

STUDIA

UNIVERSITATIS
BABEȘ-BOLYAI

B i o l o g i a

C L U J - N A P O C A 2 0 0 1



S T U D I A
UNIVERSITATIS BABEŞ-BOLYAI
BIOLOGIA

2

EDITORIAL OFFICE: Gh. Bilaşcu no. 24, 3400 Cluj-Napoca • Phone 064-40.53.52

SUMAR - CONTENTS - SOMMAIRE - INHALT

- B. DIACONEASA, S. FĂRCAŞ, Istoricul brădetelor din România, descifrat prin metoda polen-analitică • The History of Fir Tree Forests in Romania, as Revealed by the Palynological Method 3
- P. BURESCU, Considerații asupra comunităților vegetale distribuite pe cuprinsul câmpiei din nord-vestul României • Considerations on Plant Communities Distributed on the North-Western Plain of Romania 21
- S. IEPURE, Cyclopides du Parc National des Monts Apuseni. I. *Acanthocyclops plesai* n. sp. et *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* n. ssp. (Crustacea, Copepoda) • Cyclopides in the National Park of the Apuseni Mountains. I. *Acanthocyclops plesai* n. sp. and *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* n. ssp. (Crustacea, Copepoda) 31
- N. TOMESCU, D. MUREŞAN, V. POPA, The terrestrial Isopod Fauna in the Superior Basin Area of the Someşul Cald River 43
- K. BARTÓK, I. CHEREJI, A. NICOARĂ, M. SIMIHĂIAN, Distribution of ¹³⁷Cesium in Experimentally Contaminated Cells of the Lichen *Peltigera Membranacea* 49
- C. DELIU, C. MUNTEANU-DELIU, C. BOTA, A. HALMAGYI, A. KEUL-BUTIUC, Biotransformarea digitoxinei de către culturile de suspensii celulare de *Digitalis lanata* • Biotransformation of Digitoxin by Cell Suspension Cultures of *Digitalis lanata* 53
- C. PAŞCA, C. CRĂCIUN, E. KIS, Structural and Ultrastructural Modifications Induced by Two Therapeutic Doses of *Cis*-Diamminedichloroplatinum(II) (Cisplatin) on Some Lymphoid Organs in White Wistar Rats 65

C. PAȘCA, C. CRĂCIUN, E. KIS, V.-D. SANDU, Histological and Ultrastructural Studies of the Rat Thymus after Administration of Epirubicin.....	75
E. KIS, V.-D. SANDU, C. PAȘCA, C. CRĂCIUN, Efectul antigluco-corticoid al propranololului • The Antigluco-corticoid Effect of Propranolol	83
L. OPREAN, Cercetări privind prepararea de plasmolizate din celulele drojdiei de bere <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> • Researches Concerning the Preparation of Plasmolysates from Cells of the Beer Yeast <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	99

Recenzii - Book Reviews - Comptes Rendus - Buchbesprechungen

C. García, T. Hernández (Editors), Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España. Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain (S. KISS)	103
R. G. Burns (Editor), International Conference on Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications (S. KISS).....	103
A.-M. Beer, G. Lüttig & J. Lukanov (Herausgeber – Editors), Moorthérapie 2000. Peat Therapy on Its Way into the Next Millennium (D. PAȘCA, S. KISS)....	104
G.A. Evdokimova, N.P. Mozgova, Mikroorganizmy tundrovykh i lesnykh podzolov Kol'skogo Severa (S. KISS).....	105

ISTORICUL BRĂDETELOR DIN ROMÂNIA, DESCIFRAT PRIN METODA POLEN-ANALITICĂ

BĂLUȚĂ DIACONEASA* și SORINA FĂRCAȘ**

SUMMARY. – **The History of Fir Tree Forests in Romania, as Revealed by the Palynological Method.** The present paper is a synthesis, based on numerous palynological studies carried out on Holocene peat sediments especially. Fir tree had no glacial refuges in Romania and it immigrated into the South-West of our country from the Balkan Peninsula. It became dominant in the second period of the Subatlantic age. The fir tree made up a forest substorey (850-1,200 m altitude), together with beech and spruce. In the forests in North Romania fir tree has a more recent subatlantic character than in the other regions of Romania.

Absoluta majoritate a studiilor polen-analitice din România indică apariția întârziată a bradului și fagului în structurile silvestre postglaciare, intra- și extracarpătice din țara noastră, comparativ cu ceilalți copaci ai pădurilor noastre (ulm, stejar, tei, arțar, carpen etc.).

În această lucrare prezentăm evenimentele fitoistorice ale pădurilor cu mult brad, așa cum acestea au fost identificate palinologic în țara noastră, mai ales în postglaciare.

