ANUL XLV **2000**

S T U D I A
UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI

BIOLOGIA

2

Editorial Office: 3400 CLUJ-NAPOCA, Gh. Bilaşcu no. 24 • Phone: 064-40.53.52

SUMAR - CONTENTS - SOMMAIRE - INHALT

C. DELIU, C. MUNTEANU-DELIU, A. BUTIUC-KEUL, S. WAGNER, Aplicațiile embriogenezei somatice ♦ Applications of Somatic Embryogenesis.....3

Z. BUZ, Aspecte ale florei şi vegetației actuale şi postglaciare din mlaştina Pârâul Alb (județul Harghita) ♦ Aspects of the Present and Postglacial Flora and Vegetation of the Pârâul Alb Marsh (Harghita County).....23

Z. BUZ, Aspecte ale vegetației precuaternare de la Praid (județul Harghita) şi Sovata (județul Mureş) ♦ Aspects of the Prequaternary Vegetation in Praid (Harghita County) and Sovata (Mureş County).....29

N. TOMESCU, L. OLARIU, A New Species of Terrestrial Isopods: *Trachelipus radui* n. sp. (Crustacea, Isopoda).....37

V. POPA, Preliminary Studies on the Cicada Populations (Insecta, Homoptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae and Cercopidae) in the Muntele Mare Area and the Scărița-Belioara Nature Reserve 41

C. PAŞCA, V. MICLĂUŞ, C. CRĂCIUN, E. KIS, V. D. SANDU, V. CRĂCIUN, I. PAPUC, C. MUNTEANU, Histological and Ultrastructural Studies of the Rat Myocardium after a Single Therapeutic Dose of Carboplatin Administered Intravenously.....49

C. PAŞCA, V. MICLĂUŞ, C. CRĂCIUN, E. KIS, V. D. SANDU, V. CRĂCIUN, I. PAPUC, C. MUNTEANU, Histological and Ultrastructural Injuries in the Rat Kidney after Exposure to Cisplatin 57

C. SEVCENCU, Sistem şi metodă de monitorizare simultană a activității electrice cardiace şi pulsului carotidian la om ♦ Sytem and Method for Simultaneous Monitoring of the Electric Cardiac Activity and Carotid Pulse in Man 65

C. ARDELEAN, C. SEVCENCU, C. KISS, Efectul digoxinei asupra unor parametri ai contracției miocardului ventricular la broască ♦ The Effect of Digoxin on Some Parameters of the Contraction of Ventricular Myocardium in Frog.....71

C.I. SICORA, M. DRĂGAN-BULARDA, I. VASS, UV-B-Induced Damage and Recovery of Photosynthetic Activity in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 81

A. SAMUEL, S.KISS, M. ŞANDOR, Phosphatase Activities in a Brown Luvic Soil 91

Recenzii - Book Reviews - Comptes Rendus - Buchbesprechungen

Z. Buz, **Cercetări fitosociologice şi palinologice în zona Sovata-Praid-Dealu** (I. POP, B. DIACONEASA) 101

D. Moldoveanu, **Inginerie genetică** (M. DRĂGAN-BULARDA) 102

K. Januszek, **Aktywność enzymatyczna wybranych gleb leśnych Polski poludniowej w świetle badań polowych i laboratoryjnych** (S. KISS) 103

Abteilung Bodenkunde, Universität Trier (Herausgeber), **Festschrift für Dietmar Schröder zum 60. Geburtstag** (S. KISS) 104

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

APLICAŢIILE EMBRIOGENEZEI SOMATICE

CONSTANTIN DELIU[*], CORNELIA MUNTEANU-DELIU[**], ANCA BUTIUC-KEUL[*] şi SIMONA WAGNER[*]

SUMMARY. – Applications of Somatic Embryogenesis. The manipulation of plant cell and tissue cultures to produce somatic embryos efficiently is one of the keystones of the new technologies that will greatly change the way crops are planted (as synthetic seeds) and genetically altered in the future. Gene transfer into embryogenic plant cells is already challenging conventional plant breeding, and has become an indispensable tool for crop improvement. Genetic transformation of somatic embryos, large-scale production of somatic embryos in bioreactors, mass propagation, synthetic seed and fluid drilling and cryopreservation of somatic embryos are some of the applications which have attracted much attention. These recent developments are summarised in this review.

1. Introducere

Realizarea unei strategii pentru mărirea productivităţii plantelor a fost considerată esenţială pentru agricultură doar în ultimul timp. Procedeele realizate *in vitro* în scopul manipulării diferenţierii, creşterii şi dezvoltării în care sunt incluse producerea de plante haploide din culturi de antere, regenerarea plantelor din culturile celulare, izolarea de protoplaste şi fuziunea lor sunt considerate ca părţi integrale ale noii biotehnologii pe care o constituie culturile de ţesuturi şi celule vegetale. În acest sens, embriogeneza somatică este considerată astăzi ca una dintre cele mai utile căi, atât pentru multiplicarea palntelor, cât şi pentru studiile care privesc producerea de plante transgenice.

La plante, embriogeneza somatică poate fi definită ca un proces de dezvoltare a celulelor somatice, care în urma unor transformări biochimice şi morfologice vor da naştere unor sructuri asemănătoare embrionului zigotic. Astfel, E m o n s [13] defineşte acest proces ca o dezvoltare a celulei somatice caree urmează un model sau tipar de histodiferenţiere până la etapa finală, respectiv cea de embrion matur. În definiţia dată de E m o n s [13] este inclusă şi formarea de tipare asemănătoare mutanţilor zigotici letali şi a celor care germinează precoce [67], dar nu cuprinde organogeneza, respectiv formarea de lăstari şi/sau rădăcini din calusuri sau agregate celulare. În acest context, formarea embrionilor direct din celule somatice cultivate

[*] *Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: ICB@mail.dntcj.ro*
[**] *Universitatea "Babeş-Bolyai", Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj-Napoca, România*

in vitro, şi nu din zigot, poartă denumirea de *embriogeneză somatică*, iar embrionii generați pe această cale sunt denumiți *embrioni somatici*. Aceşti embrioni sunt diploizi şi se deosebesc net prin numărul lor de cromozomi de *embrionii partenogenetici* (embrioni androgenetici sau ginogenetici).

Propagarea *in vitro* este bazată în mod normal pe inducerea creşterii de muguri multipli de pe explante de nodii şi internodii tulpinale. Totuşi, metoda nu a putut fi adaptată la anumiți taxoni, iar pe de altă parte rata proliferării este mult prea mică pentru a avea o utilitate practică. În acest sens, inducerea embriogenezei somatice *in vitro* atât la plante de largă utilitate, cât şi la cele foarte valoroase se pare că prezintă mult mai multe avantaje, având în vedere că embrionii somatici pot fi obținuți în bioreactoare de capacitate mare. Cu toate acestea, mai rămân o serie de probleme de rezolvat, datorită piedicilor care se ivesc, fie de natură tehnică, fie de natură biologică. Astfel: 1. embriogeneza somatică şi capacitatea de a creşte culturi embriogene sunt determinate genetic [34]; din acest motiv, embrionii somatici induşi din cultivarii cei mai valoroşi sau din hibrizii unor plante importante nu pot fi crescuți în condiții optime în bioreactoare; 2. îmbunătățirea producției, creşterii şi dezvoltării anumitor embrioni somatici a fost asociată cu mărirea hiperhidricității (vitrificarea) [41], iar embrionii hiperhidrici sunt anormali din punct de vedere fiziologic şi incapabili să ajungă la maturitate [8]; 3. variabilitatea indusă prin culturile de țesuturi (variabilitatea somaclonală) poate să se producă şi în plantele regenerate din embrionii somatici; variantele somaclonale, aşa cum sunt cele de cafea [70] şi de palmierul de ulei [28], sunt mutanți stabili şi pot devia de la fenotipul clonal prin una sau mai multe trăsături, compromițând astfel utilitatea embriogenezei somatice ca mijloc al propagării [7].

În ultimul timp au fost făcute eforturi considerabile în scopul studierii factorilor care afectează embriogeneza somatică. De asemenea, au fost realizate studii intensive privind ultrastructura embrionilor somatici, aspecte moleculare, transformarea genetică şi exprimarea genelor în embrionii somatici. Dintre aplicațiile care se bucură de o mare atenție pot fi enumerate: obținerea de plante transgenice din embrionii somatici; producerea embrionilor pe scară largă, în bioreactoare; semințele sintetice sau artificiale; semănarea embrionilor într-o masă fluidă şi crioconservarea [64]. În lucrarea de față am realizat o scurtă sinteză a principalelor aplicații ale embriogenezei somatice, amintite mai sus.

2. Transformarea genetică a embrionilor somatici şi producerea de plante transgenice

Deşi ADN poate fi virtual introdus în orice celulă vegetală, există încă anumite impedimente care privesc regenerarea plantelor transformate pe această cale. Aceste piedici biologice sunt legate de capacitatea celulei de a răspunde atât la introducerea de ADN străin în genomul ei, cât şi la stimulii care induc regenerarea. Pentru ca transformarea să aibă loc, celulele vegetale trebuie să posede anumite caracteristici: 1. să dețină capacitatea de a exprima ADN introdus în ele; 2. să dețină competența pentru integrarea stabilă a ADN în genomul propriu; 3. să fie capabile

de a regenera plante normale [12]. Embrionii somatici sunt, în acest sens, un material excelent pentru studiile de transformare genetică şi pentru regenerarea de plante transgenice.

În studiile de inginerie genetică au fost utilizați şi embrioni zigotici, rezultatele obținute fiind însă sub aşteptări. Unul dintre motive este faptul că stadiile de dezvoltare ale acestor embrioni diferă în ceea ce priveşte capacitatea lor de a răspunde la stimulii inducători de calusuri embriogene [61].

Dintre metodele cel mai des utilizate pentru transformarea genetică a plantelor sunt citate: transformările mediate de *Agrobacterium* [37], microinjecțiile [45] şi bombardamentul cu microparticule [80].

În transformările mediate de *Agrobacterium* se folosesc diferite tulpini de astfel de bacterii ca vectori pentru introducerea unei porțiuni din ADN lor în genomul plantei. Țesuturile plantei rănite sintetizează compuşi fenolici specifici care induc în *Agrobacterium* exprimarea genelor *vir* [25]. Exprimarea acestor gene are ca rezultat formarea unei singure catene de ADN care este apoi transferată şi integrată în genomul plantelor. Problema majoră care se iveşte în cazul acestei metode de transformare este specificitatea plantei gazdă şi a țesuturilor, asociată cu vectorii biologici.

În componența culturilor celulare embriogene intră permanent şi mase celulare preembriogene (MCPE), astfel că transformarea implică invariabil transferul de ADN în celulele acestor agregate. În acest context, P e c h a n [51] raporta că proembrionii de *Brassica napus*, derivați din microspori, au fost transformați cu *Agrobacterium tumefaciens*. Aproximativ 29% din aceşti proembrionii transformați au regenerat plante normale, rezistente la higromicină. De asemenea, au fost transformate cu succes plante de *Mangifera indica*, prin cocultivarea MCPE (cu un diametru mai mic de 1000 μm) cu *Agrobacterium tumefaciens* [37]. Rezultatele obținute au confirmat faptul că, în toate celulele din embrionii somatici maturi dezvoltați din MCPE transformate, se manifestă gena GUS (β-glucuronidază) introdusă în celule prin intermediul acestei bacterii. Totuşi, la toate plantele regenerate, atât din embrionii transformați cât şi din cei netransformați, se observă apariția fenomenului de vitrificare.

La *Juglans regia*, infectarea țesuturilor embrionilor somatici cu *Agrobacterium tumefaciens* a depins de stadiul de dezvoltare a acestora. Astfel, s-a observat că frecvența infecțiilor este mult mai mare în cazul embrionilor foarte tineri [38, 39].

Un alt procedeu bazat pe transformarea mediată de *Agrobacterium*, în care s-au utilizat țesuturi excizate din cotiledoane imature pentru formarea de embrioni somatici de *Glycine max*, a avut ca rezultat obținerea primelor plante transgenice din această specie [50]. Trei dintre plantele respective deținеau gena introdusă prin această metodă, şi anume gena *zeină* cu o greutate moleculară de 15 kD. Din păcate, aceste plante transformate au fost himere şi din ele nu a fost posibilă regenerarea de alte plante cu aceleaşi caracteristici. Cu toate acestea, cel puțin din punct de vedere teoretic, problema apariției formelor himere poate fi depăşită prin utilizarea embriogenezei repetitive.

Recent, a fost pusă la punct o nouă metodă, mai eficientă, de infectare a cormofitelor cu *Agrobacterium*, denumită SAAT (engl. = Sonicated Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation). Țesuturile sau celulele recoltate din plante intacte ori din culturi *in vitro*, în asociație cu celule de *Agrobacterium*, au fost expuse, pentru o perioadă foarte scurtă de timp, la acțiunea ultrasunetelor. Examinările efectuate la microscopul electronic au scos în evidență faptul că, în urma ultrasonării, în peretele celulelor vegetale se formează foarte multe canalicule, astfel că infecția cu *Agrobacterium* va fi foarte mult ușurată. Această tehnologie permite ca din culturile de suspensii embriogene infectate cu *Agrobacterium tumefaciens* să se obțină mult mai multe clone stabile și nehimerice [77]. Prin utilizarea metodei amintite mai sus, T r i c k și colab. [77] au anunțat un nou succes în obținerea de plante transgenice de *Glycine max* din MCPE cocultivate cu o tulpină de *Agrobacterium tumefaciens*.

La *Brassica napus*, din embrionii somatici induși din microspori și injectați cu ADN, s-au regenerat plante transformate. Transformarea a fost optimă, dacă s-au utilizat embrioni aflați în stadiul de dezvoltare cordiform [45]. Totuși, datorită apariției noilor biotehnologii, această metodă se pare că a fost abandonată, deoarece este foarte laborioasă și are, ca rezultat, de foarte multe ori, formarea de plante himere.

Tehnologia transformării biolistice sau a transformării genetice prin intermediul bombardamentului celulelor vegetale cu microparticule se bazează pe accelerarea unor particule într-un dispozitiv, din care sunt ulterior expulzate spre celule și pătrund prin peretele celular în interiorul lor. Microparticulele, care au în jur de 1 µm în diametru, sunt confecționate în general din tungsten. Înainte de a fi utilizate, pe suprafața lor se inserează plasmida de ADN care se dorește a fi transferată. Odată ce ajunge în celulă, ADN se desprinde de microparticule și se integrează în genomul acesteia [17]. Această metodă este superioară celei în care se utilizează *Agrobacterium* ca vector de ADN, datorită absenței incompatibilității biologice. Cu toate că și această metodă are limite, deoarece particulele pătrund doar în cîteva straturi de celule, ea a fost aplicată cu succes în culturi de suspensii embriogene realizate din diferite specii de plante. Astfel, în urma bombardamentului suspensiilor embriogene de soia cu gena GUS, s-au obținut clone GUS-pozitive, din care au regenerat plante transformate, nehimerice [61]. De asemenea, rezultate remarcabile s-au obținut în urma bombardamentului, cu microparticule ce conțin gena pBI426 care codifică fuziunea peptidelor dintre GUS și NPTII (neomicinfosfotransferază), al culturilor celulare embriogene de *Vitis* sp. [29]. Rezultate favorabile s-au obținut cu culturi embriogene de *Picea glauca*, transformate prin bombardament cu microparticule [11]. La aceste culturi, alegerea sistemului de regenerare s-a dovedit a fi crucială pentru obținerea de plante transgenice.

La *Carica papaya* s-au obținut plante transformate, rezistente la viroze, din embrionii somatici, aflați în diferite stadii de dezvoltare, bombardați cu particule încărcate cu anumite gene [14]. Totuși, utilizarea culturilor de suspensii embriogene pentru transferul de ADN este limitată datorită eforturilor necesare pentru realizarea unor astfel de culturi, precum și datorită sterilității plantelor care regenerează din culturile celulare "bătrâne" și a apariției de anomalii morfologice [24, 35].

3. Microaltoirea embrionilor somatici

Microaltoirea, o tehnică relativ nouă, constă în grefarea apexului tulpinei plantei mame la o plantulă tânără, crescută din semințe germinate în condiții aseptice. În acest mod s-a reuşit rejuvenilizarea şi eliminarea virusurilor la mai multe specii de *Citrus* [44]. A g u i l a r şi colab. [1] au aplicat această tehnică la embrionii somatici de *Theobroma cacao*, care în condiții normale se diferențiază foarte greu în plante întregi [47]. Autorii menționați au indus embriogeneza somatică din segmente de cotiledoane cultivate *in vitro*. Embrionii somatici maturi au fost grefați în incizii realizate la nivelul hipocotilelor plantulelor de trei săptămâni, germinate din semințe. Embrionii grefați germinează după trecerea plantulelor în sol, iar după 18 luni din ei s-au format două plante care au înflorit. O astfel de biotehnologie ar putea fi extinsă la embrionii somatici care în mod normal nu se diferențiază în plante.

4. Producerea de embrioni somatici pe scară largă în bioreactoare

Micropropagarea *in vitro* a plantelor ornamentale, medicinale şi a arborilor forestieri oferă nu numai un mijloc de multiplicare a stocului existent de germoplasmă, dar este şi o metodă pentru conservarea plantelor importante din punct de vedere economic, a plantelor elită şi a celor rare, care sunt pe cale de dispariție. Pentru propagarea lor clonală este necesar un număr foarte mare de plante, iar micropropagarea convențională are nevoie de un timp îndelungat. Astfel că embriogeneza somatică *in vitro*, în mediu lichid, este o cale mult mai economică şi mai rapidă pentru înmulțirea unor astfel de plante într-un sistem pe scară largă, industrial, de producere de "semințe artificiale".

În ultimii ani s-a remarcat un interes mai mare cu privire la construirea unor dispozitive în care culturile de suspensii celulare sau de embrioni să poată fi crescute în vase cu volum mult mai mare față decât cel pe care îl permite sistemul vaselor agitate (vase conice menținute pe agitatoare rotative). Astfel de dispozitive apar în literatura de specialitate sub diferite denumiri: bioreactoare, biofermentatoare sau fermentatoare, toate definesc însă acelaşi aspect. Cu toate că interesul manifestat a fost mare, T e n g şi colab. [75] remarcau faptul că numărul de lucrări publicate în care sunt descrise astfel de biotehnologii este destul de mic.

Pentru realizarea unui sistem de cultură în bioreactor sunt importanți anumiți factori: densitatea celulară sau a embrionilor, modelul vasului bioreactorului, concentrația de oxigen dizolvat în mediul de cultură (OD), spumarea, precultivarea celulelor embriogene etc. În acest sens, mai mulți autori arătau că necesarul de O_2 pentru creşterea embrionilor somatici este dependent de specie [68]. Astfel, la *Euphorbia pulcherrima* nivelul OD care promovează embriogeneza somatică este de 60% [52], iar la *Medicago sativa* de 70% [71].

Tipurile de bioreactoare care se utilizează în creşterea culturilor celulare şi a embrionilor somatici sunt diverse atât din punct de vedere al volumului, cât şi al sistemului de agitare şi aerare a mediului de cultură. Cel mai des utilizate sunt: bioreactoare de tip cilindru rotativ cu aerare [72]; bioreactoare cu mixare dublă, rotor cu palete sau agitator magnetic şi aerare [2, 49, 74].

Pentru determinarea eficienței sistemului de cultivare în bioreactoare, productivitatea acestora este adesea comparată cu cea a vaselor agitate (vase conice menținute pe agitatoare rotative orizontale). În general, atât cantitatea de biomasă celulară uscată, cât şi regenerarea şi rata de conversie a embrionilor care se realizează în bioreactor sunt mai mici decât cele care se obțin în vasele agitate [23, 71]. De exemplu, S t u a r t şi colab. [71] au arătat că în, bioreactor, rata de conversie a embrionilor somatici de lucernă a fost de 2 – 3%, față de 30% cât se atinge în vase agitate. Totuşi, M o l l e şi colab. [40] au comunicat că, într-un fermentator de 10 litri, la care este cuplat un sistem de filtrare, au reuşit să obțină 0,7 x 10^6 l^{-1} embrioni somatici de morcov care se dezvoltă în mod sincron (90% sunt embrioni în stadiu de torpilă), viabilitatea lor este de 100%, iar rata conversiei de 77%. De asemenea, T e n g şi colab. [75], utilizând un bioreactor cu liftare de aer, au reuşit să mărească frecvența maturării şi germinării embrionilor somatici de morcov, modificând densitatea MCPE şi concentrația OD în funcție de etapele de dezvoltare ale embrionilor. Pentru creşterea culturilor celulare vegetale s-au folosit bioreactoare cu o capacitate cuprinsă între 450 de litri [78] şi 75.000 de litri [59]. Succese importante au fost obținute şi în cazul embrionilor somatici de *Pinus radiata* [69] şi de *Picea* sp. [73].

Din cele relatate reiese clar că astfel de studii sunt foarte importante având în vedere că embrionii somatici sunt utilizați în diverse scopuri, cum este cel al obținerii de plante transgenice şi de semințe sintetice sau artificiale.

5. Embriogeneza somatică şi semințele sintetice sau artificiale

Unul dintre cele mai importante aspecte economice în care embriogeneza somatică poate fi implicată este cel al fabricării de semințe sintetice sau artificiale. Prima referire asupra posibilității utilizării embrionilor somatici sub forma de semințe sintetice în multiplicarea plantelor se consideră că aparține lui M u r a s h i g e [42]. De atunci, pentru a se realiza un sistem valabil şi viabil de producere a semințelor sintetice au fost depuse eforturi considerabile. La început planta cea mai des folosită pentru realizarea unor astfel de semințe a fost *Daucus carota*, apoi studiile s-au extins şi la alte specii, atât ierboase cât şi lemnoase [20, 21, 31, 32, 53, 55 - 57, 66, 71].

Semințele sintetice pot fi definite ca embrioni somatici ajunşi într-un anumit stadiu de dezvoltare în care ei sunt apți de a fi utilizați pentru producția comercială de plante [21]. În acest context există concepții diferite de clasificare a embrionilor cu privire la faptul că ei pot fi folosiți ca atare nuzi, sau încapsulați, în anumite matrici sintetice, hidratați sau desicați. In acest context, K i m şi J a n i c k [30] propun următorul sistem de clasificare: 1. embrioni somatici aflați într-un gel fluid [10]; 2. embrioni somatici încapsulați în gel de alginat [53]; 3. embrioni somatici desicați [20] şi 4. embrioni somatici deshidratați şi încapsulați în Polyox (oxid polietilenic solubil în apă) [31, 32].

După F r i e n d [15] şi J a n i c k şi colab. [26], semințele sintetice pot fi grupate în patru clase: 1. embrioni somatici hidratați sau desicați neînveliți (sau nuzi); 2. înveliți şi desicați (definiția se referă la embrionii incluşi într-o picătură de oxid de polietilenă care este ulterior deshidratată); 3. hidratați şi încapsulați şi 4. hidratați în

interiorul unui gel fluid. Pentru a nu se crea confuzii trebuie să precizăm faptul că termenii de embrioni somatici neînveliți sau de embrioni hidratați sunt sinonimi şi că descriu, de fapt, aceeaşi stare, aceea de embrioni somatici proaspăt recoltați din mediul lor de cultură şi care conțin o anumită cantitate de apă.

Producerea de semințe artificiale are o importanță deosebită în câteva cazuri şi anume: 1. când plantele nu produc semințe, iar propagarea lor pe cale vegetativă este împiedicată; 2. când semințele sunt produse în cantități mici şi 3. cînd semințele sunt recalcitrante, respectiv germinează extrem de greu sau chiar de loc, astfel că germoplasma nu poate fi conservată.

În obținerea semințelor sintetice pe scară largă, industrială, apar o serie de impedimente dintre care unele sunt de natură biologică. Astfel, embrionii somatici induşi din MCPE se află în permanență sub influența modificărilor nivelului nutrienților din mediul de cultură, modificări care pot conduce la apariția unor diferențe extreme în ceea ce priveşte dezvoltarea lor. În acest sens, s-a observat că organele embrionilor, ajunşi la un stadiu relativ de maturizare, se dezvoltă în etape diferite, proces care are ca rezultat germinarea precoce, în care numai rădăcina sau numai tulpina se formează normal. Embrionii somatici prezintă adeseori şi anomalii structurale şi anatomice, aşa cum sunt formarea de cotiledoane multiple sau unice, ori meristeme apicale foarte puțin dezvoltate [3]. Apariția unor astfel de fenomene se pare că se datorează mai mult condițiilor de cultură decât factorilor intrinseci ai embrionilor somatici. Pentru realizarea unui sistem de producere industrială a semințelor artificiale este, de asemenea, necesară o sincronizare a culturilor celulare embriogene pentru ca embrionii somatici maturi să se formeze în mod uniform.

Una dintre cele mai semnificative diferențe dintre embrionii somatici şi cei zigotici este lipsa fazei de latență în cazul embrionilor somatici. Deshidratarea este un proces important care are rol atât în inducerea, cât şi în reglarea fazei de latență. Embrionii zigotici din semințe sunt capabili să reziste la deshidratare numai pe timpul unei faze specifice, denumită stadiu de tolerare a deshidratării [63]. Înainte de deshidratare, metabolismul semințelor naturale este orientat cu precădere spre sinteza şi acumularea compuşilor de stocare, iar după rehidratarea lor rezervele sunt consumate pentru germinarea embrionului. Lipsa unei astfel de faze la embrionii somatici poate explica slaba lor germinare.

În literatura de specialitate, respectiv în lucrările editate în limba engleză, se utilizează în mod curent doi termeni, "quiescent" şi "dormant", care de fapt definesc acelaşi proces fiziologic, şi anume starea de latență. După B e w l e y şi B l a c k [6], starea "quiescent", care ar putea fi tradusă ca o stare de repaus, este faza din care embrionii îşi pot reveni prin simpla lor rehidratare, iar starea de "dormant" (stare de inactivitate sau latență) este faza în care embrionii, pentru ca să poată germina, mai au nevoie în afară de imbibiția lor cu apă şi de tratamente termice.

Pentru ca embrionii somatici să intre într-o fază de latență asemănătoare cu cea pe care o parcurg embrionii zigotici au fost aplicate mai multe metode. Una dintre ele constă în deshidratarea lor în anumite condiții. Primele studii în acest sens au fost efectuate cu *Daucus carota* [27, 46]. Totuşi, dezvoltarea de plante din

astfel de embrioni somatici desicați a fost obținută pentru prima dată la *Dactylis glomerata* [19, 20]. Succesul realizării de embrioni somatici deshidratați, care pot să germineze după o simplă rehidratare, depinde de mai mulți factori cum sunt: toleranța la desicare, faza de dezvoltare în care se află, nivelul umidității relative a aerului utilizat pentru deshidratare şi conținutul final în apă al acestor embrioni. Capacitatea de a supraviețui desicării poate fi mărită prin pretratamente cu acid abscisic (ABA). Astfel, S e n a r a t n a şi colab. [65] arătau că, după un astfel de tratament, embrionii somatici de lucernă deshidratați au rezistat un an de zile, după care au regenereat plante normale într-o proporție de 60%.

Embrionii somatici hidratați şi neîncapsulați pot fi utilizați pentru multiplicarea unor plante ornamentale valoroase, cum sunt orhideele. Embrionii somatici deshidratați, neîncapsulați sau ulterior încapsulați pot fi stocați pentru mai mult timp ca atare. Embrionii somatici hidratați şi încapsulați în matrici de natură diferită pot fi semănați direct în pământ, în răsadnițe şi apoi în sere sau în câmp. În concluzie, semințele artificiale constau de fapt în embrioni somatici, hidratați sau deshidratați, nuzi sau încorporați în diverse matrici.

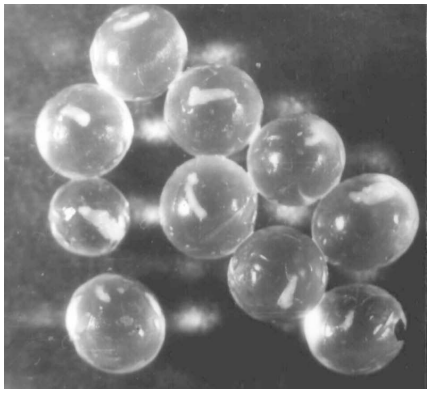
5.1. Embrionii somatici încapsulați în matrice de gel

Încapsularea embrionilor somatici pare a fi una dintre cele mai promițătoare metode care permite semănarea lor în sere sau în câmp, deoarece nu numai că îi protejează de răniri şi de deshidratare, dar uşurează manipularea şi automatizarea proceselor biotehnologice.

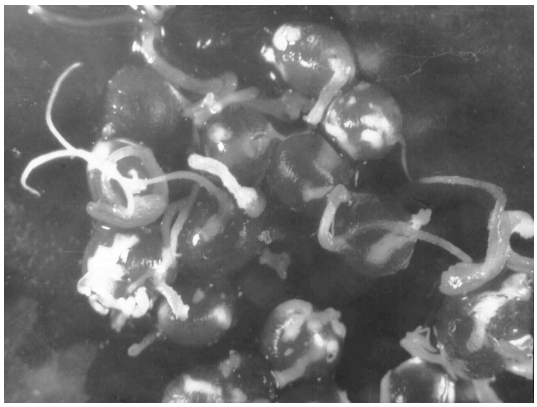
Încapsularea embrionilor somatici constă în includerea lor în stare hidratată într-o matrice de gel. Pentru încapsulare s-au utilizat o serie de hidrogeluri: alginatul de sodiu şi de potasiu, gelritul, gelatina, caaragenanul, pectatul de sodiu, oxidul de polietilenă etc. [57]. Cel mai frecvent se utilizează hidrogelul de alginat datorită proprietăților lui: vâscozitate moderată, toxicitate mică, complexare (întărire) rapidă. Gelul de alginat mai prezintă următoarele avantaje: protejează embrionii somatici mai bine decât alte hidrogeluri; oferă posibilitatea uneii selecții calitative bazate pe utilizarea unui sortator cu analizator de imagini şi, implicit, a reducerii prețului de cost per unitate. De asemenea, în el pot fi incluse o serie de substanțe cum sunt hidrații de carbon, nutrienți anorganici, reglatori de creştere, pesticide şi hife de ciuperci cu care viitoarea plantă să formeze micorize. Un astfel de înveliş, care protejează şi hrăneşte embrionul somatic, poate fi asemănat cu endospermul din cazul embrionilor zigotici.

Tehnica încapsulării în gel de alginat, pe care am aplicat-o şi noi la embrionii somatici de morcov hidratați [9], este relativ simplă şi destul de accesibilă. În prima etapă, am selectat şi recoltat embrionii aflați în stadiul de torpilă, prin trecerea culturii de embrioni printr-o sită cu ochiurile de cca 1,8 mm în diametru. Apoi, ei au fost plasați într-o mixtură compusă din mediul M u r a s h i g e – S k o o g (MS) [43], fără reglatori de creştere, şi alginat de sodiu (2%), mixtură autoclavată anterior. În continuare, acest amestec a fost picurat într-o soluție de $CaCl_2.2H_2O$ (50 mM)

care era agitată cu un agiatator magnetic. Fiecare picătură conține unul sau doi embrioni. În urma contactului dintre alginat şi soluția de clorură de calciu are loc un schimb de ioni, cei de calciu luând locul celor de sodiu. În urma acestui schimb se produce o complexare a alginatului care se întăreşte, iar picăturile se transformă în mici sfere (sau capsule sferice) de alginat de calciu cu un diametru de 4 – 5 mm, în interiorul cărora se află embrionii somatici de morcov (Fig. 1). Ele se lasă în soluția de $CaCl_2.2H_2O$ timp de 30 de minute, după care se spală de mai multe ori cu mediul de bază MS. Aceste sfere sau capsule în care sunt incluşi embrionii constituie semințele sintetice. Pentru a determina frecvența de conversie a embrionilor încapsulați, sferele au fost inoculate pe medii cu o compoziție diferită. După cca patru zile, embrionii somatici au germinat, ieşind din capsulele de alginat în care erau imobilizați (Fig. 2). Dintre mediile testate, cel mai favorabil s-a dovedit a fi mediul MS ½ solidificat cu gelrit (2,5%), frecvența regenerărări atingând cca 38% [9].



F i g. 1. *Capsule de alginat de calciu în interiorul c¾rora se afl¾ inclu¿i embrioni somatici de* Daucus carota, *aflaßi în stadiul de torpil¾.*



F i g. 2. *Germinarea* in vitro *a embrionilor somatici de* Daucus carota *încapsulaßi în gel de alginat.*

Printr-o biotehnologie asemănătoare au fost încapsulați embrioni somatici proveniți şi de la alte specii cum sunt cele de *Brassica, Gossypium, Zea* şi *Lactuca* [54] sau de la *Picea* [60].

Deşi au fost realizate progrese importante în ceea ce priveşte încapsularea embrionilor, totuşi mai există unele impedimente. Astfel, s-a observat că nutrienții solubili din capsulele de alginat difuzează rapid în exterior. În acest sens, F u j i i şi colab. [16] arătau că acoperirea suprafeței capsulelor de alginat cu un strat subțire realizat dintr-un compus cu proprietăți hidrofobe, așa cum este oxidul polietilenic (Polyox), previne astfel de fenomene. De asemenea, R e p u n t e şi colab.[58] au găsit un procedeu mult mai ieftin de protecție, acoperind capsulele cu un strat de parafină. Totuşi, după părerea noastră, asemenea procedee se pretează mai mult la conservarea embrionilor somatici încapsulați, deoarece de multe ori se remarcă faptul că ei germinează destul de greu, chiar în condiții normale, probabil datorită schimbului redus de gaze care are loc cu mediul ambiant, precum şi consistenței matricii de gel care este destul de tare [54, 57].

Aplicarea practică a tehnologiei semințelor sintetice pentru producția în masă a plantelor se bazează pe realizarea anumitor parametri:

- producerea de embrioni somatici cu capacitate mare de conversie în cazul însămânțării lor în diferite condiții;
- un sistem de cultură pe scară largă;
- integrarea proceselor dintre embriogeneza somatică şi încapsulare.

Unul dintre cele mai importante aspecte ale utilizării semințelor sintetice pentru propagarea clonală în masă a plantelor este conversia uniformă, rapidă şi într-un procent cât mai mare a embrionilor somatici, în momentul în care semințele sintetice sunt transferate în condiții de seră sau câmp. Prin procesul lor de maturație, embrionii cresc în lungime, cotiledoanele se măresc, iar greutatea proaspătă şi uscată, precum şi conținutul lor în amidon sporesc.

Termenul de unități încapsulabile (UÎ) a fost folosit de O n i s h i şi colab.[48] pentru a desemna acei embrioni somatici neîncapsulați apți pentru prepararea semințelor sintetice, embrioni care trebuie să prezinte o conversie riguroasă în plante în situații nesterile. Aceasta face ca UÎ să se distingă net de embrionii somatici obişnuiți.

