineur (2, 8, 9), mais que sa proportion dans l'attractif sexuel est plus importante.

— Il est probable que les deux espèces utilisent pour l'attraction entre les partenaires sexuels un mélange basé sur les deux mêmes composants, l'isolation reproductive étant déterminée en grande mesure par la sensibilité différenciée des mâles envers les différentes proportions de ces deux composants, selon un mécanisme similaire à celui signalé chez les espèces *Adoxophyes orana* et *Clepsis spectrana* (6, 7, 10, 11).

En ce qui concerne la spécificité de l'attraction des appâts testés, illustrée par la proportion des mâles d'*Adoxophyes orana* et d'*Archips crataegana* dans le nombre total des papillons capturés, on peut remar-

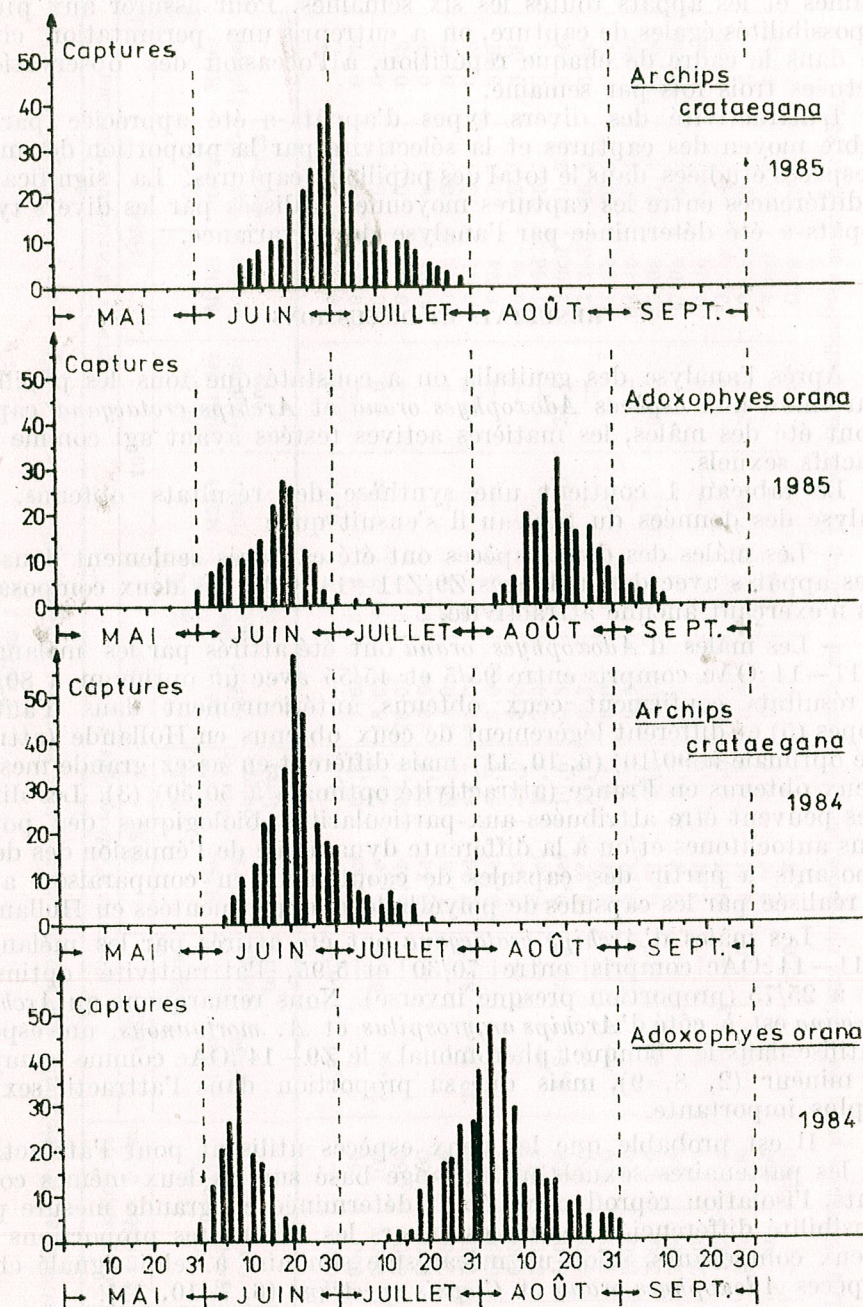


Fig. 1. — Courbes de vol d'*Adoxophyes orana* F.v.R. et *Archips crataegana* Hb. (Cluj-Napoca 1984 — 1985).

quer la supériorité de ceux qui ont manifesté les attractivités maximales ($C_5 - C_6$ pour *Adoxophyes orana* et $C_{13} - C_{18}$ pour *Archips crataegana*). Nous tenons à mentionner que les autres papillons capturés, non spécifiés dans le tableau (jusqu'à 100), appartiennent à des espèces de *Nepticulidae*, *Gracillariidae* (*Lithocolletinae*), *Zygaenidae* et *Noctuidae*. L'importance pratique de ces captures est mineure, à cause de leur nombre réduit et de leurs importantes particularités morphologiques, qui les écarte de toute confusion.

La sélectivité très élevée, mais imparfaite, des meilleurs appâts (C_{16} et C_{15}) et la gamme assez large des mélanges Z9/Z11—14 : OAc qui ont attiré les mâles d'*Archips crataegana* suggèrent que par l'addition d'autres substances (synergistes ou composants phéromonaux naturels mineurs) il est possible d'accroître l'attractivité et la sélectivité de ces appâts.

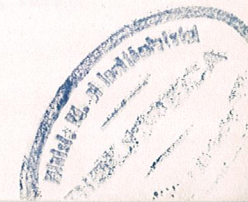
A partir des captures réalisées à l'aide des appâts testés nous avons tracé les courbes de vol des espèces étudiées à Cluj-Napoca (fig. 1). Les courbes tracées confirment l'existence de deux générations par an dans le cas d'*Adoxophyes orana* et d'une seule génération chez *Archips crataegana*. On peut remarquer aussi la haute fidélité de l'enregistrement du vol d'accouplement, la superposition du vol d'*Archips crataegana* sur le premier vol d'*Adoxophyes orana*, ainsi que les décalages qui se manifestent en fonction des conditions climatiques différentes dans les années d'essais (le printemps de 1985 plus froid que celui de 1984).

BIBLIOGRAPHIE

- Bestmann H. J., Vostrowsky O., 1980, in *Chemie der Pflanzenschutz und Schädlingsbekämpfungsmittel* (éd. R. Wegler), vol. VI, 29—164, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg—New York.
- Cardé R. T., Cardé A. M., Hill A. S., Roelofs W. L., 1977, *J. Chem. Ecol.*, **3**, 71—84.
- Chambon J. P., d'Aguillar J., 1974, *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **6**, 423—430.
- Frérot B., Descoins C., Lalanc-Cassou B., Saglio P., Beauvais F., 1979, *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **11**, 617—636.
- Ghizdavu I., Matic S., Hodoșan F. P., Oprean I., Gocan A., 1985, *Bul. Prot. Plant.* (sous presse).
- Minks A. K., Roelofs W. L., Ritter F. J., Persoons C. J., 1973, *Science*, **180**, 1073—1074.
- Minks A. K., Voerman S., 1973, *Ent. exp. appl.*, **16**, 541—549.
- Roelofs W. L., Brown R. L., 1982, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **13**, 395—422.
- Roelofs W. L., Hill A. S., Cardé R. T., Tette J. P., Madsen H., Vakenti J., 1974, *Environ. Entomol.*, **3**, 747—751.
- Voerman S., Minks A. K., 1973, *Environ. Entomol.*, **2**, 751—756.
- Voerman S., Minks A. K., Goewie E. A., 1975, *J. Chem. Ecol.*, **1**, 423—429.
- Collections des revues *Chemical Abstracts* et *Referativnyi Zhurnal, Biologhia*, 1979—1985.

Reçu le 14 décembre 1985

¹ Institut agronomique « Dr. P. Groza »
Chaire d'Entomologie
Cluj-Napoca, Mănăstur 3
² Institut de chimie
Cluj-Napoca, Fintinele 30



BIOENERGETIC PARAMETERS OF SOIL NEMATODE COMMUNITIES IN CONIFEROUS FORESTS IN THE RETEZAT MOUNTAINS

IULIANA POPOVICI

The bioenergetic parameters of soil nematodes in spruce forest, timberline spruce forest and dwarf pine shrubbery in the Retezat Mountains are recorded. The patterns of the energy ways through nematode communities indicated a reduction of these parameters from dwarf pine ecosystem to spruce forests. The indices of efficiency for these communities are also given.

A complex ecological research focused on coniferous forests in the Retezat National Park (the Southern Carpathians) was carried out during 1981 — 1985. Some of the results concerning soil-dwelling consumers, including nematodes, have already been published (9), (11), (12).

This study attempts to estimate the bioenergetic parameters of soil nematode populations in three types of coniferous forests. Nematode abundance and the contribution of different trophic groups to some parameters are also recorded.

MATERIAL AND METHODS

The study was simultaneously made in a stationary system in three areas of the scientific reservation of the Retezat National Park. The chosen ecosystems were: (i) spruce forest — As. *Hieracio rotundatae-Piceetum* Pawl. et Br.-Bl. 1939 on the Zlătuia Valley (1550 m altitude) on acid black soil; (ii) timberline spruce forest — As. *Bruckenthalio spiculifoliae-Piceetum* Borhidi 1971 (1810 m altitude) on humus silicate soil; (iii) dwarf pine shrubbery — As. *Rhododendro myrtifolii - Pinetum mughii* Borza 1959 emend. Coldea 1984 — situated at 1950 m altitude on peaty podzolic soil. For details see Coldea et al. (1) and Popovici et al. (12).

A program of random sampling was used for collecting the soil nematodes at monthly intervals from May to November 1983, the period without permanent snow cover in the area. Details on sampling system, nematode extraction and respiratory metabolism estimations are given in other papers (10), (12).

When reckoning oxygen consumption the differences between adults and juveniles were not taken into account (6). Mean individual wet mass (μg) of specific trophic groups given in Popovici (10) was used in nematode biomass estimations. Production of nematode communities was estimated in two ways by using the regression equations: (a) for short-lived poikilotherms (7); (b) for non-insect invertebrates (5).

Air and soil temperature data were provided by a meteorological station installed in the timberline spruce forest area and these data were considered valid for the other forests as well.

RESULTS AND DISCUSSION

The features of the soil nematode communities are discussed in relation with the specific climatic conditions in these mountains. Mean annual rainfall varies between 1,300 mm in the spruce forest area and 1,200 – 1250 mm at the level of dwarf pine shrubbery. There were 15–27 days with snowfall during the investigated period and an annual mean of permanent snow cover between 140–190 days (according to slope aspect). Mean soil temperature ranges between -4.5°C and 11.3°C (Figs 1,2) (3).

Nematodes were most abundant in the dwarf pine ecosystem ($1,687 \pm 276 \times 10^3 \cdot \text{m}^{-2}$) and least abundant in the spruce forest ($1,264 \pm 161 \times 10^3 \cdot \text{m}^{-2}$). Litter (Olf + Oh) accounted for 32.7 % of the nematodes in spruce ecosystems and 41.6% in dwarf pine shrubbery. The 0–5 cm and 5–10 cm strata of soil contained 31–34% and 26–28.7 %, respectively, with slight differences between ecosystems.

Figure 1 illustrates the monthly variations in number, biomass and oxygen consumption of nematode populations as well as the mean monthly soil temperature.

Seasonal variations in abundance (Fig. 1) show the only significant increase ($2.3 - 2.8 \text{ mil. m}^{-2}$) in autumn (October) in all ecosystems and a severe decrease (0.66 mil. m^{-2}) during summer in timberline spruce forest. These changes in nematode densities cannot be directly related to monthly meanfield temperature and soil humidity (Fig. 2), although the association of frozen temperature and soil humidity could account for the general abundance decrease in November.

The mean biomass (\bar{B}) of nematodes ranged from $402 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ in timberline spruce forest to $637 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ (wet mass) in dwarf pine shrubbery (Table 1). Changes in nematode biomass followed those in nematode abundance (Fig. 1). Nematode biomass and abundance in spruce forest represent only 46 % and 37 %, respectively, of those estimated in the same forest type from the Western Carpathians (11). A standing crop of $465 - 580 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ wet mass was recorded in other coniferous forests in Sweden (13), (14).

The relative proportions of total biomass represented by the trophic groups show the following decreasing order: predators > fungivores + plant feeders > omnivores > bacterial feeders (41, 22, 21 and 12 % respectively).

Using a calorific value for fresh nematode material of $2.152 \text{ cal} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($= 9.01 \text{ joules}$) (16), the energy equivalents of standing crop were calculated at $4.04 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ in spruce forest, $3.62 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ in timberline spruce forest and $5.73 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ in dwarf pine ecosystem.

Changes in biomass (ΔB) of nematodes are more pronounced in dwarf pine shrubbery as compared to spruce forests (Table 1, Fig. 3). The maximum biomass increase is noted in all studied ecosystems in October. The negative changes of biomass are greatest in dwarf pine ecosystem followed by timberline spruce forest (Fig. 3). Standing crop is greater than the initial biomass (B_0) of populations both in spruce and dwarf pine ecosystems and less in timberline spruce forest (Table 1).

The oxygen consumption of nematode communities ranged from 66 to $245.5 \text{ ml} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{month}^{-1}$ (Fig. 1). The highest respiratory metabolism

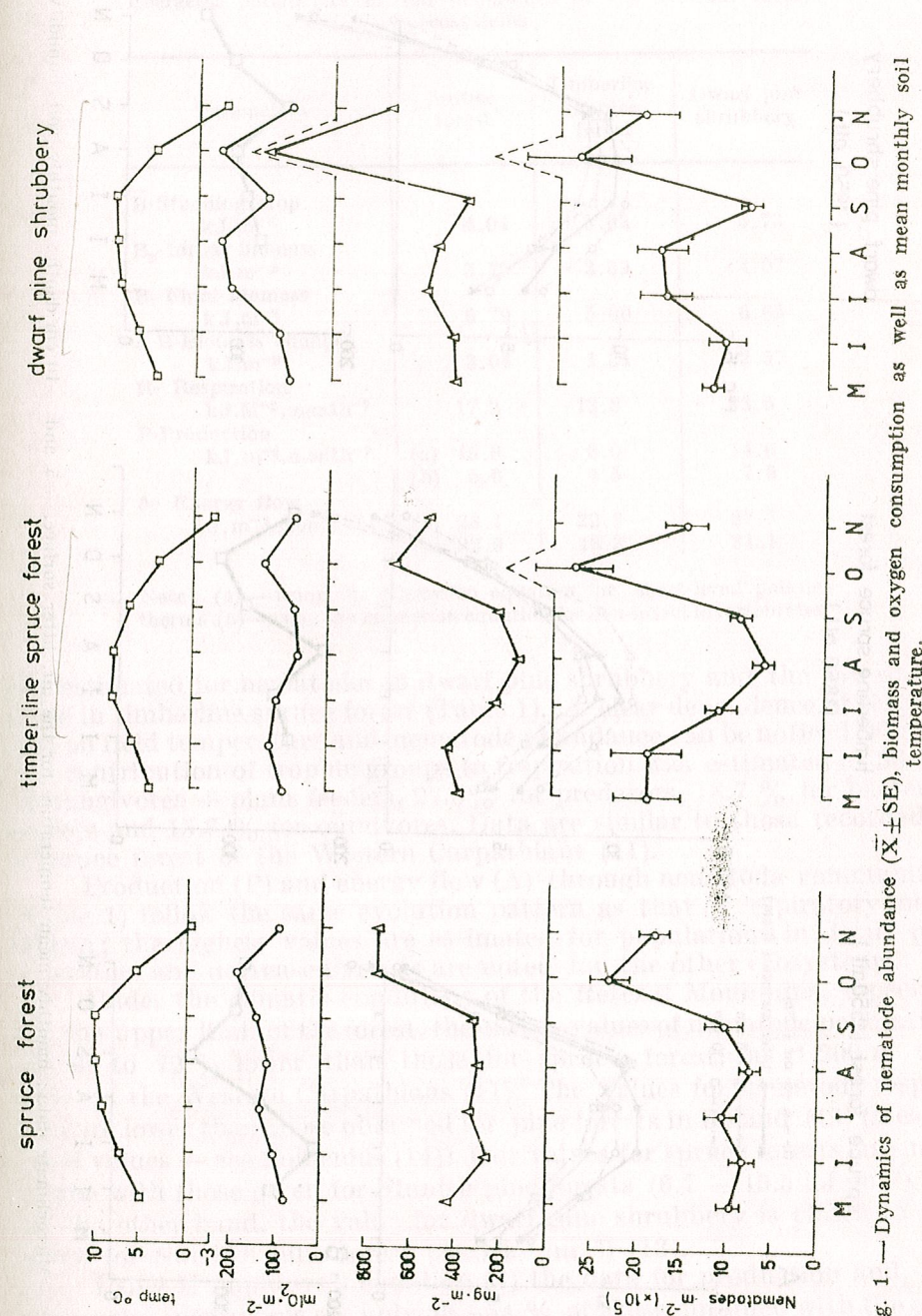


Fig. 1. — Dynamics of nematode abundance ($\bar{X} \pm \text{SE}$), biomass and oxygen consumption as well as mean monthly soil temperature.