Menționăm că într-un studiu polen-analitic efectuat de P o p [32] în sedimentele turbo-cărbunoase din jurul localității Avrig, la Adâncata sau la Șipoțel apar descifrate aspecte fitoistorice ale unor păduri alcătuite, preponderent, din conifere (brad, molid, pin), dintre care bradul (*Abies*) a avut, cândva, un rol dominant în structurile fitocenozelor respective, polenul său participând cu 60-7% în alcătuirea spectrelor polinice.

Evoluția valorilor procentuale ale polenului de brad, în continuă diminuare (ex. Adâncata), până la dispariție (ex. Șipoțel), comparativ cu cele ale molidului și pinului, mereu în ascensiune, inițial cu avans al molidului ($\pm 64,66\%$) față de pin ($\pm 20\%$), pentru ca în final polenul pinului să atingă valoarea absolută ($\pm 99\%$) la Șipoțel, l-a determinat pe P o p să afirme că topoclima acelor vremuri s-a schimbat, cel puțin, de trei ori.

Inițial a fost o etapă subatlantică cu brădete în regres (*Abies* 60-7,33%), când au conviețuit carpenul, stejarul, ulmul, mai răspândit fiind teiul ($\pm 4,66\%$), ceilalți având valori scăzute ($\pm 0,66-1,33\%$) și în frecvente cazuri întrerupte. *Fagul nu a fost atestat polen-analitic.* Aspectul subatlantic s-a tot atenuat, în final stingându-se și instalându-se un climat caracterizat printr-o mai accentuată continentalizare a vremii. Acestui climat, mai pronunțat continental, îi corespunde “constelația” silvestră cu molid dominant ($\pm 60\%$ polen), întovărășit continuu și tot mai abundent de pin (20-30%), iar din când în când cu mesteacăn și salcie. Acum încep să dispară sporo-polinic, treptat, bradul, carpenul, teiul, stejarul, alunul, ulmul etc.

* Universitatea “Babeș-Bolyai”, Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj-Napoca, România

** Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

Final s-a instalat un climat rece, aspru, continental, caracteristic unui sfârșit de interglaciar “*care trece într-o nouă glaciațiune*” [32, p. 32], când pinetele rămân singurele ecosisteme silvestre (90-100% polen), pe alocuri supraviețuind molidul, mesteacănul și salcia, așa cum aceștia sunt atestați polen-analitic, cu valori procentuale răzlețe și subunitare. Bazat pe aspectele polen-analitice analoage cunoscute, pentru acea vreme, în Austria, Cehoslovacia și Polonia, P o p a crezut că a surprins sfârșitul interglaciarului Riss-Würm.

Între anii 1958-1968 reușind, nu fără dificultăți, să aplice în străinătate metoda C^{14} la stabilirea vârstei unei probe turbo-cărbunoase de la Șipoțel-Avrig, P o p [33] obține o vârstă de ± 27.000 de ani, pe care o atribuie interstadiului Paudorf. Este datarea cea mai exactă a spectrului polinic înregistrat în această probă, în care formațiunile silvestre limitrofe au fost codificate palinologic astfel: pinetele cu $\pm 44,66\%$, molidișurile cu $\pm 21,33\%$, mestecănișurile cu $\pm 20,66\%$, aninișele cu $13,33\%$, iar cu valori reduse, chiar subunitare ($0,66\%$) bradul, carpenul, alunul, salcia, teiul, stejarul, ulmul, *fără prezența fagului*.

Acceptând ca realitate incontestabilă instantaneul fitoistoric stabilit pentru baza aflorimentului de la Șipoțel-Avrig, considerat de P o p [32] ca stivuit peste cel de la Adâncata, după o lacună de sedimentare, înseamnă că pădurile de conifere de la Adâncata, cu brad dominant (20-60% polen) sunt mai timpurii, evidențiind un climat mai blând, mai umed (asemănător Subatlanticului), ante-Paudorf. Problema încadrării acestui interstadiu necesită suficientă prudență, cu toate că turba captivă de pe Valea Porumbacului, situată aproximativ în același perimetru cu Adâncata și Șipoțel este considerată de B o ș c a i u și R ă d u l e s c u [4] ca sedimentul în care a fost captat polenul pădurilor aparținând oscilației climatice Denekamp (32.000-29.000 de ani).

Între cele două sedimentări (Adâncata și Valea Porumbacului) există suficiente deosebiri polen-analitice, care obligă să fie considerate asincrone, nu numai în cadrul aceluiași interstadiu, dar chiar ante- sau post-Denekamp. P o p nu a mai admis [33] vârsta interglaciară a acestor brădeti, iar sincronizarea lor cu resturile macroscopice, paleolitice, de nuanță “magdaleniană” [39] de la Nistru nu este în totalitate exclusă!