Realizându-se noi procedee de cultură pentru producerea de UÎ, s-a presupus că o capacitate mare de transformare poate fi indusă la embrionii somatici, atât din speciile de plante cu semințe albuminate, cât şi nealbuminate. Lucerna e o specie exalbuminată, sămânța ei având depozitate substanțele de rezervă în cotiledoanele bine dezvoltate. Pe de altă parte, la țelină şi la morcov (albuminate), aproape toate substanțele de rezervă necesare pentru germinația lor sunt furnizate de endosperm [40]. UÎ de țelină şi de morcov produse după o anumită metodă au prezentat o conversie de 50 - 80% în condiții de seră fără adaos de carbohidrați sau alți nutrienți [48].

Unitățile încapsulabile de țelină descrise mai sus au fost realizate printr-un procedeu cu trei faze distincte:

- dezvoltarea embrionilor somatici în medii cu o presiune osmotică mare;
- deshidratarea treptată şi moderată a embrionilor somatici (se înlătură total vitrificarea);
- o postcultivare a embrionilor deshidratați într-un mediu fără zaharoză pentru dobândirea capacității fotoautotrofice şi a depunerii de substanțe de rezervă.

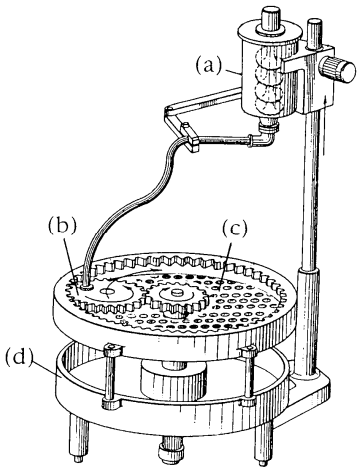
Prin acest procedeu este posibilă însămânțarea directă a unui țesut mic într-un "pat nutritiv" (ghivece cu un anumit amestec de pământ şi alte ingrediente), demonstrându-se că acest concept de UÎ poate fi extins şi la embrionii somatici ai altor specii de plante, sau chiar la muguri.

În scopul micropropagării pe scară industrială a plantelor, O n i s h i şi colab [49] au pus la punct un sistem automatizat de producere a semințelor sintetice din embrionii somatici de morcov şi de țelină. In mare, sistemul este compus din trei tipuri de aparate: 1. bioreactor; 2. aparat automat de încapsulare şi 3. sortator pentru selectarea capsulelor. Pentru producerea embrionilor, autorii au utilizat un bioreactor cu agitare magnetică, al cărui vas de cultură are o capacitate de 8 litri. Din 2,5 g de MCPE, după o lună de la inoculare, s-au obținut 5,1 x 10^5 embrioni aflați în stadiul de torpilă. După procesul de deshidratare s-au obținut 2,61 x 10^5 embrioni bine dezvoltați şi nevitrificați. În urma supunerii lor la un proces de postcultivare s-au realizat 4,10 x 10^4 unități încapsulabile. 80% din UÎ astfel obținute s-au transformat în plantule întregi după transplantarea lor pe un sol de răsadniță. În acest experiment, prima apariție a frunzelor din UÎ s-a observat în ziua a 4-a de la însămânțare şi mai mult de 50% din ele s-au transformat în plante după două săptămâni. În cea de a 5-a săptămână, majoritatea plantulelor aveau câteva frunze. Din 927 de plantule transferate doar 0,2% au prezentat anomalii ale frunzelor.

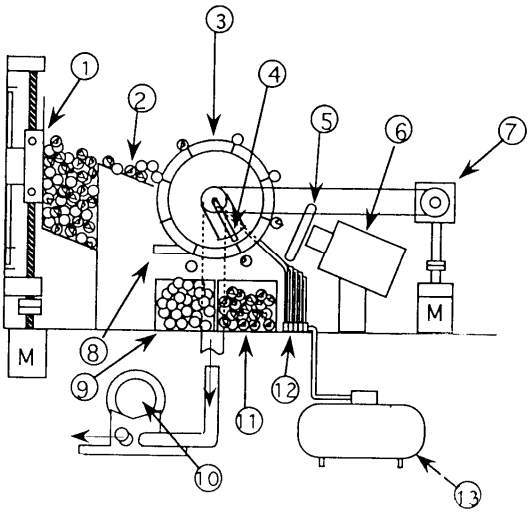
Încapsularea a fost realizată în gel de alginat şi în principiu ea urmează aceeaşi cale, descrisă şi de noi. Astfel, UÎ de morcov sau țelină (5 g de biomasă proaspătă constituită din embrioni mai mici de 5 mm) au fost suspendate în 200 ml soluție de alginat de sodiu 1,5%, care conține în plus, pentru a creea un tip de endosperm artificial, 3% microcapsule de zaharoză. Carbohidratul este eliberat în capsule, treptat în funcție de temperatură. De asemenea, s-a mai adăugat şi 0,1% Topsin (un fungicid). Acest amestec a fost apoi introdus în aparatul automat de încapsulare (Fig. 3) care îl picură printr-un tub în mai multe orificii aflate pe o placă rotativă. Picăturile formate, cu sau fără embrioni, cad într-un vas în care se găseşte soluția de complexare şi întărire a alginatului, soluție de gelificare (soluție de clorură de calciu în concentrație de 100 mM). După menținerea sferelor timp de 10 minute în această soluție, se spală cu apă de robinet şi se selectează prin intermediul aparatului de sortat care este echipat cu un analizator de imagini care cuprinde, printre altele, şi o cameră digitală video (CCD camera) (Fig. 4). Această cameră selectează capsulele goale de cele cu embrioni.

Performanțele acestui sistem sunt următoarele: 1000 de picături de alginat cu embrioni per minut. Din 8.320 de capsule de alginat, 33,2% sunt fără embrioni, 28,6% cu un singur embrion şi 38,2% cu doi sau mai mulți embrioni. Din cele peste 8.320 de capsule, sortatorul a selectat un număr de 3.000 cu o viteză de 5 capsule per secundă.

După sortare, pentru ca embrionii somatici să germineze cât mai rapid, O n i s h i şi colab. [49] au pus la punct o nouă metodă de spălare. Astfel, capsulele cu embrioni au fost spălate de mai multe ori cu apă de robinet şi apoi imersate într-o soluție de azotat de potasiu, după care au fost din nou spălate cu apă de robinet.

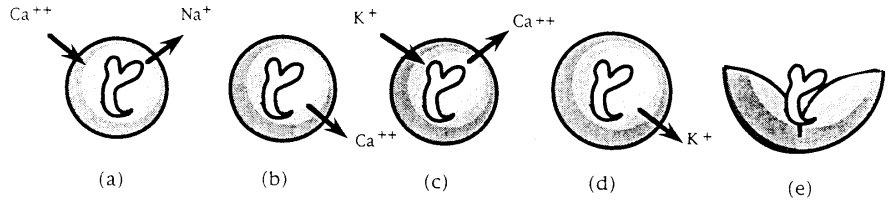


F i g. 3. *Aparat de încapsulare cu platformă perforată*.
Mixtura de alginat şi embrioni aflată într-un rezervor de amestecare (a) ajunge prin intermediul unui tub la o roată dințată perforată (b) care se rotește pe o platformă dotată cu cca 1200 de orificii cu un diametru de 5 mm (c), distribuind o anumită cantitate de mixtură în aceste orificii. Picăturile de alginat formate la nivelul fiecărui orificiu cad într-un vas (d) ce conține soluția de complexare ($CaCl_2$), sau de gelificare, a alginatului. În urma acestui contact se formează capsulele (semințele sintetice) ce dețin în interiorul lor embrionii somatici [49].

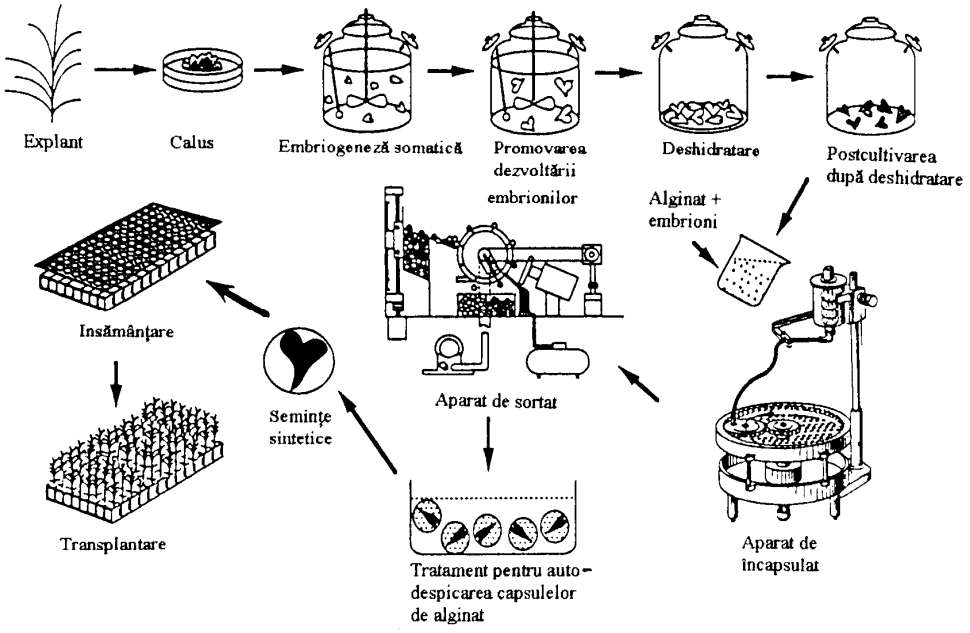


F i g. 4. *Dispozitivul de sortare a capsulelor de gel*.
1 - Autodescărcător. 2 - Platformă de glisare. 3 - Cilindru rotativ. 4 - Tub de evacuare a capsulelor cu embrioni. 5 - Sursă de lumină. 6 - Cameră video digitală (engl. = CCD camera). 7 - Indicator. 8 - Perie de curățare a capsulelor goale. 9 - Container cu capsule goale. 10 - Ventilator. 11 - Container cu semințe sintetice. 12 - Valvă electrică. 13 - Compresor de aer. M - Motor electric [49].

Trecute în condiţii de umiditate, aceste capsule se umflă şi devin fragile, iar în final se despică spontan (Fig.5). După transferul lor în răsadniţe, după două săptămâni frecvenţa regenerării de plante a fost de cca 50%. Întregul proces de producere a seminţelor sintetice este redat în Fig. 6. Desigur că un astfel de sistem poate să reducă cu mult preţul unei unităţi de plantă pregătită pentru a fi transferată în seră, preţ care în 1987 era de cca 0,033 $ [54].



F i g. 5. *Procedeul de preparare a sferelor de gel alginat în scopul autodespicării lor.* (a) - Complexarea mixturii de alginat se realizează prin picurarea ei într-o soluţie de $CaCl_2$. Sferele (capsulele) formate se menţin 10 min. în această soluţie. (b) - Spălarea capsulelor de alginat de calciu cu apă de robinet timp de trei ore în scopul înlăturării excesului ionilor de calciu. (c) - Tratamentul pentru despicare: capsulele se scufundă timp de 60 min. într-o soluţie de azotat de potasiu 200 mM. Ionii de potasiu înlocuiesc parţial ionii de calciu. (d) - Spălarea: capsulele se spală cu apă de robinet timp de 40 de min. Capsulele devin moi. (e) - Autodespicarea: capsulele sunt menţinute într-un mediu umed şi în condiţii de conductibilitate electrică scăzută. Capsulele se umflă şi apoi se despică [49].



F i g. 6. *Reprezentarea schematică a sistemului de producere a seminţelor sintetice de morcov* [49].

5.2. Includerea embrionilor somatici într-un gel fluid

Sistemul constă în introducerea semințelor într-un gel fluid protector, sistem care a fost pus la punct în Anglia în jurul anului 1970 [18]. Ideea ca acest gel să fie utilizat pentru semărea embrionilor somatici îi aparține lui D r e w [10]. În acest caz, procedeul are la bază inocularea embrionilor somatici care cresc activ sau care sunt în stadiu de pregerminație, într-un anumit tip de gel. Dintre toate gelurile testate se pare că gelul de hidroxetilceluloză este cel mai favorabil pentru o astfel de biotehnologie [22, 33]. Într-un astfel de gel mai pot fi incluşi nutrienți anorganici, hidrați de carbon, pesticide, hife de ciuperci, care măresc rata de supraviețuire a embrionilor.

După inocularea embrionilor în gelul fluid, amestecul este trecut fie în ghivece, fie în mici răsadnițe speciale, care conțin un amestec de perlit cu turbă. Rezultate promițătoare s-au obținut la mai multe plante cum este *Ipomoea batatas* [62] sau *Daucus carota* [33]. În cazul morcovului, autorii au determinat compoziția şi volumul de gel fluid, rolul luminii şi al călirii la frig a embrionilor somatici asupra procentului de convertire a acestora. Embrionii pregerminați au fost incluşi într-un gel de hidroxietilceluloză cu 2% zaharoză şi 250 mg/l de Truban (un fungicid). Ei au fost incubați timp de opt zile în acest fluid. După 12 săptămâni de la transferul lor în ghivece în condiții de seră, s-au format plante normale într-o rată foarte mare.

Aplicarea acestei tehnici permite o germinare rapidă, într-un procent mult mai mare şi mult mai uniformă decît cea care se remarcă în cazul semințelor normale.

6. Crioprezervarea embrionilor somatici în scopul conservării germoplasmei

Embrionii somatici, aşa cum arătam în capitolele anterioare, pot fi produşi într-un număr foarte mare în bioreactoare şi utilizați pentru propagarea în masă a plantelor, în transformările genetice şi pentru producerea de semințe sintetice. Este normal deci ca ei să poată fi păstrați un timp cât mai îndelungat. Dintre metodele utilizate în acest scop poate fi citată crioprezervarea clasică, procedeu în care este necesar ca celulele embrionilor să fie aduse într-un stadiu de metabolism inactiv. Această crioprezervare se poate face direct, prin imersarea embrionilor în azot lichid (AL), sau treptat cu scăderea în etape a temperaturii până la – 70°C şi apoi prin trecerea lor în AL. Metodele mai noi se referă la: a) vitrificarea ce constă în tratarea culturilor embrionare cu concentrații mari de crioprotectanți înainte de imersia în AL; b) crioprezervarea semințelor artificiale prin incubarea lor într-o soluție de zaharoză 10% şi urmată de desicare, toate aceste procedee fiind efetuate anterior imersiei în AL [4, 5].

Capacitatea embrionilor somatici, ca şi cea a MCPE din care provin, de a rezista la temperaturi foarte scăzute este determinată de genotip şi de vârsta lor. S-a observat astfel că embrionii mai tineri supraviețuiesc mult mai bine [5]. Alți factori de care depinde succesul conservării embrionilor prin înghețare la –196°C mai sunt: conținutul în apă (trebuie deshidratați), metodele de înghețare şi redezghețare, precum şi natura şi concentrația crioprotectanților.

Rezultate remarcabile în ceea ce priveşte criconservarea embrionilor somatici, în care viabilitatea lor s-a menținut la cote înalte după decongelare, au fost obținute la mai multe plante: la cafea [76], la *Citrus* [36] şi la *Asparagus officinalis* [79].

Teoretic şi practic prin această metodologie germoplasma poate fi conservată pe un număr nelimitat de ani. De asemenea, un astfel de material conservat se pretează foarte bine la schimburile internaționale între băncile de gene.

7. Concluzii

Embriogeneza somatică a fost indusă la peste 300 de specii ce aparțin majorității grupurilor taxonomice şi se presupune că ea este o trăsătură universală, ereditară a plantelor superioare. Posibilitatea de a îmbunătăți atât producția de semințe (mai ales din punct de vedere genetic), cât şi recolta plantelor de interes economic prin manipularea celulelor somatice izolate şi cultivate *in vitro* se bucură de un real interes. Embrionii somatici s-au dovedit a fi un excelent material vegetal utilizabil pentru transformările genetice şi pentru producerea de plante transgenice. Microaltoirea embrionilor somatici pe plante foarte tinere poate fi utilizată în cazurile în care în mod normal embrionii somatici nu germinează sau germinează incomplet. Producerea de embrioni somatici într-un număr foarte mare în bioreactoare se poate folosi în scopul micropropagării în masă a multor specii valoroase. Semințele sintetice, respectiv embrionii somatici încapsulați îşi demonstrează importanța la acele specii care nu produc semințe, iar propagarea lor vegetativă este prea costisitoare. În acest sens, a fost pus la punct un sistem automat de producere a semințelor sintetice într-un ritm de 70.000 de semințe per zi, de către O n i s h i şi colab. [48, 49]. Crioprezervarea embrionilor somatici sau a semințelor sintetice este o tehnologie viabilă pentru conservarea pe termen lung a germoplasmei. Luând în considerare toate aceste aspecte trebuie să subliniem faptul că atât cultivatorii, cât şi consumatorii trebuie convinşi că produsele agricole provenite din biotehnologiile bazate pe embriogeneza somatică sunt sănătoase şi necesare.

B I B L I O G R A F I E

1. A g u i l a r, M.E., V i l l a l o b o s, V.M., V a s q u e z, N., *Production of cocoa plants* (Theobroma cacao *L.*) *via micrografting of somatic embryos*, "In Vitro", **28**, 1992, 15-19.
2. A k i t a, M., T a k a y a m a, S., *Mass propagation of potato tubers using jar fermentor techniques* , "Acta Hortic.", **230**, 1988, 55-61.
3. A m m i r a t o, P.V., *Organizational events during somatic embryogenesis*, în S o m e r s, D.A., G e g e n b a c k, B.G., B i e s b o e r, B.D., H a c k e t t, W.P., G r e e n, C.E. (Eds.), *Plant Tissue and Cell Culture*, pp.57-81, Alan Liss, New York, 1987.
4. B a j a j, Y.P.S., *Storage and cryopreservation of* in vitro *cultures*, în B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17, *High-Tech and Micropropagation* I, pp. 361-381, Springer, Berlin, 1991.

5. B a j a j, Y.P.S., *Cryopreservation of somatic embryos*, în B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 30, *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed* I, pp.221-229, Springer, Berlin, 1995.
6. B e w l e y, J.D., B l a c k, M., *Seeds: Physiology of Development and Germination*, Plenum Press, New York, 1985.
7. B r e t t e l l, R.I.S., P a l l o t t a, M.A., G u s t a f s o n, J.F., A p p l e s, R., *Variation at the Nor loci in triticale derived from tissue culture*, "Theor. Appl. Genet.", **71**, 1986, 637-643.
8. D e B e r g h, P.C., A i t k e n-C h r i s t i e, J., C o h e n, D., G r o u t, B., V o n A r n o l d, S., Z i m m er m a n, R.H., Z i v, M., *Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation*, "Plant Cell, Tissue Organ Cult.", **30**, 1992, 135-140.
9. D e l i u, C., B u t i u c, A., H a l m a g y i, A., M u n t e a n u - D e l i u, C., C r i s t e a, V., *Regenerarea plantelor din embrionii somatici de morcov încapsulați în gel de alginat*, "Lucr. Simp. Scientific Debates, Cluj-Napoca (19-20 iunie)", 1997, 233-235.
10. D r e w, R.K.L., *The development of carrot* (Daucus carota *L.*) *embryoids (derived from cell suspension culture) into plantlets on a sugar-free basal medium*, "Hortic. Res.", **19**, 1979, 79-84.
11. E l l i s, D.D., *Genetic transformation of somatic embryos*, în B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 30, *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, pp. 207-220, Springer, Berlin, 1995.
12. E l l i s, D.D., M c C a b e, D.E., M c I n n i s, S., R a m a c h a n d r a n, R., R u s s e l, D.R., W a l l a c e, K.M., M a r t i n e l l, B.J., R o b e r t s, D.R., R a f f a, K.F., M c C o w n, B.H., *Stable transformation of* Picea glauca *by particle acceleration*, "Bio/ Technology", **11**, 1993, 84-89.
13. E m o n s, A.M.C., *Somatic embryogenesis: cell biological aspects*, "Acta Bot. Neerl.", **43**, 1994, 1-14.
14. F i t c h., M.M., M a n s h a r d t, R.M., G o n s a l v e s, D., S l i g h t o m, J.L., S a n f o r d, J.C., *Virus resistant papaya plants derived from tissue bombardment with the coat protein gene of papaya ringspot virus*, "Bio/Technology", **10**, 1992, 1466-1472.
15. F r i e n d, D.R., *Hydrophobic coating for synthetic seeds*, în R e d e n b a u g h, K. (Ed.), *Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, pp.47-64, CRC Press, Boca Raton, 1993.
16. F u j i i, J.A.A., S l a d e, T., R e d e n b a u g h, K., W a l k e r, K.A., *Artificial seeds for plant propagation*, "Bio/Technology", **5**, 1987, 335-339.
17. G i s e l, A., I g l e s i a s, V.A., S a u t t e r, C., *Ballistic microtargeting of DNA and biologically active substance to plant tissue*, "Plant Tissue Cult. Biotechnol.", **2**, 1996, 33-41.
18. G r a y, D.J., *Fluid drilling of vegetable seeds*, "Hortic. Rev.", **3**, 1981, 1-27.
19. G r a y, D.J., *Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seeds*, în B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 30, *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed* I, pp.126-151, Springer, Berlin, 1995.
20. G r a y, D.J., C o n g e r, B.V., *Quiescence in somatic embryos of orchardgrass* (Dactylis glomerata) *induced by desiccation*, "Am. J. Bot.", **72**, 1985, 816-818.
21. G r a y, D.J., C o n g e r, B.V., S o m g s t a d, D.D., *Desiccated quiescent somatic embryos of orchardgrass for use as synthetic seeds*, "In Vitro", **23**, 1987, 29-33.

22. G r a y, D.J., P u r o h i t, A., *Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology,* "Crit. Rev. Plant Sci.", **10**, 1991, 33-61.
23. G r e i d z i a k, W., D i e t t r i c h, B., L u c k n e r, M., *Batch cultures of somatic embryos of* Digitalis lanata *in gaslift fermentors. Development and cardenolide accumulation,* "Planta Med.", **56**, 1990, 175-178.
24. H a d i, M.Z., M c M u l l e n, M.D., F i n e r, J.J., *Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment,* "Plant Cell Rep.", **15**, 1996, 500-505.
25. H o o y k a a s, P.J.J., B e i j e r s b e r g e n, A.G.M., *The virulence system of* Agrobacterium tumefaciens, "Annu. Rev. Phytopathol.", **32**, 1994, 157-179.
26. J a n i c k, J., K i m, Z.-H., K i t t o, S.L., S a r a n g a, Y., *Desiccated synthetic seed,* în R e d e n b a u g h, K. (Ed.*), Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement,* pp.11-23, CRC Press, Boca Raton, 1993.
27. J o n e s, L.H., *Long-term survival of embryoids of carrot* (Daucus carota *L*.), "Plant Sci. Lett.", **2**,1974, 221-224.
28. J o n e s, L.H., H u g h e s, W.A., *Oil palm* (Elaeis guineensis *Jacq*.), în B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry,* Vol.5, *Trees* II, pp.176-202, Springer, Berlin, 1989.
29. K i k k e r t, R.J., H é b e r t – S o u l é, D., W a l l a c e, P.G., S t r i e m, M.J., R e i s c h, B.I,. *Transgenic plants of "Cancellor" grapevine* (Vitis *sp*.) *from biolistic transformation,* "Plant Cell Rep.", **15**, 1996, 311-316.
30. K i m, Y.-H., J a n i c k, J., *ABA and Polyox-encapsulation or high humidity increases survival of desiccated somatic embryos of celery,* "HortScience", **24**, 1989, 674-676.
31. K i t t o, S.L., J a n i c k, J., *Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos,* "HortScience", **17**, 1982, 448-450.
32. K i t t o, S.L, J a n i c k, J., *Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot,* "J. Am. Soc. Hortic. Sci.", **110**, 1985, 227-282.
33. K i t t o, S.L, P i l l, W.G., M o l l o y, D.M., *Fluid drilling as a delivery system for somatic embryo-derived plantlets,* în B a j a j, Y.P.S. (Ed.*), Biotechnology in Agriculture and Forestry,* Vol. 30, *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed* I, pp.181-192, Springer, Berlin, 1995.
34. L i t z, R.E., M a t h e w s, V.H., M o o n, P.A., P l i e g o – A l f a r o, F., Y u r g a l e - v i t c h, S., D e W a l d, S.G., *Somatic embryogenesis of mango* (Mangifera indica *L*.), în R e d e n b a u g h, K. (Ed.), *Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement,* pp.409-425, CRC Press, Boca Raton, 1993.
35. L i u, C.-M., X u, Z.-H., C h u a, N.-H., *Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis,* "Plant Cell", **5**, 1993, 621-630.
36. M a r i n, M.L., D u r a n – V i l a, N., *Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange* (Citrus sinensis *(L.) Osb*.) *after immersion in liquid nitrogen,* "Plant Cell, Tissue Organ Cult.", **14**, 1988, 51-57.
37. M a t h e w s, H., L i t z, R.E., W i l d e, H.D., M e r k l e, S.A., W e t z s t e i n, H.Y., *Stable integration and expression of β-glucuronidase and NPT II genes in mango somatic embryos,* "In Vitro Cell Dev. Biol.", **28**, 1992, 172-178.
38. M c G r a n a h a n, G.H**.,** L e s l i e, C.A., U r a t s u, S.L., D a n d e k a r, A.M., *Improved efficiency of the walnut somatic embryos gene transfer system,* "Plant Cell Rep.", **8**, 1990, 512-516.

39. M c G r a n a h a n, G.H., L e s l i e, C.A., U r a t s u, S.L., M a r t i n, L.A., D a n d e k a r, A.M., Agrobacterium-*mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants*, "Bio/Technology", **6**, 1988, 800-804.
40. M o l l e, F., D u p u i s, J.-M., D u c o s, J.-P., A n s e l m, A., C r o l u s – S a v i d a n, I., P e t i a r d, V., F r e y s s i n e t, G., *Carrot somatic embryogenesis and its application on synthetic seeds*, în R e d e n b a u g h, K. (Ed.), *Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, pp.257-287, CRC Press, Boca Raton, 1993.
41. M o n s a l u d, M.J.R., *Control of hyperhydricity in "Hindi" mango somatic embryos*, MSc Diss., Univ. Florida, Gainesville, 1994.
42. M u r a s h i g e, T., *The impact of plant tissue culture on agriculture*, în T h o r p e, T. (Ed.), *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978*, IAPTC, pp.15-26, Univ. Calgary, Alberta, 1978.
43. M u r a s h i g e, T., S k o o g, F., *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*, "Physiol. Plant.", **15**, 1962, 473-497.
44. N a v a r r o, L., *Citrus shoot tip grafting* in vitro, în B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 18, *High-Tech and Micropropagation* II, pp.327-338, Springer, Berlin, 1992.
45. N e u h a u s, G., S p a n g e r b e n b e r, G., M i t t e l s t e n – S c h e i d, O., S c h w e i g e r, H.-G., *Transgenic rapeseed plants obtained by microinjection of DNA into microspore-derived embryoids*, "Theor. Appl. Genet.", **75**, 1987, 30–36.
46. N i t z s c h e, W., *Erhaltung der Lebensfähigkeit in getrocknetem Kallus*, "Pflanzenphysiologie", **87**, 1978, 469-472.
47. N o v a k, F.J., D o n i n i, B., O w u s u, G.K., *Somatic embryogenesis and* in vitro *plant development of cocoa*, în Proc. Int. Symp. Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement, pp.443-449, IAEA/FAO, Vienna,1986.
48. O n i s h i, N., M a s h i k o, T., O k a m o to, A., *Cultural system producing encapsulatable units of synthetic seeds in celery*, "Acta Hortic.", **319**, 1992, 113-118.
49. O n i s h i, N., S a k a m o t o, Y., H i r o s a w a, T., *Synthetic seeds - an application of mass production of somatic embryos*, "Plant Cell, Tissue Organ Cult.", **39**, 1994, 137-145.
50. P a r r o t t, W.A., H o f f m a n, L.M., H i l d e b r a n d, D.F., W i l l i a m s, E.G., C o l l i n s, G.B., *Recovery of primary transformation of soybean*, "Plant Cell Rep.", **7**, 1989, 615-617.
51. P e c h a n, P.M., *Successful cocultivation of* Brassica napus *microspores and proembryos with* Agrobacterium, "Plant Cell Rep.", **8**, 1989, 387-390.
52. P r e i l, W., F l o r e k, P., W i x, U., B e c k, A., *Towards mass propagation by use of bioreactors*, "Acta Hortic.", **226**, 1988, 99-105.
53. R e d e n b a u g h, K., *Application of artificial seeds to tropical crops*, "HortScience", **25**, 1990, 251-257.
54. R e d e n b a u g h, K., F u j i i, J.A., S l a d e, D., *Hydrated coatings for synthetic seeds*, în R e d e n b a u g h, K. (Ed.), *Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, pp.35-45, CRC Press, Boca Raton, 1993.
55. R e d e n b a u g h, K., F u j i i, J.A., S l a d e, D., V i s s, P., K o s s l e r, M., *Artificial seeds: encapsulated somatic embryos*, în: B a j a j, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 17, *High-Tech and Micropropagation* I, pp. 395-416, Springer, Berlin, 1991.

56. R e d e n b a u g h, K., N i c h o l, J., K o s s l e r, M., P a a s c h, B., *Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production,* "In Vitro Cell Dev. Biol.", **20**, 1984, 256-257.
57. R e d e n b a u g h, K., S l a d e, D., V i s s, P., F u j i i, J.A., *Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats,* "HortScience", **22**, 1987, 803-809.
58. R e p u n t e, V.P., T a y a, M., T o n e, S., *Preparation of artificial seeds using cell aggregates from horseradish hairy roots encapsulated in alginate gel with paraffin coat,* "J. Ferm. Bioeng.", **79**, 1995, 83-86.
59. R i t t e r h a u s, E., U l r i c h, J., W e s t p h a l, K., *Large-scale production of plant cell cultures,* "IAPTC Newslett.", **61**, 1990, 2-10.
60. R o b e r t s, D.R., W e b s t e r, F.B., F l i n n, B.S., L a z a r o f f, W.R., C y r, D.R., *Somatic embryogenesis of spruce,* în R e d e n b a u g h, K. (Ed.), *Synseeds: Application of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, pp.427-450, CRC Press, Boca Raton,. 1993.
61. S a t o, S., N e w e l l, C., K o l a c z, K., T r e d o, L., F i n e r, J., H i n c h e e, M., *Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems,* "Plant Cell Rep.", **12**, 1993, 408-413.
62. S c h u l t e i s, J.R., C a n t l i f f e, D.J., C h é e, R.P., *Optimizing sweet potato* [Ipomoea batatas *(L.) Lam.*] *root and plantlet formation by selection of proper embryo developmental stage and size, and gel type for fluidized sowing,* "Plant Cell Rep.", **9**, 1990, 356-359.
63. S e n a r a t n a, T., *Artificial seeds,* "Biotechnol. Adv.", **10**, 1992, 379-392.
64. S e n e r a t n a, T., M c K e r s i e, B.D., *Artificial seeds from germplasm preservation, exchange and improvement,* "Diversity", **5**, 1989, 44-51.
65. S e n e r a t n a, T., M c K e r s i e, B.D., B o r o c h o v, A., *Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes,* "J. Exp. Bot.", **38**, 1987, 2005-2014.
66. S e n a r a t n a, T., M c K e r s i e, B.D., B o w l e y, S.R., *Artificial seeds of alfalfa* (Medicago sativa): *induction of desiccation tolerance in somatic embryos,* "In Vitro Cell Dev. Biol.", **26**, 1990, 85-90.
67. S h e r i d a n, W.F., C l a r k, J.K., *Mutational analysis of morphogenesis of the maize embryo,* "Plant J.", **3**, 1993, 347-358.
68. S m a r t, N.J., F l o w e r, M.W., *An airlift column bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions,* "J. Exp. Bot.", **35**, 1984, 531-535.
69. S m i t h, D.R., D o n a l d s o n, L.A., W a r r, A., *Bioreactor technology for mass propagation of* Pinus radiata *by somatic embryogenesis,* "In Vitro", **27**, 1991, 43A.
70. S o n d a h l, M.R., L a u r i t i s, J.A., *Coffee,* în H a m m e r s c h l a g, F.A., L i t z, R.E. (Ed.), *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*, pp.401-420,CAB International, Wallingford, UK, 1992.
71. S t u a r t, D.A., S t r i c k l a n d, S.G., W a l k e r, K.A., *Bioreactor production of alfalfa somatic embryos,* "HortScience", **22**, 1987, 800-809.
72. T a n a k a, H., N i s h y i m a, F., S u w a, M., I w a m o t o, T., *Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures,* "Biotechnol. Bioeng.", **25**, 1983, 2359-2370.
73. T a u t o r u s, T.E., L u l s d o r f, M.M., K i k c i o, S.I., D u n s t a n, D.I., *Bioreactor culture of black spruce and interior spruce somatic embryos,* Abstr. Proc. 3rd Can. Workshop on Plant Tissue Culture and Genetic Engineering, Univ. Guelph, 1992, p.36.

74. T e n g, L.W., L i u, C.P., L i u, Y.J., *Regenerating lettuce from suspension cultures in 2-liter bioreactor*, "HortScience", **28**, 1993, 669-671.
75. T e n g, L.W., L i u, C.Y., T s a i, Z.C., S o o n g, T.S., *Somatic embryogenesis of carrot in bioreactor culture systems*, "HortScience", **29**, 1994, 1349-1352.
76. T e s s e r e a u, H., L e c o u t o u x, C., F l o r i n, B., S c h l i e n g e r, C., P e t i a r d, V., *Use of simplified freezing process and dehydration for the storage of embryogenic cell lines and somatic embryos*, "Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.", **14**, 1991, 1297-310.
77. T r i c k, H.N., D i n k i n s, D.R., S a n t a r e m, E.R., D i, R., S a m o y l o v, V., M e u r e r, C.A., W a l k e r, D.R., P a r o t t, W.A., F i n e r, J.J., C o l l i n s, G.B., *Recent advances in soybean transformation*, "Plant Tissue Cult. Biotechnol.", **3**, 1997, 9-26.
78. U l r i c h, B**.**, W i e s n e r, W., A r e n s, H., *Large-scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of* Coleus blumei *Benth.*, în N e u m a n n, K.H., B a r z, W., R e i n h a r d, E. (Eds.), *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, pp.293-303, Springer, Berlin, 1985.
79. U r a g a m i, A**.,** S a k a i, A., N a g a i, M., T a k a h a s h i, T., *Survival of cultured cells and somatic embryos of* Asparagus officinalis *cryopreserved by vitrification*, "Plant Cell Rep.", **8**, 1989, 418-421.
80. W i l d e, H.D., M e a g h e r, R.B., M e r k le, S.A., *Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants*, "Plant Physiol.", **98**, 1992, 114-120.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

ASPECTE ALE FLOREI ŞI VEGETAŢIEI ACTUALE ŞI POSTGLACIARE DIN MLAŞTINA PÂRÂUL ALB (JUDEŢUL HARGHITA)

ZOE BUZ*

SUMMARY. - Aspects of the Present and Postglacial Flora and Vegetation of the Pârâul Alb Marsh (Harghita County). The study comprises a general characterisation of the flora and vegetation of this area. The palynological analysis of this marsh is concerned with the latest *Fagus-Picea-Abies* phase of the Subatlantic age from the Quaternary.