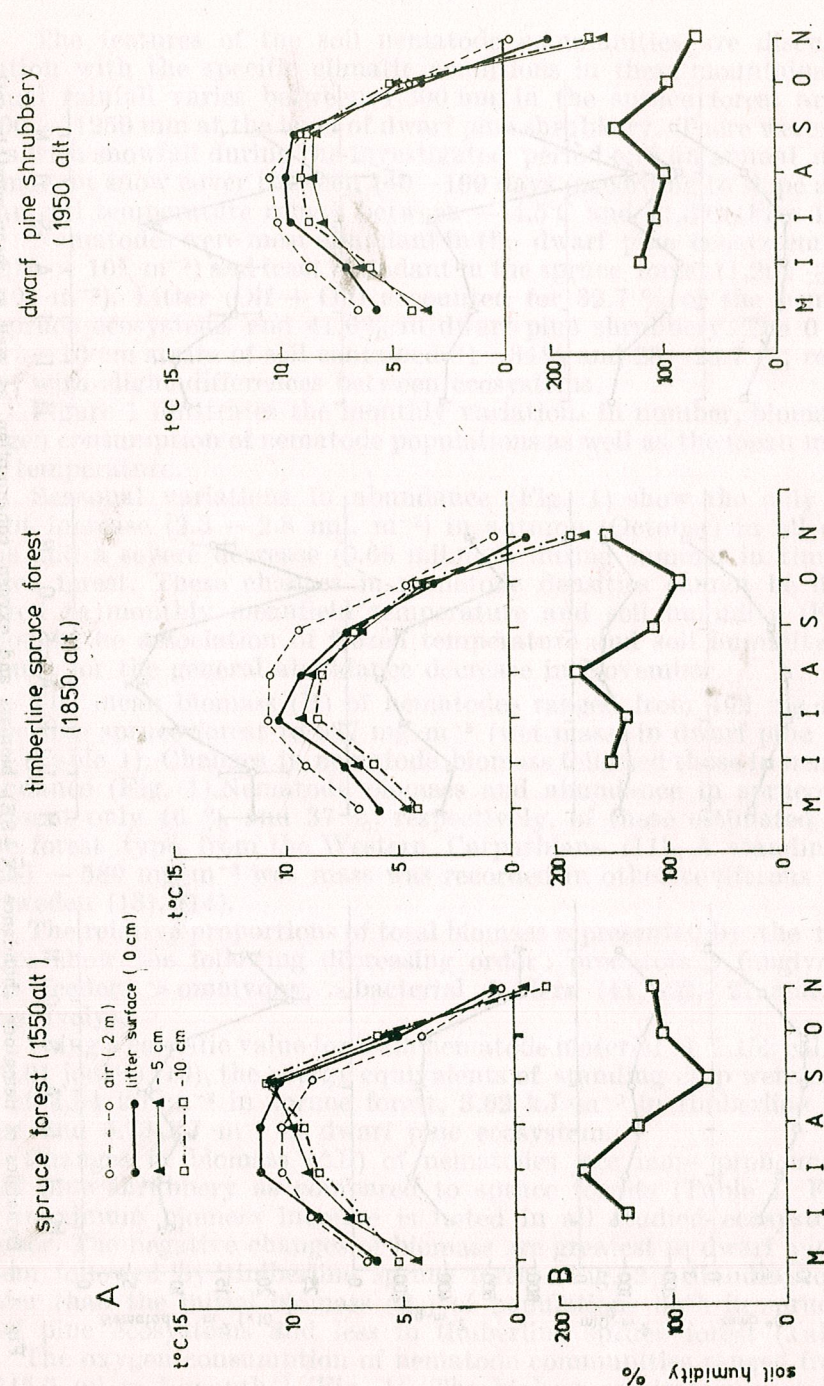


Fig. 2. — Microclimate data: monthly mean temperature for the air, litter surface, —5 and —10 cm depth; monthly soil humidity.

Table 1

Energetic parameters of soil nematodes in the Retezat forest ecosystems

Parameters	Spruce forest	Timberline spruce forest	Dwarf pine shrubbery
B- Standing crop kJ.m ⁻²	4.04	3.62	5.73
B ₀ - Initial biomass kJ.m ⁻²	3.75	3.69	4.07
B _t - Final biomass kJ.m ⁻²	6.79	5.00	6.65
Δ B- Biomass changes kJ.m ⁻²	3.04	1.31	2.57
R- Respiration kJ.M ⁻² .month ⁻⁷	17.3	13.8	23.5
P- Production kJ.m ⁻² .month ⁻⁷	(a) 10.8 (b) 5.6	9.0 4.5	14.0 7.6
A- Energy flow kJ.m ⁻² .month ⁻⁷	(a) 28.1 (b) 22.9	22.8 18.3	37.5 31.1

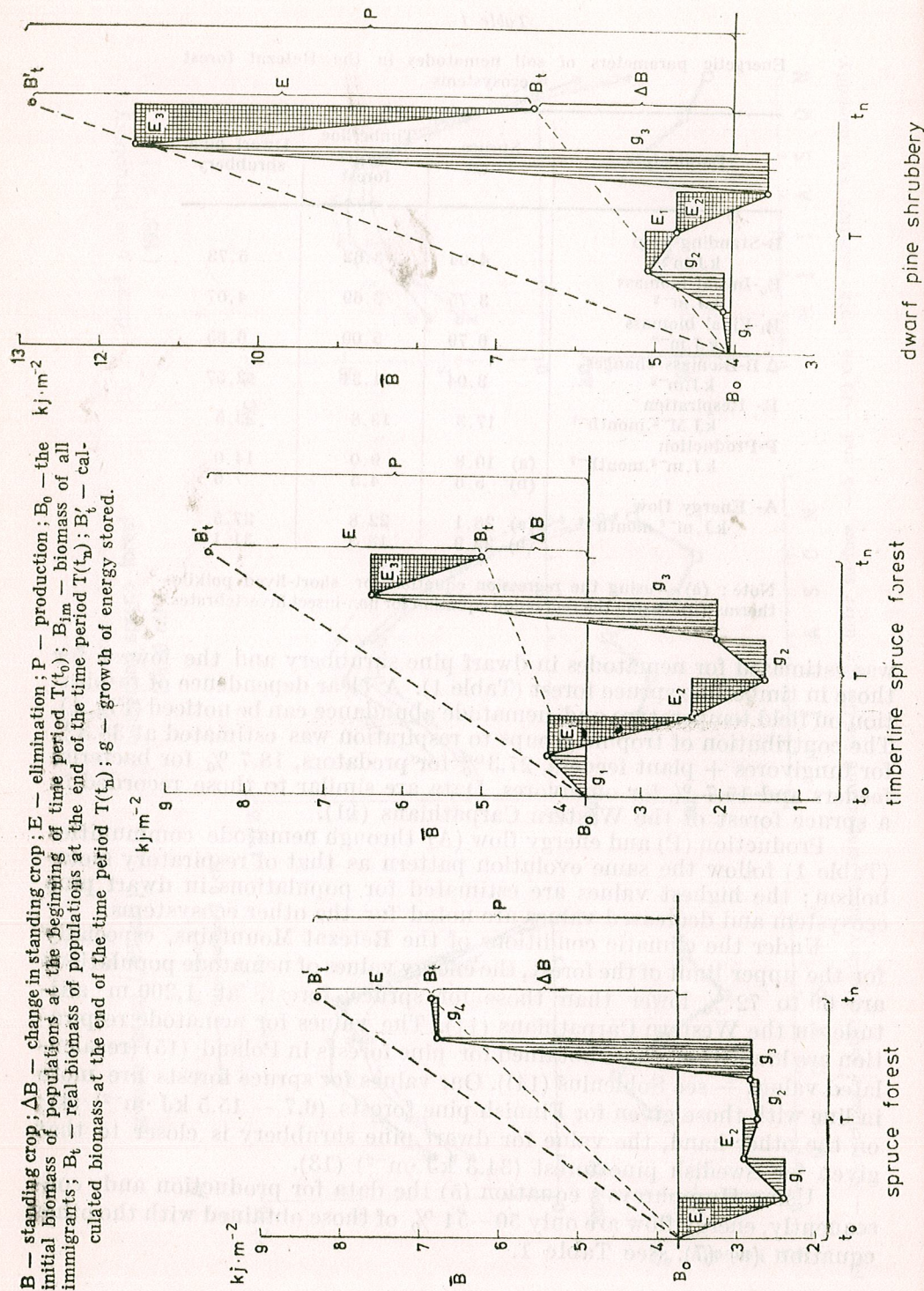
Note: (a) — using the regression equation for short-lived poikilotherms; (b) — using the regression equation for non-insect invertebrates.

was estimated for nematodes in dwarf pine shrubbery and the lowest for those in timberline spruce forest (Table 1). A clear dependence of respiration on field temperature and nematode abundance can be noticed (Fig. 1). The contribution of trophic groups to respiration was estimated at 38.3% for fungivores + plant feeders, 27.3% for predators, 18.7% for bacterial feeders and 15.7% for omnivores. Data are similar to those recorded in a spruce forest of the Western Carpathians (11).

Production (P) and energy flow (A) through nematode communities (Table 1) follow the same evolution pattern as that of respiratory metabolism; the highest values are estimated for populations in dwarf pine ecosystem and decreased values are noted for the other ecosystems.

Under the climatic conditions of the Retezat Mountains, especially for the upper limit of the forest, the energy values of nematode populations are 69 to 72% lower than those for spruce forest, at 1,200 m altitude, in the Western Carpathians (11). The values for nematode respiration are lower than those obtained for pine forests in Poland (15) (recalculated values — see Sohlenius (14)). Our values for spruce forests are more in line with those given for Finnish pine forests (6.7 — 15.5 kJ.m⁻²) (4); on the other hand, the value for dwarf pine shrubbery is closer to that given for Swedish pine forest (34.3 kJ.m⁻²) (13).

Using Humphreys's equation (5) the data for production and, consequently, energy flow are only 50—54% of those obtained with the other equation (a) (7). See Table 1.



B — standing crop; ΔB — change in standing crop; E — elimination; P — production; B_0 — the initial biomass of populations at the beginning of time period $T(t_0)$; B_{im} — biomass of all immigrants; B_t — real biomass of populations at the end of the time period $T(t_n)$; B'_t — calculated biomass at the end of the time period $T(t_n)$; g — growth of energy stored.

Fig. 3 — Models of energy flows.

The patterns of the energy routes through nematode populations (Fig. 4), where the areas correspond to the ratios between the energy values, indicate a reduction of these parameters from dwarf pine ecosystem

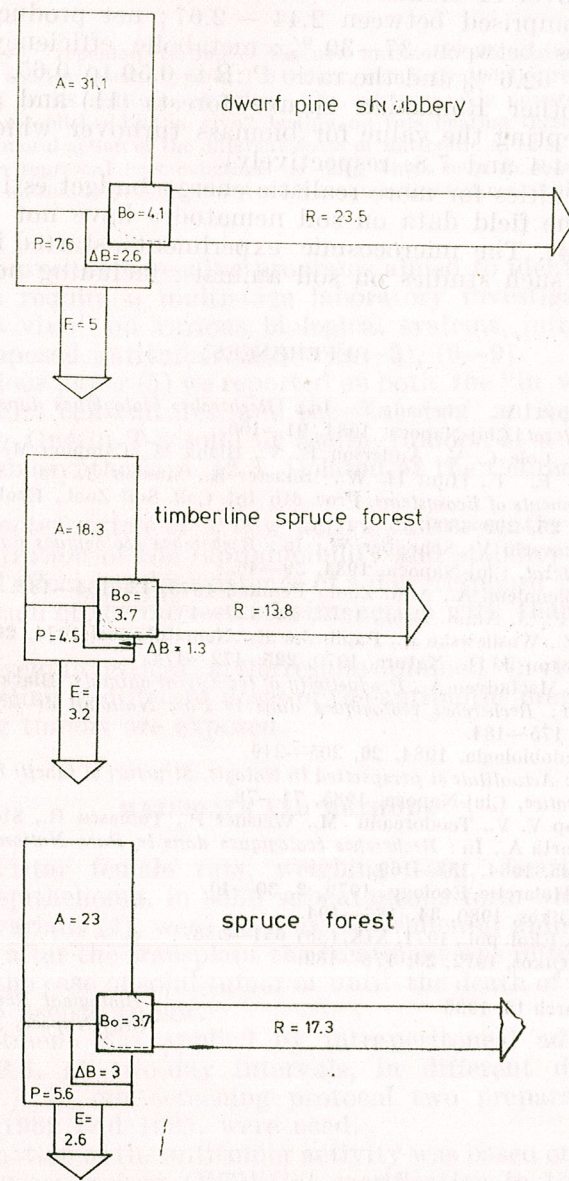


Fig. 4. — Models of main energy ways through nematode communities in three forest ecosystems.

to spruce forest and timberline spruce forest. The energy dissipated through respiration as well as the loss of energy transferred to next trophic level (assuming that $E = P - \Delta B$ when $B_{im} = 0$) (8) represented 92.8 % of

the total energy flow in timberline spruce forest, 92 % in dwarf pine shrubbery and 86.7 % in spruce forest.

The turnover of biomass (P/\bar{B}) (when P is estimated by the first equation) is comprised between 2.44 — 2.67; net production efficiency (P/A %) ranges between 37—39 %; metabolic efficiency (R/A) varies between 60.5 — 62.6 % and the ratio $P:R$ is 0.59 to 0.65. Close data are recorded for other Romanian spruce forests (11) and a Swedish pine forest (13) excepting the value for biomass turnover which is higher in the last ones (4.4 and 7.8, respectively).

The difficulties for more realistic energy budget estimations taking into account the field data on soil nematodes have not been overcome up to now (14). The microcosmic experiments, started in Sweden (2), could improve such studies on soil animals, including nematodes.

REFERENCES¹

1. Coldea G., Lupşa V., Plamada E., In: *Recherches écologiques dans le Parc National de Retezat*, Cluj-Napoca, 1984, 91—100.
2. Coleman D. C., Cole C. V., Anderson R. V., Blaha M., Campion M. K., Clarholm M., Elliot E. T., Hunt H. W., Shaefer B., Sinclair J., In: *Soil Organisms as Components of Ecosystems*. Proc. 6th Int. Coll. Soil Zool., Ecol. Bull. (Stockholm) 1977, 25, 299—309.
3. Farcaş I., Sorocovschi V., Schreiber W., In: *Recherches écologiques dans le Parc National de Retezat*, Cluj-Napoca, 1984, 39—46.
4. Huhta V., Koskenniemi A., Ann. Zool., Fennici, 1975, 12, 164—182.
5. Humphreys W.F., J. Anim. Ecol., 1979, 48, 427—453.
6. Klekowski R. Z., Wasilewska L., Paplinska E., Nematologica, 1974, 20 1, 61—68.
7. McNeill S., Lawton J. H., Nature, 1970, 225, 472—474.
8. Petruszewicz K., Macfadyen A., *Productivity of terrestrial animals*, Blackwell, Oxford, 1970.
9. Popovici I., In: *Recherches écologiques dans le Parc National de Retezat*, Cluj-Napoca, 1984, 175—184.
10. Popovici I., Pedobiologia, 1984, 26, 205—219.
11. Popovici I., In: *Actualitate și perspectivă în biologie. Structuri și funcții în ecosisteme terestre și acvatice*, Cluj-Napoca, 1985, 71—78.
12. Popovici I., Pop V. V., Teodoreanu M., Weisner P., Tomescu R., Stefan V., Georgescu A., Tarța A., In: *Recherches écologiques dans le Parc National de Retezat*, Cluj-Napoca, 1984, 158—169.
13. Sohlenius B., Holarctic Ecology, 1979, 2, 30—40.
14. Sohlenius B., Oikos, 1980, 34, 186—194.
15. Wasilewska L., Ekol. pol., 1971, XIX, (38) 651—688.
16. Yeates G. W., Oikos, 1972, 23, 178—189.

Received March 15, 1986

Biological Research Center
Cluj-Napoca, Republicii 48

FURTHER EVIDENCE OF THE ANTITUMORAL ACTIVITY OF A 12.3 BIOSYNTHESIS ANTIBIOTIC PREPARATION

P. ROTINBERG, SMARANDA KELEMEN, AL. SAUCIUC* and P. JITARIU

The "in vivo" repeated testing of the new antibiotic preparation A 12.3 on rats bearing solid or ascitic Guérin T-8 tumor, demonstrated the reproducibility and stability of its antitumoral action. The existence of a dose-response relationship was established by "in vivo" testing, on rats bearing these tumor lines, of the antitumoral action of the different doses of antibiotic A 12.3. These results represent new experimental data which help to characterize the biosynthesis antibiotic preparation A 12.3 as an active cancerostatic agent.

Chemotherapeutic screening programs aimed to identify new cancerostatic agents require a multistage laboratory investigation, both "in vitro" and "in vivo" on various biological systems, into the action of drugs with supposed antitumor effects (1—3), (6—9).

In a previous paper (5) we reported on both the "in vitro" cytotoxic activity, on HeLa cell cultures, and the "in vivo" antitumor action, on animals bearing Guérin T-8 solid or ascitic tumors, of a new antibiotic preparation of biosynthesis A 12.3, isolated at the Center for Antibiotic Research, Iași.

The characterization of a new active cancerostatic agent is based on the demonstration of the reproducibility and stability of its pharmacotherapeutic effect, on the existence of a dose-response relationship and on the comparison of the induced specific action with that of a standard agent.

In the present investigation the results obtained "in vivo" by repeated tests and by testing of different doses of the antibiotic preparation A 12.3 on rats bearing tumors are exposed.

MATERIALS AND METHODS

White Wistar female rats, weighing 150g, bearing T-8 Guérin lymphotropic epithelioma, in solid subcutaneous form and its intraperitoneal ascitic variant (4), were used as experimental animals.

24 hours after the transplant the treatment was initiated and lasted for 16 days in the case of solid tumor or until the death of the last control animal for the ascitic tumor.

The treatment was applied by intraperitoneal administration of the drug A 12.3, at two-day intervals, in different doses (0.05, 0.1, 0.2 mg/kg.b.w.). In our screening protocol two preparations of A 12.3, isolated in 1982 and 1985, were used.

The estimation of the antitumor activity was based on the follow-up of the mean tumor weight (MTW) at sacrifice in the case of solid tumor or of the mean survival time (MST) in the case of ascitic tumor in the treated groups comparatively with the controls.

The evaluation of antitumor activity was made by the determination of mean tumor regression (MTR) for solid tumor, by the increase

of the MST for ascitic tumor and by the calculation of the statistic significance and the T/C value (where T = mean tumor weight or mean survival time for the treated group and C = mean tumor weight or mean survival time for the controls).

The admissible variability range which is accepted for the assessment of the reproducibility and stability of the testing systems requires that the $T/C \times 100$ value of a retest should be within the limits of $T/C \times 100/1.82$ and $T/C \times 100 \times 1.82$ (the T/C value taken for calculation represents the value of the first test).

RESULTS

Table 1 presents the results obtained when the antitumoral action of the antibiotic preparation A 12.3/1982 was tested and retested on rats bearing Guérin T-8 solid tumor.

In comparison with the control group, it was observed that this treatment induced a significant decrease of MTW, which allows an estimate of MTR values of 46.0%, 44.9% and 48.9%. The corresponding T/C values are 0.54, 0.55 and 0.51.