Se știe sigur că analizele de polen din țara noastră, cu precădere cele de la nordul Dunării n-au mai surprins polenul bradului, pe durata întregului Tardiglaciar, până cândva în Postglaciar. A admite, sau numai a bănuși, că bradul a supraviețuit în țara noastră în climatul extrem de rece caracteristic Tardiglaciarului würmian este o fantezie lipsită de suport științific, cunoscută fiind afinitatea bradului pentru un climat umed, ușor răcoros, cu un pronunțat caracter subatlantic.

Ideea exprimată de P o p [31] că ...”*bradul n-a avut refugii glaciare la noi*”... are aceeași valabilitate și astăzi, cu mențiunea ca aceste “refugii glaciare” să aparțină ultimilor 27.000 de ani, deoarece glaciațiunea würmiană a fost de durată (± 100.000 de ani), iar de-a lungul ei s-au distins mai multe stadii și interstadii glaciare. Pădurile cu mult brad sunt la noi în țară cele mai recente formațiuni subatlantice, fiind identificate polen-analitic în diverse regiuni înșirate de-a lungul Carpaților Orientali, Meridionali și Occidentali (Fig. 1).

Apariția mult întârziată a bradului în structurile silvestre din România a fost schițată de P o p [31], comparând rezultatele polen-analitice din trei regiuni diferite ale țării noastre: nordul Carpaților Orientali (Dorna-Lucina, [29]), Munții Apuseni [30] și platoul înalt (900–1.100 m.s.m.) Oaș-Maramureș din nordul Transilvaniei [31]. Ideea

ISTORICUL BRĂDETELOR DIN ROMÂNIA

generală a lui P o p a fost că, în nordul Transilvaniei, bradul a apărut ca element întâmplător în straturile silvestre, predominant făgete (60-91%) subatlantice, nu ca asociat permanent, bine reprezentat în fitocenozele de amestec rășinoase-foioase din Munții Apuseni, unde bradul participă în proporții egale cu molidul și fagul, la altitudini de 900–1.250 m.s.m.

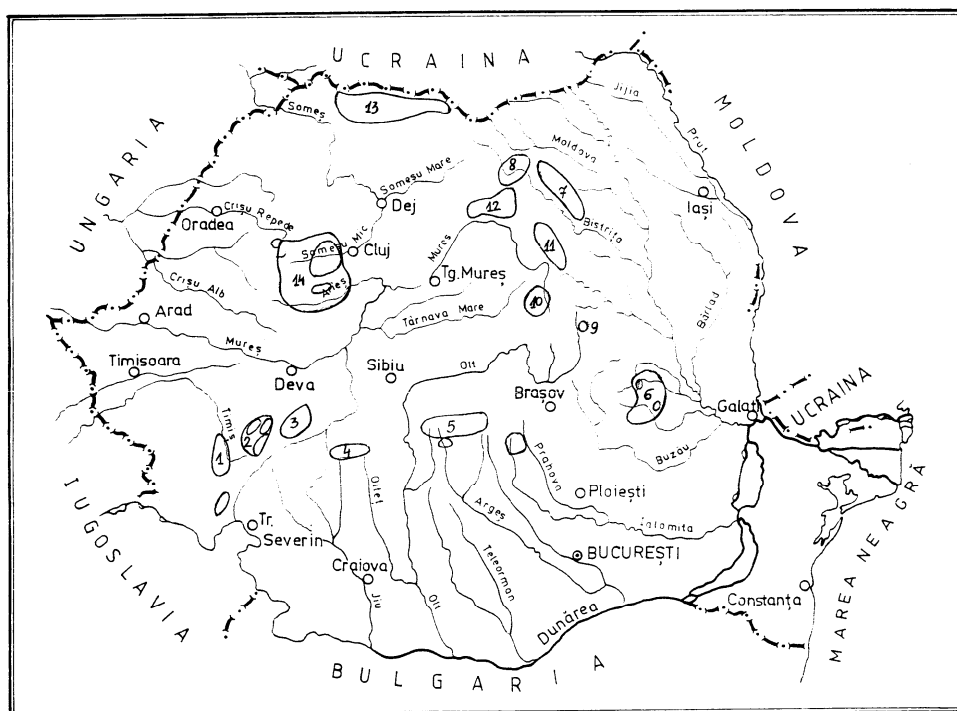


Fig. 1. Distribuția regiunilor cu cele mai semnificative spectre polinice ale bradului în România.