Frumuseţea mlaştinilor de la Pârâul Alb, dublată de importanţa ştiinţifică, ca arhive ale istoriei vegetaţiei acestei regiuni, conservatoare de rarităţi floristice şi relicte glaciare, a determinat elaborarea prezentului studiu polenanalitic.

Poziţia geografică, solurile şi clima. Teritoriul cercetat face parte din platoul Praid-Dealu (Parajd-Oroszhegy), judeţul Harghita, cu un fundament geologic vulcanogen-sedimentar, situat în etajul montan al fagului, la 900-1050 m altitudine.

Reţeaua hidrografică, atât subterană cât şi supraterană, foarte bogată în resurse, circumscriind mari întinderi de teren foarte umede, prezintă condiţii excelente pentru formarea mlaştinilor: substratul, morfologia terenului şi clima regiunii. Izvoarele din nordul cumpenei se îndreaptă spre valea Corundului, iar cele din partea sud-estică a platoului sunt drenate spre valea Pârâului Alb.

Solurile, dezvoltate în strânsă legătură cu constituţia litologică, formele de relief, sub influenţa condiţiilor bioclimatice şi hidrologice, aparţin solurilor intrazonale, dintre care semnalăm solurile hidromorfe formate în condiţiile unui exces de umiditate, cu mult humus, din familia celor humico-gleice turboase eutrofe, întâlnite în lunci de-a lungul râurilor, unde nivelul apei freatice se află la adâncime mică (1-3 m), iar în perioade de maximă pluviozitate, apa musteşte la suprafaţă.

Climatul temperat-continental de tranziţie, între climatul oceanic din vestul Europei şi cel continental din estul continentului, în general, rece şi umed, caracterizează teritoriul cercetat, în dependenţă de poziţia geografică, elementele climatice principale şi manifestările lor. Clima răcoroasă cu precipitaţii abundente, cuplată cu diversitatea formelor de relief, a favorizat dezvoltarea unei bogate reţele hidrografice, alcătuită din numeroase izvoare (dintre care multe minerale), pâraie, lacuri şi mlaştini, pe cuprinsul cărora s-a dezvoltat o vegetaţie palustră eutrofă, mezotrofă şi oligotrofă.

* *Biblioteca Centrală Universitară "Lucian Blaga", 3400 Cluj-Napoca, România.*
E-mail: bcu@bcu.ubbcluj.ro

Mlaştinile eutrofe se alimentează din apa de infiltrație bogată totdeauna în substanțe minerale nutritive. Sunt cele mai vechi, de vârstă preboreală, înfiripate în Finiglaciar (Tardiglaciar), şi cele mai bogate în relicte glaciare. Majoritatea au evoluat spre oligotrofism, aflându-se în diferite stadii de trecere. Sedimentele minerale lacustre, de la baza tuturor mlaştinilor acoperite cu vegetație mezotrofă şi oligotrofă, atestă provenienţa lor din mlaştinile eutrofe finiglaciare [6].

Platoul adăposteşte 12 mlaştini, grupate în trei mari complexe: cel mlăştinos de la Fântâna Brazilor cu 6 mlaştini, complexele de la Sâncel şi Dealu cu câte 3 mlaştini fiecare. Majoritatea mlaştinilor de la Dealu sunt mezotrofe: Lacul Mare şi Lacul Mic, numai mlaştina Pârâul Alb este eutrofă. Deşi este mai mică, este mai bogată în relicte glaciare, rarități floristice, endemisme, iar analiza sa palinologică întregeşte tabloul sinoptic al evoluției silvestre postglaciare a platoului.

Considerații floristice şi fitosociologice. Mlaştinile cu rogozuri (Nyikó Fejé), singurele mlaştini eutrofe din regiune, situate spre sud de cumpăna apelor, la obârşia şi pe valea Pârâului Alb, umplând microdepresiunile terenului, cu foarte puțin sau fără *Sphagnum*, au fost semnalate de Nyárády [5] şi Pop [6] şi estimate la circa 20 ha, din care astăzi se mai păstrează 2 ha.

Flora şi vegetația actuală a acestora nu a fost studiată din cauza stratului de apă ce depăşeşte 50 cm. Puținele referințe botanice din regiunea studiată au fost sintetizate de Nyárády [5], iar spectrul palinologic al tinovului Ruț a fost publicat de Ciobanu [3].

Nyárády citează speciile: *Caltha palustris, Narcissus angustifolius, Lycopodium clavatum, Juncus* sp., *Polytrichum* sp., pe bordura microdepresiunilor umede *Picea excelsa, Veratrum album, Anemone nemorosa*, precum şi pâlcuri de *Juniperus* şi *Alnus glutinosa* pe dealul Calonda, iar la Dealu vegetează *Trollius europaeus, Ligularia sibirica, Calla palustris, Cypripedium calceolus* etc.

Florei mlaştinilor de la obârşia Pârâului Alb îi sunt valabile caracteristicile floristice ale platoului, în special de la Dealu, dominarea mezofitelor, micromezotermelor şi abundenţa speciilor acido-neutrofile. În spectrul bioformelor predomină hemicriptofitele, legat de pajişti şi stratul ierbos al pădurilor, iar spectrul floristic este dominat de elementele eurasiatice, europene şi circumpolare.

Pe un afluent al Pârâului Alb, la zona de confluenţă, se afla până nu de mult mlaştina denumită popular Weiss, care a fost desecată complet, la fel ca multe altele, rămânând doar malurile pârâului pe care vegetează încă *Iris sibirica* [2].

Mlaştinile de la Pârâul Alb, Sâncel-Dealu sunt păstrătoare a multe relicte glaciare şi boreale, ce au supraviețuit aici ca: *Stellaria longifolia, Carex appropinquata, Carex diandra, Carex dioica, Carex elongata, Calamagrostis canescens*, endemisme pancarpatice ca: *Silene dubia, Cardamine glanduligera, Symphytum cordatum, Centaurea melanocalathia, Aconitum moldavicum*, rarități floristice ca: *Orchis incarnata* etc. ce amplifică importanța biogeografică a florei acestei regiuni [1,2].

Pentru unele specii cu extindere sporadică în țară, ca *Silene dubia, Telekia speciosa*, au fost identificate noi localități, în zonele limitrofe teritoriului cercetat, stâncării, păduri, văi.

Aspectul general şi distribuţia spaţială a vegetaţiei actuale pe teritoriul cercetat sunt rezultatul conlucrării factorilor istorici-oro-ecologici, zoo-antropici şi alţii din regiune, care au determinat subetajarea şi structura vegetaţiei actuale, încadrată în etajul montan al pădurilor de foioase cu frunze căzătoare.

Majoritatea fitocenozelor palustre sunt mezotrofe, aflate în stadiul de tranziţie de la tipul eutrof spre cel oligotrof. Pe cuprinsul fitocenozelor de *Juncus* vegetează specii de *Carex* şi *Scirpus* [1,2].

Trestiişurile (*Scirpo-Phragmitetum*) şi o parte dintre rogozişuri (*Caricetum appropinquatae*) din categoria vegetaţiei eutrofe, alcătuind formaţiuni palustre ca asociaţia *Sphagno-Caricetum rostratae* unde *Potentilla palustris* edifică faciesul – *potentillosum palustris*, şi altele, ale căror fitocenoze analizate de pe cuprinsul Lacului Mare-Dealu, sunt întâlnite şi la Pârâul Alb-Dealu [1,2].

Vegetaţia actuală a teritoriului învecinat mlaştinii este alcătuită din formaţiuni silvestre în care predomină asociaţiile: *Festuco drymeiae-Fagetum silvaticae, Pulmonario rubro-Abieti-Fagetum* etc., praticole ca: *Junco-Molinietum coeruleae*, în care abundenţa narciselor edifică faciesul –*narcissetosum*, a rogozului negru faciesul – *caricetosum nigrae* etc. şi ruderale ca *Junco-Menthetum longifoliae* etc. [1,2].

Vegetaţia cuaternară. Cuaternarul platoului Praid-Dealu este încă lacunar cunoscut, cu excepţia analizei tinovului Ruţ de la Fântâna Brazilor, efectuată de Ciobanu [3].

Din cauza stratului de apă al microdepresiunilor de la obârşia Pârâului Alb, profilul de 100 cm a fost ridicat de pe unul din malurile sale. Turba cu o suprafaţă de 2 ha, aflată pe un substrat de argile gri-verzui, sărace în polen, atinge 0,5 m adâncime, având un stoc de aproximativ 5.000 m^3.

Probele, luate cu ajutorul sondei Hiller pe verticală, la intervale echidistante din 5 în 5 cm au fost prelucrate şi analizate palinologic. Interpretarea spectrelor polenice succesive pe întreaga adâncime a profilului a permis reconstituirea evoluţiei singenetice a vegetaţiei în perspectiva unei continuităţi şi corelarea cu vegetaţia precuaternară şi actuală [1,2].

În urma analizelor polenice efectuate s-a constatat că numai stratul superficial (45 cm) a captat şi conservat polenul fitocenozelor limitrofe. Analiza palinologică evidenţiază caracterul relativ tânăr al mlaştinii, zăcământul turbos începând să se sedimenteze la începutul fazei fagului din Subatlantic, probabil după maximul arinului (Fig. 1).

Mlaştina de turbă fiind situată între satul Sâncel (Szenced) şi comuna Dealu, mai aproape de prima localitate, a conservat polenul ecosistemelor silvestre din ultima fază silvestră, cea a fagului, asemănător mlaştinilor de la Sâncel.

Faza fagului, molidului şi bradului (*Fagus-Picea-Abies*) este bine surprinsă de-a lungul celor 10 spectre polenice ale zăcământului turbos gros de 45 cm.

Spectrul polenic al orizontului 45 cm este dominat de polenul arinului, care atinge 40%, în timp ce polenul fagului nu se ridică decât la 17,3% şi al molidului la 8%, iar al stejărişului mixt la 12%.

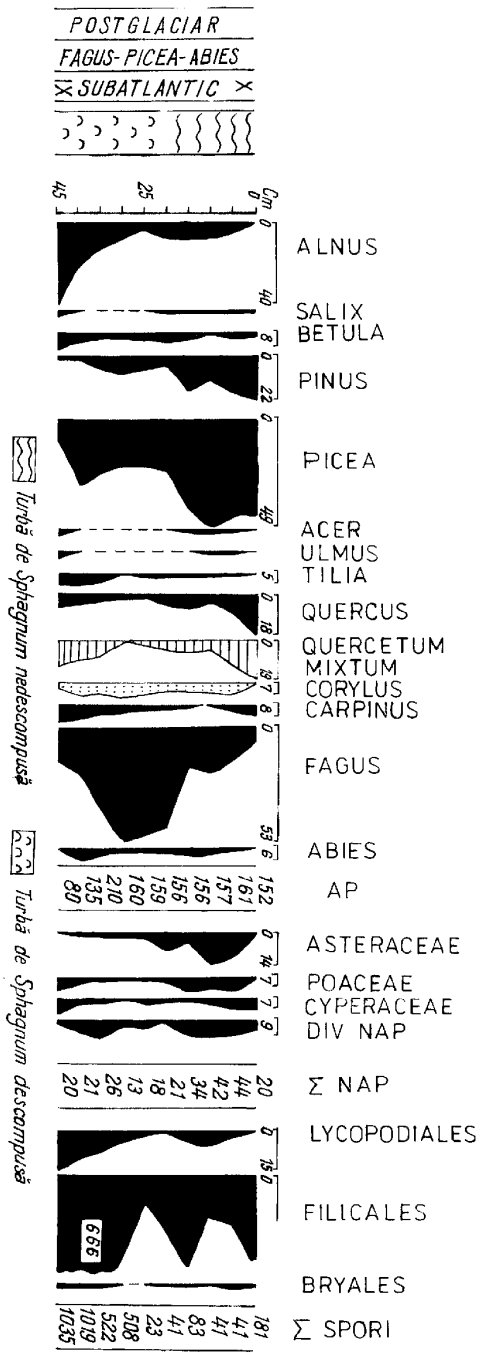


Fig. 1. *Spectrul polenic al mlaştinii Pârâul Alb.*

Ca şi la Sâncel, credem că, în cazul dat, apare o supraprezentare a polenului de arin, care eclipsează parţial polenul făgetelor şi al molidişelor. Ideea ne este confirmată şi de participarea sporo-polenică a diverselor specii de *Salix*, al căror polen atinge ±3%, precum şi polenul de *Betula* cu cele 8% ale sale [1,2].

Prezenţa polenului de *Carpinus* (8%), precum şi a celui de *Quercus* (5%) poate să reflecte existenţa unor cverceto-cărpinete în zonă, pe timpul sedimentării orizontului 45 cm.

Spre suprafaţă (nivelele 40-20 cm), spectrele polenice sunt dominate de polenul făgetelor, ale căror valori oscilează între 40-52%, în timp ce polenul molidişelor rămâne staţionar în jurul valorii ±22%.

Considerăm că s-a surprins al doilea maxim al făgetelor, instalat acum circa 1.000 de ani. În perioada acestor făgete recente, este prezent şi polenul celorlalte etaje silvestre (în special al stejărişelor mixte), însă valorile procentuale ale acestora rămân moderate, fapt ce indică distanţa mare de mlaştina analizată.

Spectrele polenice ale sedimentelor superficiale (15-0 cm) se îmbogăţesc mult cu polenul molidişelor, care atinge valori de 40-48%, în timp ce polenul făgetelor scade cantitativ de la 18 la 5,3%, ca efect al plantaţiilor recente de la Dealu. Simultaan cu regresul cantitativ al polenului de fag, începe să se afirme şi polenul pinului, care la suprafaţă atinge 22%.

Fenomenul este surprins în toate mlaştinile studiate de pe platou şi el poate avea şi un caracter antropic, pădurile de fag fiind exploatate, în locul lor făcându-se reîmpădurirea cu molid şi pin [1,2].

Exploatarea făgetelor pare să fie confirmată şi de afirmarea sporo-polenică a cvercetelor mixte care la suprafaţă înscriu chiar 18%.

Nu putem încheia aceste sumare date privind specificul fitoistoric al acestor fitocenoze subatlantice fără să nu amintim şi prezenţa polenului de brad, este drept cu valori modeste 1,3-5,6%, aşa cum a fost surprins şi în alte mlaştini de pe platou [1,2].

Plantele ierboase din familiile *Poaceae, Cyperaceae, Asteraceae* etc. au fost şi ele surprinse sporo-polenic, în toate spectrele obţinute, dar cu valori relativ mici în comparaţie cu polenul ecosistemelor silvestre, fapt ce ne determină să credem că suprafaţa pajiştilor şi a culturilor agricole (mai ales de secară şi cartof) a fost şi este şi astăzi mică.

Prezenţa sporilor de *Filicales* cu valori procentuale foarte mari (±650%), asemănătoare cu cele din mlaştinile de la Sâncel, atestă fenomenul relativ tânăr de înfiripare a mlaştinii Pârâul Alb.

Remarcăm constatarea deplinei concordanţe între valorile spectrului polenic şi compoziţia calitativă şi cantitativă a vegetaţiei din jurul staţiunilor de sedimentare împădurite. Datorită efectului filtrant al filosferei, în corelaţie directă cu gradul de închegare al pădurilor, nu se constată prezenţa polenului străin propagat de la mari depărtări, decât în mod excepţional.

În stațiunile de sedimentare Sâncel şi Dealu, fiind neîmpădurite, dispare efectul filtrant odată cu deschiderea pădurii, polenul antrenat de curenții ascendenți din etajele inferioare putând apare în spectrele tardiglaciare, în special ca polen alohton prin resedimentare, dar nu afectează spectrele polenice obținute din mlaştina Pârâul Alb, foarte tânără, de vârstă subatlantică [1,2].

Evoluția vegetației silvestre din Subatlantic, aşa cum este relevată de turba mlaştinii Pârâul Alb, se înscrie în tabloul sinoptic al evoluției vegetației postglaciare de pe platoul studiat. Comparativ cu analizele sporo-polenice ale altor mlaştini din Carpații Orientali, se regăsesc aceleaşi genuri, în aceeaşi ordine de desfăşurare, deosebirea constând în apariția mai timpurie a tuturor fazelor silvestre, asemenea celor din Carpații Sud-Estici [4].

Rezumând reconstituirea vegetației cuaternare din mlaştina Pârâul Alb, putem afirma că această mlaştină se încadrează în faza fag-molid-brad (*Fagus-Picea-Abies*) derulată în Subatlantic, având ca particularități slaba participare a bradului, specifică Carpaților Orientali de Nord şi exuberanța locală a arinişelor (*Alnus*) prefigurate din Atlantic, aşa cum reiese şi din celelalte mlaştini analizate din platou [1,2].

Lista plantelor de un deosebit interes ştiințific şi biogeografic din mlaştina Pârâul Alb şi împrejurimile sale constituie un argument pentru luarea unor măsuri de protecție, privind activitatea antropică de defrişare şi desecare pentru obținerea de terenuri agricole, prin punerea sub ocrotire a mlaştinilor cu poieni de narcise şi *Iris sibirica* de pe flancurile Pârâului Alb de la Dealu.

BIBLIOGRAFIE

1. Buz, Z., *Cercetări palinologice în depozite precuaternare şi cuaternare în regiunea Sovata-Praid-Dealu*, Teză Dr., Univ. "Babeş-Bolyai", Cluj-Napoca, 1987.
2. Buz, Z.,*Cercetări fitosociologice şi palinologice în zona Sovata-Praid-Dealu*, Casa Cărții de Ştiință, Cluj-Napoca, 1999.
3. Ciobanu, I., *Analiza polenică a turbei mlaştinii Ruț din Munții Harghita*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1960, 231-238.
4. Diaconeasa, B., *Analize sporo-polenice în etajele alpin şi subalpin ale Carpaților Sud-Estici*, în *Progrese în palinologia românească*, p. 205-210, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1971.
5. Nyárády, E.Gy., *A vizek és vízben bővelkedő talajok növényzetéről a Hargitában*, în *Emlékkönyv a Székely Nemzeti Múzeum 50 éves jubileumára*, p. 579-615, Cluj, 1929.
6. Pop, E., *Mlaştinile de turbă din R.P.R.*, Ed. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1960.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

ASPECTE ALE VEGETAŢIEI PRECUATERNARE DE LA PRAID (JUDEŢUL HARGHITA) ŞI SOVATA (JUDEŢUL MUREŞ)

ZOE BUZ*

SUMMARY. - Aspects of the Prequaternary Vegetation in Praid (Harghita County) and Sovata (Mureş County). The study of the Prequaternary vegetation is based on the results of the palynological analysis of the Upper Badenian-Lower Sarmatian deposits and indicates a climatic continentalisation for this interval.

În platoul vulcanic Sovata-Praid-Dealu (Szováta-Parajd-Oroszhegy), vegetaţia neogenă a rămas aproape necercetată, exceptând referirile lui Balteş [1] care, privind aria avanfosei carpatice, a distins două etape de formare a sării precarpatice: Burdigalianul şi Badenianul superior, remarcând "perfecta identitate a acestor asociaţii cu cele extrase din Transilvania (Sovata, Ocna de Sus)" şi referirile lui Roman [6] care a descris o microfloră cu *Azolla*, din bazinul cu apă dulce de la Sovata-gară.

Pe acest considerent, întrucât nu mai existau alte cercetări de vegetaţie precuaternară în zonă, s-a efectuat prezentul studiu.

Metode de lucru. La baza investigaţiilor efectuate în platoul Sovata-Praid-Dealu a stat metoda polenanalitică, prezentată detaliat în [2].

Materialul precuaternar, colectat în 1982, provine din salina Praid, judeţul Harghita (8 probe de sare) şi din carotele sondei de prospecţiuni Sărăţeni-Sovata, judeţul Mureş (12 probe) [5].

Au fost prelucrate palinologic toate cele 20 de probe, dar numai 13 au conţinut polen şi au fost citite şi interpretate. Exprimând procentual granulele de polen care aparţin la diferite unităţi taxonomice s-a stabilit spectrul polenic pentru fiecare orizont. Aceste spectre polenice oferă o imagine apropiată de realitatea compoziţiei medii a ploilor de polen din momentul sedimentării.

Interpretarea spectrelor polenice succesive pe întreaga adâncime a profilelor şi reconstituirea evoluţiei singenetice a vegetaţiei în perspectiva unei continuităţi, s-a realizat pe baza indicaţiilor oferite în [4].

* *Biblioteca Centrală Universitară "Lucian Blaga", 3400 Cluj-Napoca, România.*
E-mail: bcu@bcu.ubbcluj.ro

Datorită gradului relativ slab de conservare a polenului, prezenței a trei hiatusuri polenice, cât şi numărului ridicat al remanierilor din sedimente mai vechi, în special din Terțiarul vechi (Paleogen), dar şi din Cretacic (Mezozoic), aceste rezultate, din punct de vedere cantitativ, nefiind reprezentative pentru perioadele geologice în care presupunem că s-au depus respectivele grăuncioare de polen şi spori, s-a utilizat evidențierea procentuală a prezenței grăuncioarelor de polen, prin termeni relativi: sporadic < 5%, frecvent între 5-15%, foarte frecvent > 15%, unii taxoni neîncadrându-se nici în acest procentaj.

Fenomenul spălării versanților de către torenți şi, implicit, al aducerii în strate mai noi a materialului mai vechi, specific bazinelor neogene, este prezent şi aici, pe platou fiind caracteristic atât cuvetelor lacustre (Lacul Ursu), cât şi microdepresiunilor în pantă, în care s-au stocat zăcămintele organo-minerale. Cu toate acestea, ilustrația redă secvențe din istoria vegetației badeniene, sarmațiene şi pliocene (neogene) din regiunea cercetată [2].

Rezultate. Cu toată imperfecțiunea rezultatelor, pentru orientare cât şi pentru posibilitatea corelării datelor cu vegetația cuaternară şi actuală studiată, redăm procentajele sporo-polenice obținute din orizonturile analizate, valoarea lor calitativă nefiind influențată de aspectul cantitativ incert [3].

Reflectarea florei precuaternare în spectrele palinologice (Fig. 1).

1. Analiza sporo-polinică a sedimentelor saline de la Praid. Cele patru probe de sare de la Praid, care conțin polen, par să ilustreze o vegetație mixtă termofilă şi temperată (paleotropicală şi arctoterțiară), care a convieţuit la începutul perioadei Neogene în epoca Miocenă, etajul Badenian inferior.

Flora Badenianului inferior a uscăturilor învecinate locului de sedimentare, aşa cum reiese din proba 2 bine conservată în sare, era dominată de gimnosperme, dintre care se remarcă *Pinus haploxylon, Tsuga, Pinus dyploxylon, Taxodiaceae.* Mai erau prezente, dar rar, *Cedrus, Keteleeria, Sequoia*, specii care indică existența unui climat umed şi cald.

Angiospermele erau prezente şi destul de evoluate. Participarea lor în florele terțiare era mult mai mare decât o exprimă procentajul înregistrat, dat fiind polenul lor mai mult entomofil, produs în cantități mai mici în comparație cu cel de gimnosperme, cât şi capacității mai reduse de conservare în sedimente. Dintre ele se detaşează uşor polenul cvercineelor exotice. Şi între angiosperme figurează genuri fosile termofile: *Engelhardtia, Carya, Pterocarya, Zelkova, Arecaceae.*

În ecosistemele silvestre badeniene erau prezente *Ericaceae*-le, probabil în stratul arbustiv, iar în cele palustre din jurul litoralului marin era prezentă *Typha*. Existența unor asociații praticole este atestată depolenul NAP, în care intră cel de fabacee, poacee, dipsacacee, chenopodiacee. Probabil, unele dintre fabacee erau de tip arborescent.

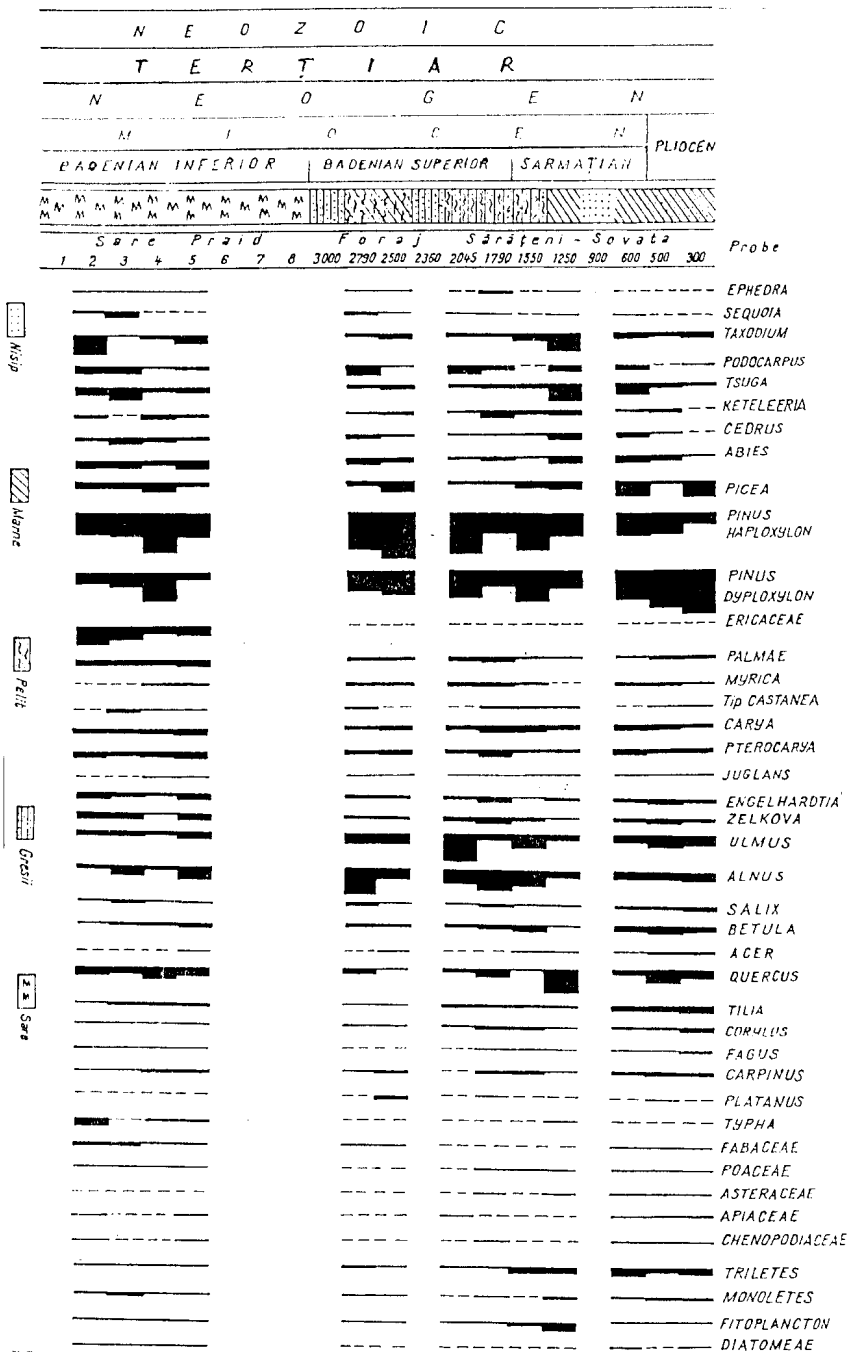


Fig. 1. *Spectrul polinic al vegetației precuaternare de la Praid şi Sovata.*
(-= sporadic<5%, --= frecvent între 5-15%, ---= foarte frecvent>15%).

Sedimentele saline ale probei 3 nu au conservat prea bine grăuncioarele de spori şi polen. De asemenea, şi numărul lor este redus în comparaţie cu cel din proba anterioară. Flora şi vegetaţia, contemporană depunerii lor, pare să fi beneficiat de o climă puţin mai caldă şi mai uscată, indicată de frecvenţa uşor ridicată a polenului de *Tsuga*, ca şi de apariţia sporadică a polenului de *Ephedra*. Printre angiosperme remarcăm apariţia polenului mic de tip *Castanea* - identificat pe platou şi în postglaciar în *Quercetum mixtum* din tinovul Ruţ profilul 1, precum şi frecvenţa polenului de *Alnus* [2].

Microsporii conservaţi în sedimentele saline ale probei 4 oglindesc un complex ecologic înfiripat într-o oscilaţie climatică puţin mai rece şi umedă, exprimată de procentajul uşor crescut al gimnospermelor, dintre care supremaţia o deţin speciile *Pinus haploxylon* urmat de *Pinus dyploxylon* urmat de *Pinus dyploxylon* şi *Picea*. Remarcăm prezenţa printre angiosperme a genurilor *Myrica* şi *Juglans.*

Analiza polenică a probei 5 de sare înfăţişează un episod floristic în care gimnospermele au regresat uşor în favoarea angiospermelor, mai frecvente fiind genurile *Alnus* şi *Quercus*, ceea ce atestă o nouă oscilaţie climatică mai cladă şi mai umedă. Printre angiosperme apare polenul de *Acer*.

2. Analiza sporo-polinică a sedimentelor saline de la Sărăţeni-Sovata. Cele 12 probe obţinute din carotele forajului Sărăţeni-Sovata se încadrează în limitele geologice întâlnite pe parcursul forării şi stabilite pe bază de microfaună: Pliocen/Sarmaţian (180-900 m), Sarmaţian/Badenian superior (900-1.790 m), Badenian superior/Badenian inferior (1.800-2.790 m).

În continuare probele provin de la gaz-carotajul efectuat pe intervalul rămas până la sare (2.800-3.000 m). Sonda de prospecţiuni Sărăţeni-Sovata a deschis, în cadrul adâncimii realizate (3.000 m), sedimente aparţinând Pliocenului şi Miocenului, începând cu Badenianul superior [5].

Badenianul superior, deschis parţial (circa 100 m grosime) pe intervalul 2.088-3.000 m, începe cu o formaţiune gazoasă, nisipoasă. Astfel, acest interval este reprezentat preponderent prin gresii cenuşii deschise, slab cimentate. Subordonat, apar intercalaţii de marne cenuşii compacte. De la adâncimea de 2.300 m în jos, Badenianul este preponderent pelitic fiind reprezentat prin marne cenuşii compacte cu rare intercalaţii de gresii cenuşii destul de dure, mai abundente pe intervalul 2.600-2.800 m.

Analiza probei obţinută din carota extrasă de la adâncimea de 2.790 m relatează despre o asociaţie vegetală, existentă în regiunea cercetată în timpul Badenianului superior, care se caracterizează, de asemenea, prin predominarea gimnospermelor, raportul *Pinus haploxylon/Pinus dyploxylon* continuă să dăinuie, deşi se remarcă o uşoară creştere a frecvenţei celui din urmă. Probabil, răcirea climatului a continuat şi, odată cu aceasta, şi evoluţia ecosistemelor silvestre a fost direcţionată în acest sens. O dovadă o constituie şi prezenţa polenului de *Myrica*, tot mai frecvent în spectre. Dintre gimnosperme, podocarpaceele devin mai frecvente,

iar taxodiaceele au regresat. În cadrul polenului de angiosperme, participarea frecventă a polenului de *Alnus* şi *Ulmus*, având în vedere ecologia genurilor, indică o perioadă mai puțin caldă şi mai umedă decât precedenta.

Asociația microfloristică, rezultată din analiza probei de la 2.500 m, apare dominată net de pinacee. Participarea angiospermelor se caracterizează prin frecvența uşor ridicată a ulmaceelor şi betulaceelor, cu tot regresul evident al genului *Almus*. Restul foioaselor terțiare continuă să participe sporadic în spectre. Apare polenul de *Platanus*.

Secvența microfloristică, rezultată de la adâncimea 2.045 m, înfățişează un moment al participării foarte frecvente în spectre a polenului de *Pinus dyploxylon*. Alături de pinacee se mențin frecvente şi podocarpaceele. Dintre angiosperme, genul *Ulmus* devine şi el foarte frecvent, în defavoarea genului *Alnus*, ceea ce evocă o încălzire a climatului.

Buglovianul (circa 500 m grosime, 1.500-2.000 m) preponderent pelitic, cu câteva intercalații subțiri de gresii compacte dure, considerat până nu demult ca etaj de sine stătător, este reconsiderat fie ca sfârşitul Badenianului, fie ca baza Sarmațianului. În consecință, spectrele obținute din probele extrase de la adâncimile de 1.790 şi 1.550 m le repartizăm, primul Badenianului superior şi ultimul Sarmațianului inferior.

În spectrul 1.790 m, pinaceele scad ca frecvență polenică în favoarea angiospermelor, dintre care se remarcă betulaceele, din nou prin genul *Alnus*, fagaceele prin cvercinee şi juglandaceele prin *Pterocarya*.

Din spectrul 1.550 m al Sarmațianului inferior rezultă o revenire la dominație a pinaceelor, cu menținerea participării frecvente a polenului de *Alnus*, alături de care se ridică procentual şi polenul de *Ulmus*.

Sarmațianul, deschis pe aproximativ 1.000 m grosime (600-1.550 m), apare într-un facies preponderent nisipos, fiind alcătuit din bancuri puternice de nisipuri separate prin intercalații mai subțiri de marne. Proba extrasă de la 1.250 m adâncime redă un spectru floristic cu participarea mai puțin frecventă a gimnospermelor şi cu menținerea unei frecvențe polenice, aproximativ egale, a celor două tipuri de *Pinus haploxylon* şi *Pinus dyploxylon*, alături de care se remarcă taxodiaceele. Dintre angiosperme o frecvență mai deosebită înregistrează doar polenul cvercineelor exotice.

Spectrul floristic aparținând probei extrase de la 600 m adâncime nu se deosebeşte mult de precedentul, decât prin regresul genului *Taxodium*. Alături de genurile *Pinus*, dintre care tipul *dyploxylon* începe să depăşească procentual tipul *haploxylon*, apare mai frecvent *Picea*. Angiospermele se caracterizează printr-o participare modestă a tuturor genurilor miocene.

Pliocenul (circa 200 m grosime, 300-500 m), din punct de vedere litologic, este, în general, marno-nisipos. Este ilustrat de spectrele obținute de la 500 şi 300 m adâncime. Microfloristic, apare dominat de polenul pinului *dyploxylon*, alături de *Pinus haploxylon* frecvent încă. Sporadic, mai apar *Tsuga*, *Taxodium*, *Abies*,

Picea. În aceste spectre se remarcă *Quercus, Ulmus* şi *Alnus*. Sporadic sunt prezente toate genurile termofile exotice. Presupunem că exista o oarecare etajare a vegetației pe verticală, a cărei schițare pare să fi început chiar în Sarmațian.