Taking into account the T/C values obtained, the product of the T/C values in the first two tests is 0.29 and the product of the T/C values in the three tests is 0.14.

Table 1

Testing and retesting of the antitumor activity of the treatment with A 12.3/1982 antibiotic (0.1 mg/kg.b.w./every 2 days) on solid Guérin T-8 tumor (Figures in brackets indicate the number of animals)

Group/Treatment	Mean tumor weight (g)	% tumor regression	Statistical significance	T/C value
CONTROL A 12.3	10.0 ± 1.1 (14) 5.4 ± 1.3 (10)	— 46.0	— p < 0.02	— 0.54
CONTROL A 12.5	14.7 ± 1.3 (12) 8.1 ± 1.9 (10)	— 44.9	— p < 0.02	— 0.55
CONTROL A 12.3	13.4 ± 1.7 (12) 6.9 ± 1.6 (10)	— 48.9	— p < 0.01	— 0.51

Knowing that the $T/C \times 100$ value of the first test is 54%, the calculated limits of acceptable variation are 29.7% and 98.3%. The $T/C \times 100$ values in the retests (55% and 51%, respectively) are within this range.

The results registered in two successive experiments testing the antitumor activity of preparation A 12.3 on ascitic type tumor are included in table 2.

It noted that the A 12.3 treatment induced a strong antitumoral activity illustrated by a significant ($p < 0.001$) increase in MST by 75%

Table 2

Successive testing of the antitumor activity of A 12.3/1982 antibiotic preparation (0.1 mg/kg.b.w./every 2 days) on ascitic Guérin T-8 tumor (Figures in brackets indicate the number of animals)

Group/Treatment	Mean survival time (days)	% increase MST	Statistical significance	T/C % value	% tumor undevelopment
CONTROL A 12.3	23.8 ± 1.5 (14) 41.6 ± 1.0 (3)	— 75.0	— p < 0.001	— 1.75	— 70.0
CONTROL A 12.3	17.6 ± 1.2 (13) 32.7 ± 2.4 (7)	— 85.8	— p < 0.001	— 1.85	— 30.0

correlated with a T/C value of 1.75, and by seven cases of tumor undevelopment.

The $T/C \times 100$ value of the first test is 175%, the minimal and maximal limits of the acceptable variation range being 96.2% and 318.5%.

The retesting experiment gave similar results, pointing out the antitumor action of A 12.3 characterized by a very significant ($p < 0.001$) increase of MST (85.8%), by a T/C value of 1.85 and by three cases of tumoral undevelopment.

The product of the T/C values obtained in the two tests is 3.24. The $T/C \times 100$ value in the retest being 185%, it is situated within the calculated variability range.

The dependence of the antitumoral effect upon the A 12.3 dose has been investigated in rats bearing either solid (table 3) or ascitic (table 4) Guérin T-8 tumor.

It should be mentioned that in this investigation a new A 12.3 preparation, isolated in 1985, was used.

It can be seen that — in comparison with the control group — the progressive therapeutical dose increase correlates with the augmentation of the tumor regressions.

Thus, the minimum effect (10.8% tumor regression) was registered when A 12.3 was administered in a dose of 0.05 mg/kg.b.w., the medium action (19.3% tumor regression) was recorded when the dose was increased to 0.1 mg/kg.b.w. and the maximum antitumoral activity (37.7%

Table 3

Antitumor activity of different doses of A 12.3/1985 antibiotic preparation (mg/kg.b.w. every 2 days) on solid Guérin T-8 tumor (Figures in brackets indicate the number of animals)

Group Treatment	Mean tumor weight (g)	% tumor regression	Statistical significance	T/C value
CONTROL	13.0 ± 1.4 (12)	—	—	—
A 12.3 (0.05 mg)	11.6 ± 0.8 (8)	10.8	N.S.	0.89
A 12.3 (0.1 mg)	10.5 ± 1.7 (9)	19.3	N.S.	0.81
A 12.3 (0.2 mg)	8.1 ± 1.1 (9)	37.7	p < 0.02	0.62

Table 4

Antitumor activity of different doses of A 12.3/1985 antibiotic preparation (mg/kg.b.w/every 2 days) on ascitic Guérin T-8 tumor
(Figures in brackets indicate the number of animals)

Group/Treatment	Mean survival time (days)	% increase MST	Statistical significance	T/C% value	% tumor undevelopment
CONTROL	20.1±1.6(13)	—	—	—	—
A 12.3(0.05 mg)	23.6±5.6(10)	27.3	N.S.	1.27	—
A 12.3(0.1 mg)	34.4±5.8(5)	71.1	p< 0.05	1.71	50.0
A 12.3 (0.2 mg)	38.4±3.5(5)	91.0	p< 0.001	1.91	50.0

tumor regression) was noticed when the antibiotic dose was of 0.2 mg/kg.b.w.

The antitumoral activity induced by different doses of A 12.3/1985 on the ascitic tumor line is presented in table 4.

The group to which the antibiotic A 12.3 was administered in a dose of 0.05 mg/kg.b.w. exhibited a nonsignificant increase of MST, as compared to control animals. The induced antitumoral activity is illustrated by a 27.3% prolongation of MST and by a T/C value of 1.27.

When the dose was increased to 0.1 mg/kg.b.w., the significant MST increase ($p<0.05$) was 71.1% with an associated T/C value of 1.71. Five cases of tumor undevelopment were also registered.

The maximum antitumoral activity was noticed when the antibiotic dose was of 0.2 mg/kg.b.w.. In comparison with the control animals, the treated group exhibited a significantly increased MST ($p<0.001$), characterized by a prolongation by 91.0% and a T/C value of 1.91. Again, the ascitic tumor did not develop in five animals.

DISCUSSION

The identification of new pharmacological agents with antineoplastic activity represents a major concern at present, when chemotherapy holds pride of place.

Chemotherapeutic screening programs aimed to identify new active cancerostatic agents require a multistage investigation on various biological systems (1-3) (6-9).

The characterization of a new drug as an antitumoral agent — the final purpose of a preclinical screening program — is based, among other things, on the evidence of its pharmacotherapeutical effects on various experimental models, on the demonstration of the reproducibility and stability of its antitumoral activity, on the existence of a dose-response relationship.

These experimental aspects were the very purpose of the present study, carried out in laboratory conditions using the new antibiotic preparation A 12.3.

In our "in vivo" screening protocol on tumor bearing rats, the evaluation of A 12.3 antitumoral activity was performed by comparative analysis of the evaluation index values obtained by us with those impos-

ed by the selection criteria of antitumoral substances established by the screening programs of the Institute of Microbiology and Experimental Therapy in G.D.R. (2) and of the Cancer Chemotherapy National Service Center in U.S.A. (3).

According to these screening programs, which are performed in three steps, the selection criteria are as follows:

— to cause, in a first stage, on at least one tumoral system out of the three systems tested, a MTR of at least 35% for solid tumors or an increase of the MST of 30-50% for ascitic tumors in the treated group compared to the controls, or to give a T/C value of 0.54 for solid tumors and 1.25 for ascitic tumors;

— to obtain, in the second stage when retesting the drug in the same dose, a product of the two T/C values of 0.20 for solid tumors and 1.56 for ascitic tumors; to prove, in at least one tumoral system, a dose-response relationship;

— in a third stage, the verification and confirmation of the antitumor activity is performed by a third test, in the case of solid tumors, when the product of the three T/C values should be 0.08; to compare the drug action with that of a standard cancerostatic agent.

Our results obtained after the multistage antitumor activity screening of the antibiotic preparation A 12.3 can be discussed in the light of the above criteria.

The significant tumoral regression values (46.0%, 44.9% and 48.9% respectively), and the significant increases of the MST (75.0% and 85.8%, respectively), obtained in the successive tests, are higher than those imposed by the German screening program (2).

The T/C values calculated in the first, second and third test (0.54, 0.55 and 0.51, respectively) for the solid tumor are similar to the ones established by the American screening program (3). The products of these T/C values (0.29 and 0.14) are very close to the values required by the same program. The T/C values obtained in the two consecutive tests on ascitic tumor line (1.75 and 1.85) and their product (3.24) are higher than those imposed by this screening program.

The T/C × 100 values in the retests for both tumor lines are situated within the limits of the admissible variation range.

These data prove the pharmacotherapeutical antitumoral spectrum of the antibiotic preparation A 12.3 and the reproducibility and stability of the cancerostatic activity which characterized this secondary metabolite of biosynthesis.

Among other things, a chemotherapeutic screening program must give a positive answer to one experimental aspect related to the existence of a dose-response relationship at least in a tumoral system.

By modifying the dose of A 12.3/1985, used in the therapy of the solid and ascitic tumoral lines, the dependence of the antitumoral effect upon the drug dose has been followed.

Thus, the augmentation of the A 12.3 dose from 0.05 to 0.1 mg/kg.b.w. is correlated with an intensification of the antitumoral action of 8.5%, in the case of solid tumor, and of 43.8%, in the case of ascitic tumor.

The increase of the drug dose from 0.1 mg to 0.2 mg/kg b.w. has shown a potentiation of the antitumoral effect of 18.4%, in the case of solid tumor and of approximately 20%, in the case of ascitic tumor.

The analysis of the results registered in this experimental condition demonstrated the existence of a relationship between the therapeutic dose used and the intensity of the cancerostatic activity induced.

The evidence of pharmacotherapeutical antitumoral actions, the demonstration of the reproducibility and stability of effects, the existence of a dose-response relationship and the increased antitumoral potential registered on the ascitic line (a very strong prolongation of MST and a high percentage of tumoral undevelopments) allow us to appreciate the antibiotic preparation A 12.3 as an active cancerostatic agent.

It is therefore advisable to extend the investigations of this secondary metabolite of biosynthesis in order to obtain new preclinical data which could justify its use in the clinical investigation, the only one which can make full use of its practical importance in the human anti-neoplastic chemotherapy.

REFERENCES

1. Eagle H., Foley X., 1978, *Cancer Mes.*, **18**, 1018.
2. Jungstand von W., Gutsche W., Wohlrabe K., 1971, *Drug Res.*, **21**, 404.
3. Leiter J., Abbott B., Schepartz S., 1969, *Cancer Res.*, **25**, 20.
4. Rivenzon A., Comisel V., Leahu L., 1968, *Bull. Cancer*, **55**, 159.
5. Rotinberg P., Kelemen S., Sauciuc, Al., 1986, *Rev. Roum. Biol., Biol. Anim.*, **31**, 97
6. Schepartz S. A. 1971, *Cancer Chemother. Rep.*, **2**, 3.
7. Schepartz S. A., 1977, *Cancer Treatm. Rep.*, **60**, 975.
8. Schepartz S. A., 1977, *Jap. J. Antib.*, **XXX**, S35.
9. Thayer P., Gordon H., MacDonald M., 1971, *Cancer Chemother. Rep.*, **2**, 3.

Received March 20, 1986

Biological Research Center, Iasi,
Calea 23 August 20 A

* Center for Antibiotic Research, Valea
Lupului—Iasi

GLUCOSE UPTAKE AND CONVERSION INTO GLYCOGEN IN ISOLATED DIABETIC RAT AORTA UNDER THE INFLUENCE OF PROCAINE, ASLAVITAL AND GEROVITAL H₃

I. MADAR, NINA ȘILDAN and A. D. ABRAHAM

"In vitro" glucose uptake and ¹⁴C(U)-glucose incorporation into glycogen were followed in the isolated thoracic aorta wall of diabetic rats, under basal conditions and in the presence of procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H₃. It was established that these drugs added to the glucose containing Krebs-Henseleit solution (at equivalent concentrations with 10 μg procaine-HCl/ml medium) increased significantly the rate of transmembranal glucose penetration into the aorta wall, but did not affect the rate of "de novo" glycogen synthesis from radioactive glucose. The results suggest an enhanced glucose catabolism under the direct influence of procaine and procaine containing drugs.

Glucose is known to be a major metabolic and energetic substrate of the arterial wall in normal rats (6), (7), (9). It is well established that diabetes mellitus in rats influences the enzyme activities in aorta (1) and leads to a reduced "in vitro" glucose uptake and glucose oxidation in aortic tissues (5), (6). On the other hand there is evidence that glucose metabolism disorders at the level of diabetic rat aorta are mainly involved in the pathogenesis of diabetic macroangiopathy and arterosclerosis (10), (11), while Aslavital exerts antiarterosclerotic effects in Wistar rats (2).

Recent studies in our laboratory have pointed out specific direct actions of procaine and procaine-containing drugs upon the glucose and glycogen metabolism of normal rat aorta (9) and upon the activity of some enzymes involved in the glucose metabolism and the oxidative phosphorylation of normal rat aorta (13). The present study was undertaken to investigate the "in vitro" influence of procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H₃ on the glucose uptake and its conversion into glycogen in streptozotocin-diabetic rat aorta.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were carried out on the thoracic aorta isolated from male albino diabetic Wistar rats, the glycemia of which varied between 210 and 260 mg%. Diabetes was induced 6 days prior to experiments, by injecting a single dose of 6.5 mg/100 g b.w. streptozotocin "Upjohn" Co., U.S.A.) through one of the tail veins under slight ether anesthesia, the diabetic agent being solved in 0.4 ml 0.01 M sodium citrate buffer (pH = 4.5). Before sacrifice the animals were fasted for 18 hours, with free admission to drinking water. Thoracic aortae were quickly isolated, cut up longitudinally into approximately equal pair hemipieces and immersed for 20 minutes in ice-cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer, without glucose.

Krebs-Henseleit buffer, 0.5 ml, containing 16.7 μ moles glucose and 2 mg gelatine/ml was used as incubation medium. Procaine-HCl ("Hoechst") was added in a final concentration of 10 μ g/ml incubation medium, while Aslavital (U.M.B. Bucharest, series 395-83) and Gerovital H₃ (U.M.B. Bucharest, series 2113-82) were utilized in concentrations calculated on the basis of their procaine-HCl content (10 μ g/ml medium).

The incubation was performed for 2 hours at 37.6°C under basal conditions and in the presence of procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H₃ in an original device (8), with a gas phase of 95% O₂ + 5% CO₂ and a shaking of 90 oscillations per minute and 5 cm amplitude.

Both the basal and the drug-containing media also contained ¹⁴C(U)-glucose (I.F.I.N. Bucharest), the final concentration approximating 400,000 CPM/ml. The specific radioactivity of ¹⁴C(U)-glucose used was 4.5 mCi/mM \pm 5%.

The initial and final glucose content of the incubation medium was determined enzymatically using Test-Combination Glucose Kit ("Boehringer", GmbH, Mannheim, Germany), according to Werner et al. (14).

The colour intensity of the samples was measured spectrophotometrically (Spekol, Carl Zeiss, Jena) at 610 nm.

The rate of glucose penetration from the medium into the hemiaortae was expressed in/micromoles/glucose uptake 100 mg fresh tissue per 2 hrs.

After incubation, each aortic preparation was washed in Krebs-Henseleit buffer (without glucose) and macerated for 30 minutes in boiling KOH 30%. The glycogen was precipitated and separated by two washings with 60% ethanol and two corresponding centrifugations at 4,000 rpm, 60 min. each. The isolated glycogen was solved in 1 ml double-distilled water and its concentration determined in 0.1 ml of this solution according to Montgomery (12). The remaining 0.9 ml solution from each sample was completed with Bray's scintillation liquid to 5 ml and the radioactivity was measured in a liquid scintillation spectrophotometer type Inter technique-Paris (efficacy for ¹⁴C = 95%). The specific activity of ¹⁴C(U)-glucose-marked glycogen by the "in vitro" incorporation was expressed in CPM/2 hrs. per 100 μ g glycogen.

The results were statistically checked for the homogeneity of the means using Chauvenet's criterion. Mean values were compared according to Student's *t* test, *P* = 0.05 being accepted as the limit of significance.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The data summarized in Table 1 show that under basal conditions the "in vitro" glucose uptake by the isolated diabetic rat aorta varies between 0.950 and 0.981 micromoles/100 mg fresh tissue per 2 hrs. Procaine-HCl intensifies the glucose uptake by 20.3% (*P* < 0.05), while Aslavital and Gerovital H₃ enhance it by 29.4 and 35.7% respectively (*P* < 0.05), as compared to the corresponding basal values.

From the results given in Table 2 one can see that the rate of "in vitro" ¹⁴C(U)-glucose incorporation into the glycogen of the diabetic

Table 1

The mean values \pm S.E. of the "in vitro" glucose uptake by the thoracic aorta of diabetic rats under basal conditions and in the presence of procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H₃

micromole glucose uptake/100 mg tissue/2 hrs			
BASAL	PROCAINE	%Diff.	P
0.955 \pm 0.079 (8)	1.149 \pm 0.075 (8)	+20.32	<0.05
BASAL	ASLAVITAL	%Diff.	P
0.961 \pm 0.076 (8)	1.234 \pm 0.070 (8)	+29.41	<0.05
BASAL	GEROVITAL	%Diff.	P
0.981 \pm 0.101 (8)	1.331 \pm 0.099 (8)	+35.76	<0.01

(The number of experiments is given in brackets. Percent differences and *P* are calculated vs. corresponding basal values).

Table 2

The rate of the "in vitro" ¹⁴C(U)-glucose incorporation in glycogen of the thoracic aorta of diabetic rats under basal conditions and in the presence of procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H₃

CPM/2 hrs/100 μ g glycogen			
BASAL	PROCAINE	%Diff.	P
271 \pm 29 (8)	275 \pm 35 (8)	+1.47	>0.50
BASAL	ASLAVITAL	%Diff.	P
266 \pm 31 (8)	287 \pm 25 (8)	+7.89	>0.50
BASAL	GEROVITAL	%Diff.	P
228 \pm 17 (8)	233 \pm 16 (8)	+2.19	>0.50

(The values represent means \pm S.E. The number of experiments is given in brackets. Differences and *P* are calculated vs. corresponding basal values).

rat aorta wall under basal conditions ranges between 228 and 271 CPM per 2 hours/100 μ g glycogen. Procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H₃ do not appreciably modify this phenomenon as compared to the basal one (*P* > 0.50).