1 – Munții Semenic: Gărna I,II. 2 – Complexul Țarcu-Godeanu-Cernei: Bistricioara I, Baranu sub Râu Șes. 3 – Munții Retezat: Sub Retezat, Lacul Lia, Adăpătoarea Caprelor. 4 – Munții Parâng: Muntinul Mic I,II. 5 – Munții Făgăraș: Sărata, Ucea-Corabia I, Podragu II. 6 – Cotul Carpaților: Bisoca, Comandău. 7 – Munții Stânișoarei: Pângărăcior. 8 – Dorna-Lucina: Pilugani II, Colăcel I, Ciocănești (Botoș). 9 – Munții Bodoc: Tușnad. 10 – Harghita: Ruț. 11 – Depresiunea Gheorgheni: Voșlăbeni. 12 – Munții Căliman: Căliman Exploatare, Cica Mică I. 13 – Oaș-Maramureș: Tăul Obcioarei, Vlășchinescu I, Iezerul Mare. 14 – Munții Apuseni: Călățele, Molhașul Mare, Mluha, Căpățâna.

Sintetizând datele polen-analitice din afara granițelor țării noastre, din Serbia [8], Cehoslovacia [28], Polonia [20], P o p [31] presupune că bradul a imigrat în spațiul românesc prin două zone: în nordul țării venind din vest prin intermediul “*derivației carpatice desprinsă din calea principală alpino-sudetică*” și în zona sudică (neconfirmat la acea vreme) din Peninsula Balcanică, direct spre Carpații sudici, prin intermediul Planinelor. Poarta sudică a fost confirmată de C i o b a n u [9] cu prilejul cercetării polen-analitice a mlaștinilor din Munții Semenic, Banat.

Ca să avem o imagine “aproximativ exactă”, atât a căilor de pătrundere cât și a arealului acestor formațiuni silvestre, fie fâgeto-brădetete, ici-colo brădetete pure, fie păduri de amestec, molid-brad-fag sau brad-fag-molid este necesar să amintim că polenul bradului este cel mai mare, cel mai greu și drept urmare durata de planare și distanța de transport eolian este cu mult mai mică decât a polenului de molid, pin, fag, carpen etc.

Reamintim aceste particularități ale polenului de brad pentru că multe stațiuni turboase, mai ales cele din Carpații Meridionali s-au format la altitudini înalte (1.750–2.200 m.s.m.) și în ele, de regulă, valorile procentuale ale polenului de brad apar mai mici, comparativ cu cele înregistrate în mlaștinile turboase cuibărite la altitudini mai joase (850–1.250 m.s.m.); în realitate și acestea redau sintetic același areal al “subetajului molid-brad-fag” (= brad-fag-molid = fag-molid-brad = molid-fag-brad).

Într-o lucrare anterioară [17] am afirmat că revenirea subatlantică a carpenului constituie atât punctul de referință al sosirii bradului la noi, dar indică și căile de migrare pe teritoriul românesc. În Subatlantic, carpenul participa ca element permanent, subordonat, în structurile silvestre, fie stejărișuri amestecate, fie fâgete de mică altitudine (± 400 m.s.m.). Sub influența vremelnică a unui climat mai cald și xeric, la care, probabil, a contribuit și factorul uman, a apărut posibilitatea afirmării lui simultane, atât la interiorul cât și la exteriorul lanțului muntos românesc.

De asemenea, în interpretarea faptelor fitoistorice am luat ca bază, așa cum se obișnuiește în palinologie, granița rațională a polenului, în cazul nostru de brad, ca fiind orizontul cel mai profund de la care începe înscrierea curbei sale raționale, oferită de procentajele tot mai mari ale polenului său, până la maxima absolută dintr-un profil turbos analizat palinologic. Această curbă polinică rațională oglindește participarea tot mai abundentă a bradului în fitocenozele silvestre, pentru ca, în apogeul ei, să reflecte caracterul mai mult sau mai puțin dominant al acestuia, raportat la fag sau molid.

Ca să cunoaștem mai bine zona de intrare, să stabilim mai corect timpul și căile de migrare ale bradului în țara noastră am folosit cele mai relevante spectre polinice, identificate în diverse mlaștini de turbă, dispersate de-a lungul lanțului muntos carpatic românesc. Tabelul 1 cuprinde spectrele polinice ale esențelor lemnoase din vremea revenirii subatlantice a carpenului, iar Tabelul 2 valorile procentuale cele mai ridicate ale polenului de brad, surprinse, în general, în aceleași mlaștini. În Fig. 2 am schițat expansiunea maximă a brădetelor în Holocenul superior.

Am afirmat [17] că revenirea subatlantică a cărpinetelor s-a petrecut acum aproximativ 1.600 de ani, pe întreg teritoriul românesc, a avut o durată de ± 300 de ani și că această realitate fitoistorică poate fi considerată ca reper al sosirii, răspândirii și participării bradului în structurile silvestre de la noi, diferențiate în timp și spațiu. Perioada este “aproximativ” corectă, gândindu-ne că datarea cu C^{14} de la Iezerul Căliman stabilește vârsta la 1.710 ± 240 ani B.P. [22], iar datarea din Munții Semenicului [42], ca punct sud-vestic din țara noastră se încadrează, aproximativ, în aceleași coordonate de timp.