Considerăm asociația floristică conservată în timpul depunerii sării de la Praid, ca aparținând Badenianului inferior. Ea oglindeşte un complex heterogen, în care predomină speciile *Pinus haploxylon* şi mai puțin *Pinus dyploxylon*. Taxodiaceele sunt elementele termofile omniprezente în spațiu şi timp, indicând existența unor mlaştini silvestre pe acest teritoriu.

În Badenianul superior, evidențiat din carotele forajului Sărățeni-Sovata, aspectul covorului vegetal a început să se schimbe ținând seama de pulsația ulmaceelor. Zvâcnirea anterioară a betulaceelor, prin genul *Alnus*, o considerăm un element edafic fără prea mare semnificație fitoistorică. A existat probabil o vegetație azonată, mixtă, ce trădează un paleoclimat cu vădit caracter anaterm, cu precipitații de tip subtropical, la care se observă, însă, o uşoară tendință de înăsprire. Menționăm creşterea frecvenței speciei *Pinus dyploxylon*.

Rezultatele analizelor palinologice arată că în Sarmațian vegetația se deosebea doar cantitativ de cea badeniană. Se pare că din vegetația nezonată a celor două etaje geologice amintite s-a schițat vegetația zonală sarmațiană, ca efect al înăspririi climatului.

În timpul Pliocenului, paralel cu mişcările pe verticală care au afectat regiunea cercetată, s-a accentuat răcirea climatului, ceea ce explică abundența foioaselor arctoterțiare şi a polenului de *Myrica*, cu subordonarea procentuală a elementelor termofile, atât dintre gimnosperme cât şi dintre angiosperme. Astfel, Pliocenul apare ca o anticipare a glaciațiunii cuaternare, care avea să zdruncine şi să înlăture vegetația terțiară, făcând posibilă apariția vegetației cuaternare de tip pleistocen şi holocen.

Concluziile de ordin paleoclimatic şi fitoistoric, care reies din analiza vegetației neogene de pe teritoriul cercetat, coincid cu datele paleoclimatice desprinse de geologii Institutului de Gaz Metan, Mureş, din analiza paleoecologică a microfaunei fosile [5].

Pe parcursul Neogenului, în regiunea cercetată s-au derulat o serie de ecosisteme vegetale, formate din conifere şi foioase cu unele genuri termofile. Pe parcursul evoluției sale, elementele termofile subtropicale, deşi prezente permanent în spectre, înregistrează un regres, fiind tot mai mult subordonate elementelor temperate, în dependență de evoluția oceanică a climatului. Fracțiunea cea mai însemnată a spectrelor o constitue polenul de pinacee, tipul *dyploxylon*, înlocuind treptat tipul *haploxylon*. Angiospermele erau dominate, alternativ, de polenul betulaceelor prin genul *Alnus*, ulmaceelor şi de polenul cvercoid al fagaceelor.

BIBLIOGRAFIE

1. Balteş, N., *Aplicarea palinologiei în studiul depozitelor salifere din avanfosa carpatică*, "Mine, Petrol, Gaze", **28** (9), 1977, 405-409.
2. Buz, Z., *Cercetări palinologice în depozite precuaternare şi cuaternare în regiunea Sovata-Praid-Dealu*, Teză Dr., Univ. "Babeş-Bolyai", Cluj-Napoca, 1987.
3. Buz, Z., *Cercetări fitosociologice şi palinologice în zona Sovata-Praid-Dealu*, Casa Cărţii de Ştiinţă, Cluj-Napoca, 1999.
4. Dragastan, O., Petrescu, I., Olaru, L., *Palinologie cu aplicații în geologie*, Ed. Did. şi Pedag., Bucureşti, 1980.
5. Institutul de Gaz Metan, Mureş, *Sonda de prospecțiuni Sărățeni-Sovata. Raport geologic*, 1972.
6. Roman, Ş., *Asupra prezenței genului* Azolla *in paleoflora României*, în *Progrese în palinologia românească*, p. 175-180, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1971.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

A NEW SPECIES OF TERRESTRIAL ISOPODS: *TRACHELIPUS RADUI* N.SP. (CRUSTACEA, ISOPODA)

NICOLAE TOMESCU[*] and LIUBOMIRA OLARIU[**]

SUMMARY. - This paper describes a species that is new for science, *Trachelipus radui*, which has been collected in the Northern Oriental Carpathians. The specific characters are the shape of pereiopod VII carpopodite and of pleopod I exopodite in males.

In the fauna of our country there are mentioned 14 species and 4 subspecies that belong to the genus *Trachelipus* [1]. Radu [2] also mentions a number of 4 species and 2 subspecies whose presence in the Romanian fauna is uncertain.

Although these are relatively large species (8-17 mm), their identification is difficult due to the relatively uniform morphological aspect. The identification of the species is conducted based on secondary sexual characters in males: the shape of pereiopod VII carpopodites, the shape of exopodites and endopodites (gonopods) of pleopod 1, the shape of the cephalic lobes, the disposition of the glandular pore fields from the thoracic region epimera, the shape of the pleotelson.

In order to identify the species, it is mandatory to completely analyse all the characters that have taxonomic value. In taxonomic studies, it is also necessary to know the morphological modifications of these characters during postembryonic development of each species, since their definitive shape appears gradually [5].

Material and methods. The biological material (8 adult males and 7 females) has been collected from a spruce forest located in the Northern part of the Oriental Carpathian Mountains, at an altitude of 900 m. In this forest there are areas with high humidity with alder trees. The individuals from the described species of isopods have been collected from such a location. The animals have been collected using pitfall traps and tweezers.

Four of the males have been dissected in order to obtain permanent slides using Canada balm, from body parts and organs (head, pleotelson, antennae, pereiopod VII and pleopods 1). The slides have been studied using a microscope, and we have made drawings (Fig. 1). The male that was described is 8.5 mm long and 4.5 mm broad. The holotype and paratypes are kept in the Zoological Museum of the Babeş-Bolyai University in Cluj-Napoca.

[*] *Babeş-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj-Napoca, Romania.*
E-mail: *ntomescu@hasdeu.ubbcluj.ro*
[**] *Museum of Natural Sciences, 5975 Vatra Dornei, Romania*

The bibliographic sources that were used include synthetic papers on Isopod fauna in Romania and Europe. [2 - 4, 6].

Description of species

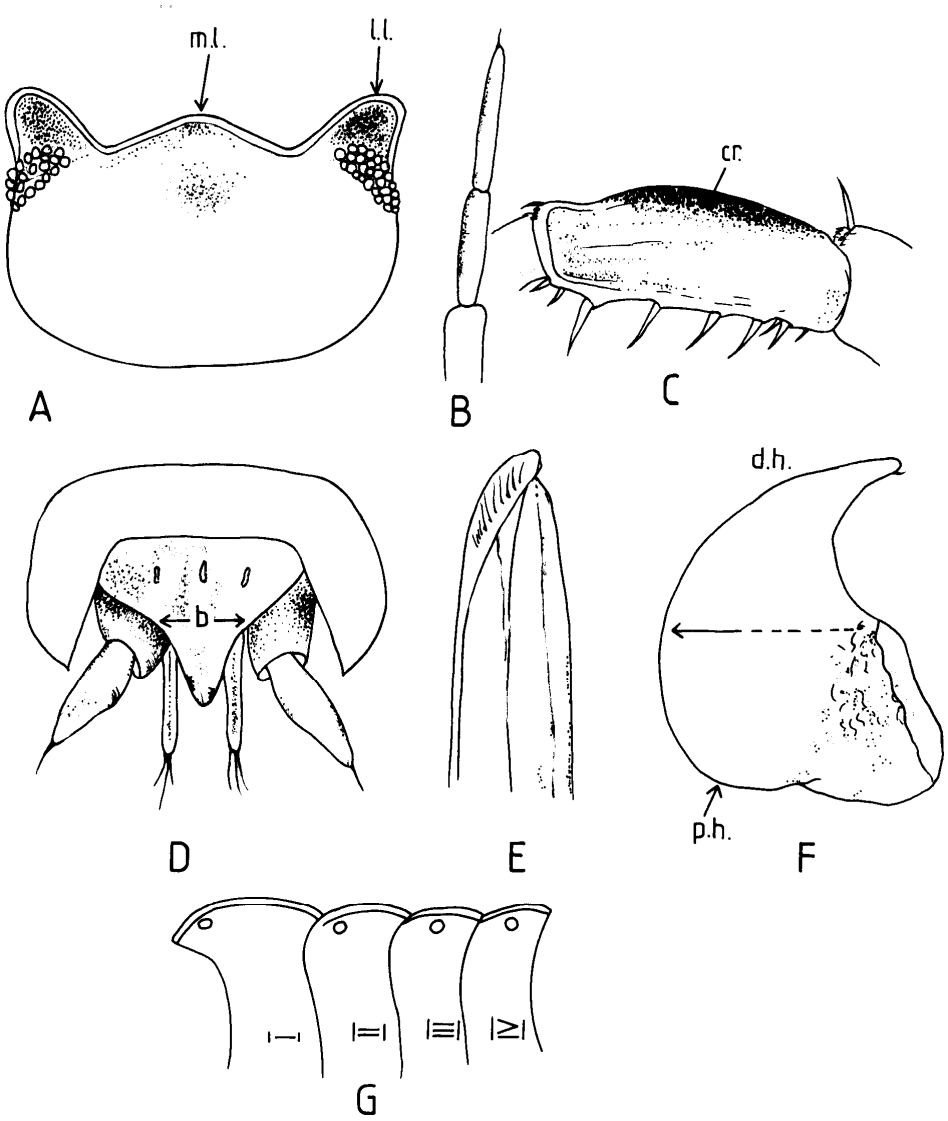
Dimensions: The males that were collected were 8-11 mm long and 4-5.5 mm broad.

Colour: The tergites are dark brown. The base of the epimera displays yellow-orange spots that form longitudinal bands. Some individuals also present spots on the posterior extremity of the epimera.

Somatic characters: The **cephalon** has the lateral lobes very well developed, of approximately triangular shape, inclined laterally, having the distal extremity rounded and narrower than their basis. The median lobe is less developed, its sides form an obtuse angle (Fig. 1 – A).
Tergites I – IV have the posterior margin slightly excavated. The glandular pore fields have a circular shape, and are very close to the lateral margin of the epimera (Fig. 1 – G), in some individuals being very close to the edge.
The **pleotelson** is short, the distal half has a large basis and an acute apex (Fig. 1 – D).

Appendages: The **antennae** have the penultimate article shorter than the last one (Fig. 1 – B), the length ratio between them being 0.8:1.
Pereiopods VII in males have the carpopodites provided with a narrow crest, like a blade, which covers 80% of the length of the carpopodite (Fig. 1 – C).
Pleopods 1 exopodites in males have the distal half much narrower compared to the proximal half (Fig. 1 – F). The extremity of endopodites 1 (gonopods) bears a row of hairs that have their extremity shorter than the edges of the seminal duct. The secondary sexual characters that distinguish the described species from the species that are already known are pereiopods VII crest and the shape of pleopods 1 exopodites, characters that differentiate most of the species of genus *Trachelipus*. *Trachelipus radui* n.sp. has the crest of the carpopodite similar to that of *Trachelipus pseudoratzeburgi*, but other characters are different.

Ecology. The population from which the described individuals have been collected lives in a very damp habitat, with rich herbaceous vegetation and also wooden vegetation composed of alder trees. During daytime, the animals stay hidden underneath the rocks.



F i g. 1. *Trachelipus radui* n.sp.
A - Cephalic lobes. B - Extremity of the antenna. C - Pereiopod VII carpopodite in males. D – Pleotelson. E - Extremity of pleopod 1 endopodite in males. F - Pleopod 1 exopodite in males. G - Epimeral glandular pore fields. b - Basis of distal half of pleotelson. cr – Crest. l.l. - Lateral lobe. m.l. - Median lobe. d.h.- Distal half. p.h.- Proximal half.

R E F E R E N C E S

1. R a d u, V., *Genul* Trachelipus *în fauna R.P.R.*, "Comun.Acad.R.P.R.", **8** (1), 1958, 53-59.
2. R a d u, V., *Fauna R.P.R.*, Crustacea, **4** (14), Ed. Acad. Rom., Bucureşti, 1985.
3. S c h m i d t, C., *Revision of the European species of the genus* Trachelipus *Budle-Lund, 1908* (Crustacea: Isopoda: Oniscidea), "Zool.J.Linn.Soc.", **121**, 1997, 129-144.
4. S c h m ö l z e r, K., *Ordnung* Isopoda, in *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, **4-5**, pp. 1-468, Verlag Akad., Berlin, 1965.
5. T o m e s c u, N., *Cercetări morfologice, biologice şi ecologice la izopodele terestre*, Teză Dr., Univ. "Babeş-Bolyai", Cluj-Napoca, pp. 1-224, 1974.
6. W ä c h t l e r, W., Isopoda, in *Die Tierwelt Mitteleuropas*, pp. 225-317, Verlag von Quelle und Meyer Akad., Leipzig, 1937.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

PRELIMINARY STUDIES ON THE CICADA POPULATIONS (INSECTA, HOMOPTERA, AUCHENORRHYNCHA, CICADELLIDAE AND CERCOPIDAE) IN THE MUNTELE MARE AREA AND THE SCĂRIȚA-BELIOARA NATURE RESERVE

VALENTIN POPA*

SUMMARY. - The studied area is located in the north-eastern part of the Apuseni Mountains. For faunistical and ecological studies we have chosen five types of ecosystems: spruce and pine forests, meadow, pasture and oligotrophic swampland. Our studies revealed that the most abundant cicada populations occurred in meadows and subalpine pastures. A small number of cicada species live in pine forest and oligotrophic swampland. All these ecosystems are dominated by two species: *Verdanus abdominalis* and *Diplocolenus bohemani* which form here abundant communities. The preliminary studies allow us to conclude that in this area the cicada fauna is very scarce.

Muntele Mare is located in the West Carpathians, in the north-eastern part of the Apuseni Mountains. Both the Bihor and the Vlădeasa Mountains form the orographic axis of the Apuseni Mountains. The highest peak is Muntele Mare, with an altitude of 1826 m.

The geological substratum presents a great lithologic and structural complexity. The substructure of this massif is made up of old prebaikalian and baikalian metamorphic rocks.

The climate of the area is mountainous. The average of annual rainfall is low (1000 mm). The average of multiannual temperature is 4.7^0C.

The vegetation presents an obvious vertical distribution. Starting from the bottom there are, successively, oak, beech, mixed, pine, spruce forests and subalpine meadows. From biogeographical point of view, the studied area belongs to the spruce layer. Besides the spruce, there also are other tree species, such as *Betula* sp., *Alnus incana*, *Salix caprea* and *Acer platanoides*. The herbaceous vegetation is specific to alpine meadows: *Vaccinium myrtillus*, *Crataegus monogyna* mixed with monocotyledonous and dicotyledonous plants.

In the biological literature in our country there are few data regarding the cicada fauna in this area, but there are more data about this subject in other areas of the Carpathian Mountains [1-3].

The biological material has been sampled in stations with varied ecosystems.

**Babeş-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj-Napoca, Romania.*
E-mail: *valentin@hasdeu.ubbcluj.ro*

These stations are:

1. The Băişoara Tourist Complex (TC), where the main sampling locations are:

a) **Meadow** with south-western aspect. In this area we have collected both quantitative and qualitative samples from the herbaceous and shrubbery layers and from the trees.

b) **Spruce forest**, located near the tourist complex. In this ecosystem, the samplings were done only from the herbaceous layer, since the shrubbery one is less represented.

2. The Scărița-Belioara Nature Reserve (SB), which covers an area of 450 ha and is located at an altitude of 1350 m. The reserve includes the meadow on the Şesul Craiului (limestone plateau), the Scărița forest and the slopes limiting the starting point of the Belioara valley, which is a tributary to the Poşaga river.

From botanical point of view, in this reserve there is a great diversity of phytogeographical elements. Among the glacial relicts, here we could find *Gentiana acaulis, Gentiana clusii, Dryas octopetala, Arctostaphylos uva-ursi,* and among the Mediterranean species, *Saponaria bellidifolia*. It is also important to notice the presence of steppe relicts, such as *Fritillaria orientalis, Serratula radiata*, and on the rocks *Leontopodium alpinum*. The forest on the Scărița plateau contains a mixture of species, such as *Pinus sylvestris, Picea abies, Larix decidua, Juniperus communis* and *Juniperus sabina*. On the rocks there grow *Taxus baccata* and the endemic species *Hieracium praebiharicum*. We have taken samples from the following ecosystems and habitats:

a) **Meadow** on the plateau named "Platoul Craiului".

b) **A pine (*Pinus sylvestris*) forest** near the "Platoul Craiului". In this ecosystem we have also sampled biological material from the herbaceous vegetation of the rocks.

3. Româneasa (R), located in front of the Scărița-Belioara Nature Reserve.

a) **Meadow** with many species of spontaneous Gramineae, located near the Nature Reserve Scărița-Belioara.

b) **Pasture** along the way leading to the Nature Reserve.The herbaceous vegetation is dominated by monocotyledonous species.

4. Muntele Mare (MM)

a) **Subalpine meadow** located near the Muntele Mare peak, where the dominant vegetation is an association of *Juniperus communis.*

b) **Oligotrophic swampland** with *Sphagnum* sp. located along the way leading to Muntele Mare. The oligotrophic swampland is located at a high altitude, under climatic conditions specific to the coniferous forests. These oligotrophic swamps are found predominantly on plane areas that are submitted to an increased humidity, where the ventilation lacks and where there are conditions for the accumulation of plant residues. The predominant plant species are *Sphagnum* sp. and *Polytrichum* sp., and glacial relicts, such as Carex *magellanica, Carex limosa, Carex pauciflora, Drosera rotundifolia, Eriophorum vaginatum* and *Vaccinium oxycoccos*.

Material and methods. The sampling of biological material on herbaceous vegetation has been performed using an entomological net. We have also collected biological material from trees and shrubs using the umbrella net and by direct sampling from the plants. We have taken both quantitative and qualitative samples. We have collected samples of identical size (100 sweeps) in all ecosystems. The studies have been carried out in 1998. The collected biological material was preserved in 70% alcohol. The species were identified taking into consideration the morphological features, especially the genital system, according to the literature [5, 8, 9]. We have used the following ecological indices: relative abundance, numeric dominance, the Shannon-Weaver ecological diversity index and the equitability index.

Results and discussion. The preliminary results of our research in the Muntele Băişorii – Scărița Belioara area is presented in Table 1. We mention that in this area, faunistic studies have never been performed before in the Auchenorrhyncha group. All our faunistic data are original.

In the studied area we have identified 21 species belonging to 19 genera, 2 families and 4 subfamilies. The family with the greatest number of species is Cicadellidae Latreille 1825, with 19 species, compared to family Cercopidae Leach 1815, with only 2 species.

The Cercopidae family includes, generally, a small number of species (24 in Central European fauna) [6]. The distribution of cicada species in subfamilies is presented in Fig.1. Subfamily Deltocephalinae is represented by a great number of species, since this subfamily includes a high number of taxa. In the studied area, the species belonging to the subfamily Typhlocybinae are also well represented, due to their favourable trophic base which is very abundant here (poplar, birch, mountain alder, hazelnut tree, mountain sycamore maple, willow etc.). The subfamily with the lowest representation is Macropsinae, with only one species. C a n t o r e a n u [4] has obtained similar results in a faunistic and ecological study performed in the Retezat Massif.

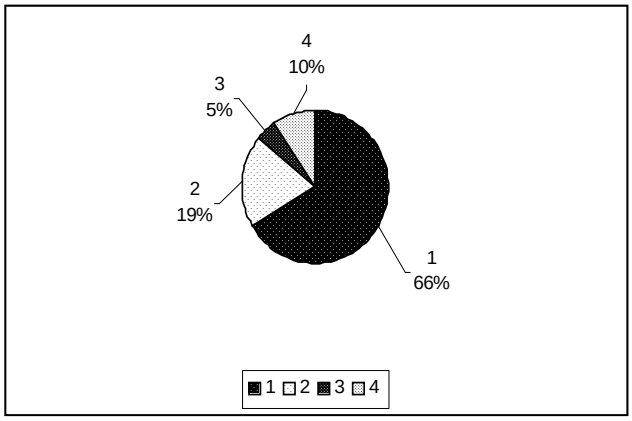


Fig. 1. *Distribution of the cicada species in subfamilies.*
1 – Deltocephalinae. 2 – Typhlocybinae. 3 – Macropsinae. 4 – Aphrophrinae.

Table 1

Distribution of the cicada species and the number of individuals on ecosystems and stations

No.	Taxa	Type of ecosystem													
		Spruce forest		Pine forest		Meadow					Pasture		Swampland		
		TC *	RA % **	S.B.*	RA % **	S.B.*	R*	TC *	M.M.*	RA % **	R*	RA % **	M.M.*	RA % **	D % ***
	Family Cicadellidae Latreille, 1825														
	Subfamily Deltocephalinae Fieber, 1869														
	Tribe Macrostelini Kirkaldy, 1906														
1	Balclutha punctata Fabricius, 1775							1		0.7246377			1	10	0.3731343
2	Macrosteles sexnotatus Fallen, 1806 (?)												1	10	0.1865672
	Tribe Athysanini Van Duzee, 1892														
3	Graphocrerus ventralis Fallen, 1806								1	0.7246377	14	7			2.7985075
4	Speudotettix subfusculus Fallen,1806	3	1.8987342												0.5597015
5	Thamnotettix confinis Zett. 1840	3	1.8987342												0.5597015
6	Conosanus obsoletus Kbm. 1858												3	30	0.5597015
	Tribe Deltocephalini Fieber, 1869														
7	Deltocephalus pulicaris Fallen, 1806	2	1.2658228												0.3731343
	Tribe Paralimnini Distant, 1908														
8	Psammotettix notatus Melichar,1896			5	17.241379						6	3			2.0522388
9	P. cephalotes Herrich-Schaffer,1834	22	13.924051					1	3	2.8985507	3	1.5	3	30	5.9701493
10	P.alienus Dahlbom,1850										7	3.5			1.3059701
11	Turrutus socialis Flor, 1861	18	11.392405			4		12		11.594203					5.3459119
12	Jassargus(Arrailus) alpinus Then,1896	2	1.2658228					1		0.7246377					0.5597015
13	Diplocolenus bohemani Zett. 1840	88	55.696203	22	75.862069	37			11	34.782609	50	25			38.80597
14	Verdanus abdominalis Fabricius,1803	14	8.8607595			4	3	15	17	28.26087	120	60	1	10	32.462687
	Subfamily Macropsinae Evans, 1935														
15	Oncopsis flavicollis Linnaeus,1761					1		21		15.942029					4.1044776
	Subfamily Typhlocybinae Kbm.1868														
	Tribe Empoascini Ditant, 1908														
16	Empoasca vitis Gothe,1875												1	10	0.1865672
17	Chlorita viridula Fallen, 1806							1		0.7246377					0.1865672
	Tribe Dikraneurini Mc Atee, 1926														
18	Erythria montandoni Puton, 1880	1	0.6329114												0.1865672
19	Dikraneura sp.	1	0.6329114												0.1865672
	Family Cercopidae Leach, 1815														
	Subfamily Aphrophorinae Am.&Serv.1843														
20	Neophilaenus campestris Fallen,1805	4	2.5316456	2	6.8965517	3		1		2.8985507					1.8656716
21	Philaenus spumarius Linnaeus, 1758 var. xanthocephala						1								0.3731343
	No. of species	**11**		**3**		**5**	**2**	**8**	**4**		**6**		**6**		

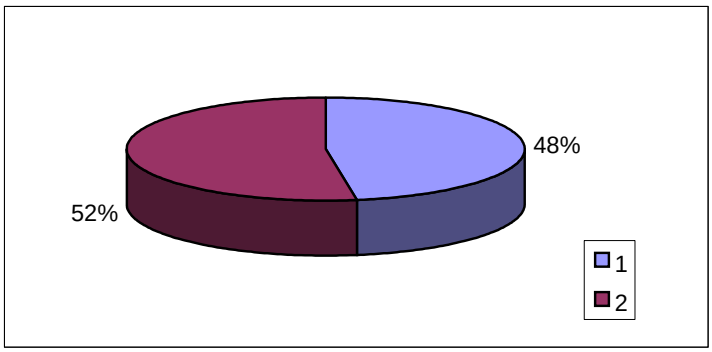
* TC - Tourist Complex;
SB - Scărița-Belioara Nature Reserve;
R - Românceasa;
MM - Muntele Mare.

** Relative abundance.
*** Numeric dominance.

By analysing Table 1, we can observe that the highest number of species is found in meadows and spruce forests (11 species), then in pastures and swamplands (6 species only). In the meadow, the great number of species is due to the rich trophic base, especially spontaneous Gramineae, which make up a favourable source of food for the cicada communities. In the spruce forests, the cicada communities are also abundant due to the rich herbaceous substratum. In the alpine pastures, the specific diversity is low compared to the meadows, which proves that here the abiotic and biotic conditions are more unpropiteous than in the meadows. In the swampland ecosystem, there is a low number of species, of which several are eurihygrous, such as *Balclutha punctata*, *Verdanus abdominalis*, *Empoasca vitis*, and other have higher demands regarding the humidity factor: *Macrosteles sexnotatus*, *Conosanus obsoletus*, *Psammotettix cephalotes*.

The distribution of species according to stations is the following: the Tourist Complex station (TC) exhibits the greatest number of species (14), followed by the Muntele Mare station (MM) with 8 species, the Româneasa station with 7 species, and the lowest number of species is found at the Scărița-Belioara station (6 species). This distribution on stations shows that biodiversity is negatively correlated with the altitude.

Regarding the distribution of species in different ecosystems or the ecological valence (Fig. 2), we can observe that the majority of species are spread in two or more ecosystems (eurybiont species – 52%), but there are many species that are found in only one ecosystem (stenobiont species – 48%). In the spruce forest, there are species like *Speudotettix subfusculus*, *Thamnotettix confinis*, *Deltocephalus pulicaris*, *Erythria montandoni*, *Dikraneura* sp. (sylvan species). We have obtained similar results in a neighbouring mountain area [7], which confirms the ecological preferences of these species. In the meadows, we found *Oncopsis flavicollis*, *Chlorita viridula*. In the swamplands, the following species live: *Macrosteles sexnotatus*, *Conosanus obsoletus* and *Empoasca vitis*. We observed also the presence of eurybiont species, such as *Psammotettix cephalotes* and *Verdanus abdominalis*.



F i g. 2. *Ecological valence of the cicada species.*
1 – Stenobiont species. 2 – Eurybiont species.

The highest relative abundance (RA%) has been recorded for *Diplocolenus bohemani* (55.69% in spruce forests, 37.78% in meadows and 25% in pastures), followed by *Verdanus abdominalis* (98.86% in spruce forests, 28.26% in meadows, 60% in pastures and 10% in swampland). The different levels of the RA% show that the two species have different ecological needs: *Verdanus abdominalis* is a species that lives in open areas, and *Diplocolenus bohemani* prefers the forests. Low values of the RA% were found for *Erythria montandoni, Dikraneura* sp. and *Philaenus spumarius* (0.63%).

The highest values of the dominance index (D%) were registered for *Diplocolenus bohemani* (38.80%) and *Verdanus abdominalis* (32.46%). All ecosystems in the studied area were numerically dominated by these two species.

The values of the Shannon-Weawer ecological diversity and of the equitability indices are presented in Table 2. By analysing this table, one can see that we have found the highest value of the diversity index in the meadow (0.73), followed by the spruce forest (0.64), and the lowest value was registered for the swampland ecosystem (0.18). Regarding the values of the equitability indices, the situation is similar. This result shows that the cicada species mainly prefer open ecosystems, such as meadows and subalpine pastures and also the spruce forests. The fact that the cicada species prefer these two types of ecosystems may be due to the richness of the trophic base, and also to the temperature and humidity conditions that favour the development of these types of communities. In the spruce forest the trophic base is also rich, due to the substantial herbaceous layer.

Table 2

Values of the Shannon-Weaver diversity index (H') and equitability index (e) in the studied ecosystems

Index	Type of ecosystem				
	Spruce forest	Pine forest	Meadow	Pasture	Swampland
H'	0.64	0.3	0.73	0.48	0.18
e	0.61	0.6	0.67	0.2	0.12

Conclusions. 1.In the studied area, we have identified 21 species belonging to 19 genera, 2 families and 4 subfamilies. The cicada fauna is relatively reduced.

2. The majority of the species belong to the family Cicadellidae Latreille, 1825.

3. The most abundant cicada fauna lives in meadows and subalpine pastures. Also, a great number of species live in spruce forests. The cicada fauna is less represented in swamplands and pine forest.

4. The studied area presents a high percentage of stenobiont species (48%).

5. The species with the highest relative abundance are *Diplocolenus bohemani* and *Verdanus abdominalis*, and those with the lowest abundance are *Erythria montandoni, Dikraneura* sp. and *Philaenus spumarius*.

6. In the studied area, the ecosystems are numerically dominated by *Diplocolenus bohemani* and *Verdanus abdominalis*.

7. The highest value of the diversity indices is registered in pastures, meadows and the spruce forest, while in the other ecosystems the diversity is very reduced.

REFERENCES

1. C a n t o r e a n u, M., *Cercetări privind fauna de cicadine* (Homoptera, Auchenorrhyncha) *în două biotopuri de munte*, "Comun. Zool.", **1**, 1969, 113-118.
2. C a n t o r e a n u, M., *Studii privind distribuția altitudinală a cicadinelor* (Homoptera, Auchenorrhyncha) *în Munții Bucegi*, "Muz. Şti. Nat., Comun. Ref." (Ploieşti), 1972, 195-206.
3. C a n t o r e a n u, M., *Specii silvicole de cicadine* (Homoptera, Auchenorrhyncha) *din Retezat*, "Stud. Cercet. Biol., Ser. Zool.", **5**, 1973, 421-426.
4. C a n t o r e a n u, M., *Structura comunităților de cicadine* (Homoptera, Auchenorrhyncha) *din Retezat*, in P o p o v i c i, I. (Ed. coord.), *Parcul Național Retezat – Studii Ecologice*, pp. 251-253, West Side, Braşov, 1992.
5. D e l l a G i u s t i n a, W., *Homoptères* Cicadellidae, "Faune France", **73** (3), 1989, 1-350.
6. H o l z i n g e r, E. W., F r ö h l i c h, W., G ü n t h a r t, H., L a u t e r e r, P., N i c k e l, H., O r o s z, A., S c h e d l, W., R e m a n e, R., *Vorläufiges Verzeichnis der Zikaden Mitteleuropas* (Insecta: Auchenorrhyncha), "Beitr. Zikadenk.", **1**, 1997, 43-62.
7. P o p a, V., C o j o c n e a n u, R., *Faunistic and ecological studies on the cicada populations* (Insecta, Homoptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae *and* Cercopidae) *along the superior course of the Someşul Cald river* (*Romania*), "Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.", **42** (1-2), 1999, 61-77.
8. R i b a u t, H., *Homoptères Auchénorhynques*. I (Typhlocybidae), "Faune France", **31**, 1936, 1-228.
9. R i b a u t, H., *Homoptères Auchénorhynques*. II (Jassidae), "Faune France", **57**, 1952, 1-472.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF THE RAT MYOCARDIUM AFTER A SINGLE THERAPEUTIC DOSE OF CARBOPLATIN ADMINISTERED INTRAVENOUSLY

CRISTINA PAŞCA[*], VIOREL MICLĂUŞ[**], CONSTANTIN CRĂCIUN*, ERIKA KIS*, VICTORIA DOINA SANDU*, VERONICA CRĂCIUN*, IONEL PAPUC and CRISTIAN MUNTEANU[***]**

SUMMARY. – Carboplatin (Paraplatin) is an alkylating agent belonging to the family of platinum-containing products, widely used in the chemotherapy of many types of malignant diseases in humans. According to the previous studies concerning its toxicity, this anticancer drug has a significant myelotoxicity, nephrotoxicity and cardiotoxicity. Therefore, our investigations intended to evaluate the histological and ultrastructural modifications induced by a single therapeutic dose of Carboplatin (400 mg/m^2 body surface) in the left ventricle of the rat myocardium. Light microscopy demonstrates that Carboplatin induces many and obvious modifications consisting of the appearance of a slight congestion, haemorrhage and a diffuse oedema which was not correlated with the presence of a cellular infiltration. At the level of many cardiac muscle fibres, some nuclear modifications appeared which consisted of hyperthrophy, the presence of an increased number of nucleoli, a peculiar arrangement of chromatin in groups. A few nuclei were round shaped and very intensely stained. In addition, an obvious congestion and many haemorrhages could be seen in the myocardium.

The ultrastructural alterations induced by this cytostatic consisted of the appearance of an alteration of the vascular and sarcolemmal permeability, correlated with a modified flux of electrolytes and water, leading to cell swelling, disorganisation of the ultrastructure, especially at the periphery of the myocytes, lysis of the sarcolemma and myofibrils, breaking of the Z-lines, increasing of the interfibrillar spaces, swelling and degeneration of the mitochondria. Besides, it could be noticed a massive oedema between the myofibrils which determined the myocyte disorganisation. In the areas with an advanced lysis, an obvious collagenous proliferation could be seen. All these modifications, which already appeared 24 hours after the treatment, aggravated progressively, but after 11 days started decreasing; at the end of the experiment the granular myocardiosis correlated with myolysis microfocuses, congestion, oedema and haemorrhages had just a zonal character.

[*] *Babeş-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj-Napoca, Romania. E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro*

[**] *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Department of Histology, 3400 Cluj-Napoca, Romania*

[***] *Elementary School Nr. 17, 3400 Cluj-Napoca, Romania*

Carboplatin is widely used in the treatment of a variety of common cancers including small cell and non small cell lung cancer, ovarian, testicular, head, neck, bladder cancer and many other malignant tumours. The primary cellular target of Carboplatin is DNA. The linkers which result inside or between the two DNA strands, following interaction with Carboplatin, mainly account for its antitumoural action [2, 5, 10]. However, the administration of Carboplatin frequently results in clinically important toxicities, including kidney, bone marrow and heart toxicity, that pose certain risks and adversely affect the quality of life of the patients. Nowadays, the investigations try to safely increase the total dose or the dose frequency of this platinum drug which would lead to an increase in tumour response rates and could result in a substantial patient benefit. According to the previous studies, high doses of Carboplatin determine significant histological and ultrastructural modifications of the cardiac tissue, which, unfortunately, are incompletely known. Therefore, our studies intended to reveal the effect of a single therapeutic dose of Carboplatin administered i.v. on the rat myocardium.

Material and methods. Our experiments were carried out with the following five groups of healthy adult male Wistar rats, weighing 190 $\pm$ 10 g and maintained under bioclimatic laboratory conditions, with no food for 18 hours before the treatment, but having water *ad libitum*:

-group U – untreated (control) group;

-group C_1, C_2, C_3 and C_4 treated i.v. with 400 mg Carboplatin /m^2 body surface and sacrificed 24 hours, 4, 11 and 18 days after the treatment.