By comparing the data presented here with those recently obtained by us on isolated normal rat aorta (9), it is obvious that streptozotocin-

diabetes reduces significantly both the rate of glucose uptake and glucose incorporation in the glycogen of the aorta wall. These observations are in good agreement with the data demonstrating that in the aorta wall of diabetic rats the "in vitro" glucose consumption, the conversion of glucose into glycogen, lactate, CO_2 and lipids are significantly diminished and the hexokinase activity and ATP concentration are decreased (1), (6), (15).

As results from our data, in the presence of procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H_3 the "in vitro" glucose consumption of the diabetic aorta is improved, but the rate of $^{14}\text{C}(\text{U})$ -glucose conversion into glycogen remains unchanged as compared to the basal values. On this basis it is pertinent to assume that procaine-HCl and procaine containing drugs besides their direct stimulatory effects upon the transmembrane glucose transport from the incubation medium into the tissues of diabetic aorta also enhance the glucose catabolism by increasing the glycolysis and oxidation of glucose to CO_2 . This hypothesis is supported by the observations that procaine and Gerovital H_3 stimulate oxidative phosphorylation in certain tissues of white rats (3), (4). At the same time, our earlier histo-enzymatical studies suggest that in the aorta isolated from normal rats, procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H_3 intensify "in vitro" the activity of lactate-dehydrogenase, succinate-dehydrogenase, cytochrome oxidase and ATP-ase (13) and increase the capacity of the aorta wall for glucose utilization "in vitro" (9).

In conclusion, procaine-HCl, Aslavital and Gerovital H_3 enhance the "in vitro" glucose uptake of the diabetic rat aorta, without affecting the rate of "de novo" glycogen synthesis from glucose at the level of the aorta wall.

Acknowledgements. We thank Eva Madar for her skilful technical assistance. The investigations were supported by the Institute of Physics and Nuclear Engineering, Măgurele-Bucharest, Romania.

REFERENCES

1. Argren A., Arnqvist H. J., *Diabete et Metabolism* (Paris), 1981, **7**, 19-24.
2. Aslan A., Matei-Vlădescu C., Simion H., Ciobanu G., Apostol G., Rădăceanu, V., *Rom. J. Geront. Geriatrics*, 1983, **4** (4) 289-295.
3. Aslan A., Rusu C., Cofaru S., Brazdes L., Constantinescu E., *Rom. J. Geront. Geriatrics*, 1980, **1** (1) 47-53.
4. Bai F., Nichel R., Rossignol P., *Mechanism of ageing and development*, 1984, **26** (2-3), 227.
5. Capron L., Phillippe M., Fiessinger J. N., Housel E., *Diabete et Metabolisme* (Paris), 1984, **10**, 78.
6. Dobikvis H. H., Arnqvist H. J., Norrby K., *Diabete et Metabolisme* (Paris), 1981, **7**, 275-281.
7. Doly M. M., *J. Physiol.*, 1976, **23**, 16.
8. Madar J., *Studies of the role of adrenal cortex in the carbohydrate metabolism of white rats*. Doctoral thesis, University of Cluj, Romania, 1966.

9. Madar J., Sildan N., Abraham A. D., *In vitro effects of procaine, Aslavital and Gerovital H_3 upon the glucose penetration and conversion into glycogen in the diaphragm and aorta of white rats*, in *Seminar of Some Romanian Original Drugs*, CIP Press, Bucharest, 1985, 123-133.
10. Magyar I., *Acta med. Acad. hung.*, 1955, **3**, 37.
11. Magyar I., Tamas Gy., *Diabetes Mellitus*, Ed. Medicina, Budapest, 1979, p. 268.
12. Montgomery H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **67**, 378.
13. Rusu V. M., Madar J., Abraham A. D., Sildan N., *In vitro effects of procaine, Gerovital H_3 and Aslavital on the histoenzymatical aspect of rat aorta*, in *Seminar on Some Romanian Original Drugs*, CIP Press, Bucharest, 1985, 147-157.
14. Werner W., Rey H.-G., Wielinger H., *Z. analyt. Chem.*, 1970, **252**, 224.
15. Wertheimer H. E., Ben-Tor V., *Diabetes*, 1962, **11**, 422-425.

Received November 28, 1986

Biological Research Centre
Cluj-Napoca, Republicii 48

NEW DATA ON TISSUE METABOLISM IN RAINBOW TROUT ONTOGENESIS

C. WITTENBERGER, RODICA GIURGEA, GH. FRECUȘ, D. COPREAN, I. MADAR and ANA ILONCA*

Ontogenetical modifications of some parameters of liver and muscle metabolism from the age of 1 to 48 months are described. Some seasonal variations are also reported. The general characteristic of tissue metabolism is that of a carnivorous animal, whose main nutrients are proteins.

There are very few data available on tissue metabolism in fish ontogenesis, especially beyond the larval stage (see references in (5)).

In a previous paper (10) we brought some contributions to the study of muscle and liver metabolism in the developing rainbow trout. We are now presenting some more data on this topic.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were carried out on *Salmo gairdneri*, purchased from the fish breeding farm of Gilău, Cluj district, where they had been fed on standard age-fit fodder. The spinal cord of the fish was transected immediately after they were out of water, in order to delay the rigor (6). The trouts were transported to the laboratory on ice, and samples were immediately collected, from non-rigid individuals only.

Whole organisms were taken for analyses, when working on very young fish. From the age of four months on, determinations were made on white muscle from the epaxonal region and on liver; for some parameters, lateral red muscle was also used.

The parameters determined and the methods used were as described in the above-cited paper (10).

RESULTS AND DISCUSSION

The intensity of lipid synthesis (appreciated by the specific radioactivity of the lipids isolated from tissue slices after the incubation of the latter with ^{14}C -sodium acetate) is very high in the liver, for the age of 15 to 24 months, and drops afterwards. The process is tens of times slower in the muscles; the maximum is also reached at about 15 months. There are no significant differences between the two muscles. (Fig. 1).

No correlation can be found between the tissular lipid content and the velocity of synthesis. No ontogenetical variation is apparent in the lipid content from the age of four months on. In the muscle tissue, the value is between 0.8 and 1.2 %, related to fresh mass. In the liver, an

* The authors wish to express their gratitude to dr. Monica Munteanu, from the Sylvotechnical Experimental Station Cluj-Napoca for her kindness in helping them to obtain the living trouts. The skilled technical assistance of A. Răbulea and Maria Pop is acknowledged.

evident seasonal variation occurs: the lipid content is lower during winter (2–3 % in October–February) and higher during spring (3–4.5 % in April–May).

The lipid content of the whole organism is 1.8–2.0 % at one month (after having reached a 3.8% level during the larval stage (11)). After

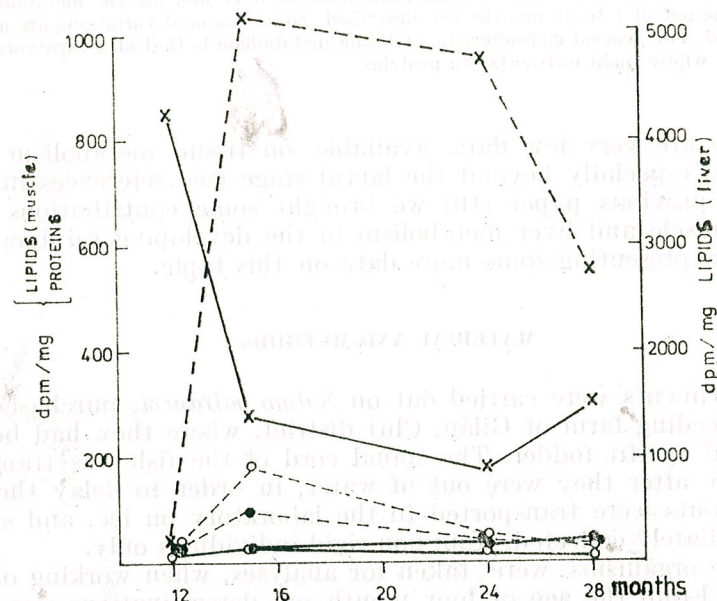


Fig. 1. — Rate of synthesis of lipids (---) and of proteins (—) in the white muscle (o), red muscle (●) and liver (x) of the rainbow trout. Abscissa: age in months. Ordinates: specific radioactivity of lipids and proteins, in disintegrations per minute per milligram.

a new increase to 2.7–2.8 %, it drops again at about four months, probably in connection with the increase in the musculature relative mass. Afterwards it stabilizes around the value shown above.

We have not found — up to the age of 28 months — that lipid (and glycogen) depletion in the tissues, which was described in migratory salmonids at “smoltification” (7).

As we have shown (10), the tissular oxygen consumption is very low in 12 to 24 months aged trouts, when determined *in vitro*, with glucose as substrate. Even under these conditions, the share of carbohydrates in oxidations is low. Taking into account the strong increase in the hepatic lipogenetic capacity, which occurs by that age, one may suppose that the enzymatic equipment of trout tissues is such that energogenesis proceeds preferentially by lipid betaoxidation rather than by acetate oxidation *via* the Krebs-cycle.

The water content of the organism increases, and the protein content decreases, during the pre- and early post-hatching periods of development (11). This trend goes on until the age of one month; afterwards, the protein content increases. Muscle protein content (related to tissue

mass) becomes soon stabilized and keeps rather constant from the age of 4 to 48 months. In the liver, the value reaches a maximum by 9–10 months, then decreases until the age of 16–18 months; a new, slow increase follows, which lasts over the whole period we have investigated. (Fig. 2)

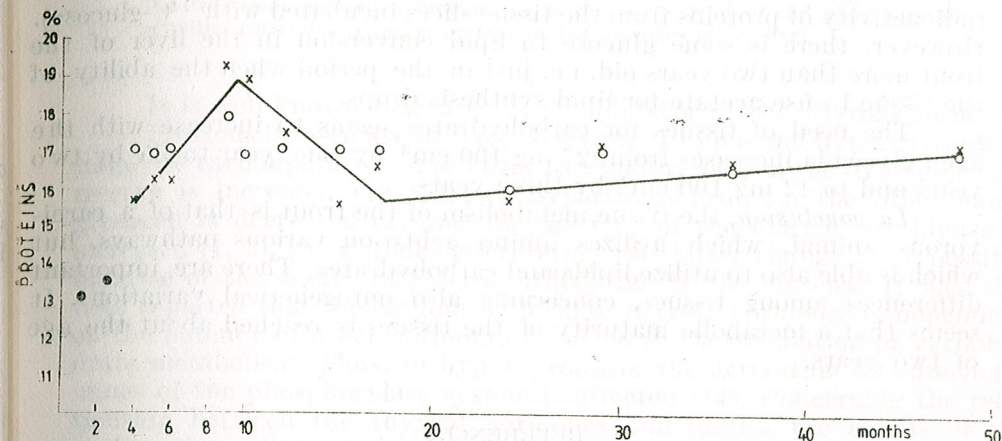


Fig. 2. — Ontogenetical variation of the protein content of the whole body (●), white muscle (o) and liver (x) of the rainbow trout. The full line shows the approximate tendencies of the liver protein content during three ontogenetical periods. Abscissa: age in months.

Data on the proteosynthetic ability of the tissues (evaluated by the specific radioactivity of the proteins isolated from slices incubated with ^{14}C -leucine) are given in Fig. 1. The process is much more intense in the liver than in the muscle tissues. Developmental variations in the liver parallel approximately those of the tissue protein content (see Fig. 2). Protein synthesis in the red muscle is, from the age of two years on, significantly more intense than in the white muscle.

Inui and Ishioka (2), (3), (4) showed that fish proteosynthesis is submitted to a multiple hormonal control. This regulates both the amino acid transport across the cell membranes and the synthesis process proper, both in the muscle and liver tissues. We showed (see above) an intensification of the protein synthesis in the liver and the red muscle, in the period when the trout reaches its sexual maturity (about two years); at the same time, a decrease of the hepatic liposynthesis occurs. One can suppose that these modifications are also humorally determined, may be by the increase of the blood level of sexual hormones. The liver might also function, in this period, as a protein source for the needs of the sexual glands.

There are interrelations between the metabolism of proteins on the one hand, of carbohydrates and lipids on the other hand, as in all vertebrate groups. Some aminotransferases are very active both in the liver and the muscles, including GOT, GPT and branched chain amino acid aminotransferases; GOT is even more active in the lateral red muscle than in the liver (8), (9). These high activities suggest that amino acids are utilized not only for protein synthesis, a likely supposition if we take

into account that the trout is a carnivorous animal, whose food is poor in carbohydrates, but rich in proteins and lipids. An intense gluconeogenesis has been demonstrated in the tissues of the trout, even if the food is enriched in carbohydrates (1). The converse process, i.e. the conversion of glucose into proteins, which we tried to measure in this investigation, is indeed practically absent at all ages (we did not find a measurable radioactivity of proteins from the tissue slices incubated with ^{14}C -glucose). However, there is some glucose to lipid conversion in the liver of the trout more than two years old, i.e. just in the period when the ability of the tissue to use acetate for lipid synthesis drops.

The need of tissues for carbohydrates seems to increase with the age: glycemia increases from 27 mg/100 cm³ by one year to 35 by two years and to 42 mg/100 cm³ by three years.

In conclusion, the tissue metabolism of the trout is that of a carnivorous animal, which utilizes amino acids on various pathways, but which is able also to utilize lipids and carbohydrates. There are important differences among tissues, concerning also ontogenetical variations. It seems that a metabolic maturity of the tissues is reached about the age of two years.

REFERENCES

1. De la Higuera, M., Cardenas, P., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985, A, **81**, 391.
2. Inui, Y., Ishioka, H., *Gen. comp. Endocrinol.*, 1983a, **51**, 208.
3. Inui, Y., Ishioka, H., *Gen. comp. Endocrinol.*, 1983b, **51**, 213.
4. Inui, Y., Ishioka, H., *Gen. comp. Endocrinol.*, 1985, **59**, 295.
5. Love, R. M., *Chemical Biology of Fish*, Acad. Press, London, vol. I (1970) & II (1980).
6. Pora, E. A., Wittenberger, C., Pora, M., Roșca, D. I., *Bui. șt. Acad. R.P.R., sect. șt. biol.*, 1954, **6**, 503.
7. Sheridan, M. A., Woo, N. Y. S., Barn, H. A. J. *exp. Zool.*, 1985, **236**, 35.
8. van Waarde, A., *Comp. Biochem. Physiol.*, B, 1981, **68**, 407.
9. Wittenberger, C., Giurgea R., *Rev., roum. Biol., sér. Zool.*, 1973, **18**, 441.
10. Wittenberger, C., Giurgea, R., in *Actualit. de și perspectivă în biologie. Fiziologie animală cu implicații în zootehnie și în medicină*, 1985, Cluj-Napoca, p. 135.
11. Wittenberger, C., Haller, J., Roșioru, C., Frecuș, G.I., Coprean, D., Ilonca A., in print.

Received October 4, 1986

Biological Research Centre
Cluj-Napoca, Republicii 48

EFFECTS OF UREA IN FOODER ON SOME PARAMETERS OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN DUCKS

D. COPREAN, RODICA GIURGEA and V. MICLE

Tetralinear hybrid ducks were treated with urea (640 g/100 kg fodder) as an antithyroidian agent, from hatching until one day before killing (at 53 days). The treatment induced a decrease in glucose-6-phosphatase and phosphorylase activities correlated with an increase in the glycogen of the liver.

It is well known that urea is an inhibitor of the thyroid hormone. Previous investigations have shown that hypo- and hyperthyroidism influence carbohydrate metabolism. In hypothyroidism the liver glycogen reserve is increased (12, 13); in hyperthyroidism, on the other hand, glycogen is decreased (2) and the activity of the muscle hexokinase is increased (1, 2), the authors interpreting this latter change as a possible increase of the degree of glucose utilization by the muscles. It has also been reported that the circulating level of thyroid hormones is dependent on the potency of other hormones involved in the regulation of carbohydrate metabolism. Thus, in hypothyroidism the activation by catecholamines of the phosphorylase system is affected (14). Concerning the relationship between the thyroid hormones and insulin the results of the various investigators are contradicting. Very recent researches have shown that at physiological serum insulin concentrations hyperthyroidism potentiates the hypoglycemic effect of the hormone; hypothyroidism, however, decreases this effect (10). These same researches found that in hyperthyroidism the glucose production by the liver is much decreased as compared with hypothyroidism or normal thyroidism. Bratusch-Marrain et al., 1984 (cited by 10) obtained the potentiation of glucose utilization induced by insulin in healthy subjects treated with T_3 . However, other researches revealed the existence of an antagonism between the thyroid hormones and insulin (Davidson, 1985; Dimitriadis et al., 1985; Laville et al., 1984 — all cited by 10).

The aim of the present investigation has been to follow up the effect of the administration of urea in food on glycemia (gl), liver glycogen (G), liver glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) and phosphorylase *a* (Pa) in young ducks.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were performed on ducks, a Romanian four-line hybrid for fowl aged 53 days. The animals were fed on the food usually used in poultry farms.

The ducks were divided into two experimental groups:

- a group receiving urea in food in a proportion of 640 g urea for 100 kg food, from hatching till the day before sacrifice (53 days);
- a control group receiving the same food but without the addition of urea.

The animals received no food 16 hours before sacrifice.

Immediately after sacrifice the following determinations were made; the glucose amount in the blood (11), the glycogen content (8) and the activity of G-6-Pase (4) and of Pa (5) in the liver. The inorganic phosphate released in the reaction media in which the activity of the two liver enzymes was assayed, was determined using the method of Tausky and Shorr (15). From the homogenate in which the activity of Pa and of G-6-Pase was assayed the amount of protein (3) was determined in order to express the activity of the enzymes in micromoles of inorganic phosphate released per amount of protein and per minute.

The data obtained were interpreted statistically using Student's "t" test. The homogeneity of the media was tested using Chauvenet's criteria and the aberrant values were eliminated.

The statistical significance was considered at $p = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The liver glycogen content of the ducks receiving urea in food was increased as compared with the controls (Fig. 1). In the same animals (receiving urea in food) a rise of glycogen content was found in the bursa of Fabricius and thymus as well as a decrease of Pa activity in the thymus (unpublished data). A doubled amount of liver glycogen correlated with a decrease of free glucose content in the same tissue was also obtained by Giurgea et al., 1986 (unpublished data) in chicken receiving an inhibitor of the thyroid gland (thyourea) in food.