Bazinul Dorna-Lucina (nordul Carpaților Orientali). În majoritatea spectrelor polinice obținute în mlaștinile de turbă din nordul Carpaților Orientali [29], granița rațională a polenului de brad (*Abies*) apare în perioada maximei revenirii subatlantice a carpenului, iar curba sa rațională, cuprinsă între 7,50% și 17,50% este înscrisă după aceasta

ISTORICUL BRĂDETELOR DIN ROMÂNIA

Tabel 1
Reafirmarea subatlantică a carpenului

Alt. (m.s.m.)	Stațiunea	Adânc. (cm)	Picea (%)	Pinus (%)	Abies (%)	Fagus (%)	Carpinus (%)	Betula (%)	Alnus (%)	Quercus (%)	Tilia (%)	Ulmus (%)	Acer (%)	Q.M. (%)	Salix (%)	Corylus (%)	Regiunea (Zona)
880	Pitugani II	155	54,66	9,90	0,66	16,60	9,90	1,33	5,90	0,66	0,00	0,00	0,00	0,66	0,66	2,40	Dorna-
810	Colăcel I	80	52,80	1,90	0,80	17,00	12,40	5,90	6,40	0,66	1,20	0,60	0,00	2,40	0,60	0,60	Lucina
880	Ciocănești (Botos)	65	64,20	0,60	0,60	15,60	5,80	5,20	4,50	1,30	0,00	1,33	0,60	2,60	0,60	0,60	
1000	Iezerul Mare	420	5,33	0,00	0,00	72,00	10,00	0,66	8,00	2,66	0,66	0,66	0,00	4,00	0,00	4,00	Oaș-
900	Vlășchinescu I	270	21,18	1,32	0,00	58,28	14,57	0,00	1,99	1,99	0,00	0,00	0,00	1,99	0,65	1,33	Maramures
916	Călățele	295	16,66	0,66	29,33	30,33	10,00	1,33	0,66	6,66	2,66	0,66	0,00	10,00	0,66	4,00	
916	Călățele I	360	14,66	0,66	21,66	37,33	11,33	3,33	2,66	6,00	0,66	0,00	0,00	6,66	2,00	1,33	Munții
1150	Molhasul cu Lacuri	465	47,33	2,00	16,00	24,00	9,33	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00	Apuseni
1240	Mluha	390	31,00	2,60	28,30	22,40	13,20	0,00	0,60	0,60	0,00	0,60	0,00	1,20	0,00	0,66	
1383	Sub Gozna I	75	4,00	1,33	12,73	60,07	12,06	0,67	0,00	3,33	0,67	3,37	0,00	7,39	1,33	2,66	Munții
1388	Zănoaga Roșie III	105	17,42	5,36	10,72	27,47	18,76	0,00	6,03	2,00	8,71	0,66	0,00	11,37	3,35	10,05	Semenic
1800	Tăul între Brazi	75	38,28	40,92	6,60	6,60	5,28	0,00	0,67	0,67	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	Munții
1840	Tăul Zănoagă	85	30,78	21,34	2,02	22,24	10,56	1,34	5,61	0,85	0,67	1,20	0,00	2,72	0,67	0,44	Retzat
2050	Muntinul Mic I	65	40,66	9,33	24,00	12,66	9,33	0,00	1,33	0,66	0,00	0,66	0,00	1,33	0,00	0,00	Munții
2050	Muntinul Mic II	110	31,33	8,66	19,00	16,66	10,66	0,00	8,00	2,66	1,33	0,66	0,00	4,66	0,66	0,00	Parâng
2000	Ucea-Corabia	75	21,33	2,33	14,00	27,33	15,33	2,00	12,00	2,00	2,00	0,66	0,00	4,66	0,00	2,00	Mnții
2170	Puha I	97,5	31,33	4,00	14,60	19,33	10,66	0,66	11,33	4,60	0,60	1,30	0,00	6,60	1,33	4,00	Făgăras
1017	Comandău II	180	24,15	2,70	7,59	50,37	9,66	0,00	1,38	0,69	0,00	2,76	0,00	3,45	0,60	8,97	Cotul
900	Bisoca-L.mușchi	225	0,00	2,00	4,00	66,66	13,33	4,00	2,66	4,66	0,00	0,66	0,00	5,33	2,00	3,33	Carpaților