The animals were not fed for 18 hours before the sacrification. Having sacrificed the animals, we took fragments from the myocardium. For microscopic examinations, the fragments were fixed in 10% neutral formol, processed by the paraffin technique and the sections of 6 μm were stained by the hematoxylin-eosin, and Masson-Goldner trichrome [11]. For ultrastructural investigations, fragments of myocardium were prefixed in 2.7% glutaraldehyde solution and postfixed in 2% osmic acid solution. The fragments were dehydrated in acetone and then embedded in Vestopal W. The ultrathin sections were obtained using an LKB III ultramicrotome and were contrasted with uranyl acetate. Examination of the sections was performed in a TESLA-BS-500 electron microscope [1, 8, 12].

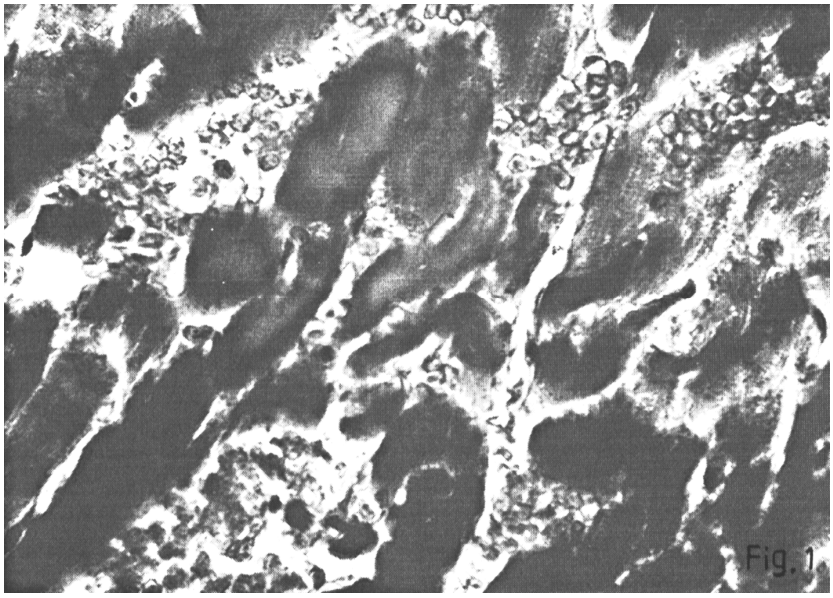
On the stained and contrasted sections we studied, by light and electron microscopic examinations, the histological and ultrastructural modifications induced by this drug at the level of myocardium in the left ventricle, in concordance with the moment of the sacrification.

Results and discussion. By light microscopy it could be seen that Carboplatin determines certain histological modifications which already appeared 24 hours after the treatment. They consisted of a slight congestion and a diffuse oedema which was not correlated with the presence of a cellular infiltration. Many myocytes had nuclear modifications consisting of: hypertrophy, an increased number of nucleoli and a peculiar arrangement of chromatin in groups. A few nuclei were

round shaped and very intensely stained, all these aspects being very well pointed out on the sections stained with hematoxylin-eosin, and the oedema was obvious on the sections stained with Masson-Goldner dye.

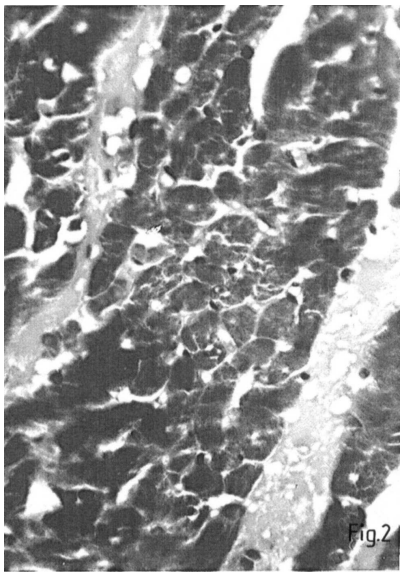
All the modifications aggravated progressively, so that 4 days after the treatment the stasis, congestion, oedema were more serious and, in addition, many interfascicular haemorrhages appeared. Groups of myocytes were affected by anisocaryocytosis and anisochromy processes (Fig. 1).

The circulatory disturbances correlating with a significant perivascular and interfascicular oedema persisted in the group sacrificed 11 days after the treatment (Fig. 2). Here and there, microfocuses of myolysis could be noticed. A small number of myocytes were affected by a granulo-hyaline dystrophy.

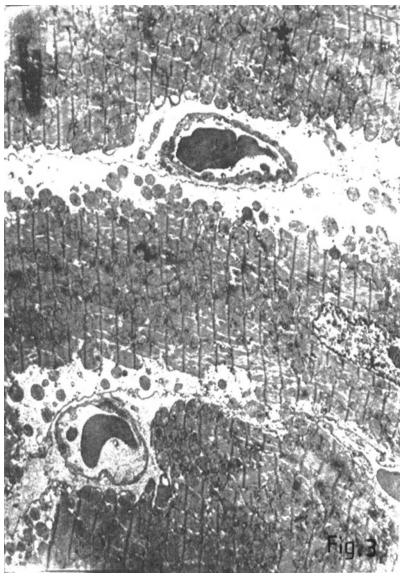


F i g. 1. *Haemorrhages, oedemas and myolysis in the rat myocardium* (x 320).

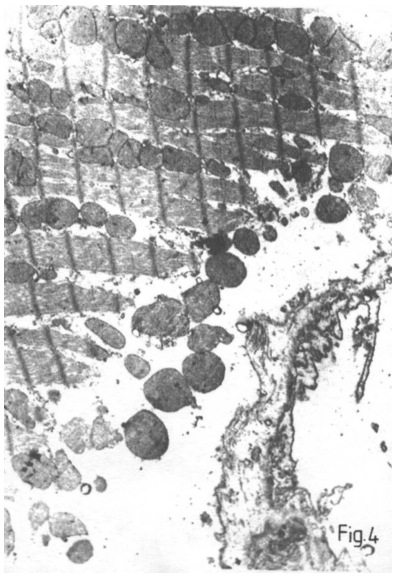
The electron microscopy investigations showed that Carboplatin induced certain ultrastructural alterations consisting of the appearance of a serious modification of the vascular and sarcolemmal permeability correlated with a modified flux of electrolytes and water, leading to cell swelling, disorganisation of the cell ultrastructure, especially at the periphery of the myocytes, lysis of the sarcolemma and myofibrils (Fig. 3), breaking of the Z-lines, increasing of the interfascicular spaces, swelling and degeneration of the mitochondria (whose cristae appeared destroyed and whose matrix was rarefied) (Fig. 4), and swelling of the nucleus (Fig. 5). The massive oedema between the myofibrils determined a myocyte disorganisation. In the areas with an advanced lysis process, an obvious collagenous proliferation appeared (Fig. 6). The granular myocardiosis persisted, too.



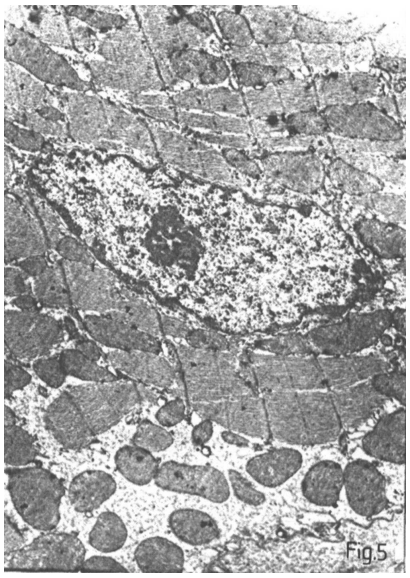
F i g. 2. *Significant interfascicular oedemas and stasis in the myocardial capillaries* (x 320).



F i g. 3. *Congestion, lysis of the sarcolemma and myofibrils, especially at the periphery of the myocytes, and interfascicular oedema* (x 4410).



F i g. 4. *Severe disorganisation of the myocytes, breaking of the Z-lines, swelling of the myocytes and mitochondria* (x 8400).



F i g. 5. *Swelling of the nucleus and mitochondria in the myocytes and a peculiar arrangement of the nuclear chromatin* (x 12600).

F i g. 6. *Obvious disorganisation of the myocytes at the periphery and a collagenous proliferation in the areas with an advanced lysis process* (x 7350).

At the end of the 18 days of the experiment, the granular myocardosis correlated with myolysis microfocuses, congestion, stasis, oedema and haemorrhages had a zonal character and were very discreet, an obvious recovery process of the myocardium being noticed.

The histological and ultrastructural aspects confirm the cardiotoxic effect of this anticancer drug, which, according to the previous studies, appears after high doses of Carboplatin or after a long chemotherapy and consists of the appearance of certain histological modifications: congestion, stasis and haemorrhages at the level of the capillaries, very grave microvascular disturbances and a slight hypertrophy of the myocardium mass [6, 13, 14]. In severe Carboplatin treatment, muscle cells are irreversibly damaged, the sarcolemmal permeability being seriously affected. The functional consequences of the altered sarcolemmal permeability involve a modified flux of electrolytes and water, leading to cell swelling and increased transport of Ca^{2+} from the extracellular space to the cardiac muscle cell [4]. Besides, dilatation of the tubules of the sarcoplasmic reticulum, increased numbers of irregularly shaped lysosomes containing heterogenous deposits of electron-dense material, dehiscence of intercalated discs, mitochondria with destroyed cristae, and intramitochondrial amorphous inclusion bodies were observed [3, 7, 9]. Thus, a myocardial Ca^{2+} overload developed and the ultrastructural modifications of the myocytes were correlated with certain devastating effects on the cardiac cell functions.

The histological and ultrastructural modifications noticed by us demonstrated that Carboplatin, administered i.v. in a single therapeutic dose of 400 mg/m^2 body surface, had a significant cardiotoxic effect, which already appeared 24 hours after

the treatment, aggravated progressively, but after 11 days started decreasing; at the end of the 18 days of our experiment, an obvious recovery tendency was noticed, all the modifications having a zonal character and affected especially isolated myocytes and only a small number of groups of myocardial cells.

Conclusions. 1. A single therapeutic dose of 400 mg Carboplatin/m^2 body surface has a moderate toxic effect on the rat myocardium consisting of the appearance both of certain histological and ultrastructural modifications.

2. All the modifications induced by this anticancer drug seem to be due to the grave circulatory disturbances and the thrombocytopenia.

3. Carboplatin determines certain histological alterations: capillary stasis, interfascicular haemorrhages, oedemas, nuclear modifications (hypertrophy, the presence of an increased number of nucleoli, a peculiar arrangement of the chromatin in groups) and an obvious collagenous proliferation in the lysis areas.

4. The ultrastructural modifications induced by Carboplatin consist of cell swelling, disorganisation of the cell ultrastructure, especially at the periphery of the myocytes, lysis of the sarcolemma and myofibrils, breaking of the Z-lines, swelling of the interfascicular spaces, swelling and degeneration of the mitochondria, myocyte disorganisation and myolysis.

REFERENCES

1. B r e n d a, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy,* Butler & Tanner, London,1981.
2. C a l v e r t, A. H., *Dose optimisation of carboplatin in adults,* "Anticancer Res.", **14**, 1994, 2273-2278.
3. D i e t r i c h, W. S., *The ultrastructure of cardiac muscle in health and disease,* "Micron", **24** (1), 1993, 47-73.
4. F l e c k e n s t e i n, A., J a n k e, J., D o r i n g, H. J., P a c h i n g e r, O., *Calcium overload as the determinant factor in the production of catecholamine-induced myocardial lesions,* "Cardiomyopathies", **2**, 1973, 455-466.
5. G r i g g, A., S z e r, J., S k o v, K., B a r n e t t, M., *Multi-organ dysfunction associated with high-dose carboplatin therapy prior to autologous transplantation,* "Bone Marrow Transplantation", **17**, 1996, 67-74.
6. H r u b a n, R. H., S t e r n b e r g, S. S., M e y e r s, P., F l e i s h e r, M., M e n e n d e z-B o t e t, C., B o i t n o t t, J. K., *Fatal thrombocytopenia and liver failure associated with carboplatin therapy,* "Cancer Invest.", **9**(3), 1991, 263-268.
7. K a t z, A. M., F r e s t o n, J. W., M e s s i n e o, F. C., H e r b e t t e, L. G., *Membrane damage and the pathogenesis of cardiomyopathies,* "J. Molec. Cell. Cardiol.", **17**, 1985, 11-20.

8. K a y, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
9. Kino, M., *Chronic effects of some drugs under partial inhibition of catalase activity in the rat heart: light and electron microscopic observation*, "J. Molec. Cell. Cardiol.", **13**, 1981, 5-21.
10. M i l l w a r d, M. J., W e b s t e r, L. K., T o n e r, G. C., B i s h o p, J. F., R i s c h i n, D., S t o k e s, K. H., J o h n s t o n, V. K., H i c k s, R., *Carboplatin dosing based on measurement of renal function – experience at the Peter MacCallum Cancer Institute*, "Cancer Res.", **26**, 1996, 372-379.
11. M u r e ş a n, E., G a b o r e a n u, M., B o g d a n, A. T., B a b a, A. I., *Tehnici de histologie normală şi patologică*, Ed. Ceres, Bucureşti, 1974.
12. P l o a i e, P. G., P e t r e, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații la biologia celulară şi moleculară*, Ed. Acad. R.S.R, Bucuresti, 1979.
13. S a k a i, T., Y o s h i k a w a, K., N o s a k a, S., T a k e n o s h i t a, M., *A case report of cardiac failure caused by the new anti-neoplasic agent, carboplatin*, "Cancer", **72**(5), 1993, 756-760.
14. W a l k e r, R. W., R o s e n b l u m, M. K., K e m p i n, S. J., C h r i s t i a n, M. C., *Carboplatin associated thrombotic microangiopathic hemolytic anemia*, "Cancer", **64**(5), 1989, 1017-1020.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL INJURIES IN THE RAT KIDNEY AFTER EXPOSURE TO CISPLATIN

CRISTINA PAŞCA[*], VIOREL MICLĂUŞ[**], CONSTANTIN CRĂCIUN*, ERIKA KIS*, VICTORIA DOINA SANDU*, VERONICA CRĂCIUN*, IONEL PAPUC and CRISTIAN MUNTEANU[***]**

SUMMARY. – Cisplatin, a platinum compound, is an alkylating agent with a marked antitumour activity, that has been extensively and successfully applied in the chemotherapy of several types of cancer (testicular, ovarian, pulmonary etc). Unfortunately, it has a significant hematologic and nonhematologic toxicity, especially nephrotoxicity. The tissue injury and repair in the rat kidney induced by this anticancer drug are still incompletely known; therefore, we tried to emphasise the histological and ultrastructural modifications induced by some therapeutic doses of Cisplatin on the rat kidney. Our researches demonstrated that the lesions were very grave, affected wide areas and progressively and significantly grew worse during the experiment. They consisted of the appearance of a marked swelling of the renal tubules, especially between the cortex and medulla, a distension of the epithelial cells, the cytoplasm of which appeared homogeneous and in some areas the epithelium was atrophied or detached. In addition, it could be noticed a granular material inside the renal tubules (because of the necrosis processes of the epithelial cells), a proliferation of mesangial and endothelial cells, an accumulation of certain circulating elements (polymorphonuclears, monocytes, lymphocytes) in the capillary lumen. The mesangial and monocytic interposition determined the parietal thickening and the striking "double outline" aspect of the basement membrane. Electron microscopy studies showed that Cisplatin induced grave nuclear alterations, a complete vacuolisation of the apical cytoplasm, intracellular lysis, while the mitochondria were swollen and had a rarefied matrix. Many epithelial cells in the uriniferous tubules had a seriously affected brush border, the microvilli being swollen and destroyed here and there, and the basal infoldings appeared hypertrophied. An increase of the mesangial matrix, with an obvious expansion in the capillary loops, determined the "double outline" aspect of the basement membrane which was found in light microscopy investigations. Besides, a pronounced cellularity of the glomeruli appeared, which was due to mesangial cell proliferation and especially to monocytic infiltration. Monocytes appeared in the mesangial zone, between the basement membrane and the endothelium along with mesangial cells, or in the lumen of some capillaries. Deposits of granular structure were found in the subendothelial area.

[*] *Babeş-Bolyai University, Department of Zoology, 3400 Cluj-Napoca, Romania.*
E-mail: cpasca@biolog.ubbcluj.ro
[**] *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Department of Histology, 3400 Cluj-Napoca, Romania*
[***] *Elementary School Nr. 17, 3400 Cluj-Napoca, Romania*

Cisplatin (Platinol, cis-DDP) is a platinum compound belonging to the alkylating agents, successfully applied in the chemotherapy of several types of cancer. The antineoplasic activity is generally believed to result from the interaction of the drug with the DNA in the tumour cells, this interaction leading to the formation of different types of adducts through the reaction of the bifunctional platinum compound with N7 atoms of the nucleobases guanine and adenine. The major adducts are intrastrand cross-links formed by the binding of cis-DDP on two neighbouring guanines, on adenine and guanine, and on two guanines separated by one or more nucleobases. Other types of adducts formed are the interstrand cross-link on two guanines and monofunctionally bound cis-DDP. Inside cells, cis-DDP can form DNA-protein cross-links [6-8]. Cisplatin has a significant hematologic and nonhematologic toxicity, especially nephrotoxicity. The histological and ultrastructural modifications induced by this anticancer drug on the rat kidney are still incompletely known; therefore, our investigations tried to emphasise these aspects in concordance with the moment of the sacrification after the administration of some therapeutic doses.

Material and methods. Our experiments were carried out with the following five groups of healthy adult male Wistar rats, weighing 190 $\pm$ 10 g and maintained under bioclimatic laboratory conditions, with no food for 18 hours before the treatment, but having water *ad libitum*:

-group U – untreated (control) group;

-group C_1, C_2, C_3 and C_4 treated i.v. with 20 mg Cisplatin /m^2 body surface/day, for three days, and sacrificed 24 hours, 4, 11 and 18 days after the treatment.

The animals were not fed for 18 hours before the sacrification. Having sacrificed the animals, we took fragments from the kidney. For microscopic examination the fragments were fixed in 10% neutral formol, processed by the paraffin technique and the sections of 6 μm were stained by the hematoxylin-eosin, Masson-Goldner trichrome and PAS methods [12]. For ultrastructural investigations fragments of kidney were prefixed in 2.7% glutaraldehyde solution and postfixed in 2% osmic acid solution. The fragments were dehydrated in acetone and then embedded in Vestopal W. The ultrathin sections were obtained using an LKB III ultramicrotome and were contrasted with uranyl acetate. Examination of the sections were performed in a TESLA-BS-500 electron microscope [1, 10, 13].

On the stained and contrasted sections we studied, by light and electron microscopic examinations, the histological and ultrastructural modifications induced by this anticancer drug in concordance with the moment of the sacrification.

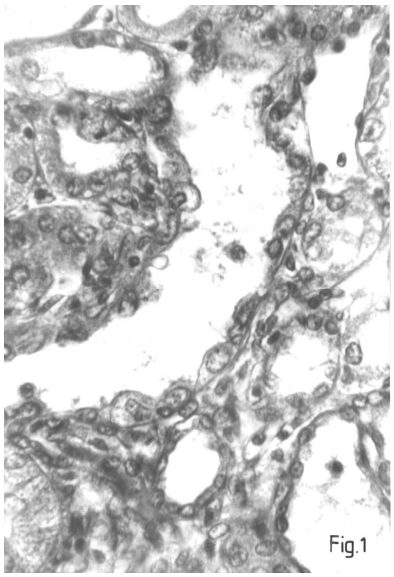
Results and discussion. The light and electron microscopy investigations of the kidney sections showed the appearance of some significant modifications which seemed to be in concordance with the moment of the sacrification.

The first histological alterations could be noticed even after 24 hours after the treatment, but they were very discreet, had a zonal character, affecting small areas, especially between the cortex and medulla of the kidney. Thus, in a few uriniferous tubules, there was a polymorphous proteic granular material which appeared as a consequence of some incipient necrosis processes of the tubule epithelium. Just a small number of renal corpuscles were affected, they presenting a discreet oedema of the Bowman's space.

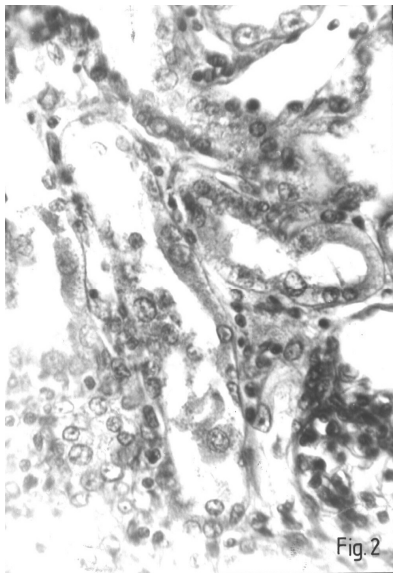
Four days after the treatment, some uriniferous tubules in the cortex of the kidney were swollen and the cytoplasm of the epithelial cells was homogenous. The granular material inside the lumen of the tubules persisted and it had an obvious merging tendency. All these alterations persisted and aggravated in the group sacrificed 11 days after the treatment, in which it could be noticed that some renal tubules showed a urinary stasis, their walls having an atrophied epithelium, and here and there suffering serious necrosis processes. Many cells of the tubular epithelium, as a result of these processes, detached from the basement membrane, and made up the granular material noticed in a larger number of tubules than in the group sacrificed 4 days after the treatment.

The necrosis processes progressively got worse, so that in the group sacrificed 18 days after the treatment we could noticed that the urinary stasis was significantly increased, more tubules being very distended and having an advanced necrosis process of the epithelial cells. Besides, many cells were very swollen, having an abnormal, peculiar aspect, their dimensions being three times larger compared to normal cells. All these modifications were much increased between the cortex and medulla and moderate in the cortex and medulla of the kidney (Figs. 1-3). In addition, in this group, a proliferation of the mesangial and endothelial cells and an accumulation in the capillary lumen of certain circulating elements (polymorphonuclears, monocytes and lymphocytes) were obvious. The interposition of mesangial and monocyte cells determined the parietal thickening and the striking "double outline" aspect of the basement membrane (Fig. 4).

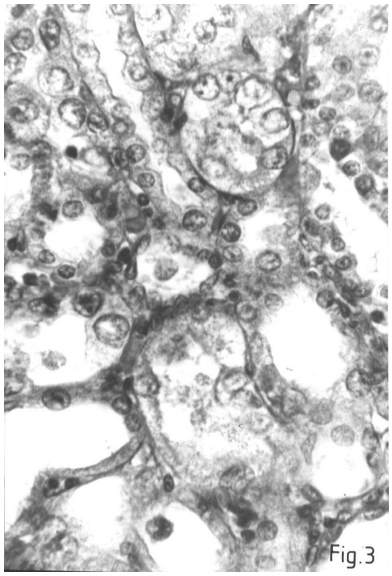
Electron microscopy showed that Cisplatin induced grave nuclear alterations, a complete vacuolisation of the apical cytoplasm, intracellular lysis phenomenon, which started to appear 4 days after the treatment and got worse during the 18 days of the experiment. Besides, the mitochondria became swollen and had a rarefied matrix (Figs. 5, 6), many epithelial cells had a seriously affected brush border, the microvilli being swollen and destroyed here and there, and their basal infoldings appeared hypertrophied (Fig. 7). The pronounced cellularity of the glomeruli was due to mesangial cell proliferation and especially to monocytic infiltration. Monocytes appeared in the mesangial zones, between the basement membrane and the endothelium or in the lumen of some capillaries. Many granular structures were found in the subendothelial area and in the lumen of some capillaries, too.



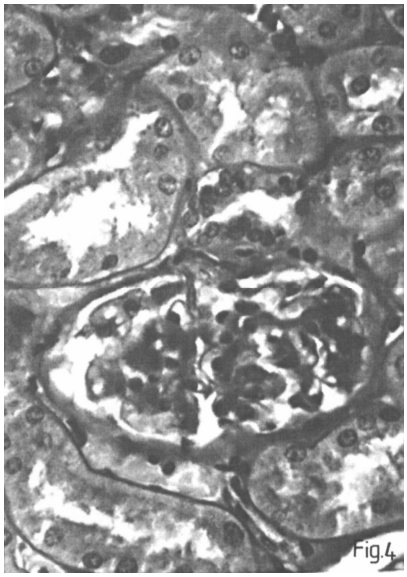
F i g. 1. *Urinary stasis and the presence of some abnormal cells, three times larger compared to normal cells in the renal tubules* (x 665).



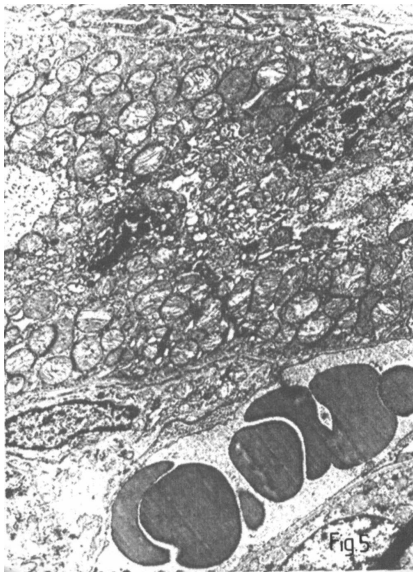
F i g. 2. *Advanced necrosis process of the epithelial cells in the uriniferous tubules between the cortex and medulla* (x 665).



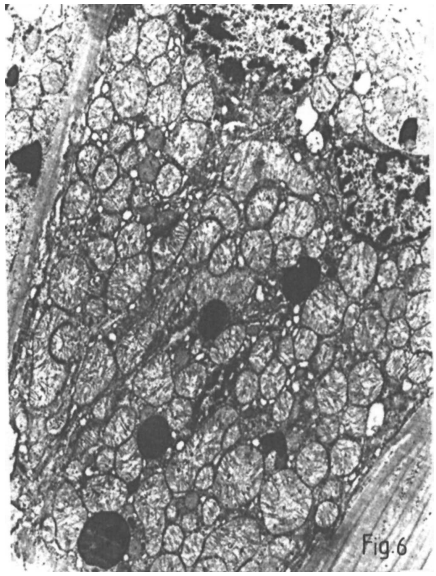
F i g. 3. *Swollen and abnormal epithelial cells in the uriniferous tubules, necrosis processes and urinary stasis* (x 665).



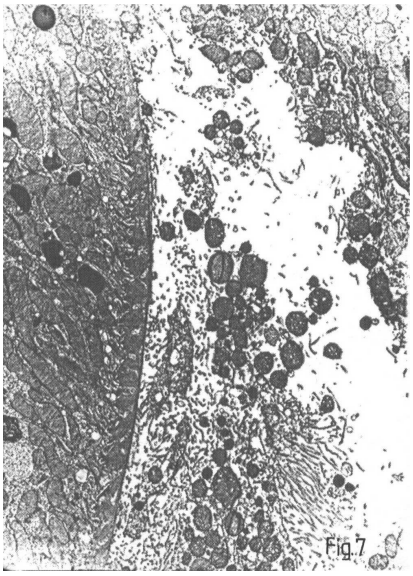
F i g. 4. *Proliferation of the mesangial and endothelial cells and a thickening of the parietal Bowman capsule* (x 665).



F i g. 5. *Congestion in the renal capillaries, serious swelling of the mitochondria and disorganisation of their matrix and cristae* (x 6720).



F i g. 6. *Vacuolisation of the cytoplasm of the epithelial cells in the uriniferous tubules, swelling and disorganisation of the mitochondrial and nuclear structure* (x 8400).



F i g. 7. *Serious necrosis process of the epithelial cells in the renal tubules between the cortex and medulla and a hypertrophied aspect of the cell basal infoldings* (x 7140).

Both the histological and ultrastructural modifications previously presented confirm the nephrotoxicity of Cisplatin. According to the previous investigations, the nephrotoxicity of this anticancer drug is minimal when it is administered in low doses, but high doses induce a significant glomerular and tubular toxicity which could seriously affect the function of the kidney [2-4, 6-9, 11, 14]. Its toxic effect consists of certain alterations both of the renal corpuscle structure (glomerular capillaries, endothelium, mesangium and Bowman capsule) and the uriniferous tubules, especially between the cortex and medulla.

As a consequence of the affecting of the glomerular capillaries, the ultrafiltration process was significantly disturbed. Mesangial cells, which

provide support for the capillaries and seem to be phagocytic suffered, in this case, mitosis and proliferated. These cells, under normal conditions, apparently function to clear large proteins from the basal lamina, which itself probably is not static, with the addition of new material externally and the removal of the old material internally by the mesangial cells. It has also been suggested that mesangial cells can contract when stimulated by angiotensin, with consequent decrease of blood flow in the glomerular capillaries [5]. The mesangial cell proliferation could be another cause for the alteration of the ultrafiltration process at the level of the kidney of the rats treated with Cisplatin. Because of the affecting of the uriniferous tubules, the excretion and absorption processes were affected, too.

Conclusions. 1. Cisplatin has a nephrotoxic effect which got worse during the 18 days of our experiment.

2. Cisplatin affects both the structures involved in the ultrafiltration process (glomerular capillaries, Bowman capsule, mesangium) and in the absorption and excretion processes (epithelium of the proximal convoluted tubule, loop of Henle and distal tubule).

3. Microscopy examination showed that Cisplatin induced necrosis processes of the tubular epithelium, urinary stasis, proliferation of the mesangial cells, the appearance of some granular proteic material inside the lumen of the tubules, a few epithelial cells getting an abnormal, peculiar aspect, and a significant monocyte infiltration.

4. Electron microscopy investigations of the kidney sections demonstrated that Cisplatin produced grave nuclear alterations, a complete vacuolisation of the cytoplasm in the epithelial cells, the swelling of the mitochondria and a grave alteration of the brush border and of the basal infoldings.

REFERENCES

1. B r e n d a, S. W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy,* Butler & Tanner, London ,1981.
2. B r o c k, N., P o h l, J., S t e k a r, J., *Detoxification of urotoxic oxazaphosphorines by sulfhydryl compounds,* "J.Cancer Res. Clin. Oncol.", **10**, 1981, 311-320.
3. D a i c o v i c i u, D., C h i r i c u ț ă, I., *Complicațiile provocate de tratamentul citostatic,* in *Cancerul Chimioterapie,* Vol.3, pp. 53-56, Inst. Oncol., Cluj-Napoca, 1983.
4. E t t i n g e r, L. J., K r a i l o, M. D., G a y n o n, P. S., H a m m o n d, G. D., *A phase I study of carboplatin in children with acute leukemia in bone marrow relapse. A report from the children's cancer group* , "Cancer" , **72**, 1993, 917-922.
5. F a r q u h a r, M. G., W i s s i n g, S. L., P a l a d e, G. E., *Glomerular permeability: I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall,* "J. Exp. Med.", **47**, 1961, 113-119.

6. F i g h t i n g e r – S c h e p m a n, A. M. J., L o h m a n, P. M. H.,R e e d i j k, J., *Detection and quantification of adducts formed upon interaction of diamminedichloro-platinum (II) with DNA, by anion-exchange chromatography after enzymatic degradation,* "Nucleic Acids Res.", **10**, 1982, 53-45-5356.
7. F i g h t i n g e r – S c h e p m a n, A. M. J., v a n d e r V e e r, J. L., d e n H a r t o g, J. H. L., L o h m a n, P. M. H., R e e d i j k, J., *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA : formation, identification and quantification,* "Biochemistry", **24**, 1985, 707-713.
8. F i g h t i n g e r – S c h e p m a n, A. M. J., v a n O s t e r o n, A. T., L o h m a n, P. M. H., B e r e n d s, F., *cis-Diamminedichloroplatinum (II) induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients : quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-diamminedichloroplatinum (II),* "Cancer Res.", **47**, 1987, 3000-3004.
9. F r e n k e l, J., K o o l, G., K r a k e r, J., *Acute renal failure in high dose carboplatin chemotherapy,* "Med. Pediatr. Oncol." , **25**, 1995, 473-477.
10. K a y, D., *Techniques for Electron Microscopy,* Alden & Mowbray , Oxford, 1967.
11. K n o x, R. J., F r i e d l o s, F., L y d a l l, D. A., R o b e r t s, J. J., *Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-diammine- (1, 1-cyclobutanedicarboxylato)platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA,* "Cancer Res.", **46**, 1979, 1972-1979.
12. M u r e ş a n, E., G a b o r e a n u, M., B o g d a n, A. T., B a b a, A. I., *Tehnici de histologie normală şi patologică,* Ed. Ceres, Bucureşti, 1974.
13. P l o a i e, P. G., P e t r e, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații la biologia celulară şi moleculară,* Ed. Acad. R.S.R , Bucureşti, 1979.
14. S k r e t k o w i c z, J., S e k u l s k a, M., D a n i e l w i c z, M., W a g r o w s k a-D a n i e l w i c z, M., P o l a k o w s k i, P., *Effect of some anticancer drugs and combined chemotherapy on renal toxicity,* "Cancer", **5**, 1996, 51-58.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

SISTEM ŞI METODĂ DE MONITORIZARE SIMULTANĂ A ACTIVITĂȚII ELECTRICE CARDIACE ŞI PULSULUI CAROTIDIAN LA OM

CRISTIAN SEVCENCU*

SUMMARY. – System and Method for Simultaneous Monitoring of the Electric Cardiac Activity and Carotid Pulse in Man. In order to record both the electrical and the mechanical activities of the isolated frog heart, a double-trace monitoring system was designed in our laboratories. Based on the same technical principles and using the same electronic monitoring devices, a new system was designed. By means of a pneumatic displacement transducer, the movements of the carotid artery are transformed into electrical signals, which are then acquired together with the cardiac ones. The result is a double-trace recording showing the parallel development of the pulse waves and of the signals generated by the heart during its electrical cycles.

Odată cu dezvoltarea explozivă a tehnicilor informaționale, care au acaparat practic toate domeniile de activitate umană, asistăm în ultimii ani la răspândirea pe scară largă a unor noi metode de utilizare a calculatorului ca instrument central în cercetarea biologică şi medicală.

Una dintre cele mai moderne modalități de înregistrare şi analiză a celor mai diverse tipuri de parametri fiziologici are la bază aşa-numitul sistem de achiziție a datelor (Data Acquisition System, DAQS). În esență, un astfel de sistem oferă câteva facilități principale. Astfel, prin utilizarea unor dispozitive de culegere a parametrilor urmăriți, cuplate la o interfață care realizează comunicarea cu calculatorul, este asigurată înregistrarea pe harddisk a datelor care reflectă desfăşurarea unui proces fiziologic. Având în vedere imensa capacitate de stocare a calculatoarelor actuale, rezultă cu claritate posibilitățile practic nelimitate de acumulare a valorilor experimentale. Pe de altă parte, odată stocate, toate aceste date pot fi oricând reactualizate pentru analize şi măsurători detaliate. În al treilea rând, rezultatele obținute pot intra mai departe în filtrul prelucrărilor statistice, realizate pe acelaşi calculator cu ajutorul unor programe adecvate.