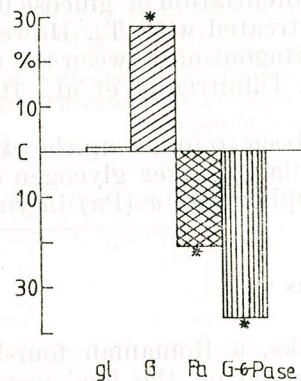


Fig. 1. — Variation of glycemia as well as glycogen, Pa and G-6-Pase activities in the liver of the ducks. Values figured in the graphs are percentage differences between urea treated and control ducks. * marks statistically significant differences.

In the animals receiving urea in food, glycemia was not changed as compared with the controls, although the activity of G-6-Pase and of Pa in the liver showed a significant decrease (Fig. 1).

As shown before, the activity of liver Pa decreased in the liver of ducks receiving urea in food. A decrease of the total phosphorylase activity (9) as well as a decrease of the capacity of the contracting

muscle to activate phosphorylase (6) have been recently reported in thyroidectomized rats or in rats with hypothyroidism; the latter research workers consider that the decrease of the activation capacity of the phosphorylase system is due to the fact that the activation mechanism of phosphorylase *b* kinase is affected.

Because it is known that the thyroid hormones are involved in the transport of Ca across the membrane of plasmatic reticulum (16, 17), in conditions of hypothyroidism deficiencies could occur in the transport of this ion towards the place of the activation of the phosphorylase system; it is known that phosphorylase *b* kinase, even in its active form is a calcium dependent enzyme. A deficiency in the activation of the liver phosphorylase system determined by an inadequate transport of calcium to the activation site could be the cause of the decrease of Pa activity found by us. Another cause could be the disturbance of the activation path by the catecholamines of the phosphorylase system in the conditions of hypothyroidism (see 14). The other enzyme involved in glycogenolysis, G-6-Pase, was found by other research workers, too to be decreased in hypothyroidism (Snedecor et al., 1972, cited by 12). The decrease of Pa and G-6-Pase activity correlated with the increase of the liver glycogen store (see Fig. 1) reflects a decrease of the capacity of the liver to produce glucose by phosphorolytic path and a possible increase of the glycogen-synthetising capacity of this organ in hypothyroidism. Taking into account the above-mentioned facts we can assert that the increased accumulation of glycogen in the liver of ducks receiving urea in the food may be the consequence of a complex of factors:

1) Possibly in our experimental conditions the reduction of the amount of thyroid hormones induced by urea treatment creates favourable conditions for a potentiated action of insulin regarding the activation of the glycogen-synthetising system and the inhibition of the phosphorylase system; this can be the cause of the increased glycogen storing in the liver.

2) It has been recently found that in the wake of thyroidectomy the glucose turnover is decreased (McCulloch et al., 1983, cited by 10). Not only the suppression of the production of thyroid hormones but also the reduction of their circulating levels alone (hypothyroidism — our experimental conditions) can determine a reduction of glucose turnover; these conditions can facilitate an increased accumulation of liver glycogen.

3) Last but not least, the decreased activity of liver Pa and G-6-Pase (see Fig. 1) can be another factor which in cooperation with the above-mentioned ones could cause an increased accumulation of glycogen in the liver of ducks with hypothyroidism.

It should be mentioned that an increased accumulation of glycogen in the liver is not associated with a reduction of blood glucose level (Fig. 1). In the conditions of experimentally induced hypothyroidism by propylthiouracyl administration in hens, Raheja and Linscheer (12) also noted that an increased glycogen storing in the liver is not associated with hypoglycemia. In experiments performed on mammals a decrease of lactic acid production was found in hypothyroidism (7). This can be interpreted as a reduction of glucose catabolization by glycogenolytic path in the muscle tissue. The absence of a change of the blood glucose

level in the conditions of a reduced liver glucose production induced by hypothyroidism could be interpreted, in our experiments, as a reduction of glucose utilization by the peripheral tissues.

CONCLUSIONS

1. Administration of urea in the food of ducks favours the accumulation of glycogen in their liver.
2. The activity of liver enzymes involved in the breakdown of glycogen, Pa and G-6-Pase is decreased in the ducks receiving urea in food.

REFERENCES

1. C. Ising, F., Blomstrand, E., Melichna J., Terrados, N., Clausen, N., Lins, P. E., Jansson, E., Clin. Physiol., 1986, **6**, 171-181.
2. Challiss, R.A.J., Arch. J.R.S., Newsholme, E.A., Biochem. J., 1985, **231**, 217-220.
3. Gornall, A. G., Bardawill, G. J., David, M.M., J. Biol. Chem., 1959, **177**, 751.
4. Hurper, A.E., in *Methoden der enzymatischen Analyse*, 1962, (Bergmeyer, H.U. ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 788.
5. Hedrick, J. L., Fischer, E.H., Biochemistry, 1965, **4**, 1337.
6. Leijendekker, W. J., Van Hardeveld, C., Kissenaar, A.A.H., Metabolism, 1985, **34**, 437-441.
7. Marple, D.N., Nichreiner, R. F., Mc Guire, J. A., Squires, C.D., J. anim. Sci., 1975, **41**, 799-803.
8. Montgomery, R., 1957, **67**, Arch. Biochem. Biophys., 378.
9. Moore, G. E., Harvey, S., Klandorf, N., Goldspink, G., Gen. Comp. Endocrinol., 1984, **55**, 195-199.
10. Müller, M., Möring, J., Seitz, H. J., Biochem. J., 1986, **234**, 537.
11. Nelson, N., J. Biol. Chem., 1944, **153**, 375.
12. Raheja, K. L., Linscheer, W.G., Comp. Biochem. Physiol., 1978, **61 A**, 31-34.
13. Snedecor, I.G., Camyre, M.F., Gen. Comp. Endocrinol., 1966, **6**, 276-279.
14. Storm, H., Van Hardeveld, D., Kissenaar, A.A.H., Biochem. Biophys. Acta, 1984, **798**, 350-360.
15. Taussky, H., Shorr, E., J. Biol. Chem., 1953, **202**, 675.
16. Van Hardeveld, C., Clausen, T., Am. J. Physiol., 1984, **247**, E 421.
17. Van Hardeveld, D., Kassenaar, A.A.H., FEBS LETT, 198), **121**, 349.

Received October 2, 1986

Biological Research Center
Cluj-Napoca, Republicii 48

THYROIDAL INFLUENCES ON GLUCOSE AND LEUCINE ABSORPTION IN THE CHICKEN JEJUNUM

RODICA GIURGEA and C. WITTENBERGER

Intestinal absorption of glucose and leucine was studied in thiourea (t) and/or thyroid (T) treated Cornish-Rock chickens. Absorption of glucose was somewhat enhanced in T and inhibited in t, while that of leucine varied conversely.

There are many investigations on the intestinal absorption of glucose and amino acids as depending on age (3), (16), protein and carbohydrate levels of the food (9), (15), various hormones (4), (7), (12), (13), ionic conditions in the intestine (1), (8) a.s.o.

Our previous research has put into evidence modifications of the jejunal absorption of glucose and leucine, in chickens or laying hens fed on various protein level fodders, and/or having the thyroid function pharmacologically altered (5), (6). New variants of the experimental schedule related to thyroidal influences were the object of the present investigation.

MATERIAL AND METHODS

Cornish-Rock chickens were purchased from a commercial hatchery, reared in our Laboratory under adequate zoohygienic conditions and fed age-fit concentrated fodders. Food and water were given *ad libitum*. Six groups of six chickens each were set: control group (C), fed with normal fodder; group T, which received thyroid treatment during the last two weeks of life; groups t_1 and t_2 , which were given thiourea in the early ontogenesis: two doses of 75 mg per kg body weight on the 3rd and 4th day respectively in t_1 , and a single dose of 50 mg per kg b.w. on the 7th day in t_2 ; groups t_1T and t_2T , which received both thiourea and thyroid treatments, as specified above. All chickens were killed at the age of 9 weeks.

Thyroid hormones were administered as powdered dry (integral) gland (I.M.B. Bucharest) in the fodder, corresponding to 170 μ g triiodothyronine per kg body weight and per day. Thiourea was also given in the fodder, as powdered pure (*pro analysi*) substance.

Chickens were killed by decapitation, after a fasting of 18 hours. A portion of the jejunum was immediately sampled, and rinsed in physiological saline. An "everted intestinal sac" (13), (17) of about 4 cm was made and filled with Krebs-Henseleit saline, buffered to pH 7.4 with phosphates (final concentration 10 mM) and containing 10 mM glucose. All further steps of the experimental procedure were as described in our previous papers (5), (6), except that radioactivity determination was made taking into account the "quench" due to the glass of the scintillation vials. Results were expressed both as disintegrations per minute (DPM) per mg organ mass, and as percentage partition coefficient of the radioactivity between the external saline and the fluid sampled from the interior

of the sac. Mean values were checked for homogeneity by Chauvenet's criterion, and compared according to the following schedule: for thiourea effects: t_1 and t_2 with C, t_1T and t_2T with T; for thyroid effects: T with C, t_1T with t_1 and t_2T with t_2 . Differences were considered significant, if Student's "t" test indicated $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Thiourea is generally accepted as a potent thyroid inhibiting agent. On the other hand, there are data on the long-lasting effects of thyroid inhibition, if applied in the early ontogenesis of the chicken (10). Thus, we can assume that our "t" chickens had their thyroid glands partially inhibited even by sacrifice, being in a slightly hypothyroid state, and that our "T" chickens were slightly hyperthyroid.

There are old literature data showing that, in mammals, glucose absorption and jejunal alkaline phosphatase activity are enhanced by an excess of thyroid hormones (11), (12). An inhibition by thiourea and activation by thyroid treatment of some enzymes involved in jejunal transport were also obtained in our laboratory (V. D. Sandu, unpublished data).

Some of our results are in line with these data but others are not. Glucose absorption seems to be enhanced by thyroid treatment, but it is not clearly inhibited in thiourea treated chickens. However, such an inhibition does occur in both tT groups, as compared to T (Table 1).

Table 1

Intestinal absorption of glucose and leucine in chickens

GROUPS:	C	T	t_1T	t_1	T_1	t_2
Glucose	3.71 ±	7.99 ±	3.27 ±*	3.31 ±	4.31 ±	3.92 ±
DPM/mg	1.16	2.38	0.78	0.34	0.99	1.17
PC	16.96 ±	31.46 ±	13.15 ±	14.63 ±	19.84 ±	33.29 ±
	6.68	9.02	3.55	6.90	4.94	11.65
Leucine	6.74 ±	5.62 ±	13.04 ±*	11.38 ±*	3.29 ±	7.12 ±
DPM/mg	1.36	1.48	3.75	1.45	0.79	1.87
PC	28.95 ±	16.54 ±	25.93 ±	38.83 ±	7.38 ±	26.12 ±
	8.51	4.30	6.68	10.28	1.75	7.53

Mean values ± standard errors. Values significantly differed from the appropriate controls (see text) are marked with *. PC=partition coefficient, in %. For other explanations see the text.

Leucine absorption (Table 1) seems to be reduced by thyroid treatment, while thiourea (only t_1 variant) clearly enhances it. The mean value of the partition coefficient is 31.3 ± 5.1 for the variants with thyroid treatment, and 16.6 ± 3.1 in those without it. The difference is statistically significant at the $p = 0.02$ level.

Our results clearly show that thyroidal influences on jejunal absorption in chickens do exist. However, they are difficult to interpret. One puzzling feature is the apparently synergic effect of thyroid hormones and of an antithyroid agent, the thiourea, as it occurs related to glucose in tT groups. We should take into account that various substances may also have direct effects on the intestinal wall, when administered orally (2), (14). If thyroid hormones also have such contact effects, a perfect antagonism with thiourea is not to be expected.

We obtained clearly different results concerning leucine absorption, for the two thiourea variants: the effect was clearly positive for t_1 , but zero for t_2 . The latter variant received a smaller dose of the drug. Both this fact and the several days' difference in the age of administration (in a period of rapid developmental changes in the chicken's organism) may be supposed to generate the clear divergences between the effects.

REFERENCES

- Alvorado F., Monreal J., *Comp. Biochem. Physiol.*, 1967, **20**, 471.
- Arvanitakis C., Chen, G. H., Folscroft, J., Greenberger, N. J., *Gut*, 1977, **18**, 187.
- Bogner P.H., Haines I. A., *Am. J. Physiol.*, 1964, **207**, 37.
- Florsheim W. H., M. A. Faircloth, M. A. Graff, N. S. Austin, S. M. Velicoff, 1963, in: Bell D. J., B. M. Freeman, *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*, 1971, Acad. Press, London, New York, vol. 2, 1101.
- Giurgea R., Wittenberger, C., *Acta Vet. Hung.*, 1987 (in press).
- Giurgea R., Wittenberger, Rev. Roum. Biol., 1986, **31**, 135.
- Hudson D. A., R. J. Levin, D. H. Smyth, 1962, in: Bell D. J., B. M. Freeman, *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*, 1971, Acad. Press, London, New York, vol. 1, 51.
- Ivanov N., Ivanov, C., *Arch. Tierem.*, 1962, **12**, 109.
- Karasov W. H., Diamond, J. M., *Am. J. Physiol.*, 1983, **245**, G 443.
- Lamošová D., Nvota J., Černá, V., Tesařová, D., 1975, in: Hag K. Bod'a, 1977, *N-Stoffwechsel der landwirtschaftlichen Nutztiers*. VEDA, Bratislava, 243.
- Milcu S., Lupulescu A., Săhleanu V., Holban, R., *Fiziopatologia experimentală a glandei tiroide*, 1963, Ed. Academiei, București.
- Negoescu I., Constantinescu A., Heltianu C., *Biochimia hormonilor tiroidieni*, 1971, Ed. Academiei, București.
- Petcu G. *Absorbția apei și a unor electroliți la nivelul intestinului sub influența vasopresinei. Teză de doctorat*, 1971, Fac. Med. Vet. București.
- Sandu V.D., Abraham A.D., Puica-Dat C., *Seminars in Biophysics*, 1986, RB-17, CIP Press Bucarest, 161.
- Scharrer E.S., Wolfram, W., Raa B. B., Amann B., Agne, N., 1981, in: U. K., Lankaster, *Mechanisms of intestinal absorption*, 1981, MTD, 123.
- Raheja K. L., Tepperman, J., Tepperman, H. M., *Comp. Biochem.*, *Physiol.*, 1977, **58A**, 245.
- Wilson T. H., Wiseman G., *J. Physiol. London*, 1954, **123**, 116.

Received October 4, 1986

Biological Research Centre
Cluj-Napoca, Clinicilor 5-7

ÉTUDES CYTOPHOTOMÉTRIQUES SUR LA SPERMATO-
GENÈSE CHEZ *ISOPHYA SPECIOSA* FRIVALDSKY
(ORTHOPTERA-PHANEROPTERIDAE)

VIORICA MANOLACHE et M. IONESCU VARO

The sex determinism is XO in the male, XX in the female, the X male heterochromosome being picnotic and very distinct since the leptoten stage, when it is separated from the rest of the nucleus by its own membrane. In the female, the heteropicnosis of an X chromosome determines the appearance of a sex chromatin in the nuclei of the somatic cells; in the male, the X chromatids may show chiasma. The ADN/chromosome value suggests the existence of three groups of chromosomes beside the sexual one.

Les études sur la quantité DNA chez les Orthoptères ont été réalisées par Fox (3), Willmore et Brown (11) qui ont établi les valeurs pour le DNA du noyau des différentes espèces. John et Hewitt (5) ont trouvé des différences significatives du DNA tant entre les espèces avec le même nombre de chromosomes qu'entre celles avec $2n = 17$ et $2n = 23$ chromosomes. A partir de l'étude quantitative du DNA chez différentes espèces d'Orthoptères, Gonsalvez, Lopez-Fernandez et Esponda (4) arrivent à la conclusion que quelques espèces d'un genre peuvent évoluer par une duplication massive en tandem de certaines régions des chromosomes. En échange, d'autres espèces du même genre ne subissent pas cette duplication.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les larves mâles d'*Isophya speciosa* (stade 4) contiennent dans leurs gonades les spermatogonies en division, tous les stades de la prophase méiotique ainsi que les autres phases des deux types de division de maturation. Les larves femelles du même stade présentent des divisions des cellules folliculaires.

La dissection des larves a été faite en solution physiologique pour les insectes et les gonades ont été fixées en liquide Fleming. Après le lavage, la déshydratation, la clarification et l'inclusion des pièces à la paraffine, on a procédé à des sections de $8 \mu\text{m}$ d'épaisseur à l'aide d'un microtome de type Spencer. Les sections ont été colorées par la réaction Feulgen d'après Scott (9) afin d'éviter les pertes de DNA. L'hydrolyse a duré 25 min/60° en HCl N à 20% w/v polyéthylène glycol (Carbovax 6000); elle a été suivie par un bref rinçage à l'eau distillée à 5% w/v polyvinylglycol et ensuite, par le traitement avec le réactif Schiff, préparé d'après Coleman, contenant 20% w/v polyéthylène glycol. Les sections ont été introduites trois échanges en métabisulfite de natrium 0,5% w/v polyéthylène glycol 5 min. chacun et après ont été lavées à l'eau courante. Le montage a été fait en baume synthétique. Les mensurations de la quantité DNA/chromosome ont été effectuées avec un cyto-

spectrophotomètre Zeiss-Jena, à deux longueurs d'ordre à 565 m μ et à 490 m μ en employant l'immersion Ap 100 \times et l'objectif « MF » - Projectif 6,3 : 1.