Tabel 2

Valorile maxime ale polenului de brad

Alt. (m.s.m.)	Stațiunea	Adânc. (cm)	Picea (%)	Pinus (%)	Abies (%)	Fagus (%)	Carpinus (%)	Betula (%)	Alnus (%)	Quercus (%)	Tilia (%)	Ulmus (%)	Acer (%)	Q.M. (%)	Salix (%)	Corylus (%)	Regiunea (Zona)
880	Pilugani II	100	48,40	4,30	7,70	26,20	5,70	2,30	4,30	0,00	0,00	0,60	0,00	0,60	0,60	1,80	Dorna-Lucina
810	Colăcel I	50	47,30	8,70	9,30	19,30	3,90	6,30	2,10	0,60	0,60	0,60	0,00	1,80	0,60	1,20	Lucina
880	Ciocănești (Botoș)	40	60,90	0,00	8,60	15,60	4,60	2,60	4,60	0,00	0,00	1,90	0,00	1,90	0,00	0,00	Oaș-Maramureș
1000	Iezerul Mare	140	3,94	1,97	5,33	85,50	0,00	0,00	1,33	3,33	0,00	0,00	0,00	3,33	1,00	2,00	Oaș-Maramureș
900	Vlășchinescu I	170	1,33	1,33	4,66	84,00	4,66	0,00	0,00	2,66	0,00	0,66	0,00	3,33	0,66	1,33	Maramureș
916	Călățele	250	23,33	1,33	43,33	21,00	2,66	0,66	2,66	2,66	1,33	0,66	0,00	4,66	0,66	1,33	Munții Apuseni
916	Călățele I	280	16,16	0,66	43,33	29,33	2,00	2,00	1,33	3,33	0,00	0,00	0,00	3,33	0,66	1,33	Munții Apuseni
1150	Molhașul cu Lacuri	120	32,00	2,00	45,33	16,66	1,33	0,00	0,00	2,00	0,66	0,00	0,00	2,66	0,00	0,00	Munții Apuseni
1240	Mluha I	430	41,50	0,66	37,60	12,20	6,60	0,00	0,66	0,00	0,66	0,00	0,00	0,66	0,00	2,66	Munții Apuseni
855	Gărăna I	53	0,66	1,73	55,68	17,92	0,66	0,00	17,72	1,28	4,48	1,28	0,00	7,00	0,64	8,00	Munții Semenic
855	Gărăna II	84	1,33	2,00	84,42	6,00	1,33	0,00	2,00	0,00	2,66	0,00	0,00	2,66	0,66	0,66	Munții Semenic
1750	Bistrițoara I	90	10,66	2,00	44,66	31,33	8,33	0,00	0,66	0,00	1,33	0,00	0,66	2,00	0,66	0,00	Munții Tarcu
1800	Baranu s. Râu Șes	170	9,33	8,66	38,70	26,66	10,66	0,00	0,66	1,33	2,00	0,00	0,00	3,33	1,66	5,00	God., Cernei
1920	Sub Retezat	110	43,00	19,00	31,00	0,00	3,00	0,00	0,00	2,00	2,00	0,00	0,00	4,00	1,00	0,00	Munții Retezat
1930	Lacul Lia	120	28,81	22,11	29,04	9,24	4,69	0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	4,00	0,66	0,00	Munții Retezat
2125	Adăpătoarea Capre.	62	39,33	17,33	28,66	2,66	3,33	3,33	0,00	2,00	1,33	0,66	0,00	4,00	1,33	4,66	Munții Retezat
2050	Muntinul Mic I	60	50,66	6,00	29,00	9,33	2,00	0,00	0,66	2,00	0,66	0,66	0,00	3,33	0,00	0,00	Munții Parâng
2050	Muntinul Mic II	200	54,33	2,66	25,33	2,66	1,33	0,00	8,66	2,66	1,33	0,66	0,00	4,66	0,66	0,00	Munții Parâng
1750	Sărata	115	32,00	3,33	25,33	29,70	2,20	0,00	5,33	1,33	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00	0,00	Munții Făgăraș
2000	Ucea-Corabia I	105	32,00	4,65	26,00	21,33	4,00	0,00	9,33	1,33	0,66	0,66	0,00	2,66	0,00	2,00	Munții Făgăraș
2030	Podragu II	100	37,33	4,00	27,33	24,33	2,00	0,66	2,00	0,66	1,33	0,00	0,00	2,00	0,00	3,33	Munții Făgăraș
1017	Comandău	105	47,33	0,67	9,33	40,00	0,00	0,00	0,67	0,67	0,00	0,00	0,00	0,67	1,33	0,00	Cotul Carpaților
900	Bisoca-L. negru	165	7,66	1,98	42,90	41,90	1,33	0,66	2,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66	0,00	M. Stânișoarei
860	Pângărăcior	80	13,33	0,66	59,33	23,33	0,66	0,00	0,66	1,33	0,00	0,00	0,00	1,33	0,00	0,00	M. Stânișoarei
1183	Tăul Obcioarei	315	22,00	0,00	41,33	33,33	0,66	0,00	0,66	0,66	0,66	0,66	0,00	2,00	0,00	0,00	M. Maramureș