Într-o serie de lucrări şi comunicări anterioare [4-8], am prezentat unele realizări obținute în laboratoarele noastre în ceea ce priveşte proiectarea şi utilizarea unui sistem original de monitorizare a activității inimii izolate de broască. Cu ajutorul acestuia am obținut înregistrări şi date comparabile cu cele publicate în lucrări recente [1-3, 9, 10].

* *Universitatea "Babeş-Bolyai", Catedra de Fiziologie animală, 3400 Cluj-Napoca, România.*
E-mail: sevcr@biolog.ubbcluj.ro

Pe structurile hardware şi software de bază ale sistemului mai sus menţionat, proiectând şi realizând terminale de culegere adecvate, am reuşit extinderea metodelor de monitorizare şi asupra altor indici fiziologici, atât în ceea ce priveşte lucrul cu organe şi ţesuturi izolate, cât şi pe subiecţi umani.

În cele ce urmează, vor fi prezentate o serie de caracteristici tehnice şi facilităţi de analiză ale unui sistem de monitorizare simultană a activităţii electrice cardiace şi pulsului carotidian la om.

Material şi metode. Sistemul de achiziţie destinat monitorizării paralele a parametrilor amintiţi cuprinde patru module de bază (Fig. 1): un electrocardiograf Cardior KTD2 adaptat, un electrosfigmograf de concepţie originală, placa de achiziţie (placa DAQ) şi calculatorul ca unitate centrală.

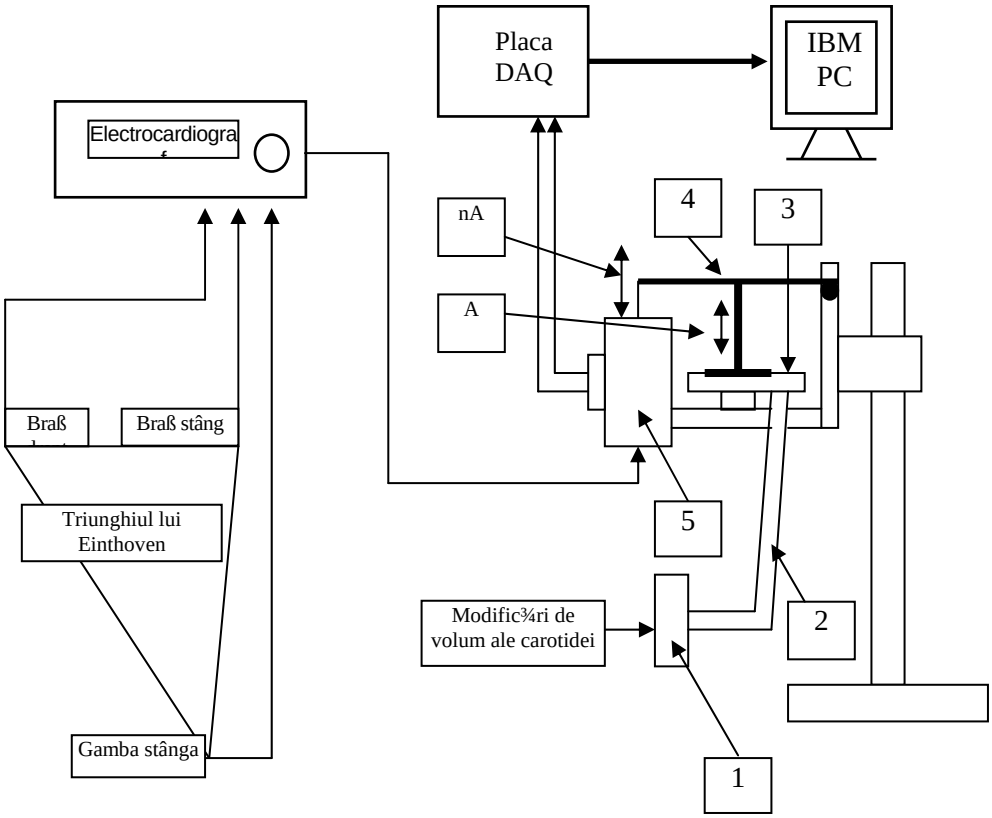


Fig. 1. *Schema de principiu a sistemului de achiziţie a datelor destinat monitorizării paralele a activităţii electrice cardiace şi pulsului carotidian la om.*
1 - Capsula de captare a modificărilor de volum ale arterei carotide. 2 - Tub de cauciuc. 3 - Tambur cu membrană elastică. 4 - Pârghie de amplificare a mişcării. 5 - Traductor de deplasare. A şi nA semnifică amplificarea de n ori a vibraţiilor membranei.

Electrocardiograful. Prezintă toate unitățile specifice de culegere a semnalului electric cardiac. Achiziția datelor se realizează conform principiilor clasice, utilizându-se derivațiile standard pe care le conferă acest aparat. Singura adaptare constă în conectarea blocului de amplificare la placa de achiziție. Ca urmare, semnalul cules şi amplificat de către aparat este ulterior transmis calculatorului prin intermediul acesteia.

Electrosfigmograful. Din punct de vedere constructiv, acesta se bazează pe captarea modificărilor de volum ale arterei carotide cu ajutorul unei capsule de culegere (1) care se fixează pe gât, în zona cu mişcările pulsatile cele mai pronunțate. Această piesă face parte dintr-un sistem pneumatic etanş, care conduce modificările de presiune spre tamburul cu membrană (3), cu rol de traductor de presiune. Vibrațiile membranei sunt preluate şi amplificate printr-un sistem de pârghii (4), care le transmite în acelaşi timp traductorului de deplasare (5). Acesta are menirea de a transforma mişcările liniare verticale (nA) în variații de frecvență transmise ulterior plăcii de achiziție (placa DAQ).

Placa de achiziție. Este modulul pentru preprocesarea şi transferul datelor către calculator.

Acest sistem electronic îndeplineşte trei funcții de bază. Astfel, pe unul din porturile de intrare este măsurată frecvența oscilatorului din componența traductorului de deplasare. În urma acestui proces rezultă şiruri de valori numerice încadrate în intervale de timp precis determinate prin program. Aceste şiruri de date reprezintă astfel prima grupă de date care urmează a fi trimise calculatorului.

O altă sarcină a plăcii de achiziție constă în preluarea semnalului electric generat de inimă şi amplificat în blocul de amplificare. Acest semnal este ulterior convertit în valori numerice prin intermediul unui convertor analog-digital, încorporat în microcontrolorul plăcii de achiziție. În urma acestui proces rezultă cel de-al doilea şir de date valorice.

Cele două grupe de date astfel generate pe baza semnalelor analoage sunt transmise calculatorului în timp real prin intermediul interfeței seriale. În acest mod, placa îndeplineşte cel de-al treilea rol – acela de element de transmisie.

Transmiterea datelor se realizează alternativ, unei valori de frecvență urmându-i una de tensiune. Chiar dacă apare în acest fel un mic decalaj, acesta este întrutotul nesemnificativ ca valoare de timp şi de aceea cele două trasee (Fig. 2) pot fi considerate ca simultane.

Pachetul de programe. Constă într-o structură software care asigură mai multe facilități.

Astfel, după cum am arătat mai sus, transmisia datelor prin interfața serială se realizează în timp real. În consecință, rezultatul este o monitorizare pe viu ("on line"), calculatorul rulând pe monitor graficele analoage rezultate prin procesarea celor două şiruri numerice amintite. Simultan acestui proces, datele sunt automat salvate în fişiere proprii pe harddisk.

Ulterior achiziției şi independent de aceasta, datele pot fi oricând reactualizate prin intermediul unui program de citire sub forma unor trasee paralele mai mult sau mai puțin condensate, în funcție de durata înregistrării. Una dintre facilitățile programului cititor este tocmai aceea de a conferi utilizatorului capacitatea de a alege, mări şi analiza pasajele cele mai semnificative dintr-o înregistrare care poate dura oricât.

Rezultate şi discuții. Cu ajutorul sistemului descris mai sus am reuşit obținerea unor înregistrări de tipul celei din Fig. 2.

După cum se poate observa aici, toate componentele celor două tipuri de trasee – anacrota, catacrota şi dicrotul pentru traseul sfigmografic, respectiv undele P, QRS şi T pentru cel al electrocardiogramei – se evidențiază cu suficientă claritate şi pot fi studiate în detaliu. Facem precizarea că denivelările de mai mică amplitudine de pe panta descendentă a sfigmogramei se datorează inerției sistemului de amplificare al sfigmografului şi nu trebuie confundate cu unda dicrotă.

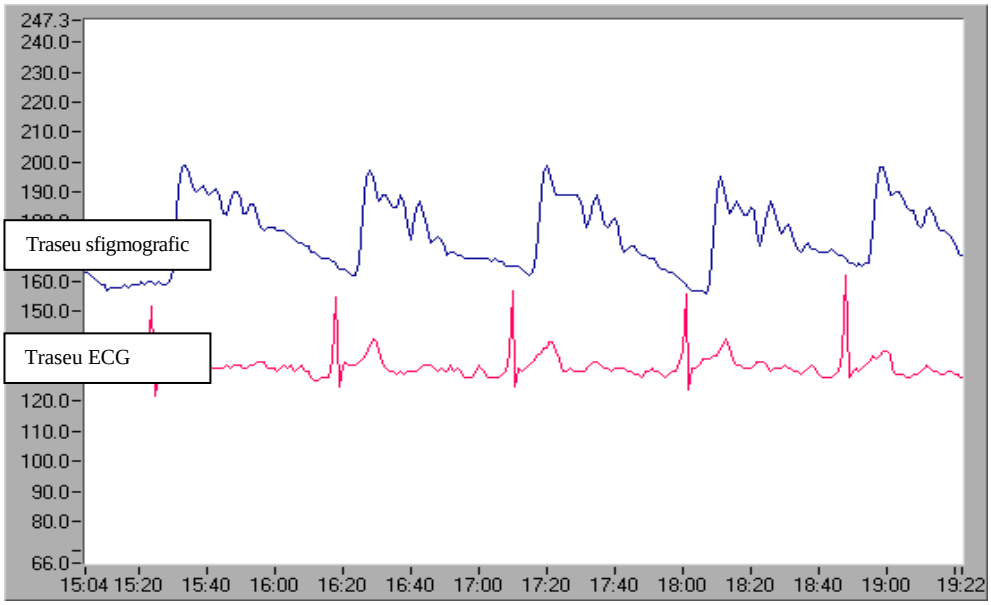


Fig. 2. *Fragment dintr-o înregistrare paralelă a electrocardiogramei şi sfigmogramei.*

Facilitățile programului de citire şi analiză permit, după realizarea unor etalonări ale înălțimii semnalelor înregistrate, măsurarea cu precizie a tuturor parametrilor temporali şi de amplitudine stabiliți. Se pot măsura astfel amplitudinile undelor P, QRS şi T, precum şi durata acestora şi a segmentelor care le separă.

În mod similar, se pot determina duratele componentelor sfigmogramei şi stabili momentul apariţiei dicrotului. Luând în considerare faptul că în urma unor etalonări exacte se poate măsura cu precizie amplitudinea maximă a undei pulsatile şi că aceasta este proporţională cu debitul sistolic, variaţiile acestui factor pot fi de asemenea urmărite pe baza indicelui sfigmografic amintit.

Analizînd întreaga desfăşurare a înregistrării sau doar un fragment din cadrul acesteia, se poate stabili de asemenea frecvenţa cardiacă, în mod obligatoriu egală cu cea a undelor pulsatile.

Principalul avantaj al unei astfel de monitorizări constă în faptul că înregistrarea paralelă a celor două trasee permite o analiză integrată a acestora.

Este posibilă, de exemplu, determinarea perioadei scurse de la manifestarea undei QRS a electrocardiogramei până la captarea undei pulsatile la nivelul carotidei.Acest indice permite stabilirea sau măcar estimarea stării de elasticitate a pereţilor arteriali. Astfel, se poate aprecia că în cazul diminuării elasticităţii arteriale, această perioadă va fi mai redusă decât într-o situaţie normală, viteza undei pulsatile fiind mai mare.

În **concluzie**, având în vedere cele arătate mai sus, se poate aprecia că metoda prezentată este utilă pentru studiul integrat al parametrilor cardiovasculari amintiţi, atât în ceea ce priveşte caracteristicile tehnice ale sistemului care permite folosirea ei, cât mai ales capacităţile de stocare şi analiză a datelor.

BIBLIOGRAFIE

1. Neunlist, M., Tung, L., *Optical recording of ventricular excitability of frog heart by an extracellular stimulating point electrode*, "Pace", **17**, 1994, 1641-1654.
2. Neunlist, M., Tung, L., *Dose-dependent reduction of cardiac transmembrane potential by high-intensity electrical shocks*, "Am. J. Physiol.", **273**, 1997, H2817-H2825.
3. Neunlist, M., Zou, S., *Design and use of an "optrode" for optical recordings of cardiac action potentials*, "Pflügers Arch.", **420**, 1992, 611-617.
4. Patriciu, A., Sevcencu, C., *Sistem de monitorizare simultană a parametrilor bioelectrici şi mecanici ai activităţii inimii izolate de broască*, "Bul. Soc. Naţl. Biol. Cel.", Nr. 26, 1998, 163.
5. Sevcencu, C., *Effects of certain cardioinhibiting and cardioactivating factors reflected in the total bioelectrical activity of isolated frog heart*, "Abstr., 4th Natl. Conf. Biophys. (Cluj-Napoca, 1997)", 1997, 33.
6. Sevcencu, C., Ardelean, C., *Correlations between bioelectrical events and ventricular motility assessed by means of an original system for double monitoring of frog isolated heart activity*, în *Actualităţi în creşterea şi patologia animalelor domestice*, p. 94 - 96, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
7. Sevcencu, C., Ardelean, C., *Individual bioelectrical activity of the heart chambers in isolated and perfused frog hearts*, în *Actualităţi în creşterea şi patologia animalelor domestice*, p. 97 - 99, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.

8. Sevcencu, C., Patriciu, A., Chihaia, E., *System for monitoring the total bioelectrical activity of isolated frog heart*, "Abstr., 4th Natl. Conf. Biophys. (Cluj-Napoca, 1997)", 1997, 34.
9. Syme, D.A., *Influence of extent of muscle shortening and heart rate on work from frog heart traberculae*, "Am. J. Physiol.", **265**, 1993, 310-319.
10. Syme, D.A., Josephson, R.K., *Influence of muscle length on work from trabercular muscle of frog atrium and ventricle*, "J. Exp. Biol.", **198**, 1995, 2221-2227.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

EFECTUL DIGOXINEI ASUPRA UNOR PARAMETRI AI CONTRACŢIEI MIOCARDULUI VENTRICULAR DE BROASCĂ

CĂLIN ARDELEAN*, CRISTIAN SEVCENCU* şi CLAUDIA KISS*

SUMMARY. – The Effect of Digoxin on Some Parameters of the Contraction of Ventricular Myocardium in Frog. The role of digoxin in affecting transmembrane calcium fluxes is well established in mammalian cardiac myocytes. In order to see whether digoxin also induces calcium-related effects on ventricular parameters in ectotherms, we performed the present experiments on isolated frog hearts by means of a previously presented data acquisition system. Taking into consideration that the digoxin-induced calcium disturbances would be reflected mainly in changes of the ventricular contractility, we have measured its classical parameters – contraction amplitude, contraction period, contraction plateau and relaxation period, as well as some original ones, such as contraction velocity, force, mechanical work and heart power. Our results are consistent with those obtained by others in mammalian hearts and demonstrate that digoxin has a positive inotropic effect on the frog ventricle. Thus, all the parameters mentioned above showed significant initial increases, followed by their stabilisation above the basic values during the second and the third time intervals. In terms of cardiac frequency, we have established a severe bradycardia which was not observed in mammals. Therefore, the conclusion of our study is that, like in mammals, digoxin affects the mechanical activity of the frog hearts, and its inotropic and chronotropic effects are probably due to changes induced by this agent in the calcium activity.

Digoxina este un glicozid natural care face parte din categoria cardiotonicelor, acest compus fiind cunoscut şi utilizat de multă vreme în tratamentul unor afecţiuni cardiace caracterizate prin incapacitatea inimii de a asigura afluxul sangvin necesar unei oxigenări tisulare corespunzătoare.

Plante medicinale cu conţinut bogat în glicozide cardiace erau cunoscute încă de acum 3000 de ani de către vechii egipteni. Astfel de agenţi au fost însă folosiţi sporadic şi cu consecinţe variabile până în secolul trecut, când William Withering (citat în [6]) a publicat o monografie, în care a descris, între altele, efectele clinice ale unor extracte digitalice.

* *Universitatea "Babeş-Bolyai", Catedra de Fiziologie animală, 3400 Cluj-Napoca, România.*
E-mail: sevcr@biolog.ubbcluj.ro (C. Sevcencu)

Dintre steroizii cardiaci comuni, denumiți şi cardenolide [6], digoxina - care poate fi considerată prototipul acestora - are o structură chimică ce combină un nucleu steroid cu un inel lactonic nesaturat şi o serie de glucide legate la carbonul 3 al nucleului.

Pe lângă plantele consacrate ca sursă a unor astfel de extracte, îndeosebi *Digitalis purpurea* şi *Digitalis lanata*, au fost identificate specii de batracieni, ale căror glande tegumentare secretă aşa numitele bufadienolide [6], care diferă de cardenolide doar la nivelul inelului lactonic printr-un număr diferit de atomi de carbon. Astfel, recent a fost evidențiat un efect asemănător digoxinei pentru o substanță extrasă din venin de *Bufo marinus* [2]. Mai mult decât atât, în urina umană a fost identificat un factor "digoxin-like" de natura endogenă [4], care nu poate fi diferențiat prin metode fizico-chimice de digoxină. S-a demonstrat, de asemenea, că această substanță acționează la nivel celular ca şi extractele digitalice prin blocarea ATP-azei de Na^+-K^+ [1].

Dintre efectele bine studiate, menționăm acțiunea inotropă pozitivă a digoxinei asupra muşchiului cardiac [6, 7]. Creşterea capacității de contracție a miocitului cardiac se datorează în special afinității mărite a actinei pentru miozină ca efect al acumulării de calciu liber în citosol. Mecanismul celular de acțiune a glicozidului are la bază blocarea funcționării ATP-azei de Na^+-K^+ prin cuplare cu aceasta [14]. Rezultatul acestui cuplaj constă în creşterea concentrației citosolice a ionului Na^+ şi, prin aceasta, în intensificarea activității de internalizare a calciului, realizată de către schimbătorul Na^+-Ca^{2+} din sarcolemă [6].

Pe lângă inducerea inotropiei pozitive, digoxina determină şi efecte aritmogene, cum ar fi tahicardia [5] şi fibrilația ventriculară [3].

Literatura de specialitate tratează cu predilecție efectele determinate de digoxină asupra parametrilor activității mecanice a inimii de mamifer. Pentru a caracteriza din punct de vedere mecanic motricitatea ventriculară sunt folosiți cel mai adesea indici cum ar fi forța de contracție, perioada de contracție, rata de creştere şi cea de scădere a forței contractile, timpul de atingere a 10% din forța finală [7].

De exemplu, la concentrația de 25 μg/ml a digoxinei, forța de contracție manifestă o creştere de scurtă durată urmată de o scădere a acesteia [3].

În bibliografia consultată, referirile la efectele digoxinei asupra activității inimii vertebratelor inferioare sunt puține şi disparate. Cu toate acestea, cercetarea mecanismelor bioelectrice şi mecanice care stau la baza activitații inimii de broască reprezintă un subiect de actualitate în explicitarea fenomenelor care guvernează funcția cardiacă [8-10, 12, 19-21].

Pornind de la cele enunțate mai sus, ne-am propus să urmărim efectele induse de digoxină asupra activității mecanice a ventriculului inimii izolate de broască. În acest scop, am elaborat o schemă de cuantificare a acestor efecte pe baza unor parametri, pe care i-am stabilit în aşa fel încât să ofere o imagine cât mai cuprinzătoare a desfăşurării ciclului mecanic amintit, atât în condiții bazale, cât şi ca urmare a intervenției cu digoxină.

Material şi metode. Am lucrat pe un lot experimental alcătuit din patru exemplare adulte de *Rana ridibunda*. Broaştele au fost paralizate şi apoi decapitate conform metodelor standard.

Pentru monitorizarea activității mecanice ventriculare, inimile au fost izolate și plasate în dispozitivul de perfuzie al unui sistem de achiziție de date (DAQS) conceput şi realizat în laboratoarele noastre [11, 15, 18]. Pe scurt, acesta este alcătuit din patru module: un tanc de perfuzie format din trei rezervoare pentru soluțiile utilizate, dispozitivul de perfuzie, placa de achiziție și calculatorul ca unitate centrală.

Au fost alimentate doar două dintre rezervoarele tancului, unul cu ser Ringer normal, iar celălalt cu o soluție de digoxină dizolvată în ser Ringer la o concentrație de 10 μg/ml.

Izolarea inimii s-a realizat după procedeele utilizate în cadrul laboratoarelor noastre [13], care au fost însă adaptate în conformitate cu cerințele sistemului de monitorizare utilizat.

Astfel, după înlăturarea platoului sternal şi a pericardului, s-a introdus în vârful ventriculului un cârlig-electrod cu rolul de a fixa acest pol cardiac la traductorul de deplasare care face parte din alcătuirea dispozitivului de perfuzie. Atunci când se intenționează monitorizarea activității electrice în paralel cu cea mecanică, acest cârlig joacă şi rolul electrodului activ. Canula cardiacă a fost introdusă la baza sinusului venos şi legată strâns de pereții acestuia. După desprinderea de țesuturile adiacente şi declanşarea fluxului de ser Ringer din primul rezervor, inima a fost fixată în dispozitivul de perfuzie al DAQS [16, 17] prin ataşarea canulei cardiace la capul de perfuzie şi a cârligului la traductorul de deplasare.

După stabilizarea ritmului cardiac a fost declanşat procesul de monitorizare pentru înregistrea unui traseu bazal (de referință) cu o durată de 30 de secunde. În secunda 30, fluxul de ser Ringer normal a fost oprit simultan cu declanşarea celui al serului în care a fost dizolvată digoxina. S-a avut în vedere păstrarea aceleiaşi presiuni de perfuzare pe parcursul întregii perioade de culegere a datelor. Înregistrarea a continuat pe fondul alimentării inimii cu soluția de digoxină încă două minute.

Pentru a caracteriza modificările induse de glicozid asupra activității mecanice ventriculare, au fost stabiliți şi măsurați următorii parametri:

- perioada de contracție (T contracție) – timpul scurs de la începerea contracției musculare până în momentul atingerii fazei de platou;
- perioada de platou (T platou) – timpul de stagnare amplitudinală;
- perioada de relaxare (T relaxare) – timpul cuprins între sfârşitul fazei de platou şi revenirea la traseul bazal;
- perioada totală (T total) – durata întregului ciclu contractil;
- amplitudinea contracției (amplitudine) – diferența dintre vârful secusei şi baza traseului.

Pe baza acestor modificări primare am calculat un al doilea set de parametri:

- forța de contracție (F), dată de formula F = kA, unde k reprezintă constanta de elasticitate a resortului, calculată pe baza unor etalonări, iar A este amplitudinea semnalului mecanic în mm;
- viteza de contracție (v), v = A / T contracție;
- puterea contractilă ventriculară (P) – relația vF/2 sau raportul dintre lucrul mecanic efectuat de forța F şi perioada de contracție (L / T contracție);
- frecvența cardiacă (f) – exprimă numărul de contracții efectuate în unitatea de timp.

Pentru eliminarea variațiilor datorate eventualelor diferențe legate de caracteristicile intrinseci ale fiecărei inimi, modificările parametrilor s-au exprimat în valori procentuale față de traseul bazal, considerat 100 %.

Măsurătorile s-au făcut la intervale de timp a 45 s, prima efectuându-se la 15 s, a doua la 60 s, iar ultima la 105 s după tratarea cu digoxină.

Prelucrarea statistică s-a făcut cu ajutorul testului "t" din programul Microsoft Excel, comparând şirurile de valori măsurate pe traseul de bază cu cele înregistrate după aplicarea soluției cu digoxină.

Rezultate. În cazul primului set de indici ai traseului mecanic, semnalăm faptul că digoxina determină o creştere grupată a acestora, cel puțin la 15 s după aplicarea sa. În momentele următoare de determinare, situate la 60 s şi 105 s, variația acestora nu mai este atât de unitară.

În Tabelul 1, alături de variația celorlalți parametri, sunt prezentate modificările procentuale ce afecteaxă perioada întregului eveniment contractil (T total). Acestea se desfăşoară sincron cu ale celorlalți parametri, observându-se la cei trei timpi de determinare majorări cu 22, 28,9 şi 36,4% relativ la perioada de referință.

Tabel 1

Valorile procentuale de variație ale perioadelor ciclului mecanic ventricular şi ale amplitudinii contracției la 15, 60 şi 105 secunde după aplicarea digoxinei

Parametrul	Traseu bazal	Efectul digoxinei la		
		15 s	60 s	105 s
T contracție	100	118,36	125,77	136,65
p		0,08	0,04	0,02
T platou	100	122,11	131,87	139,46
p		0,08	0,04	0,1
T relaxare	100	143,32	148,63	152,95
T total	100	122,1	128,9	136,47
p		0,05	0,01	0,02
amplitudine	100	126,77	120,24	122,31
p		0,03	0,06	0,04

Un parcurs asemănător urmează şi perioada platoului de contracție, caracterizată prin creşteri aproape liniare ale duratei sale de desfăşurare: 122% la 15 s, 131% la 60 s şi 139% la 105 s de la intervenția cu soluția test.

După cum se poate observa în Fig. 1, parametrul temporal ce înregistrează creşterea cea mai importantă este perioada de relaxare (T relaxare), aceasta atingând valori mai mari cu 43% la 15 s după aplicarea digoxinei comparativ cu valoarea de bază. La 60 s, durata relaxării creşte cu 48%, pentru ca la 105 s de tratare cu soluție ce conține digoxină, aceasta să se majoreze cu 52%.

Perioada de contracție evoluează ascendent față de nivelul bazal la 118% după 15 s, 125% după 60 s şi la 136% pentru ultima determinare (105 s de la aplicarea digoxinei). Amplitudinea descrie un traseu diferit comparativ cu cele parcurse de indicii temporali, începând cu măsurătorile făcute după 60 s de la începerea perfuzării cu soluția test. Valoarea acesteia are în prima fază tendința de creştere, la 15 s depăşind cu 26,7% valoarea martor, pentru ca apoi să se diminueze şi să se stabilizeze la valori de 120 – 122% față de cele bazale.

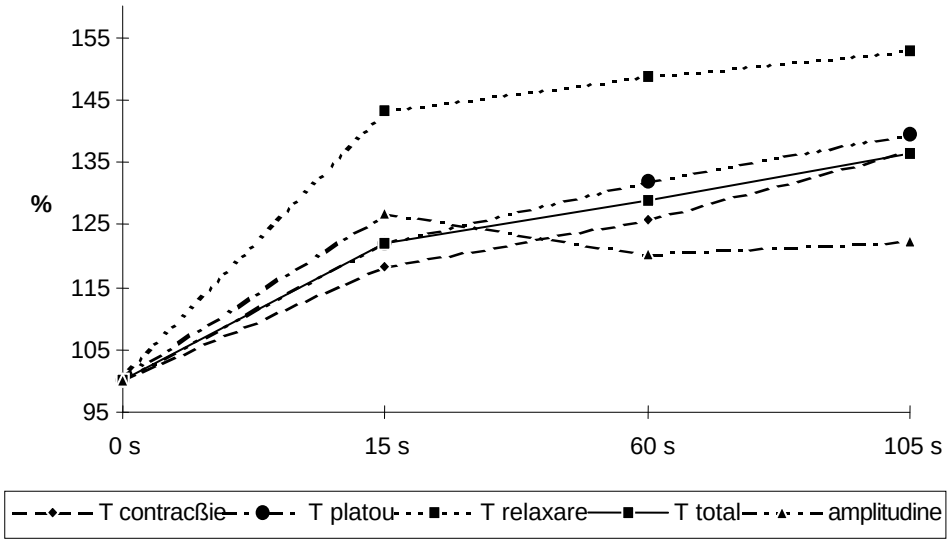


Fig. 1. *Variația parametrilor temporali şi a amplitudinii la 15, 60 şi 105 secunde după aplicarea digoxinei.*

Cel de-al doilea set de parametri prezintă forme de variație distincte de cele ale indicilor anteriori. Ascensiunea acestora nu este atât de evidentă sau, dimpotrivă, prezintă diminuări valorice – cazul vitezei de contracție, care scade la 60 s sub valoarea de 100% (95,3%), pentru ca la determinarea făcută după 105 s să măsoare cu 10,7% mai puțin decât pe traseul de referință (Tabel 2).

Tabel 2

Valorile procentuale de variație ale forței, puterii şi vitezei de contracție a miocardului ventricular la 15, 60 şi 105 secunde după aplicarea digoxinei

Parametrul	Traseu bazal	Efectul digoxinei la		
		15 s	60 s	105 s
Forța	100	126,35	120,1	122,1
p		0,04	0,06	0,04
Puterea	100	135,675	115,325	109,725
p		0,06	0,2	0,2
Viteza	100	106,975	95,3	89,35
p		0,3	0,3	0,05

Valorile forței de contracție (F) calculată în timp nu înregistrează variații constant pozitive. După cum relevă şi Fig. 2, traseul acesteia suportă o inflexiune, pentru că după ce valoarea ei creşte (126%) în determinarea de la 15 s, urmează o diminuare a capacități contractile ventriculare la 110% (60 s), după care se înregistrează o nouă creştere – 122% față de valoarea bazală după 105 s.

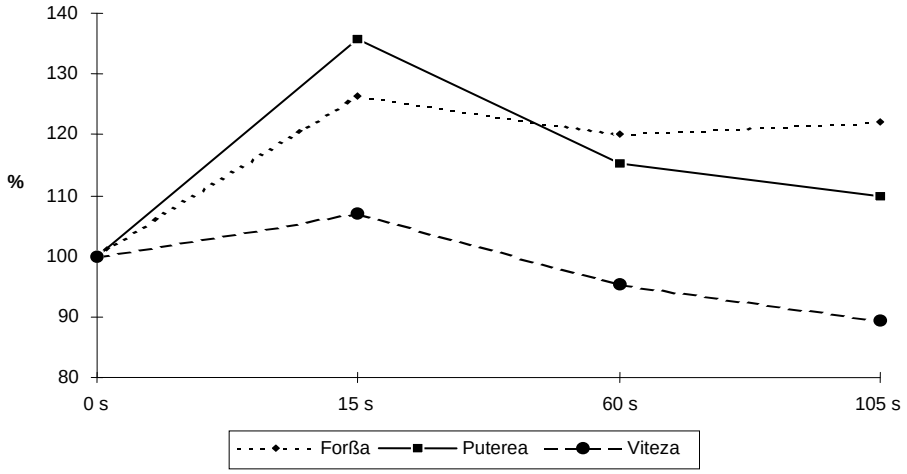


Fig. 2. *Variația parametrilor forță, putere şi viteză la 15, 60 şi 105 secunde după aplicarea digoxinei.*

Puterea contractilă (P) se modifică procentual cel mai mult la prima măsurare: 36,5% peste puterea de lucru a cordului în condițiile perfuzării cu ser Ringer. În celelalte două puncte de colectare a datelor s-au găsit puteri valoric mai scăzute, dar totuşi superioare celor bazale cu 15,3% şi, respectiv, cu 9,7%.

Singurul parametru caracterizat de o scădere importantă este frecvența cardiacă, ce descreşte aproximativ cu 25% comparativ cu frecvența înregistrată pe fondul perfuzării cu ser Ringer normal (Fig. 3).

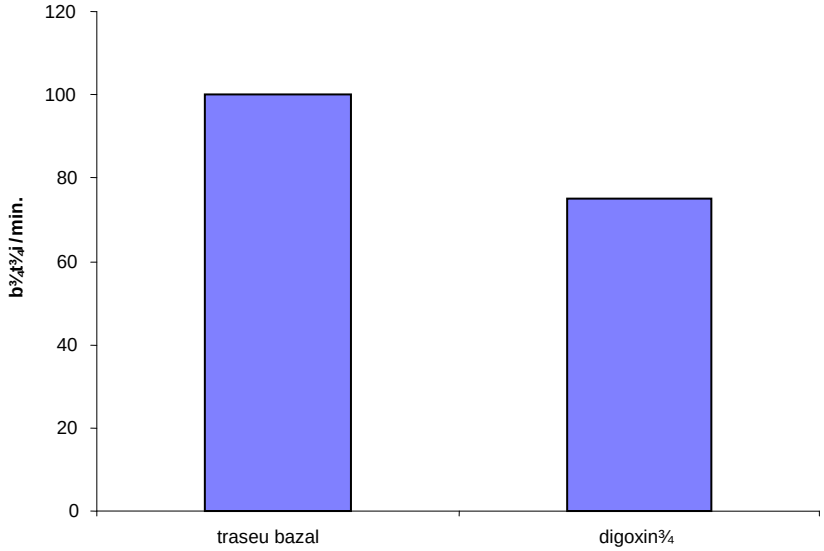


Fig. 3. *Variația frecvenței de contracție consecutiv aplicării digoxinei.*

Discuții. Creşterea perioadelor de contracție, relaxare, a platoului, precum şi a amplitudinii contracției ventriculare ca urmare a tratamentului cu digoxină poate fi pusă pe seama creşterii afinității actinei pentru miozină în urma acumulărilor de Ca^{2+} liber în citosol [6]. Creşterea concentrației calciului influențează în mod nemijlocit activitățile contractile rezultante ale cuplajului actină – miozină, majorarea perioadei de relaxare fiind probabil o consecință a acestor procese.

În aceeaşi ordine de idei, mărirea duratei unui ciclu contractil complet este rezultatul creşterii timpilor componenți ai acestuia. Acest fapt influențează direct şi frecvența cardiacă în sensul diminuării sale, pentru concentrația de 10 μg/ml folosită de noi înregistrându-se efecte bradicardice.

Dintre parametrii primari, amplitudinea este singurul care nu are o creştere stabilă în timp, prezentând o diminuare față de valorile măsurate în punctul de la 15 s cu 4 – 6%. Aceasta este cauza pentru care forța de contracție este caracterizată de un traseu asemănător cu cel al amplitudinii, cei doi parametri variind direct proporțional. Diminuarea forței contractile a miocardului în urma acțiunii digoxinei, după o creştere de scurtă durată, este în concordanță cu datele din literatura consultată [3].

Deşi perioada de contracție şi amplitudinea cresc ca efect al aplicării digoxinei, viteza de contracție coboară sub această valoare bazală în determinările de la 60 s şi 105 s, demonstrând că perioada de contracție nu creşte în urma majorării amplitudinii, cei doi indici variind independent unul față de celălalt.