RÉSULTATS

L'*Isophya speciosa* a la formule chromosomiale $2n = 30 + X$ chez le mâle et $30 + 2X$ chez la femelle. Dans les plaques métaphasiques des cellules folliculaires des ovaires on distingue les deux chromosomes X qui sont grands et de la même longueur (fig. 3/2). Les larves femelles présentent dans leurs noyaux somatiques l'un des chromosomes X hétérochromatique sous la forme d'une chromatine sexuelle picnotique dans les noyaux interphasiques. D'habitude les plaques métaphasiques des mitoses spermatogoniales contiennent 30 autosomes et un hétérochromosome X donc $2n = 31$. Leur disposition est caractéristique, le chromosome X et les grands étant disposés à la périphérie, alors que les petits chromosomes sont placés au milieu de la plaque métaphasique (fig. 1/1). Mais on trouve aussi des plaques métaphasiques avec 33, 34 et 36 chromosomes au lieu de 31, ayant à peu près le même emplacement dans la plaque métaphasique (fig. 3/1). Par conséquent, à la suite de la division réductionnelle, on en trouve aussi des plaques avec 17 chromosomes. Les mensurations photométriques à deux longueurs d'ordre nous offrent les valeurs moyennes suivantes du DNA des chromosomes en unités arbitraires calculées pour 25 plaques métaphasiques spermatogoniales :

X = 6,416 \pm 0,015	9 = 1,25 \pm 0,019
1 = 2,666 \pm 0,13	10 = 1,171 \pm 0,036
2 = 2,095 \pm 0,025	11 = 1,0945 \pm 0,03
3 = 2,012 \pm 0,038	12 = 0,987 \pm 0,019
4 = 1,828 \pm 0,048	13 = 0,892 \pm 0,035
5 = 1,656 \pm 0,059	14 = 0,701 \pm 0,056
6 = 1,516 \pm 0,028	15 = 0,514 \pm 0,06
7 = 1,37 \pm 0,026	
8 = 1,324 \pm 0,021	

On peut apprécier trois classes de chromosomes : avec environ 2 μ A, avec environ 1 et inférieur à 1 μ A. On n'a donné les valeurs moyennes du DNA que pour l'une de chaque paire de chromosomes. En même temps, on ne doit pas perdre de vue que tous les 31 chromosomes métaphasiques sont quadruplés, ayant une quantité fois plus grande de DNA du genome. La somme des valeurs de DNA des 15 autosomes et de la moitié de DNA de l'hétérochromosome X représente la valeur 2c DNA du noyau haploïde.

Il y a lieu de remarquer quelques caractéristiques de la prophase méiotique chez *Isophya speciosa*. Au début de la prophase, les chromosomes sont très minces et longs, étant dépourvus de chromomères (fig. 2/2). C'est à peine à la fin du stage leptotène qu'apparaissent de leur long de petits chromomères. Au cours de ce stage, les télomères de quelques chromosomes sont dirigés vers une zone étroite de l'enveloppe nucléaire.

Fig. 1. — plaque métaphasique à 31 chromosomes; 2 — diacinèse avec quelques tétrades; 3. diplotène où les chromosomes X présentent 3 chiasmés; 4. au début de la diacinèse, les boucles successives entre les chiasmés sont placées entre deux plans perpendiculaires, comme résultat d'une rotation de 90° du plan des bivalents du commencement du diplotène; 5. plaque métaphasique de la spermatocyte d'ordre II; 6. plaque métaphasique de la spermatocyte d'ordre I; la comparaison des deux plaques laisse voir les bivalents fusionnés dans un seul chromosome dans les spermatocytes I (immersion 100 \times oc. K 15).

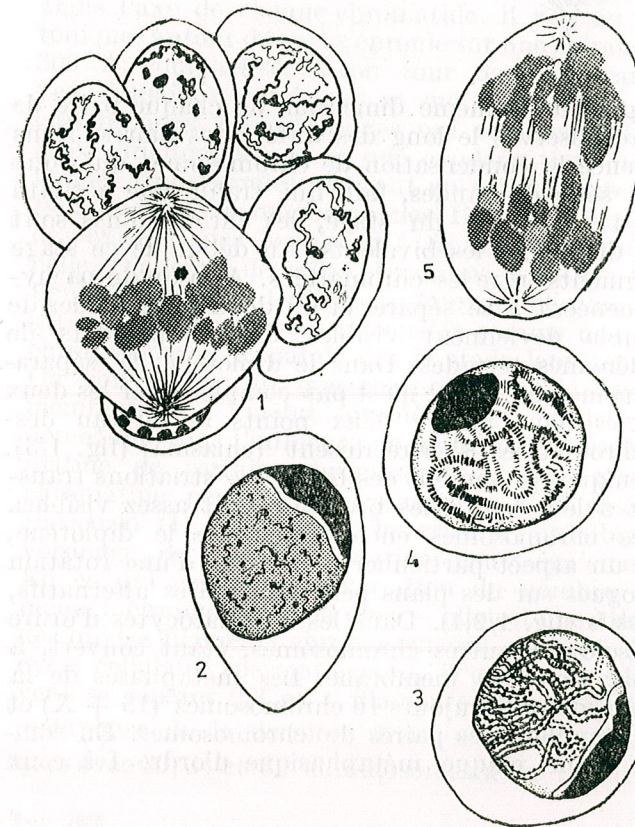
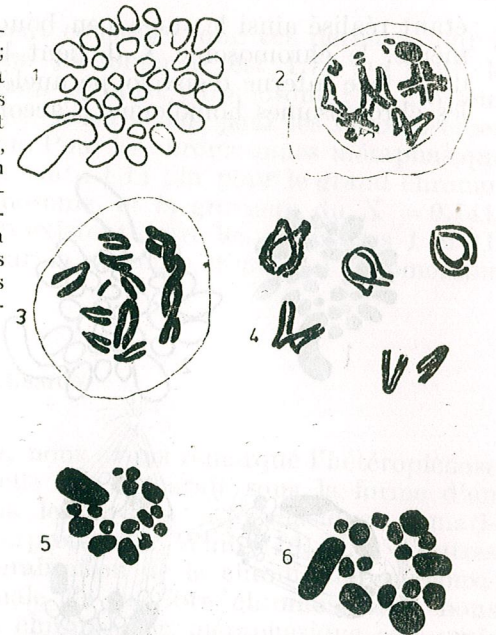


Fig. 2. — 1. nid de spermatogonies en division ayant les chromosomes plus petits que ceux des métaphases des spermatocytes d'ordre II prouvant que la phase S de la méiose a lieu dans les spermatogonies; 2. spermatocyte en phase leptotène; 3. spermatocyte en phase pachitène, représentant le chromosome X hétérochromatique; 5. télophase de la deuxième division méiotique (immersion H 120 \times oc. K 20)

étant réalisé ainsi le stage « en bouquet » (fig. 2/3). A partir de ce stade même, le chromosome X devient hétéropicnotique, étant placé le long de la face interne d'enveloppe nucléaire (fig. 2/2, 3/4). Dans le zygotène, les chromosomes homologues s'accollent, excepté l'hétérochromosome X.

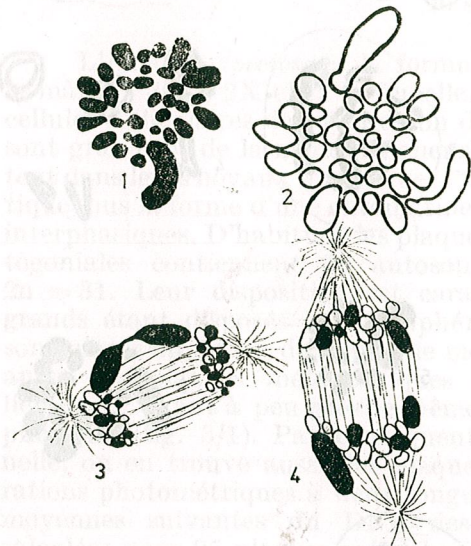


Fig. 3. — 1. plaque métaphasique spermatogoniale à 34 chromosomes; 2. plaque métaphasique des cellules folliculaires de l'ovariole avec $30 + 2x$; 3. télophase de la deuxième division méiotique; 4. télophase de la première division méiotique avec des chromosomes plus grands (immersion H 1000 \times , oc. K. 15).

Les chromomères homologues de la même dimension de chaque paire de chromosomes peuvent être observés le long des différentes paires. Dans le stage pachytène commence la condensation de chromosomes qui vont finalement présenter une série de bandes, fait qui trahit une activité transcriptionnelle (fig. 2/4). A la fin du stage, les chromosomes sont assez grossis et l'on peut distinguer les bivalents. Au début de ce stage ont lieu les échanges de segments entre les chromatides. A la fin du pachytène, les homologues commencent à se séparer et les deux chromatides de chaque chromosome double deviennent visibles. Ces groupements de quatre chromatides sont dénomés tétrades. Dans le diplotène, la séparation des chromosomes continue, mais elle n'est pas complète, car les deux homologues restent associés dans un ou deux points au niveau desquels deux des quatre chromatides s'entrecroisent (chiasma) (fig. 1/3). Les chromosomes pachyténiques présentent des bandes — striations transversales tout leur long et à leur bouts, les bivalents sont assez visibles. La diacynèse condense les chromosomes encore plus que le diplotène, chaque bivalent revêtant un aspect particulier à la suite d'une rotation qui place les deux homologues sur des plans perpendiculaires alternatifs, entre des chiasmés successifs (fig. 1/2,4). Dans les spermatocytes d'ordre I le chromosome X est isolé des autres chromosomes, étant couvert, à une certaine distance, par une fine membrane. Les métaphases de la première division de maturation ont toujours 16 chromosomes ($15 + X$) et l'on remarque une fusion complète des paires de chromosomes. En comparant les chromosomes d'une plaque métaphasique d'ordre I à ceux

d'une métaphase d'ordre II, on peut constater que ces derniers sont à moitié plus petits que les premiers. La longueur est $1,71 \mu\text{m}$ pour le grand chromosome, et $0,912 \mu\text{m}$ pour le petit chromosome; la grosseur du chromosome X = $1,76$; toutes les valeurs sont pour les chromosomes métaphasiques de la première division. Pour les chromosomes métaphasiques de la deuxième division les valeurs sont: $1,14 \mu\text{m}$ pour le grand chromosome, $0,57 \mu\text{m}$ pour le petit chromosome, et la grosseur du X = $0,741$. Les mêmes différences de dimension existent entre les anaphases I et II, la première se distinguant aussi par la présence d'un seul chromosome X (fig. 3/3,4).

DISCUSSION

Chez l'espèce *Isophya speciosa*, nous avons remarqué l'hétéropicnose d'un chromosome X chez la femelle qui apparaît sous la forme d'un corpuscule hétérochromatique dans les noyaux interphasiques somatiques. Cette hétéropicnose a été interprétée par White (10) chez d'autres espèces dans le sens d'une supersprialisation de la chromatine qui considérée dans la structure nucléosomale de la fibre chromosomiale nous apparaît comme très plausible. Le chromosome métaphasique est vraiment formé de deux chromatides associés par leurs régions centromériques. Dans l'axe de chaque chromatide, il y a un réseau de protéines nonhistoniques autour duquel s'enroule sur une spirale la fibre chromosomique de 300 \AA , compactisée à son tour dans des rangées de « microconvules ». Ces domaines condensés se succèdent dans une ordre linéaire, et les chromosomes pachyténiques qui commencent à se condenser, ainsi que ceux diploténiques avec une condensation plus avancée, présentent des bandes transversales qui sont en réalité justement les régions de formation des spires de microconvules. Il est très possible qu'entre de telles bandes existent des boucles d'ADN déroulé avec une activité transcriptionnelle. D'ailleurs de telles structures à petites bandes donnent la réaction Feulgen légèrement diffuse autour des chromosomes en cours de condensation. L'hétéropicnose interprétée comme une condensation maximale du chromosome X apparaît dès le stade leptotène, et pendant la diacynèse. On voit clairement que celui-ci est isolé des autres bivalents par une membrane qui l'inclut complètement. Muller (8) et Fernandes (2) considèrent que sous l'influence de mutations récessives et dominantes, l'euchromatine de certains chromosomes peut se transformer dans une hétérochromatine permanente comment est le cas des deux chromosomes X. Barigozzi (1), Manna et Chatterjee (7) ont observé que l'euchromatine du voisinage de l'hétérochromatine peut également s'hétérochromatiser. En ce qui concerne la variation du nombre de chromosomes — 2,3 et même 5 chromosomes de plus — elle est due à des séparations prématurées des quatre filaments chromosomiaux réalisés dans la phase S du dernier cycle cellulaire spermatogonial. D'un ou de plusieurs chromosomes peuvent se séparer 2,3 et 1 filaments chromosomiaux de sorte que dans la métaphase de la dernière division chromosomiale apparaissent des plaques avec 33, 34 et 36 chromosomes avec le même degré de condensation.

Un deuxième mécanisme serait celui de la nondisjonction des paires de chromosomes dans la méiose, de sorte qu'à un pôle vont ensemble une ou plusieurs paires, et à l'autre pôle les paires en question manquent. Ainsi nous n'avons pas trouvé de plaques métaphasiques avec 26 et 28 chromosomes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Barigozzi C., 1968, Proc. Internat. Seminar on Chromosome, Nucleus, Suppl., 138-143.
2. Fernandes, A., 1949, Biol. Soc. Broteriana, 23, 1-69.
3. Fox D. P., 1970, Chromosoma, 29, 446-461.
4. Gonsalvez, J., Lopez-Fernandez, C., Esponda P., 1980, Caryologia, 1980, 33, 275-281.
5. John B., Hewitt G.M., 1966, Chromosoma, 20, 155-172.
6. Manna G. K., 1972, Proc. Nat. Acad. Sci., 42 (B), 1, 55-64.
7. Manna G. K., Chatterjee K., 1963, Nucleus, 6, 121-134.
8. Muller, H. J., 1932, Amer. Genet., 66, 138-188.
9. Scott, J. E., 1974, J. Histochem. Cytochem., 23, 833.
10. White M.J.D., 1968, Caryologia, 21, 167-179.
11. Willmore, P., Brown A., 1975, Chromosoma, 51, 337-345.

Reçu le 1 février 1986

Faculté de Biologie
Bucarest, Splaiul Independenței 91-95

CHROMOSOMAL ABERRATIONS INDUCED BY TRITIATED WATER INTERNAL IRRADIATION IN RAT BONE-MARROW CELLS

FLORICA TRIPĂDUȘ

Chromosomal changes in rat bone-marrow cells have been studied, following internal irradiation with HTO low-doses.

The rats were exposed for 45 days to the constant activity of tritium in drinking water, using low activities of HTO, corresponding to $1 \times \text{MPC}$, $10 \times \text{MPC}$, and $50 \times \text{MPC}$.*

Although from the cytogenetic analysis a higher degree of chromosomal damage has been noticed in the groups of animals exposed to HTO contamination as compared with the control group, the frequency of the structural aberrations was, however, reduced and situated around the highest limit of the permissible acceptability.

INTRODUCTION

In recent years, the biological effects associated with low and very low doses have been more and more debated at both scientific and public levels of interest. Tritium, the major product of the reactions that occur in the nuclear reactors, is mainly released as HTO and leads to the contamination of the environment.

The properties of HTO, along with the toxicity data from the animals exposed to HTO (1, 2) have been considered when calculating a maximum permissible concentration in water for occupational exposure of $3 \times 10^{-2} \mu\text{Ci/ml}$ (3, 4).

HTO causes a uniform irradiation of mammal cells both in culture and in whole-body. This fact raises the question of HTO effectiveness or biological action in producing the genetical damages of cell nucleus.

It is unanimously accepted that ADN and chromosomes are biological structures presenting the highest fragility with low doses of ionizing radiations. This fact determined us to study the possible chromosomal changes induced in the rat bone-marrow cells by internal irradiation with low activities of HTO (situated around the MPC for professionally exposed personnel).

MATERIAL AND METHOD

For experimental investigations, we worked on a number of 20 female Wistar-London rats of the same age and weight of 180-250 g.

The animals were divided into 4 groups: one control group and three other groups which have received HTO by gavage during a 45 days period.

* Maximum permissible concentration.

The activity was calculated with respect to each animal's weight as follows :

- A group : 0.03 $\mu\text{Ci/day.g}$ — accordingly MPC.
- B group : 0.3 $\mu\text{Ci/day.g}$ — accordingly 10 . MPC.
- C group : 1.5 $\mu\text{Ci/day.g}$ — accordingly 50 . MPC.

The animals were maintained in similar conditions, during the treatment, receiving as standard food concentrated pills and water "ad libitum".

The preparations for the study of chromosomes were obtained by means of the cytogenetical technique of J. H. Tjio and J. Whang (1962, 1965) modified by P. Raicu and collaborators (5).

In all, a number of 1800 metaphasic plates were examined and chromosomal aberrations were recorded as structural and numerical aberrations. Their frequency was calculated in percents.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The cytogenetical observations made on the 3 groups that suffered internal contamination, and on the control group are shown in Table 1. As it can be seen, they indicate the number of diploid and aneuploid cells as well as different types of structural aberrations. As it can be seen (Table 1), as a rule, the frequency of aberrations is very low.

A higher frequency was detected in the C group which was exposed to the highest activity of about 1.5 $\mu\text{Ci } ^3\text{H/day.g}$. Unfortunately, the number of the analysed cells (234) is insufficient and does not allow further discussions. However, it is interesting to notice a gradually increasing number of numerical and structural chromosomal aberrations together with the increasing activity of HTO. The significance tests applied in the control group and the other 3 irradiated groups revealed some significant differences between the incidence of the chromosomal aberrations in the control group and the other three irradiated groups as well as between a control batch which received a lower amount and another one with a higher amount of administrated HTO.

Another important issue to be brought into discussion is the qualitative one, which concerns the types of observed aberrations. Breaks have been distinguished within chromatidial aberrations types (with a frequency of 2% in the control batch to 2.78% in B batch) and fragments which did not exceed 1.48%. We identified chromosomal aberrations such as : chromosomal breaks of a low frequency about 0.33% and 1.8%; fragments ranging between 0.16% and 0.55%; translocations ranging between 0.33% and 0.92%.

As it can be seen there is a correlation between frequency of breaks and that of the fragments.

Although the frequency of translocations is very reduced, the formation of the observed methacentric chromosomes (chromosomes which appear by the fusion of two acentric chromosomes) can constitute a sign of the preferential break of the chromosome, in the vicinity of the centromer.