ISTORICUL BRĂDETELOR DIN ROMÂNIA

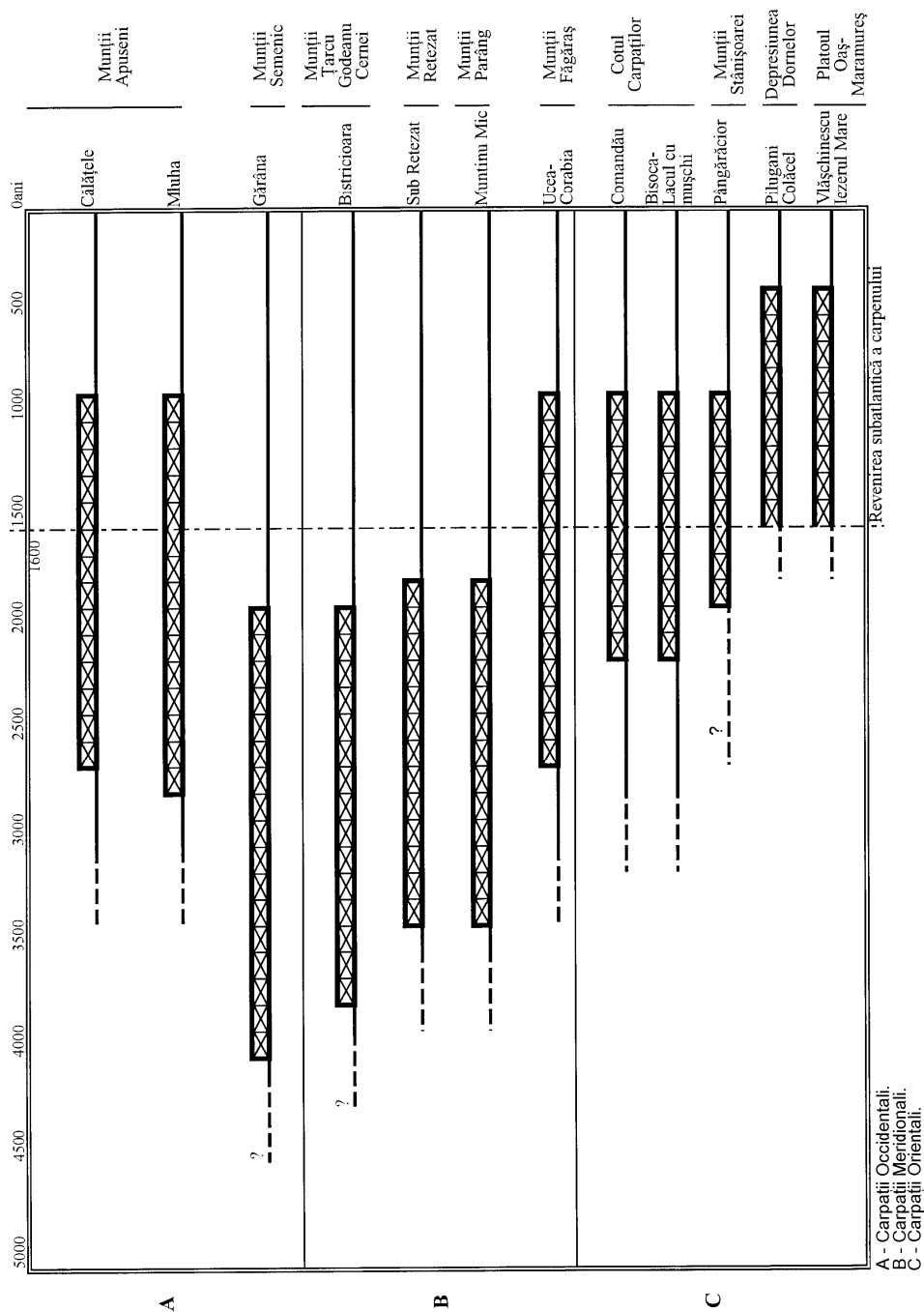


Fig. 2. Reprezentarea extensiunii maxime a brădetelor în Holocenul superior.