Lucrul mecanic efectuat în unitatea de timp se caracterizează, la fel ca şi ceilalţi parametri, printr-o creştere în faza iniţială, urmată de o revenire spre valoarea bazală datorată în special scăderii accentuate a vitezei de contracţie.

Concluzii. 1. Digoxina măreşte capacitatea contractilă a muşchiului cardiac prin creşterea duratei stării active a sarcomerilor miocitari.

2. Digoxina produce un dezechilibru de scurtă durată în activitatea mecanică, efect ulterior şi parţial anihilat, inima stabilizându-se, însă, pe noi coordonate.

3. Inducerea fenomenului de bradicardie, efect contrar celor obţinute de alţi autori pe inimi de mamifer, poate fi atribuită fie concentraţiei mici de glicozid cu care s-a lucrat, fie unor caracteristici particulare de reacţie a inimii de broască la acţiunea digoxinei.

BIBLIOGRAFIE

1. Bagrov, A.Y., Fedorova, O.V., Roukoyatkina, N.I., Zhabko, E.P., *Effect of endogenous digoxin-like factor and digoxin antibody on myocardial Na^+, K^+-pump activity and ventricular arrhythmias in acute myocardial ischaemia in rats*, "Cardiovasc. Res", **27**, 1993, 1045-1050.
2. Bagrov, A.Y., Roukoyatkina, N.I., Fedorova O.V., Pinaev, A.G., Ukhanova, M.V., *Digitalis-like and vasoconstrictor effects of endogenous digoxin-like factor(s) from the venom of* Bufo marinus *toad*, "Eur. J. Pharmacol.", **234**, 1993, 165-172.
3. Gok, S., Ulker, S., Evinc, A., *Possible contribution of leukotrienes in the arrhythmogenic effects of digoxin on isolated guinea-pig hearts*, "Pharmacology", **57**, 1998,279-284.
4. Goto, A., Ishiguro,T. Yamada, K., Ishii, M., Yoshioka, M., Eguchi, C., Shimora, M., Sugimoto, T., *Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin*, "Biochem. Biophys. Res. Commun.", **173**, 1990, 1093-1101.
5. Kaplanski, J., Weinhouse, E., Topaz, M., Genchik, G., *Verapamil and digoxin*: *interactions in the rat*, "Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.", **42**, 1983, 377-388.
6. Katzung, B.G., *Basic & Clinical Pharmacology*, p. 143, Lange Med. Publ., Los Altos, California, 1984.
7. Kocic, I., Korolkiewicz, K. Z., *Digoxin effects in the guinea pig heart: interaction with rimalkalim*, "Pharmacol. Res.", **37**, 1998, 67-73.
8. Neunlist, M., Tung, L., *Optical recording of ventricular excitability of frog heart by an extracellular stimulating point electrode*, "Pace", **17**, 1994, 1641-1654.
9. Neunlist, M., Tung, L., *Dose-dependent reduction of cardiac transmembrane potential by high-intensity electrical shocks*, "Am. J. Physiol.", **273**, 1997, H2817-H2825.
10. Neunlist, M., Zou, S., *Design and use of an "optrode" for optical recordings of cardiac action potentials*, "Pflügers Arch.", **420**, 1992, 611-617.
11. Patriciu, A., Sevcencu, C., *Sistem de monitorizare simultană a parametrilor bioelectrici şi mecanici ai activităţii inimii izolate de broască*, "Bul. Soc. Naţl. Biol. Cel.", Nr. 26, 1998, 163.

12. Riemer, T.L., Sobie, E.A., Tung, L., *Stretch–induced changes in arrhythmogenesis and excitability in experimentally based heart cell models*, "Am. J. Physiol.", **275,** 1998, 431-442.
13. Roşioru, C., Sevcencu, C., Gherghel, P., *Lucrări practice de Fiziologie animală*, Cluj – Napoca, 1995.
14. Schmidt, T.A., Kjeldsen, K., *Enhanced clearance of specifically bound digoxin from human myocardial and skeletal muscle samples by specific digoxin antibody fragments: subsequent complete digitalis glycoside receptor (Na, K-ATP-ase) quantification*, "J. Cardiovasc. Pharmacol.", **17**, 1991, 670-677.
15. Sevcencu, C., *Effects of certain cardioinhibiting and cardioactivating factors reflected in the total bioelectrical activity of isolated frog heart*, "Abstr., 4th Natl. Conf. Biophys. (Cluj-Napoca 1997)", 1997, 33.
16. Sevcencu, C., Ardelean, C., *Correlations between bioelectrical events and ventricular motility assessed by means of an original system for double monitoring of isolated frog heart activity*, în *Actualităţi în creşterea şi patologia animalelor domestice*, p. 94-96, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
17. Sevcencu, C., Ardelean, C., *Individual bioelectrical activity of the heart chambers in isolated and perfused frog hearts*, în *Actualităţi în creşterea şi patologia animalelor domestice*, p. 97-99, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
18. Sevcencu, C., Patriciu, A., Chihaia, E., *System for monitoring the total bioelectrical activity of isolated frog heart*, "Abstr., 4th Natl. Conf. Biophys. (Cluj-Napoca, 1997)", 1997, 34.
19. Syme, D. A., *Influence of extent of muscle shortening and heart rate on work from frog heart traberculae*, "Am. J. Physiol.", **265**, 1993, 310-319.
20. Syme, D. A., Josephson, R. K., *Influence of muscle length on work from trabercular muscle of frog atrium and ventricle*, "J. Exp. Biol.", **198**, 1995, 2221-2227.
21. Vornanen, M., Tuomennoro, J., *Effects of acute anoxia on heart function in crucian carp: importance of cholinergic and purinergic control*, "Am. J. Physiol.", **277**, 1999, R465-R475.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

UV-B-INDUCED DAMAGE AND RECOVERY OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY IN THE CYANOBACTERIUM *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803

COSMIN IONEL SICORA[*], MIHAIL DRĂGAN-BULARDA[**] and IMRE VASS[*]

SUMMARY. - Due to human activity the amount of ozone-depleting substances in the stratosphere increases dramatically. As a consequence, the level of photosynthetically relevant UV radiation reaching the Earth's surface raises. In this study we intended to detect how the UV-B influences the photosynthetic efficiency of cyanobacteria and their capacity of recovering after the stress. We also studied the temperature dependence of the damage and the recovery process.

Our conclusions show that the PS II protein complex appears to be one of the main targets of UV-B radiation in cyanobacteria and that the recovery process after UV-B damage is a complex one which depends on many factors.

Photosynthetically relevant solar radiation that reaches the Earth is divided into three main spectral regions: UV-B (280-320 nm), UV-A (320-400 nm) and photosynthetically active radiation, PAR (400-700 nm) [5]. Among these, the UV-B region is selectively attenuated by the stratospheric ozone layer [5]. By the contrary, UV-A and PAR radiation have no selective absorber and are affected mainly by light scattering. The biologically most damaging wavelengths below 280 nm, such as those of UV-C (200-280 nm) region, are absorbed almost completely by the atmosphere and, therefore, are insignificant for biological processes under natural conditions.

Recent reduction in the stratospheric ozone layer as a consequence of human activities [3, 10, 12, 16], allowing more UV-B radiation to reach the surface of Earth and the ecologically significant depths (10-15 m) of the ocean, is of concern because of the potential adverse effects on the biosphere [15]. An important action

[*] *Institute of Plant Biology, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, H – 6701 Szeged, Temesvári krt. 62, P.O. Box 521, Hungary.*
E-mail: sicora@nucleus.szbk.u-szeged.hu

[**] *Babeş-Bolyai University, Department of Plant Biology, 3400 Cluj-Napoca, Romania.*
E-mail: draganb@bioge.ubbcj.ro

site of UV-B radiation in plant cells is the photosynthetic apparatus, in which a sensitive target is the light energy-converting complex of PSII [1, 18]. *In vitro* studies indicate that the most UV-sensitive component of PS II electron transport is the water-oxidising complex [7, 14, 19]. The Q_A and Q_B quinone electron acceptors [6] as well as the Tyr-Z and Tyr-D redox-active tyrosine donors [20] are also potential targets of UV-B, but their damage appears to be slower than the impairment of water oxidation [19]. The apparently quinone- and Mn-independent protein loss may be related to direct effects on the polypeptide chain involving the redox-active tyrosines [18].

An important consequence of UV-B radiation is the degradation of the D1 and D2 subunits of the PS II reaction centre [6, 11, 17]. Despite intense research, the molecular mechanism of the UV-B-induced inhibition and recovery of PS II still remains unclear. Yet, it was shown that under low levels of UV-B radiation there is an enhanced turnover of both D1 and D2 proteins of PS II complex in higher plants [8]. The so-called D1 protein repair cycle is known to facilitate the restoration of PS II function after photoinhibition, caused by visible light, which damages mainly the D1 protein. This protein subunit of the membrane-bound photosystem II complex has a much higher turnover rate than the other PS II proteins. Thus, the D1 protein has to be replaced while the other PS II components are not newly synthesised [13].

In cyanobacteria, the photosynthetic system is tightly connected to the other principal metabolic pathways and is in itself a major metabolic sink for iron, nitrogen and carbon [2]. The general assembly of the photosynthetic membranes in cyanobacteria is similar to that of higher plants; therefore, *Synechocystis* 6803 might serve as a powerful model for studying the molecular mechanisms of stress response and long-term adaptation. Being naturally competent, this cyanobacterium can easily be transformed and foreign DNA integrates into its genome at a high frequency. Recently, the complete nucleotide sequence of the *Synechocystis* 6803 genome has been determined and the collection of annotated data (CyanoBase) is available over the Internet. Moreover, a useful promoter probing vector has been constructed and the recently published ‘plasmid shuffling’ method allows the manipulation and mutational analysis of essential genes in the organism [4].

The *psb*A genes code for the D1 protein subunit of the PS II reaction centre. In *Synechocystis* 6803 there are three different *psb*A genes named: *psb*A1, *psb*A2, *psb*A3. The *psb*A1 is not transcribed under natural conditions and its function is unknown. The *psb*A2 codes for the D1 protein under basal conditions, and the *psb*A3 codes for a D1 protein which was proved to be more resistant under stress conditions (UV-B irradiation, photoinhibition, cold stress etc.).

During the last years it was shown by different authors that modification in the physical status of the thylakoid membrane affects the turnover of the D1 subunit of PS II. High levels of unsaturation of fatty acids in the membrane increase membrane fluidity and produce a more efficient D1 exchange under repair conditions [9].

Materials and methods. *Culture conditions and strains*. In this study we used the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 wild type and one mutant of this strain which is a construct having the luciferase reporter gene under the regulation of the *psbA2* gene promoter. *Synechocystis* PCC 6803 was grown in BG-11 medium and air containing 5% CO_2 at 32^0C and 57 μE light intensity. Cells in exponential growth phase were harvested and adjusted to a chlorophyll concentration of 10 μg Chl/ml (A_{580}-1.7) for oxygen evolution measurements. In the case of luminescence measurements we used the cells at 5 μg Chl/ml.

UV-B and visible light treatment. In the case of UV-B damage and recovery experiments we used larger volumes of cell suspension (100 ml). The cells were irradiated in glass containers in a layer of 1.5 cm thickness under continuous sterring in water bath. A Villbert-Lourmat VL-215M lamp was used as UV-B source with maximal emission at 312 nm.The UV-B intensities varied in a range of 2 to 0.3 $mWcm^{-2}$. For filtering out the UV-C light we used six layers of 0.1-mm cellulose acetate filter (Clarfoil, Courtaluds Chemicals, UK). For recovery after UV-B irradiation the cells were exposed to 45 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ visible light under the same temperature conditions.

Oxygen evolution measurements. Steady state oxygen evolution was measured using a Hansatech DW2 O_2 electrode at a saturating light intensity (2000 $\mu E\ m^{-2}s^{-1}$) in the presence of 10 μl saturated solution of 2,5-dimethyl-*p*-benzoquinone as electron acceptor. We used a 2-ml sample of cell suspension at 10 $\mu g\ ml^{-1}$ chlorophyll concentration.

Results. In intact *Synechocystis* cells UV-B radiation induces a decrease in oxygen evolution as a consequence of decrease in the photosynthetic activity. Under our experimental conditions we obtained (Fig. 1) a decrease of about 50% of the initial oxygen evolution rate in about 120 min., with a high initial rate of the decrease to about 60% in the first 30 min. The *Synechocystis* cells have the capacity of recovery after UV-B damage if put in visible light. The rate of the recovery is directly dependent on light intensity if this does not exceed the photoinhibition values (data not shown). The rate of recovery is also dependent on the extent of the damage. Under normal light conditions (45 $\mu Em^{-2}s^{-1}$), from a damage value of 50% of initial oxygen evolution activity, the recovery is complete in about 2 hours (Fig. 1).

It is evident from our study that the temperature is also a factor which influences the extent of the damage caused by UV-B (data not shown) and the rate of recovery (Fig. 2). After an initial 33% damage of oxygen evolution activity, the recovery at 20^0C was very slow reaching a value of about 45% in 150 min. If we shifted the temperature of the sample to 30^0C, maintaining all the other parameters, the cells started to recover much faster reaching the 70% value in 30 min. (Fig. 2).

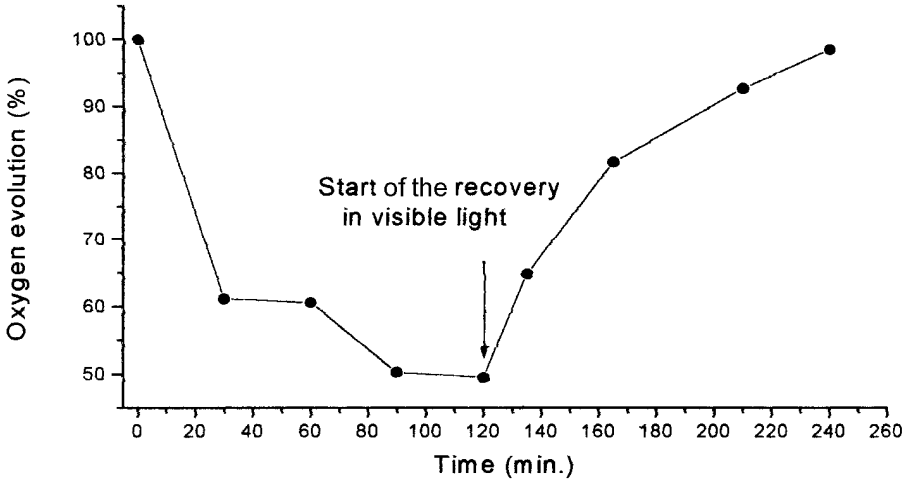


Fig. 1. *UV-B- induced damage of photosynthetic activity of* Synechocystis *PCC 6803 and recovery in visible light.*
The oxygen evolution rate is expressed as percentage of the initial rate.

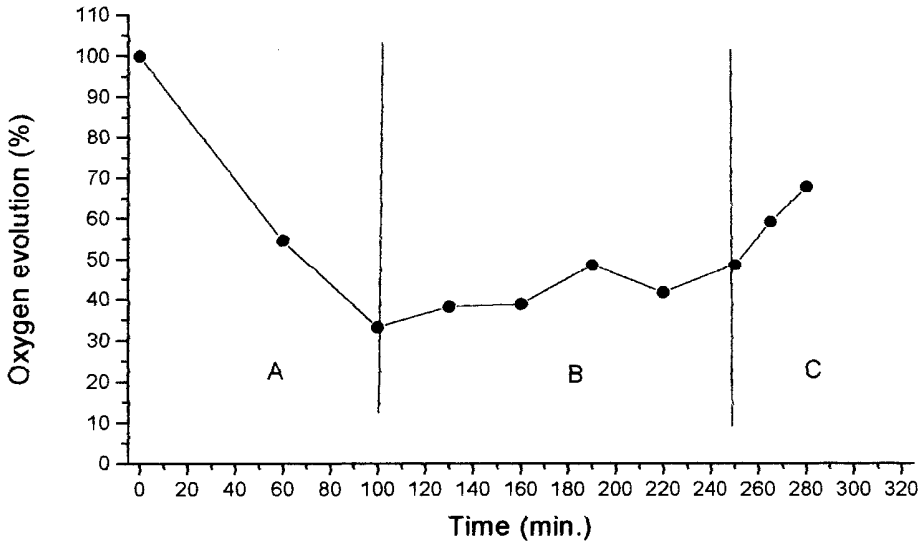


Fig. 2. *Effect of temperature on the rate of recovery following UV-B damage in* Synechocystis *PCC 6803.*
A - UV-B damage at 30^0C. B - Recovery in visible light ($45\mu Em^{-2}s^{-1}$) at 20^0C.
C - Recovery under the same light intensity at 30^0C.

The modifications in the recovery rate as a consequence of the temperature shift might be the result of the modifications in the physical status of the membrane. It was shown that modifications in the saturation degree of the fatty acids in the thylakoid membrane induce modifications in the efficiency of PS II protein subunits to assemble into the membrane [9]. In order to study the effect of membrane fluidity on the recovery process after UV-B damage we used a chemical agent, benzyl alcohol (BA), known to have a fluidising effect on biological membranes. First we studied the effect of BA on the oxygen evolution of the *Synechocystis* cells under control conditions and we obtained no significant changes. We used two different concentrations of BA, 10 mM and 20 mM which are within the range of the usually applied concentrations. During a period of 150 min. no relevant changes in the oxygen evolution were observed (Fig. 3).

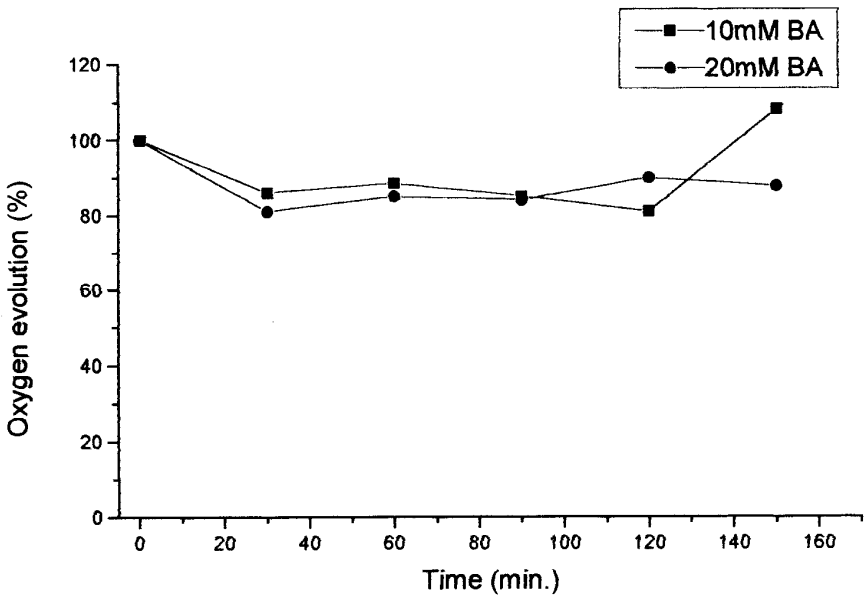


Fig. 3. *Effect of benzyl alcohol (BA) on the oxygen evolution rate of* Synechocystis *PCC 6803.*

For studying a longer time effect of BA we cultured the cyanobacterial cells in the presence of different concentrations of BA (5, 10, 20 and 30 mM) and we monitored the growth of the cells daily by measuring the absorbancy at 580 nm during a 6-day period (Fig. 4). This is the time for the cells under our culturing conditions to reach the stationary phase of the growth. The experiment showed that concentrations higher than 5 mM drastically inhibited the growth of the cells. At 5 mM BA, the growth was inhibited to an extent of 70.5% of the control without BA (Fig. 4).

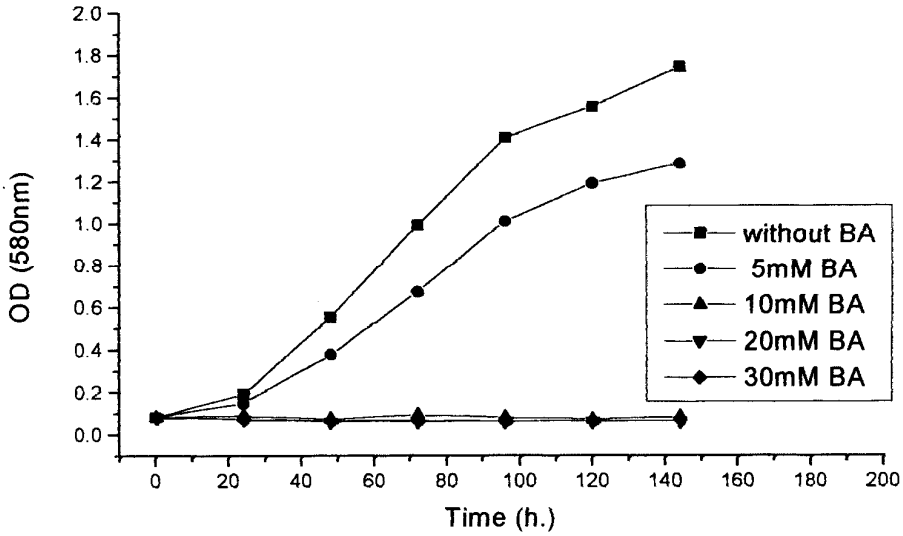


Fig. 4. *Influence of different concentrations of benzyl alcohol (BA) on the growth of* Synechocystis *PCC 6803.*

Concerning the UV-B damage and recovery, the BA had an inhibitory effect on recovery at 10 mM (Fig.5) or at higher concentrations (data not shown). Starting from a value of 30% of the initial oxygen evolution activity, the sample without BA recovered fully in a 2-hour period. The sample which contained 10 mM BA recovered to 45% starting from a 20% value in the same period of time (Fig.5). In the case of using a 5 mM BA concentration, the BA-treated sample was, after an initial drop, more resistant to UV-B damage and recovered faster (Fig.6). Using a mutant strain of *Synechocystis* which contains the luciferase gene under the $psbA_2$ promoter, we studied the expression of the gene in the presence of BA. Exposing the cells to 45 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ visible light, at 25°C, we observed, in about 2 hours, a 23-fold increase of the bioluminescence emission (Fig.7). When we added 10 mM BA to the cells, the extent of the increase was only 3.5-fold. This shows a clear inhibitory effect of the BA at the level of luciferase production.

Conclusions. 1. The photosynthetic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is, under visible light conditions, capable of full recovery from severe (about 50%) damages caused by UV-B radiation.

2. The change in the temperature during the recovery phase induced the modification of the rate of recovery. This effect was, probably, caused by the modification of the membrane fluidity which influences the turnover of membrane protein subunits of the PS II, especially D1 and D2.

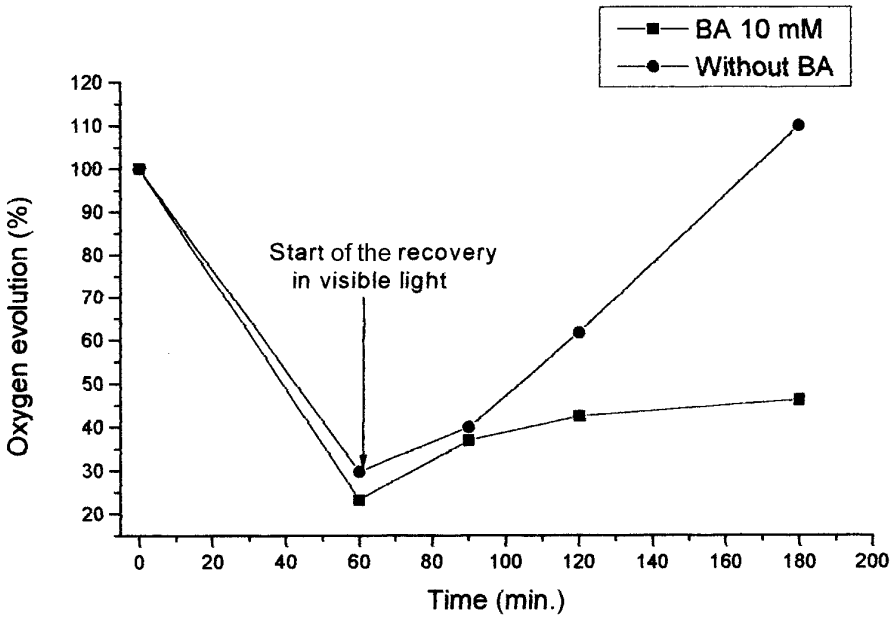


Fig. 5. *The effect of 10 mM benzyl alcohol (BA) on UV-B- induced damage and recovery of PS II in* Synechocystis *PCC 6803.*
Measurements were done at 30^0C. Intensity of visible light was $45\mu Em^{-2}s^{-1}$.

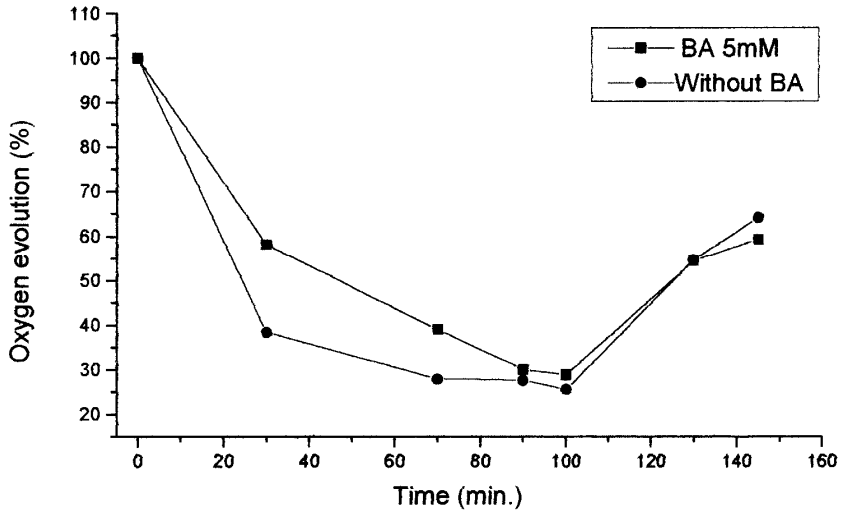


Fig. 6. *The effect of 5mM benzyl alcohol (BA) on UV-B- induced damage and recovery of PS II in* Synechocystis *PCC 6803.*
Measurements were done at 30^0C. Intensity of visible light was $45\mu Em^{-2}s^{-1}$.

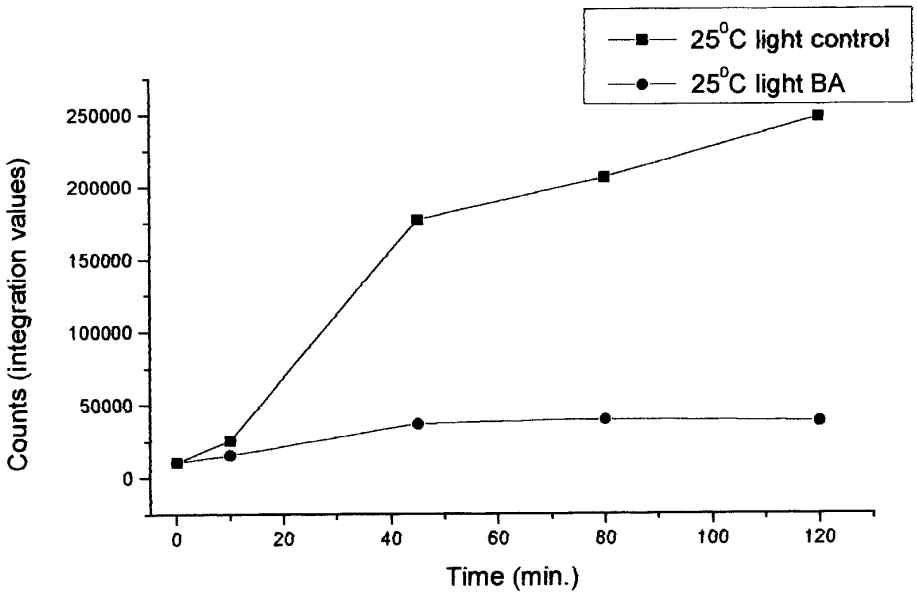


Fig. 7. *The effect of 10 mM benzyl alcohol (BA) on luminescence emission during visible light illumination of* Synechocytis *PCC 6803 strain containing the luciferase construct under* $psbA_2$ *promoter.*
Temperature of visible light illumination was 25^0C. Intensity of visible light was 45 $\mu Em^{-2}s^{-1}$. Light emission was measured at 30^0C in 1-ml samples of cell suspension (chlorophyll concentration: 5 μg/ml).

3. Addition of a fluidising agent such as benzyl alcohol is expected to induce an increased resistance to UV-B damage and a faster recovery. In contradiction with our expectations, BA acted as an agent which increased the damage and decreased the recovery.

4. Although BA did not seem to inhibit the oxygen evolution of intact cells cultivated for short periods of time, it acted as an efficient inhibitor of the cyanobacterial cells cultivated for longer time periods.

5. Our data indicate that benzyl alcohol inhibits the protein synthesis somewhere at the transcriptional level. Its membrane-fluidising effect manifests itself to some extent at low concentrations when its toxic effect is less obvious.

REFERENCES

1. B o r n m a n, J. F., *Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants,* "J. Photochem. Photobiol.", **B4**, 1989, 145-158.
2. C a m p b e l l, D., H u r r y, V., C l a r k e, A. K., G u s t a f s o n, P., O q u i s t, G., *Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation,* "Microbiol. Molec. Biol. Rev.", **62**, 1998, 667-683.
3. F r e d e r i c k, J. E., *Ultraviolet sunlight reaching the Earth's surface: a review of recent research,* "Photochem. Photobiol.", **57,** 1993, 175-178.
4. G l a t z, A., V a s s, I.,. L o s s, D. A., V i g h, L., *The* Synechocystis *model of stress: from molecular chaperones to membranes,* "Plant Physiol. Biochem.", **37**, 1999, 1-12.
5. G r e e n, A. E. S., S a w a d, W. T., S h e t t l e, E. P., *The middle ultraviolet reaching the ground,* "Photochem. Photobiol.", **19,** 1974, 251-259.
6. G r e e n b e r g, B. M., G a b a, V., C a n a a n i, O., M a l k i n, S., M a t t o o, A. K., E d e l m a n, M., *Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions,* "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", **86**, 1989, 6617-6620.
7. H i d e g, E., S a s s, L., B a r b a t o, R., V a s s, I., *Inactivation of photosynthetic oxygen evolution by UV-B irradiation: a thermoluminescence study,* "Photosynth. Res.", **38**, 1993, 455-462.
8. J a n s e n, M. A. K., G a b a, V., G r e e n b e r g, B. M., M a t o o, A. K., E d e l m a n, M., *Low treshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem II,* "Plant J.", **9**, 1996, 593-599.
9. K a n e r v o, E., A r o, E. M., M u r a t a, N., *Low unsaturation level of thylakoid membrane lipids limits turnover of the D1 protein of the photosystem II at high irradiance,* "FEBS Lett.", **364**, 1995, 239-242.
10. K e r r, J. B., M c E l r o y, C. T., *Evidence for large upwards trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion,* "Science", **262**, 1993, 1032-1034.
11. M e l i s, A., N e m s o n, J. A., H a r r i s o n, M. A., *Damage to functional components and partial degradation of the photosystem II reaction centre proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation,* "Biochim. Biophys. Acta", **1100**, 1992, 312-320.
12. M o l i n a, M. J., R o w l a n d, F. S., *Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone,* "Nature", **249**, 1974, 810-814.
13. P a u l a, M., L a a k o s, S., M a e n p a a, P., A r o, E. M., *Stepwise photoinhibition of photosystem II,* "Plant Physiol.", **177**, 1998, 483-490.
14. R e n g e r, G., V o l k e r, M., E c k e r t, H. J., F r o m m e, R., H o h m – V e i t, S., G r a b e r, P., *On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation,* "Photochem. Photobiol.", **49**, 1989, 97-105.
15. S m i t h, R. C., P r e z e l i n, B. B., B a k e r, K. S., B i d i g a r e, R. R., B o u c h e r, N. P., C o l e y, T., K r e n t z, D., M c I n t y r e, S., M a t l i c k, H. A., M e n z i e s, D., O n d r u s e k, M., W a n, Z., W a l t e r s, J., *Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters,* "Science", **255**, 1992, 952-959.
16. S t o l a r s k i, R., B i o k o v, R., B i s h o p, L., Z e f e r o s, C., S t a e h e l i n, J., Z a w o d n y, J., *Measured trends in stratospheric ozone,* "Science", **256**, 1992, 342-349.

17. T r e b s t, A., D e p k a, B., *Degradation of the D1 protein subunit of photosystem II in isolated thylakoids by UV light*, "Z. Naturforsch.", **45C**, 1990, 765-771.
18. V a s s, I., *Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus*, in P e s s a r a k a l i, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*, pp. 931-950, Dekker, New York, 1997.
19. V a s s, I., S a s s, L., S p e t e a, C., B a k o u, A., G h a n o t a k i s, D., P e r t o u l e a s, V., *UV-B-induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor site components*, "Biochemistry", **35**, 1996, 8967-8973.
20. Y e r k e s, C. T., K r a m e r, D. M., F e n t o n, J. M., C r o f t s, A. R., *UV-photoinhibition: studies* in vitro *and in intact plants*, in B a l t s c h e f f s k y, M. (Ed.), *Current Research in Photosynthesis*, Vol. 2, pp. 381-384, Kluwer, Dordrecht, 1990.

STUDIA UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI, BIOLOGIA, XLV, 2, 2000

PHOSPHATASE ACTIVITIES IN A BROWN LUVIC SOIL

ALINA SAMUEL[*], STEFAN KISS[**] and MARIA ŞANDOR[***]

SUMMARY. – Phosphatase (phosphomonoesterase) activities were determined in the 0–20-, 20–40- and 40–60-cm layers of a brown luvic soil submitted to a complex tillage (no-till and conventional tillage), crop rotation (2- and 6-crop rotations) and fertilisation [mineral (NP) fertilisation and farmyard-manuring] experiment. It was found that the activities decreased in the order: phosphatase activity measured in unbuffered reaction mixtures > acid phosphatase activity > alkaline phosphatase activity. Each activity decreased with increasing sampling depth. No-till – in comparison with conventional tillage – resulted in significantly higher soil phosphatase activities in the 0–20-cm layer and in significantly lower activities in the deeper layers. The soil under maize or wheat was more phosphatase-active in the 6- than in the 2-crop rotation. In the 2-crop rotation higher soil phosphatase activities were recorded under wheat than under maize. Farmyard-manuring of maize – in comparison with its mineral (NP) fertilisation – led to a significant increase in each activity. The enzymatic indicators of soil quality calculated from the values of phosphatase activities determined in the plots of the 6-crop rotation showed the order: farmyard-manured maize > minerally fertilised (m.f.) soybean > m.f. clover > m.f. maize (plot 4) > m.f. wheat > m.f. maize (plot 1). This order means that by determination of phosphatase activities valuable information can be obtained regarding fertility status of soils.