Table 1
Chromosomal aberrations induced by internal irradiation with HTO in rat bone-marrow cells

Batch	Dose	Time interval	Num-ber of ani-mals	Num-ber of cells ana-lysed	Numerical modifications Aneuploidy %	STRUCTURAL MODIFICATIONS							
						CHROMATIDIAL			CHROMOSOMAL			Total structural modifications %	
					Breaks %	Frag-ments %	Dele-tions %	Total chromati-dial aberrations	Breaks %	Frag-ments %	Trans-locations %		Total chromosomal aberrations
Con-trol		45 days	5	500	1.4±0.246	0.2	0	0	0.2±0.2	0	0	0	0.2±0.2
A	MPC 0.03 $\mu\text{Ci/day.g}$	45 days	5	600	2.66±0.33	0.66	0.16	0.16	1±0.24	0.33	0.16	0.33	0.83±0.21
B	10.MPC 0.3 $\mu\text{Ci/day.g}$	45 days	5	539	5.009±0.55	2.78	1.48	4.45	4.45±0.42	0.18	0.55	0.92	1.67±0.26
C	50.MPC 1.5 $\mu\text{Ci/day.g}$	45 days	5	234	7.69	3.41	2.99	0.42	6.83	0	0	1.70	8.54

Another important thing observed is that the activities of HTO near MPC did not produce unstable types of aberrations such as dicentric and rings. The pericentric and paracentric inversions could not be observed by the conventional method. The chromatidial aberrations (such as breaks and chromatidial fragments) had a prevailing character in all groups. If we consider this fact, it means that HTO action is higher on the cells in G₂ and S phases, than on the cells in G₁ phase. These effects are like those produced by chemical substances (knowing that chemical substances produce almost only chromatidial aberrations).

Some authors (6) mention the presence of chromatidial exchanges but these were observed at higher activities of HTO or HTdR.

A higher percentage was reached by aneuploidy (hyperdiploidy and hypoploidy) that means 5.009% in the group which received 0.3 μCi ³H/day.g.

Other studies made by Brooks on mice (7) used low activities of HTO (but higher than those used in our experiment; 100.MPC) in chronic irradiation and revealed the presence of the same types of chromosomal aberrations, but with a higher frequency.

Concerning the activity of 0.03 μCi ³H/day.g. corresponding to MPC, it can be said that although we noticed chromosomal changes of 4.49% that means a significant difference compared with the control group, this increase does not indicate, however, a genetic risk.

The 4% percent can rise spontaneously in the control group and the types of aberrations observed here are not among the chromosomal aberrations that cause mechanical difficulties during the division process. The risk is relatively small, because in mitosis as well as in meiosis the abnormal cells are eliminated by the organism.

REFERENCES

1. V. P. Bond, in: *Environmental Aspects of Nuclear Power Stations*, 1971, pp. 287—300 IAEA, Vienna.
2. R. C. Thomson, *Rad. Res.*, 1971, **47**, p. 338 (Abstract).
3. International Commission of Radiological Protection, *Report of Committee II on Permissible Dose for Internal Radiation*, ICRP 1959, Publication 2, Pergamon Press, New York.
4. *Maximum Permissible Body Burdens and Maximum Permissible Concentrations of Radionuclides on Radiation Protection*, 1959, Natl. Bur. Stand. Handbook 69, U. S. Dept. of Commerce, National Bureau of Standards.
5. P. Raicu et al., *Genetica — Laboratory methods*, Ed. Academiei, 1983.
6. W. C. Dewey, R. M. Humphrey, B. A. Jones, *Rad. Res.*, 1965, **24**, 214—238.
7. A. L. Brooks, A. L. Carsten, K. D. Mead, *Rad. Res.*, 1973, **68**, 480—489.

Received April 25, 1986

Institute for Physics and
Nuclear Engineering,
Bucharest MG-6, Romania

ZUR FORTPFLANZUNG VON *DIKEROGAMMARUS VILLOSUS* (SOW.) MART. (CRUSTACEA-AMPHIPODA) IM „EISERNES TOR“-STAUSEE (BAHNA-GOLF, 1983 — 1984)

OCTAVIAN CIOLPAN

The paper presents some reproductive parameters as: mean size of reproductive females, mean brood size, minimum size of reproductive females, mean brood size/mean body size, sex ratio, of the amphipod *Dikerogammarus villosus* (Sow.) Mart. in the Danube ("Iron Gate" area — section Bahna).

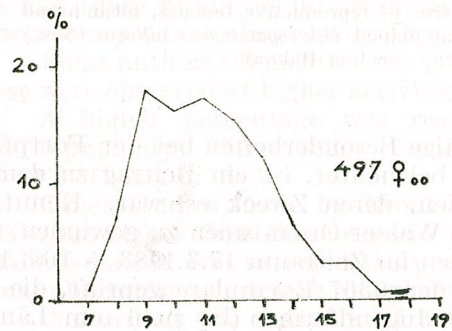
Vorliegende Mitteilung, die einige Besonderheiten bei der Fortpflanzung von *Dikerogammarus villosus* beleuchtet, ist ein Beitrag zu den im Bahna-Golf vorgenommenen Studien, deren Zweck es war, Kenntnisse über die Biologie und Ökologie von Wasser-Organismen zu gewinnen. Die Proben biologischen Materials wurden im Zeitraum 17.3.1983 — 16.3.1984 allmonatlich eingesammelt. Es wurden 9367 Exemplare geprüft, die folgendermassen aufgliedert wurden: Jugendformen (bis zu 6 mm Länge), Männchen, Weibchen und Eier führende (trächtige) Weibchen (über 6 mm Länge). Die Abtrennung der Erwachsenen erfolgte auf Grund der Anwesenheit oder Abwesenheit der Costegiten.

Die Variationen gewisser Parameter wurden tabellarisch zusammengestellt u.z.w.: Das Verhältnis (Sex-Ratio) der Männchenzahl zur Weibchenzahl (Kolonne 1), der Prozentsatz trächtiger Weibchen von der Gesamtzahl der Weibchen (Kolonne 2), die Mindestlänge der trächtigen Weibchen (Kolonne 3), die durchschnittliche Länge der trächtigen Weibchen (Kolonne 4), die mittlere Grösse des Geleges — mittlere Zahl der Eier pro Gelege (Kolonne 5), die Variationen des Verhältnisses zwischen der mittleren Gelege-Grösse und der mittleren Körperlänge der trächtigen Weibchen (Kolonne 6).

Trächtige Weibchen waren in der Population vom März bis Oktober vorhanden, mit höchsten Prozentsätzen im April und Mai. Die Geburtenzahl war in der Population am grössten bei den Weibchen von 9—12 mm Körperlänge (Abb. 1). Die Variationsbreite der Eierzahl und auch der Durchschnittswert (Abb. 2) zeigen, dass das Maximum im Mai erreicht wird. Die monatliche Aufteilung der trächtigen Weibchen nach Körperlänge-Klassen (Abb. 3 A) und mittlerer Eierzahl pro Weibchen (Abb. 3 B) zeigen, dass die Höchstzahl trächtiger Weibchen im Juni gesammelt wurden, während das Verhältnis mittlere Eierzahl/Gelege im Mai grössten ist. Es konnte ebenfalls eine allmähliche Abnahme der mittleren Länge bei den trächtigen Weibchen in den warmen Monaten festgestellt werden. Die Variation der Eierzahl in Gelege steht im Zusammenhang

mit der Körperlänge der Weibchen, doch konnte kein Zusammenhang zwischen der Eier-Zahl pro Gelege und deren Grösse abgeleitet werden.

Zusammenfassend: Die Fortpflanzung erfolgt bei *Dikerogammarus villosus* zeiden warmen Monaten (März-Oktober) und wird in der kalten Jahreszeit (November-Februar) unterbrochen. Das Geschlechter-Verhält-



497 ♀^{oo}

Abb. 1. — Der prozentuelle Anteil (%) der Weibchen verschiedener Körperlänge an der Geburtzahl der Population.

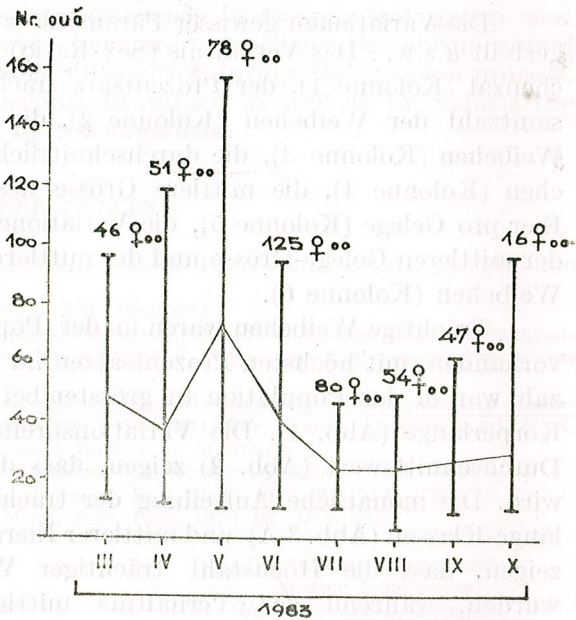


Abb. 2. — Die Variationsbreite und die mittlere Eierzahl.

nis variiert zwischen 0,73 und 2,31, wobei die Weibchen von Mai-September und die Männchen von Oktober-Mai vorherrschen. Es fällt auf, dass die Zahl trächtiger Weibchen nicht unter 20% von der Gesamtzahl monatlich gefangener Weibchen sinkt.

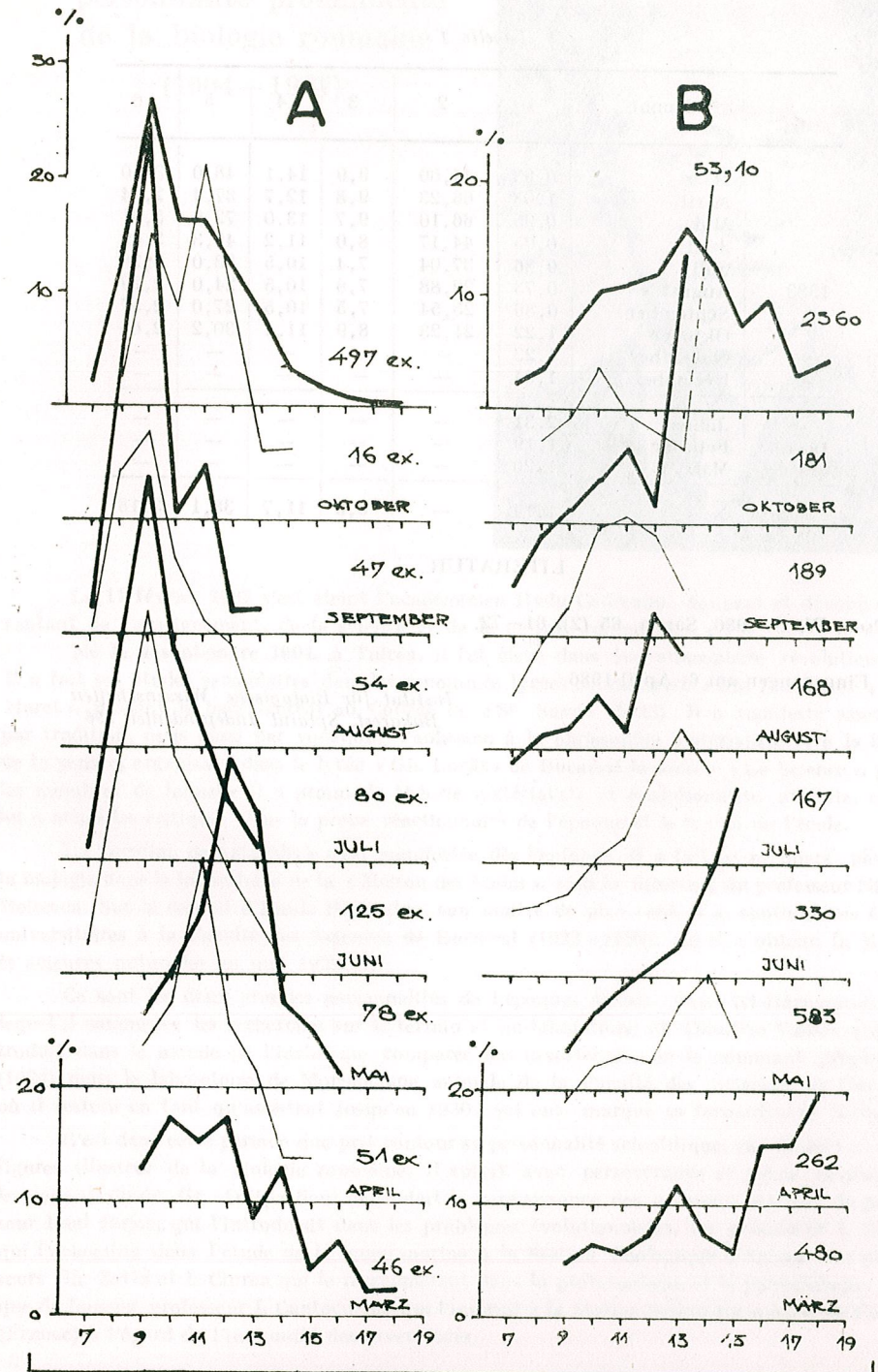


Abb. 3. — Die monatliche Dynamik und die Verteilung (%) auf Längensklassen der Zahl der trächtigen Weibchen (A) und der mittleren Eierzahl/Weibchen (B).

Tabelle 1

	Monat	1	2	3	4	5	6	
1983	März	0,93	44,00	9,9	14,1	48,0	3,40	
	April	1,08	66,23	9,8	12,7	37,4	2,94	
	Mai	0,95	66,10	9,7	13,0	72,9	5,61	
	Juni	0,95	44,17	8,0	11,2	41,3	3,69	
	Juli	0,86	37,04	7,4	10,5	23,0	2,28	
	August	0,73	22,88	7,6	10,5	24,0	2,29	
	September	0,86	25,54	7,5	10,5	27,0	2,57	
	Oktober	1,22	21,23	8,9	11,4	30,2	2,65	
	November	1,23	—	—	—	—	—	
	Dezember	1,34	—	—	—	—	—	
	1984	Januar	2,31	—	—	—	—	—
		Februar	1,19	—	—	—	—	—
März		1,20	—	—	—	—	—	
	\bar{x}	1,14	—	8,6	11,7	38,1	3,18	

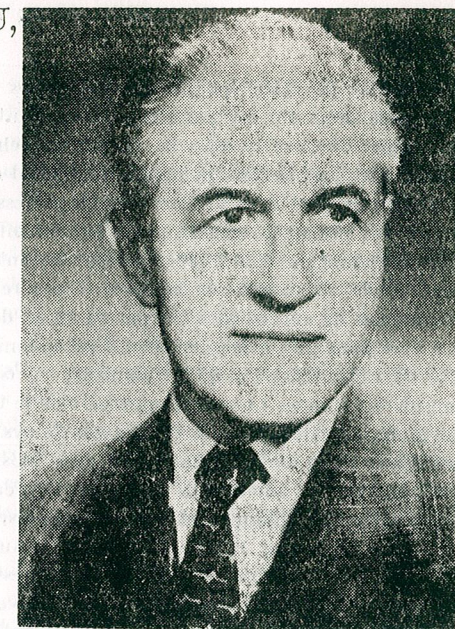
LITERATUR

1. Nelson, W. G. 1980, Sarsia, **65** (2), 61—72.

Eingegangen am 6. April 1986

*Institut für Biologische Wissenschaften
Bukarest, Splaiul Independenței 296*

Académicien RADU CODREANU,
personnalité préminente
de la biologie roumaine
(1904—1987)



Le 11 février 1987 s'est éteint l'académicien Radu Codreanu, éminent et dévoué représentant de l'enseignement, de la science et de la culture roumaine.

Né le 4 septembre 1904, à Tulcea, il fut élevé dans une atmosphère révolutionnaire. Il a fait ses études secondaires dans les renommés lycées de Bucarest « Gh. Lazăr » et « Spiru Haret », passant le baccalauréat au Collège de « Sf. Sava » (1923). Il a manifesté assez tôt, par tradition, mais aussi par vocation, l'adhésion à la philosophie matérialiste et à la liberté de la pensée, organisant dans le lycée « Gh. Lazăr » de Bucarest la société « La Science », parmi les membres de laquelle il a promu la théorie matérialiste et évolutionniste athéiste, ce qui lui a attiré les critiques dans la presse réactionnaire de l'époque et le renvoi de l'école.

La vocation de naturaliste s'est manifestée dès l'enfance. Il a fait les premiers pas vers la biologie dans la laboratoire de la « Maison des écoles », sous la direction du professeur Nicolae Moiescu. Sur le conseil d'Émile Racovitza, son maître de plus tard, il a continué ses études universitaires à la Faculté des Sciences de Bucarest (1923—1926), où il a obtenu la licence ès sciences naturelles en mai 1927.

Ce sont les deux grandes personnalités de l'époque, Andrei Popovici-Báznoșanu, avec lequel il commence les recherches sur le terrain et au laboratoire, et Dimitrie Voinov qui l'introduit dans le monde de l'histologie comparée des invertébrés, en le nommant préparateur (1924) dans le laboratoire de Morphologie animale de la Faculté des Sciences de Bucarest, où il restera en tant qu'assistant jusqu'en 1930, qui ont marqué sa formation de biologiste.

C'est dans cette période que prit contour sa personnalité scientifique, en contact avec les figures illustres de la biologie roumaine. Il suivit avec persévérance et même dévouement les conseils du dr. Gr. Antipa dont dépendait la connaissance des animaux marins, du professeur Paul Bujor, qui l'introduisit dans les problèmes évolutionnistes, du professeur I. Borcea qui l'achemina dans l'étude de la faune marine à la Station Zoologique d'Agigea, des professeurs Gh. Zotta et I. Ciurea qui le renseignèrent dans la protozoologie et la parasitologie, ainsi que du fameux professeur I. Cantacuzino qui l'instruit à la Station biologique marine de Roscoff (France) à l'égard de l'immunité des invertébrés.

C'est de cette époque que datent les commencements de ses recherches dirigées vers la grande diversité des parasites (notamment des protistes), des éphémères des ruisseaux de montagne, découverts dans les nombreux échantillons pris au cours des assidues périodes de travail dans la Station Zoologique Cumpătul de Sinaia, à la constitution de laquelle, en 1922, il avait pris part sous la direction du professeur A. Popovici-Bâznoșanu. Celui-ci lui y avait donné les premiers conseils dans les domaines de la faune et de l'écologie, en lui déterminant l'orientation vers l'hydrobiologie torrenticole. Ses études dans ce dernier domaine, ainsi que l'étude concernant la complexité des relations des parasites avec les éphémères, seront couronnées de succès en 1939 par sa thèse de docteur ès sciences.

À partir du 1 janvier 1930 il est nommé assistant à l'Institut de Spéologie de l'Université de Cluj. C'est ici qu'il commence sa collaboration directe avec Émile Racovitza, qu'il considérait comme « son père spirituel » en le rappelant toujours avec une pieuse reconnaissance. Le professeur Racovitza le dirige vers la systématique évolutionniste des crustacés, dans les problèmes de la biologie générale et de la biospéléologie. C'est aussi de cette époque que date le contact avec les adjoints de l'Institut, R. Jeannel, spécialiste en zoogéographie et reconstitutions paléogéographiques et P. A. Chappuis, spécialiste dans les explorations sur le terrain.

Le professeur RADU CODREANU succédera au professeur Émile Racovitza d'abord en tant qu'agrégé (1940) et puis comme professeur titulaire (1942—1945) à la chaire de Biologie générale de la Faculté des Sciences de l'Université de Cluj.

L'intelligence brillante, les idéaux enthousiastes, ainsi que l'assiduité dans le travail, accompagnés de l'esprit de sacrifice, ont porté le jeune RADU CODREANU à l'affirmation dans le monde des hommes de science et de culture, par sa contribution au développement de la biologie en Roumanie et à l'étranger.

Il a connu de près le mouvement biologique de France, au cours des périodes de recherche (1924—1939) dans des stations et des laboratoires renommés, dirigés par des personnalités scientifiques, à savoir le professeur M. Caullery (Station marine de Wimereux), le professeur Ch. Perez (Station biologique de Roscoff), le professeur O. Duboscq (Laboratoire Arago-Banyuls sur-Mer), le professeur L. Léger (Institut d'Hydrologie de Grenoble) les professeurs F. Mesnil et A. Lwoff (Laboratoire de Protozoologie de l'Institut Pasteur de Paris) et le professeur A. Besredka, le successeur de Metschnikoff au même institut. Avec les assistants de ces chefs d'école, devenus à leur tour des savants renommés, il s'est lié d'amitiés durables, matérialisées plus tard dans de fructueux contacts scientifiques.

En 1939, il soutient à la Faculté des Sciences de Paris, sa thèse de doctorat ès Sciences Naturelles sous le titre « Recherches biologiques sur un Chironomide, *Symbiocladius rhithrogenae* (Zavr.) ectoparasite „cancérigène” des éphémères torrenticoles », ayant comme président du jury le professeur Maurice Caullery, directeur du Laboratoire d'Évolution des Êtres Organisés, où elle a été élaborée après des travaux accomplis en Roumanie. Le travail, publié dans les « Archives de zoologie expérimentale et générale » (283 p., 34 figs, 12 pl.), a mis en évidence le type d'une extrême spécialisation dans la nutrition d'un parasite, à la suite de l'induction d'un processus de prolifération dans le hémocoèle de l'hôte, en décrivant et surtout en interprétant le premier processus net de malignité connu des invertébrés, inaugurant de la sorte le chapitre de la pathologie comparée des néoplasies, d'une grande actualité à présent sur le plan mondial. La thèse comprend de nombreuses données nouvelles pour la taxonomie, la morphologie (biométrie), l'anatomie et l'histologie de l'appareil reproducteur, la cytologie des éléments figurés du sang et du tissu adipeux concernant les deux types d'insectes, hôte et parasite, complétées d'observations originales d'éthologie, de sexualité et de parasitisme.

Le professeur RADU CODREANU revient de Cluj à Bucarest en 1945, en tant que professeur titulaire à la chaire de Biologie générale, récemment créée à la Faculté des Sciences de l'Université. Après avoir affirmé sa conception biologique dans l'étude « Évolution des êtres organisés » (Matière et vie) (1943), il définit la biologie générale comme une « recherche histo-

rique et causale des formes organisées » en acceptant la validité du principe de l'évolution (1946), en insistant ensuite sur la complémentarité de la connaissance historique comparée et de celle causale-expérimentale pour la compréhension intégrative des phénomènes biologiques (1963).

À partir de 1949 il est transféré en tant que professeur titulaire à la chaire de Zoologie des invertébrés qu'il a dirigée pendant 25 ans, jusqu'à sa retraite en 1974; ensuite, après 50 ans d'activité universitaire, il y demeura en qualité de professeur consultant. Son talent d'orateur, son érudition parfaite et sa vaste culture, les remarquables connaissances dans l'immense et complexe domaine de la biologie, l'ont élevé sur les hautes cimes de l'enseignement; en même temps, il fut considéré comme un modèle de pédagogue, aimé et admiré par tous les étudiants jusqu'à son dernier cours. Il a accompli son travail de professeur avec un dévouement rarement rencontré et une vocation toute particulière, en mettant son empreinte sur la formation professionnelle de tous ses élèves.

Tous ses cours, sans exception, exemples du rapprochement du professeur de ses élèves, ont toujours été animés, entraînants et merveilleux, restant inoubliables dans la mémoire de générations entières d'étudiants, tant par la complexité et la beauté des structures et des cycles biologiques, l'écologie et la zoogéographie de nombreux groupes d'invertébrés, que par l'originalité de leur illustration au tableau noir.

C'est de son activité de début en tant que professeur de zoologie des invertébrés que datent ses cours introductifs concernant la cellule et l'hérédité, conformément à la génétique classique, dépassant les idées qui circulaient pendant les années '50, période de grands bouleversements dans la biologie, quand le professeur RADU CODREANU anticipait courageusement, avec le sens de la science et avec clairvoyance, le développement de la biologie moderne. Ses leçons constituaient une plaidoirie pour l'évolutionnisme darwiniste, tout en étant les ennemies de toute immixtion pseudoscientifique.

Son infatigable activité didactique a toujours été doublée d'une tenace passion pour la recherche de pointe, soutenue jusqu'à son dernier an de vie et concrétisée dans plus de 200 travaux scientifiques se caractérisant par une haute originalité et une parfaite exactitude sur de divers plans, apportant, à part les nouvelles découvertes, d'importantes contributions théoriques. C'est ainsi qu'il réussit à s'imposer en Roumanie et à l'étranger et à obtenir la reconnaissance unanime de sa valeur en tant qu'homme de science dans les domaines particulièrement importants, mais tellement difficiles de la zoologie des invertébrés, la protozoologie, la parasitologie générale et comparée, l'histologie comparée et la pathologie des invertébrés, la biospéléologie, la zoogéographie, la biologie générale et l'histoire des sciences biologiques.

Plusieurs de ses recherches l'ont fait aborder certaines disciplines biologiques peu cultivées en Roumanie et même en formation sur le plan mondial, à savoir: la protozoologie des unicellulaires pathogènes des invertébrés (1928), la réactivité cellulaire dans la pathologie des insectes (1927), la pathobiologie au niveau de la cytologie ultrastructurale (1965), l'initiation de l'étude des états intersexuels chez les insectes éphémères (1930), la taxonomie et la zoogéographie de certains vers Turbellariés (Triclades, 1929) et de certains groupes de crustacés — Asellides (1950) et décapodes parasites (1959).

Fin connaisseur de la faune aquatique des invertébrés de divers milieux (ruisseaux de montagne, eaux douces et saumâtres, la Mer Noire, la Méditerranée, la Manche et l'Océan Atlantique), il a pris en étude de multiples directions de recherches qui l'ont consacré en tant que spécialiste de réputation mondiale dans l'étude du cycle évolutif et la systématique de certains protozoaires parasites (flagellés, microsporidies, grégarines, ciliés et d'autres protistes — les genres *Endoblastidium*, *Metschnikowia* entre les levures, etc.), la systématique et la distribution des Triclades souterrains et épigés, la systématique, la biologie et la sexualité des crustacés marins parasites.

Dans les groupes rappelés il a décrit plus de 15 nouveaux genres et 30 nouvelles espèces, en établissant leur classification dans plusieurs nouvelles familles et sous-familles.

En étudiant les microsporidies parasites des crustacés et des insectes, il établit de nouveaux genres, à savoir *Mitoplastophora* (1966), *Pseudoplastophora* (1967), *Orthothelohania* (1974) et *Parathelohania* (1973); en précisant la structure bicellulaire de la spore de *Telomyxa* il sépare les sous-ordres *Monocytoporea* et *Polycytopores* (1961). Il décrit la première grégarine parasite dans le parenchyme des Triclades cavernicoles (1967) et étudie les protistes pathogènes des populations d'*Artemia salina* du lac de Tekirghiol (1956). Dans un ample travail (1975) il analyse d'une manière critique les parasites des éphémères.

Comme conclusion de sa conception sur la phylogénie des protozoaires, il présente au 1^{er} Symposium International de Zoophylogénie (1969) une classification du phylum à la base duquel il met un ancêtre commun zooflagellé hétérotrophe.

Des sources et des eaux phréatiques il a fait connue l'exceptionnelle abondance en certains endémismes souterrains (troglobies) des groupes des Triclades (environ 15 nouvelles espèces de Dendrocelides aveugles, 1929—1971) et Asellides, dont la fréquence est corrélée à l'histoire paléogéographique du territoire de la Roumanie. Il a montré l'extension de l'aréal des Planaires polypharyngiennes (*Crenobia montenigrina*, 1956) d'origine balcanique, dans les Carpates de Sud, en démontrant le caractère paléoenémique des espèces de *Dugesia*, parallèlement à celui des *Asellus* du groupe *Coxalis*, conformément à leur distribution circumméditerranéenne (1961), en rectifiant de la sorte les interprétations de M. Benazzi comme exemple de spéciation récente par polyploidie.

La présence de nouvelles biocénoses originaires des régions de la Mer Noire et de la Mer Caspienne dans le défilé du Danube, où il décrit la relique *Paludendrocoelum romano-danubiale* (1949), genre nouveau, isolé par rapport aux autres Paludicoles d'Europe, constitue l'argument décisif pour déterminer la tectonique de cette région comme ancienne vallée (1950). Il établit aussi de nouvelles espèces de *Dugesia* provenant du matériel de l'expédition roumaine spéléologique, à Cuba (1973).

En étudiant le développement larvaire des rhizocéphales et des épicarides de la Mer Noire, il établit ici la présence de certaines espèces indo-pacifiques, ce qui lui permet de tirer des conclusions zoogéographiques inattendues (1961). Ultérieurement il a étendu leur étude en décrivant de nouveaux types et espèces des régions océaniques tropicales (1963—1966) en établissant la classification des Bopyriens dans de nouvelles sous-familles (1967), y soulevant le problème de l'existence des espèces biologiques des parasites (1968).

Il a employé les effets du parasitisme dans l'analyse de la différenciation des caractères sexuels chez les pagures-hôtes (1959, 1968).

En considérant la biologie générale comme un domaine d'une synthèse maxima des connaissances biologiques, il a débattu d'une manière critique les facteurs de l'évolution ainsi que les étapes phylogénétiques du règne animal, en imposant ses conceptions dans les problèmes les plus controversés de la phylogénie.

Dans « L'évolution physiologique des microorganismes et les hypothèses récentes sur l'origine de la vie » (1964) il a confronté les hypothèses concernant l'origine de la vie, avec le résultat de l'évolution physiologique des microorganismes, en limitant l'application de l'entropie thermodynamique à l'intérieur des groupes et non pas à la macroévolution progressive. À cette occasion il a montré que l'évolution est essentiellement une *morphogenèse historique irréversible*, qui intéresse la spécificité spatiale et la dynamique de l'organisation des êtres, caractérisées par l'ordination hiérarchique des composants actifs; le métabolisme général n'est pas morphogène, seul le métabolisme directeur des acides nucléiques ayant cette capacité par la répllication inductrice des protéines de synthèse. La physiologie de la nutrition, qui avait beaucoup préoccupé Lwoff, n'est pas selon R. CODREANU déterminante pour l'évolution des grands groupes. Dans toute l'évolution biologique il y a un sorte d'oscillation entre les processus régressifs et ceux progressifs, conséquence d'un principe énergétique de l'écono-

mie du travail physiologique. Les groupes spécialisés sont des états dérivés des types ayant des caractères synthétiques généralisés, qui se trouvent à l'origine des grands groupes du règne animal.

Il donne une représentation originale à l'évolution phylogénétique du règne animal (1970), en opposant à l'entérocoelie, le concept de l'*archétype planuloïde*, pour expliquer l'apparition des *Bilateralis triploblastiques*; il émet la conception originale de la descendance des Deutérostomiens des Protostomiens archicoelomés, en limitant la valeur évolutive de la pédomorphose, injustement considérée comme une source principale de l'évolution progressive (G. de Beer, A. Vandel, etc). Le professeur R. CODREANU a mis en valeur l'importance de la théorie de A. D. Xenopol concernant la logique historique dans l'interprétation de l'évolutionnisme biologique (1974).

L'académicien RADU CODREANU se trouve parmi les biologistes qui ont eu les connaissances et la capacité d'aboutir à des synthèses philosophiques matérialistes dialectiques dans la biologie contemporaine, se rangeant du côté des grands raisonneurs du domaine, V. Conta et L. Blaga.

Excellent patriote, dévoué aux traditions de valeur de ses illustres maîtres et précurseurs, il a débattu dans de nombreux articles l'œuvre biologique d'Émile G. Racovitza, a organisé les manifestations occasionnées par le centenaire de sa naissance (1968) et par le semi-centenaire de l'Institut de Spéléologie (1971), a installé, en tant que représentant officiel de la Roumanie, le monument d'Émile Racovitza à Banyuls-sur-Mer en France (1965) et celui de son collaborateur, René Jeannel, au Musée d'Histoire Naturelle de Paris (1969), chef-d'œuvre des renommés sculpteurs roumains Gh. Anghel et R. Ladea.

Il a évoqué les grandes figures de la biologie roumaine: I. Ciurea, D. Voinov, E. Botezat, Al. Vitzu, I. Cantacuzino, Gr. Antipa, A. Popovici-Băznoșanu, etc. et a édité « L'Histoire de la biologie en Roumanie » (1975). À la suite des Symposiums organisés par l'Académie Roumaine, il a édité les volumes « Problèmes d'écologie terrestre » et « Problèmes de biologie évolutionniste » (1978).

Il a entretenu des liaisons de collaboration et de publication en commun avec les spécialistes de Tchécoslovaquie, Grande Bretagne, France, Nouvelle Zélande, donnant des conférences scientifiques appréciées à la Station Zoologique de Naples, à l'Université de Rome, de Pise, de Padoue, au Musée National d'Histoire Naturelle de Paris, à l'Université de Porto, ainsi qu'aux Universités roumaines de Cluj, Jassy, Craïova, Galatzi.

Il a représenté la Roumanie au Programme Biologique International et a pris part à plus de 16 congrès et réunions internationales (1964—1982).

Dans son pays, il s'est avéré une présence active à tous les événements scientifiques et, en tant que membre de différents forums et commissions et en qualité de rédacteur en chef des revues de biologie de l'Académie de la R. S. de Roumanie il a déployé une prestigieuse et infatigable activité, militant pour le rôle de la biologie dans la résolution des problèmes économiques et sociaux actuels, pour la modernisation de son contenu dans l'enseignement universitaire et dans la recherche scientifique et pour la mise en valeur de l'humanitarisme de la profession de biologiste, en débattant à toute occasion la confrontation entre l'expansion sociale humaine et les impératifs de la conservation des équilibres naturels.

La reconnaissance officielle de ses mérites fut concrétisée dans les médailles accordées: « Ordinul Muncii » cl. III (1963) et cl. I (1964), « Meritul Științific » cl. III (1966), le titre de « Professeur émérite » (1964) et membre titulaire de l'Académie de la R. S. de Roumanie (1974), ainsi que membre d'honneur de la Société Zoologique de France (1977), membre correspondant d'honneur au Groupement de protistologues de langue française (1964). Il a été élu membre de diverses sociétés scientifiques d'Europe et des États-Unis.

La personnalité accablante du professeur et du savant RADU CODREANU comprend trop d'aspects qui ne sauraient être entièrement relevées dans une pareille présentation.

Exigeant et fier à la chaire et dans la recherche, mais modeste dans sa vie privée, cet homme beau et d'une allure imposante, toujours gai, toujours plein d'humour, avait quelquefois un accent d'ironie, jamais fâcheuse. Intellectuel d'une fine culture classique, formé à l'école de I. L. Caragiale et de Paul Zarifopol, desquels il a adopté l'élégance de l'expression claire et ordonnée, il a été un raffiné connaisseur et amateur des arts plastiques et de la littérature.

Maintes de ses pensées manuscrites nous permettent de pénétrer pour un instant dans son univers spirituel :

« La vocation est essentielle dans la création, la littérature et l'art. C'est le contact avec la nature, avec les hommes de valeur, la diversité ethnique humaine qui nous entretiennent et nous appliquent l'élan créateur ... La grandeur, la noblesse ne se séparent jamais de la simplicité et de la sincérité. Il faut avoir des idéaux et l'assiduité dans le travail peut nous imposer des sacrifices ... Je considère la connaissance biologique comme essentielle pour le développement matériel et culturel de l'humanité. La définition complète de la patrie doit comprendre aussi son histoire et son héritage biologique ».

Pour ceux, peu nombreux, qui ont vécu dans sa proximité et auxquels il a dévoilé le secret des plus nobles qualités humaines, l'enthousiasme toujours ardent pour la recherche scientifique dont il visait la perfection, le seul et modeste hommage que nous pouvons lui rendre maintenant, à cette triste séparation, c'est de lui garantir de n'épargner aucun effort, engagés dans la voie des idéaux transmis, pour valoriser l'immense trésor de la nature, y compris de celle humaine.

Doina Ivan, Maria Suci et
Maria Năstăsescu

AVIS AUX AUTEURS

La « Revue roumaine de biologie — Série de biologie animale » publie des articles originaux d'un haut niveau scientifique de tous les domaines de la biologie animale : taxonomie, morphologie, physiologie, génétique, écologie 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, conférences, etc. ; 2. *Comptes rendus* des livres de spécialité.

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

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

Les tableaux et les illustrations seront numérotés avec des chiffres arabes.

La répétition des mêmes données dans le texte, les tableaux et dans les graphiques sera évitée. Les références bibliographiques citées par ordre alphabétique comporteront le nom de l'auteur, l'initiale du prénom, le titre de la revue, abrégé conformément aux usances internationales, l'année, le tome, le numéro, la page.

Les travaux seront accompagnés d'un court résumé de 10 lignes au maximum, en anglais. Les textes des travaux ne doivent pas dépasser 7 pages (y compris les tableaux, la bibliographie et l'explication des figures).

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