In continuation of our investigations, during which in October 1997 we determined actual and potential dehydrogenase and catalase activities in a brown luvic soil submitted to a complex tillage, crop rotation and fertilisation experiment at the Agricultural and Animal Breeding Experiment Station in Oradea (Bihor county) [10], now we report on the determination of phosphatase (phosphomonoesterase) activities in this soil.

It is well known (see the reviews [1, 2, 4-6, 8, 11]) that the phosphomonoesterase enzymes play an important role in P cycling in soil and, consequently, in P nutrition of plants, as these hydrolytic enzymes eliberate plant-available, mineral *o*-phosphate from organic P compounds, namely from P monoesters.

[*] *University of Oradea, Department of Plant Biology, 3700 Oradea, Romania. E-mail: agcc@texnet.ro*
[**] *Babeş–Bolyai University, Department of Plant Physiology, Laboratory for Environmental Enzymology and Microbiology, 3400 Cluj, Romania. E-mail: skiss@bioge.ubbcluj.ro*
[***] *Agricultural and Animal Breeding Experiment Station, 3700 Oradea, Romania*

The first data on phosphatase activity in the brown luvic soil at the Oradea Experiment Station were published by Ştefanic and his collaborators [12, 13]. They found that phosphatase activity was lower in soil sampled from NP-fertilised and limed plots than in that sampled from unfertilised and limed plots. Our present report contains the first data on the effects of complex management practices on the phosphatase activities in this brown luvic soil.

Materials and methods. The ploughed layer of the studied soil is of mellow loam texture, it has a pH value of 5.5, medium humus (2.32 %) and P (22 ppm) contents, but it is rich in K (83 ppm).

The experiment started in 1992. The experimental field occupying 3.84 ha was divided into plots and subplots for comparative study of no-till and conventional tillage, rotations of 2 and 6 crops, and mineral (NP) fertilisation and farmyard-manuring.

The crops of the two rotations are specified in Table 1. Each plot consisted of two subplots representing the no-till and conventional tillage variants. The plots were annually NP-fertilised at rates of 120 kg of N/ha and 90 kg of P/ha, excepting, in each year, a maize plot (in the 6-crop rotation) which received farmyard manure (50 t/ha) instead of mineral fertilisers. The plots (and subplots) were installed in three repetitions.

Table 1 also shows that in the 6-crop rotation there were, in 1995, 1998 and 1999, two minerally fertilised maize plots.

Table 1

Crops of the two rotations

Year	Rotation of 2 crops		Rotation of 6 crops					
	Plots		Plots					
	1	2	1	2	3	4	5	6
1992	Wheat	Maize	Maize	Soybean	Clover	Wheat	Maize (FYM)*	Flax
1993	Maize	Wheat	Soybean	Maize	Maize (FYM)	Oats - clover	Hemp	Wheat
1994	Wheat	Maize	Oats - clover	Maize (FYM)	Flax	Maize	Wheat	Soybean
1995	Maize	Wheat	Maize (FYM)	Maize	Wheat	Soybean	Maize	Oats - clover
1996	Wheat	Maize	Flax	Wheat	Soybean	Maize	Oats - clover	Maize (FYM)
1997	Maize	Wheat	Wheat	Soybean	Maize	Maize (FYM)	Clover	Oats - clover
1998	Wheat	Maize	Soybean	Oats - clover	Maize	Wheat	Maize (FYM)	Maize
1999	Maize	Wheat	Maize	Maize (FYM)	Clover	Maize	Soybean	Wheat

* (FYM) – (farmyard-manured).

In October 1999, soil was sampled from all subplots. Sampling depths were 0–20, 20–40 and 40–60 cm. The soil samples were allowed to air-dry, then ground and passed through a 2-mm sieve and, finally, used for determination of phosphatase (phosphomonoesterase) activities. Disodium phenylphosphate served as enzyme substrate [3, 7]. Three activities were measured: phosphatase activity in unbuffered reaction mixtures, acid phosphatase activity in reaction mixtures to which acetate buffer (pH 5.0) was added and alkaline phosphatase activity in reaction mixtures treated with borax buffer (pH 9.4). The buffer solutions were prepared as recommended by [7].

The reaction mixtures consisted of 2.5 g soil, 2 ml toluene (antiseptic), 10 ml distilled water or buffer solution and 10 ml 0.5% substrate solution. Reaction mixtures without soil or without substrate solution were the controls. All reaction mixtures were incubated at 37°C for 2 hours. After incubation, the phenol released from the substrate under the action of phosphatases was determined spectrophotometrically (at 614 nm) based on the colour reaction between phenol and 2,6-dibromoquinone-4-chloroimide [3, 7]. Phosphatase activities are expressed in mg phenol/g soil/2 hours. The activity values were submitted to statistical evaluation by the two-way ***t***-test [9].

Results and discussion. Results of the determination of phosphatase activitities are presented in Table 2, and those of the statistical evaluation are summarised in Table 3.

Comparison of the three phosphatase activities measured. At the same soil depth (0-20, 20-40 or 40-60 cm) in both subplots under all crops of both 2- and 6-crop rotations, the activities decreased in the order: phosphatase activity measured in unbuffered reaction mixtures > acid phosphatase activity > alkaline phosphatase activity (Table 2). This decreasing order is also valid for the mean values of the three activities (Table 3).

Variation of the three soil phosphatase activities in dependence of sampling depth. It is evident from Table 2 that each phosphatase activity decreased with sampling depth in both subplots under all crops of both rotations. In addition, Table 3 shows that the mean values of each of the three activities in both non-tilled and conventionally tilled subplots also decreased with increasing soil depth.

The effect of tillage practices on the phosphatase activities in soil. Each of the three phosphatase activities determined was significantly higher (at least at $p<0.001$) in the upper (0–20-cm) layer of the non-tilled subplots than in the same layer of the conventionally tilled subplots. The reverse was true (at least at $p<0.02$) in the deeper (20–40- and 40–60-cm) layers. These findings are valid for subplots under each crop of both rotations.

The effect of crop rotations on the phosphatase activities in soil. For evaluation of this effect, the results obtained in the three soil layers analysed in the two subplots of each plot were considered together.

Table 2

The effects of soil management practices on phosphatase activities in a brown luvic soil

Soil phosphatase activity*	Soil depth (cm)	Rotation of 2 crops**				Rotation of 6 crops**											
		Maize		Wheat		Maize (plot 1)		Maize (FYM)		Clover		Maize (plot 4)		Soybean		Wheat	
		N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.	N.t.	C.t.
Measured in unbuffered reaction mixtures	0-20	0.368	0.302	0.384	0.342	0.386	0.315	0.480	0.442	0.474	0.411	0.375	0.309	0.489	0.452	0.402	0.397
	20-40	0.255	0.268	0.233	0.245	0.257	0.272	0.328	0.332	0.354	0.384	0.236	0.269	0.361	0.391	0.259	0.275
	40-60	0.139	0.160	0.140	0.169	0.160	0.185	0.194	0.215	0.165	0.205	0.142	0.172	0.151	0.196	0.154	0.190
Acid	0-20	0.294	0.204	0.318	0.250	0.352	0.245	0.429	0.362	0.310	0.246	0.387	0.312	0.303	0.247	0.344	0.298
	20-40	0.141	0.171	0.135	0.173	0.136	0.179	0.179	0.204	0.137	0.156	0.142	0.209	0.133	0.146	0.149	0.195
	40-60	0.097	0.108	0.069	0.137	0.117	0.123	0.115	0.133	0.090	0.136	0.104	0.107	0.118	0.126	0.112	0.156
Alkaline	0-20	0.094	0.082	0.102	0.086	0.116	0.082	0.136	0.102	0.100	0.084	0.124	0.096	0.104	0.086	0.098	0.086
	20-40	0.040	0.052	0.044	0.050	0.048	0.054	0.056	0.064	0.048	0.054	0.052	0.060	0.044	0.048	0.050	0.054
	40-60	0.022	0.032	0.022	0.038	0.034	0.042	0.038	0.044	0.036	0.046	0.030	0.040	0.036	0.044	0.028	0.040

* Expressed in mg phenol/g soil/2 hours.
** N.t. – No-till.C.t. – Conventional tillage.
(FYM) – (farmyard-manured).

Table 3

Significance of the differences between phosphatase activities in a brown luvic soil submitted to different management practices

Management practices	Soil phosphatase activity*	Soil depth (cm)	Mean activity values in management practices a	b	(a-b)	Significance of the differences
1	2	3	4	5	6	7
No-till (a) versus conventional tillage (b)	UPA	0-20	0.4197	0.3712	0.0485	0.001>p>0.0001
		20-40	0.2854	0.3045	-0.0191	0.002>p>0.001
		40-60	0.1556	0.1865	-0.0309	0.0001>p
	AcPA	0-20	0.3421	0.2705	0.0716	0.0001>p
		20-40	0.1440	0.1791	-0.0351	0.001>p>0.0001
		40-60	0.1027	0.1282	-0.0255	0.02>p>0.01
	AlkPA	0-20	0.1092	0.0880	0.0212	0.001>p>0.0001
		20-40	0.0477	0.0545	-0.0068	0.001>p>0.0001
		40-60	0.0307	0.0407	-0.0100	0.0001>p
The same crop in the two rotations						
Maize in 2-crop rotation (a) versus maize (plot 1) in 6-crop rotation (b)	UPA	0-60	0.2487	0.2625	-0.0138	0.02>p>0.01
	AcPA		0.1687	0.1920	-0.0233	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0537	0.0627	-0.0090	0.05>p>0.02
Maize in 2-crop rotation (a) versus maize (plot 4) in 6-crop rotation (b)	UPA	0-60	0.2487	0.2505	-0.0018	0.02>p>0.01
	AcPA		0.1687	0.2102	-0.0415	0.10>p>0.05
	AlkPA		0.0537	0.0670	-0.0133	0.01>p>0.002
Wheat in 2-crop rotation (a) versus wheat in 6-crop rotation (b)	UPA	0-60	0.2522	0.2792	-0.0270	0.01>p>0.002
	AcPA		0.1803	0.2090	-0.0287	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.0570	0.0593	-0.0023	0.02>p>0.01
Different crops in the same rotation						
2-crop rotation						
Maize (a) versus wheat (b)	UPA	0-60	0.2487	0.2522	-0.0035	0.02>p>0.001
	AcPA		0.1687	0.1803	-0.0116	0.02>p>0.01
	AlkPA		0.0537	0.0570	-0.0033	0.02>p>0.01
6-crop rotation						
Maize (plot 1) (a) versus maize (FYM)** (b)	UPA	0-60	0.2625	0.3318	-0.0693	0.01>p>0.002
	AcPA		0.1920	0.2370	-0.0450	0.10>p>0.05
	AlkPA		0.0627	0.0733	-0.0106	0.02>p>0.01
Maize (plot 1) (a) versus clover (b)	UPA	0-60	0.2625	0.3322	-0.0697	0.02>p>0.01
	AcPA		0.1920	0.1792	0.0128	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0627	0.0613	0.0014	p>0.10
Maize (plot 1) (a) versus maize (plot 4) (b)	UPA	0-60	0.2625	0.2505	0.0120	0.02>p>0.01
	AcPA		0.1920	0.2102	-0.0182	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0627	0.0670	-0.0043	0.02>p>0.01
Maize (plot 1) (a) versus soybean (b)	UPA	0-60	0.2625	0.3400	-0.0775	0.02>p>0.01
	AcPA		0.1920	0.1788	0.0132	p>0.10
	AlkPA		0.0627	0.0603	0.0024	0.05>p>0.02

Table 3 (continued)

1	2	3	4	5	6	7
Maize (plot 1) (a) versus wheat (b)	UPA	0-60	0.2625	0.2795	-0.0170	p>0.10
	AcPA		0.1920	0.2090	-0.0170	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0627	0.0593	0.0034	p>0.10
Maize (FYM) (a) versus clover (b)	UPA	0-60	0.3318	0.3322	-0.0004	0.02>p>0.01
	AcPA		0.2370	0.1792	0.0578	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0733	0.0613	0.0120	0.10>p>0.05
Maize (FYM) (a) versus maize (plot 4) (b)	UPA	0-60	0.3318	0.2505	0.0813	0.01>p>0.002
	AcPA		0.2370	0.2102	0.0732	0.02>p>0.01
	AlkPA		0.0733	0.0670	0.0063	0.01>p>0.002
Maize (FYM) (a) versus soybean (b)	UPA	0-60	0.3318	0.3400	-0.0082	0.02>p>0.01
	AcPA		0.2370	0.1788	0.0582	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0733	0.0603	0.0130	0.05>p>0.02
Maize (FYM) (a) versus wheat (b)	UPA	0-60	0.3318	0.2795	0.0523	0.001>p>0.0001
	AcPA		0.2370	0.2090	0.0280	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0733	0.0593	0.0140	0.05>p>0.02
Clover (a) versus maize (plot 4) (b)	UPA	0-60	0.3322	0.2505	0.0817	0.01>p>0.002
	AcPA		0.1792	0.2102	-0.0310	0.02>p>0.01
	AlkPA		0.0613	0.0670	-0.0057	0.05>p>0.02
Clover (a) versus soybean (b)	UPA	0-60	0.3322	0.3400	-0.0078	0.05>p>0.02
	AcPA		0.1792	0.1788	0.0004	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0613	0.0603	0.0010	0.02>p>0.01
Clover (a) versus wheat (b)	UPA	0-60	0.3322	0.2795	0.0527	0.05>p>0.02
	AcPA		0.1792	0.2090	-0.0298	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.0613	0.0593	0.0020	0.10>p>0.05
Maize (plot 4) (a) versus soybean (b)	UPA	0-60	0.2505	0.3400	-0.0895	0.02>p>0.01
	AcPA		0.2102	0.1788	0.0314	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0670	0.0603	0.0067	0.01>p>0.002
Maize (plot 4) (a) versus wheat (b)	UPA	0-60	0.2505	0.2795	-0.0290	0.10>p>0.05
	AcPA		0.2102	0.2090	0.0012	0.05>p>0.02
	AlkPA		0.0670	0.0593	0.0077	p>0.10
Soybean (a) versus wheat (b)	UPA	0-60	0.3400	0.2795	0.0605	0.05>p>0.02
	AcPA		0.1788	0.2090	-0.0302	0.01>p>0.002
	AlkPA		0.0603	0.0593	0.0010	0.01>p>0.002

* Expressed in mg phenol/g soil/2 hours.
UPA – Phosphatase activity measured in unbuffered reaction mixtures.
AcPA – Acid phosphatase activity.
AlkPA – Alkaline phosphatase activity.
** (FYM) – (farmyard-manured).

– *Soil phosphatase activities as affected by the same crop in the two rotations.* As maize and wheat were crops in both rotations, it was possible to compare their effect on soil phosphatase activities. The soil under both crops was more phosphatase-active in the 6- than in the 2-crop rotation. In the soil under maize, the difference between the two rotations was significant (at least at $p<0.05$ or at $p<0.02$) in the case of each phosphatase activity, excepting acid phosphatase activity in the maize plot 4, in which this activity was only unsignificantly higher ($p>0.05$). In the soil under wheat, each activity was significantly higher (at least at $p<0.02$) in the 6- than in the 2-crop rotation.

– *Soil phosphatase activities as affected by the same crop growing in different plots of the same rotation.* We have already mentioned that in 1999 there were, in the 6-crop rotation, two minerally fertilised plots (1 and 4) cropped to maize. Phosphatase activity measured in unbuffered reaction mixtures was significantly higher ($p<0.01$) in the soil of maize plot 1 (in which the previous crop was soybean) than in maize plot 4 (in which the previous crop was wheat). Contrarily, acid and alkaline phosphatase activities gave significantly higher values ($p<0.05$ and $p<0.02$, respectively) in plot 4 than in plot 1.

– *Soil phosphatase activities as affected by different crops in the same rotation.*

The 2-crop rotation. Each phosphatase activity measured in the wheat soil exceeded significantly ($p<0.02$) the corresponding activity recorded in the maize soil.

The 6-crop rotation. Significant ($p<0.05$ to $p<0.001$) and unsignificant ($p>0.05$ to $p>0.10$) differences were registered in the soil phosphatase activities depending on the type of activity and the nature of crop. Based on these differences the following decreasing orders of the activities could be established in the soil of the six plots:

- phosphatase activity measured in unbuffered reaction mixtures: soybean > clover > maize (FYM) > wheat ≈ maize plot 1 > maize plot 4;
- acid phosphatase activity: maize (FYM) > maize plot 4 > wheat > maize plot 1 > clover > soybean;
- alkaline phosphatase activity: maize (FYM) > maize plot 4 > maize plot 1 ≈ clover > soybean > wheat.

It is evident from these orders that phosphatase activity in unbuffered reaction mixtures is more pronounced in soil under the legumes (soybean, clover) than under the cereals (wheat, maize). The reverse is true for acid phosphatase activity and, with the exception of soil under wheat, also for alkaline phosphatase activity.

Soil phosphatase activities as affected by fertilisation. The three maize plots in the 6-crop rotation could serve for comparing the effect of mineral (NP) fertilization (plots 1 and 4) and farmyard-manuring (plot 2) on the soil phosphatase activities. Each activity was higher in the farmyard-manured maize plot than in the other two, minerally fertilised maize plots. The differences were significant at $p<0.01$ or at $p<0.02$, excepting acid phosphatase activity which was unsignificantly higher ($p>0.05$) in the farmyard-manured plot than in the minerally fertilised plot 1.

Enzymatic (phosphatase) indicators of soil quality. For establishing a hierarchy of the plots in the 6-crop rotation admitting equal importance for the three phosphatase activities, we have used the method, referred to in [10], to calculate the enzymatic indicators of soil quality.

The results obtained (Table 4) show that in the hierarchy of the six plots – based on their phosphatase indicators of soil quality –, position 1 is occupied by the farmyard-manured maize plot, followed by the minerally fertilised legume (soybean and clover) plots, while the last positions are occupied by the minerally fertilised cereal (wheat and maize) plots.

Table 4

Enzymatic (phosphatase) indicators of soil quality in plots of the 6-crop rotation

Position	Plot	Enzymatic (phosphatase) indicator of soil quality
1	Farmyard-manured maize	293.0
2	Minerally fertilised (M.f.) soybean	257.8
3	M.f. clover	252.3
4	M.f. maize (plot 4)	250.3
5	M.f. wheat	247.4
6	M.f. maize (plot 1)	240.1

Another hierarchy of the six plots was registered by us [10] in October 1997 when we determined soil actual and potential dehydrogenase and catalase activities. Thus, position 1 was occupied by the minerally fertilised wheat plot, whereas the farmyard-manured maize plot and the minerally fertilised soybean and clover plots were placed on positions 3, 4 and 5, respectively. The minerally fertilised maize plot occupied the last position as did the minerally fertilised maize plot 1 in 1999.

The different hierarchies of the six plots as registered in 1997 and 1999 may be related to the different nature of the enzymes studied in these two years. Dehydrogenase and catalase activities, determined in 1997, are considered as indicators of the global and respiratory activity of soil, whereas phosphatase activities are related to the P cycling in soil.

Farmyard-manuring and using of legumes in crop rotations are well-known fertility-increasing measures. As the phosphatase indicators of soil quality in the studied 6-crop rotation were highest in the farmyard-manured maize plot and in the minerally fertilised soybean and clover plots, we consider that by determination of phosphatase activities valuable information can be obtained regarding fertility status of soils.

Conclusions. 1. The soil phosphatase activities decreased in the order: phosphatase activity measured in unbuffered reaction mixtures > acid phosphatase activity > alkaline phosphatase activity.

2. Each phosphatase activity decreased with increasing soil depth.

3. No-till – in comparison with conventional tillage – resulted in higher phosphatase activities in the 0–20-cm soil layer and in lower activities in the 20–40- and 40–60-cm soil layers.

4. The 6-crop rotation – as compared to the 2-crop rotation – led to higher phosphatase activities in the soil layers under maize or wheat.

5. In the 2-crop rotation, the soil layers under wheat were more phosphatase-active than those under maize.

6. Farmyard-manuring – in comparison with mineral (NP) fertilisation – proved to be more efficient in increasing phosphatase activities in soil layers under maize in the 6-crop rotation.

7. The enzymatic indicators of soil quality calculated from the values of phosphatase activities determined in the plots of the 6-crop rotation showed the order: farmyard-manured maize > minerally fertilised (m.f.) soybean > m.f. clover > m.f. maize (plot 4) > m.f. wheat > m.f. maize (plot 1). This order means that by determination of phosphatase activities valuable information can be obtained regarding the fertility status of soils.

REFERENCES

1. Cosgrove, D.J., *Metabolism of organic phosphates in soil*, in McLaren, A.D., Peterson, G.H. (Eds.), *Soil Biochemistry, Vol. 1*, pp. 216-228, Dekker, New York, 1967.
2. Cosgrove, D.J., *Microbial transformations in the phosphorus cycle*, in Alexander, M. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology, Vol. 1*, pp. 95-134, Plenum Press, New York, 1977.
3. Drăgan-Bularda, M., *Lucrări practice de microbiologie generală*, pp. 167-169, Univ. Babeş–Bolyai, Cluj-Napoca, 1983.
4. Gianfreda, L., Bollag, J.-M., *Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil*, in Stotzky, G., Bollag, J.-M. (Eds.), *Soil Biochemistry, Vol. 9*, pp. 123-193, Dekker, New York, 1996.
5. Halstead, R.L., McKercher, R.B., *Biochemistry and cycling of phosphorus*, in Paul, E.A., McLaren, A.D. (Eds.), *Soil Biochemistry, Vol. 4*, pp. 31-63, Dekker, New York, 1975.
6. Kiss, S., Drăgan-Bularda, M., Rădulescu, D., *Biological significance of enzymes accumulated in soil*, "Adv. Agron." (New York), **27**, 1975, 25-87.
7. Öhlinger, R., *Phosphomonoesterase activity with the substrate phenylphosphate*, in Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*, pp. 210-213, Springer, Berlin, 1996.
8. Ramírez-Martínez, J.R., *Organic phosphorus mineralization and phosphatase activity in soils*, "Folia Microbiol." (Prague), **13**, 1968, 161-174.
9. Sachs, L., *Statistische Auswertungsmethoden*, pp. 140, 309-310, Springer, Berlin, 1968.
10. Samuel, A., Kiss, S., *The effects of soil management practices on the enzymatic activities in a brown luvic soil*, "Stud. Univ. Babeş–Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 189-197.
11. Speir, T.W., Ross, D.J., *Soil phosphatase and sulphatase*, in Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*, pp. 197-250, Acad. Press, London, 1978.
12. Ştefanic, G., *Enzimologia solurilor cultivate*, in Kiss, S., Ştefanic, G., Paşca, D., Drăgan-Bularda, M., Zborovschi, E., Crişan, R., *Enzimologia mediului înconjurător, Vol. 1*, pp. 83-84, Ceres, Bucureşti, 1991.
13. Ştefanic, G., Eliade, G., Chirnogeanu, I., *Researches concerning a biological index of soil fertility*, "Fifth Symp. on Soil Biology (Iaşi, 1981)", Rom. Natl. Soc. Soil Sci., Bucharest, 1984, 35-45.

RECENZII - BOOK REVIEWS

Zoe Buz, **Cercetări fitosociologice şi palinologice în zona Sovata-Praid-Dealu**, Casa Cărţii de Ştiinţă, Cluj, 1999, 214 pagini cu 40 tabele, 3 hărţi, 23 diagrame, 36 figuri şi 15 fotografii.

Rod al unei laborioase activităţi de cercetare, prezentul studiu botanic, efectuat în perimetrul platoului vulcanic Sovata-Praid-Dealu, contribuie cu date noi, atât la cunoaşterea florei şi vegetaţiei actuale, cât şi a celei postglaciare, reconstituită pe baza analizei sporopolenice a turbei din mlaştinile aferente acestei regiuni.

Lucrarea este structurată judicios în 8 părţi interdependente, reliefând necesitatea valorificării raţionale a potenţialului vegetal din regiunea cercetată, în vederea conservării în condiţii optime atât a genofondului, cât şi a unor biocenoze caracteristice, care adăpostesc numeroase specii relictare, cu un deosebit interes fitogeografic.

În vederea stabilirii relaţiilor dintre factorii de mediu locali şi distribuţia vegetaţiei actuale, în prima parte a lucrării (p. 9-24), s-au analizat succint principalele aspecte fizico-geografice (geomorfologice, geologice, climatice) ale regiunii luate în studiu.

Partea a doua, "Istoricul cercetărilor fitotaxonomice, fitocenologice şi palinologice, cu referire specială la teritoriul cercetat" (p. 25-26), a fost elaborată pe baza consultării unei bogate surse informaţionale (225 titluri bibliografice). Se specifică că până la investigaţiile efectuate de autoare, studiile botanice îndreptate cu precădere asupra acestei regiuni au fost puţine la număr şi incom-plete.

"Caracterizarea generală a florei actuale din regiunea Sovata-Praid-Dealu", inclusă în partea a treia a lucrării (p. 27-31), se bazează pe analiza celor 514 specii (37 briofite, 477 cormofite) identificate, dintre care 150 au fost semnalate în regiune pentru prima dată. Sunt citate speciile rare, relictele glaciare şi endemice. Flora este grupată şi analizată judicios pe categorii fitotaxonomice, morfoecologice, fitogeografice, ecologice şi reprezentate prin grafice sugestive.

"Vegetaţia regiunii Sovata-Praid-Dealu" (p.32-85), cuprinsă în partea a patra a lucrării, a fost studiată în vederea corelării acesteia cu succesiunea vegetaţiei postglaciare, care de fapt şi constituie problema de bază a acestei lucrări.

Sunt analizate din punct de vedere cenotaxonomic, corologic şi ecologic 34 asociaţii, dintre care 13 aparţin de formaţiunile nemorale, 10 praticole, 8 palustre şi 3 ruderale. În cadrul unei mlaştini eutrofe s-a identificat şi analizat o subasociaţie relictară, nouă pentru ştiinţă, grefată pe fitocenozele asociaţiei arbustive de sălcişe-sfagnet: *Salici cinereae-Sphagnetum recurvi, calamagrostio canescenti-calletosum palustris.*

Studiile de vegetaţie efectuate de autoare contribuie cu date noi, atât la cunoaşterea comunităţilor vegetale regionale, cât şi la măsurile care se impun a fi luate în vederea protejării şi conservării acestui important patrimoniu natural.

Tematica fundamentală a prezentului volum o constituie, totuşi, succesiunea covorului vegetal postglaciar, descifrată pe baza analizelor de polen, aplicate în cele 14 sedimente organo-minerale, împrăştiate pe platoul Sovata-Praid-Dealu. Acesta este miezul ştiinţific al lucrării, interpretat corect în gândirea şcolii palinologice clujene.

Deşi prezintă unele particularităţi regionale, succesiunea covorului vegetal, descifrată în acest perimetru, se încadrează armonios în cea cunoscută pentru ţara noastră, cu menţiune specială pentru Transilvania, începând cu Tardiglaciarul würmian, până astăzi; totuşi are mai multe afinităţi fitoistorice cu

cele descifrate în Carpații Meridionali, comparativ cu ce se cunoaşte pentru nordul Carpaților Orientali sau nordul Transilvaniei. Aceste trăsături comune pot reflecta arealele de răspândire, în timp şi spațiu, ale diverselor tipuri de păduri, gândindu-ne mai ales la cărpinete, dar şi la teişe, ulmete, alunete, sau chiar brădete. Este o lucrare ce merită să existe în orice bibliotecă personală sau publică.

IOAN POP şi BĂLUȚĂ DIACONEASA

Dumitru Moldoveanu, **Inginerie genetică**, Ovidius University Press, Constanța, 1999, 243 pagini cu 51 figuri şi un tabel în text.

Autorul, care este profesor de microbiologie la Universitatea Ovidius din Constanța, specialist în genetică microbiană, prezintă o lucrare de mare interes ce se constituie într-un adevărat îndreptar, fiind expuse într-o manieră integratoare "bazele teoretice şi practice ale tehnologiei ADN recombinant".

Lucrarea include 15 secțiuni, de întindere diferită, care practic acoperă toate aspectele legate de tema aleasă. După o introducere este prezentat în mod documentat conceptul de clonare, iar apoi sunt tratate particularitățile fundamentale privind sistemul de clonare. Urmează o secțiune mai bogată în date ştiințifice intitulată "Vectori de clonare". Se insistă în primul rând asupra plasmidelor, fiind foarte amănunțit tratate o serie de aspecte cum ar fi: clasificarea, structura moleculară, replicarea şi originea acestora. Se continuă cu elementele genetice transpozabile şi vectorii utilizați în tehnologia ADN recombinant.

Secțiunea următoare este intitulată "Restricția şi modificarea" în care sunt discutate cele 3 sisteme de restricție şi modificare (notate RM_1 – RM_3). Se continuă apoi cu secțiunile ce tratează ADN-ligazele, respectiv alte enzime utilizate în tehnologia ADN recombinant (între care ADN-polimeraza I, revers-transcriptaza, terminal-transferaza, nucleaza S_1 şi altele). Se trece la secțiunile în care se descriu: izolarea fragmentelor de ADN utilizate în tehnologia ADN recombinant, construirea moleculelor de ADN recombinant *in vitro* şi introducerea moleculelor de ADN hibride în celula gazdă, insistându-se asupra fenomenelor de transformare genetică, de transfecție, de transfer de informație în protoplaşti. Sunt descrise apoi exprimarea genelor străine în celula gazdă şi selecția microorganismelor recombinate genetic, punându-se accentul pe metodele microbiologice, genetice şi imunochimice ce se folosesc în acest scop. Secțiunea ce urmează este dedicată analizei secvențelor de ADN clonate, fiind prezentate cele două metode aplicate (Sanger, respectiv Maxam şi Gilbert) pentru secvențializarea fragmentelor de ADN clonate, iar în final fiind tratată sintetic mutageneza *in vitro*. Secțiunea cu cea mai mare întindere (84 pagini) este consacrată realizărilor în domeniul tehnologiei ADN recombinant. Sunt prezentate în mod documentat clonarea genelor ce codifică sinteza somatostatinei, preproinsulinei de şobolan, insulinei umane, β-glucanazelor, hormonului uman de creştere şi a interferonilor, obținerea de noi bacterii fixatoare de N_2, producerea de "superbacterii" care utilizează hidrocarburile. De asemenea, se prezintă succint vaccinurile produse prin tehnologia ADN recombinant şi se insistă asupra studiului virusului HIV, tot

prin această tehnologie. În cadrul acestei secțiuni se continuă cu prezentarea clonării anticorpilor monoclonali, cu obținerea animalelor transgenice, cu tumorile Crown gall la plante, cu vectorii derivați de la plasmida Ti, încheindu-se cu clonarea genelor *cry* de la *Bac. thuringiensis*. Lucrarea se termină cu secțiunea ce cuprinde riscurile şi măsurile de prevenire a acestora în experiențele de clonare. Lucrarea se recomandă ca o sursă modernă de informații atât pentru studenți cât şi pentru specialiştii interesați de acest domeniu.

MIHAIL DRĂGAN-BULARDA

Kazimierz Januszek, **AktywnoÑƒ enzymatyczna wybranych gleb leÑnych Polski poludniowej w Ñwietle bada½ polowych i laboratoryjnych** (*Enzymatic Activity in Selected Forest Soils of Southern Poland in the Light of Field and Laboratory Investigations*), Wydawnictwo Akademii Rolniczej Kraków, 1999, 132 pages with 39 tables and 28 figures in the text.

Professor K. Januszek's book appeared as No. 250 of the Scientific Studies of the Agricultural Academy in Cracow (Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kollataja w Krakowie). It represents a synthetic description of the soil enzymological investigations conducted by the Author in the 1985-1997 period. Soils of 23 forest stands located in southern Poland were studied. Activities of several enzymes participating in the biogeochemical cycles of C, N and P (dehydrogenase, invertase, protease, urease, phosphatase) were determined. The enzyme analyses were accompanied by chemical analyses and the analytical data were evaluated statistically.

Based on the results obtained, Professor Januszek has established that the enzymatic index of soil (EIS) fully reflected the fertility of forest soils of southern Poland. EIS = 0.01.DA + PA + UA, where DA is dehydrogenase activity in mg of triphenylformazan/24 h, PA is protease activity in g of NH_2-N/20 h and UA is urease activity in g of NH_4-N/24 h, all being expressed in terms of soil volume in a profile of 1 dm^2 x 1 m.

Some of the other valuable findings described in the book will also be quoted.

Thus, it has been found that among the studied dehydrogenase, protease and phosphatase activities in rhizosphere and non-rhizosphere soils of *Pinus sylvestris*, *Alnus incana* and *Abies alba*, the ratio of phosphatase activities in rhizosphere soil/non-rhizosphere soil had the highest values, namely 2.9, 1.9 and 1.5, respectively.

Dehydrogenase activity – contrarily to other enzyme activities – proved to be sensitive to pollution of a sandy forest soil by zinc– and lead-containing industrial emissions.

Freezing and thawing of forest soils led to significant increases in protease and phosphatase activities and to no changes in invertase activity, whereas dehydrogenase and urease activities changed rather irregularly in different forest soils.

Professor Januszek's book is a major contribution to the development of soil enzymology; the appearance of this book may be considered a significant event in the history of this science. The book is addressed to a broad circle of readers (experts and students) all over the world as the titles and legends of tables and figures and the summary are given in English, too.

STEFAN KISS

Abteilung Bodenkunde, Universität Trier (Herausgeber) (Soil Science Department, University Trier - Editor), **Festschrift für Dietmar Schröder zum 60. Geburtstag** (*Festive Volume for Dietmar Schröder to the 60th Birthday*), 2000, 279 pages (including 72 figures and 43 tables) plus 6 appendices.

This volume, which is Band 1 of the Trierer Bodenkundliche Schriften, comprises 36 papers written by 55 authors for expressing their homage to the illustrious scientist, Head of the Soil Science Department of the University in Trier, Germany, Professor Dietmar Schröder on the occasion of his 60th birthday.

The investigations conducted by Professor Dietmar Schröder cover a wide range of topics, including soil protection, melioration and restoration, recultivation, regional soil development, water protection. All these investigations were interdisciplinary and tightly connected to environmental economy and environmental law and led to important findings, known and recognised by soil and other environmental scientists all over the world. For example, I mention that the studies performed by Professor Dietmar Schröder and his collaborators on the agri- and sylvicultural recultivation of spoils, that resulted from strip mining of brown coal in the Rhine region, constitute major contributions not only to the physicochemistry, but also to the enzymology of technogenic soils.

I and my colleagues from our research group of Environmental Enzymology and Microbiology should like to wish Professor Dietmar Schröder all the best, including good health and new successes in his and his collaborators' outstanding scientific activity.

The 36 papers of this volume are a valuable source of information for students and experts, interested in fundamental and applied soil and other environmental sciences.

STEFAN KISS