și mult, mult întârziată comparativ cu a fagului. După toate probabilitățile, curba rațională a fagului are un avans de cca. 1.500 de ani. *Avansul real al fagului, în structurile silvestre din această zonă, față de brad este o realitate fitoistorică și nu poate fi contestată nici cu estimările radiocarbonului (C^{14}).*

Valori de peste 10% ale polenului de brad s-au înregistrat în mlaștinile de turbă situate spre bazinul transilvan (ex. Teșna Împutită – 17,20%) și nu este exclusă posibilitatea ca acestea să ateste prezența, mai recentă, a brădetelor dominante de pe latura sudică a Masivului Rodnei – 950 m.s.m. [14]. Spectre polinice similare (40% polen de brad) au fost identificate și în turba de la Tăul Obcioarei (1.183 m.s.m.) din Munții Maramureșului [37]. Este posibil ca polenul acestor brădete, situate la vest-nord-vest de Bazinul Dorna-Lucina să fi fost transportat de vânt pe direcția vest-nord-vest → est-sud-est și să apară în spectrele polinice de la Teșna Împutită, îmbogățindu-le și mai mult, comparativ cu cele cunoscute din alte mlaștini turboase din perimetrul Dornelor.

Referitor la istoria pădurilor subatlantice din nordul Carpaților Orientali, deși altitudinea este cuprinsă între 810–890 m.s.m., molidișurile au caracter dominant sporo-polinic (48-69%), comparativ cu făgetele (15,9-32,7%). Asemenea valori procentuale sugerează ideea că făgetele n-au constituit păduri compacte în bazinul Dornelor, iar polenul lor, captat și conservat aici este rezultatul unui transport eolian, pe distanțe apreciabile, pe aceeași direcție vest-nord-vest → est-sud-est, mai ales din bazinul transilvan, unde, pe platoul Oaș-Maramureș (\pm 950 m.s.m.) ating cele mai ridicate valori din țara noastră: 85-94% [31].

Podișul Oășan-Maramureșan (nordul Transilvaniei). În mlaștinile de turbă din nordul Transilvaniei, revenirea subatlantică a carpenului este ușor detectabilă (10-14%), nu este însoțită de granița rațională a polenului de brad, neperceptibilă pe platoul Oaș-Maramureș, din cauza valorilor extrem de scăzute (0,66-5,33%) și întrerupte ale polenului de brad, apărute după revenirea subatlantică a carpenului (Tabel 1). Asemenea valori procentuale scăzute presupun fie prezența întâmplătoare a bradului în structura făgetelor subatlantice, fie că acesta n-a vegetat în acest perimetru; în acest ultim caz, polenul bradului înregistrat palinologic aici ar putea apărea ca efect al unui transport din regiuni mai îndepărtate.

În vremuri istorice, mai timpurii, întregul platou Oaș-Maramureș pare să fi fost un areal unitar, compact, al făgetelor, în care astăzi mai apar câteva enclave de molidișuri pure (ex. Tăul lui Dumitru, Poiana Brazilor), restrânse ca arie după opinia lui P o p [31, p. 109], ca urmare a defrișărilor pădurilor de molid și înlocuirea lor, pe cale naturală, cu făgete.

Carpații Occidentali. 1. *Munții Apuseni.* Cele mai cunoscute evenimente fitoistorice subatlantice din țara noastră sunt cuprinse în perimetrul central al Munților Apuseni (Muntele Mare-Balomireasa-Munții Gilăului), grație numeroaselor analize sporo-polinice efectuate în peste 40 mlaștini de turbă, sedimentate în bazinele hidrografice superioare ale Someșului Rece [18] și Someșului Cald [11, 12, 27, 30]. Menționăm că despre unele zăcăminte turboase s-au scris și publicat câte 2 – 5 diagrame polinice (ex. Molhașul de la Călățele), ale căror spectre polinice sunt asemănătoare între ele, fiind prelevate, pe verticală, la aceleași intervale (din 15 în 15 cm).

Asemenea investigații polen-analitice, extrem de amănunțite au evidențiat în numeroase cazuri fie stagnarea, fie încetinirea proceselor turbogenice, probabil cândva în Subborealul superior, aproximativ cu 3.500 de ani în urmă. Supoziția noastră are ca argument apariția, în profile deschise, a unor orizonturi de turbă înguste, mai întunecate la culoare, care separă stratul turbos superior, deschis la culoare și cu grosimi apreciabile (250-300 cm), de cel bazal, mai puțin gros (75-125 cm), de culoare galben-brunie, ce se brunifică în contact cu atmosfera, devenind mai unsuros decât cel superficial. Ideea noastră are, de asemenea, ca suport științific și salturile bruște ale polenului de brad și fag, în numeroase cazuri atingând 10-15%, *fără să se identifice granița rațională, cu siguranță apărută cu mult înaintea revenirii subatlantice a carpenului.*

Valorile polenului de brad, oscilante între 17-29% în timpul revenirii subatlantice a carpenului, apar ca informații palinologice exacte, întărind afirmația anterioară și încadrând fenomenul în Subatlanticul mediu (± 1.600 de ani), suficient de sigur în subfaza a II-a a *fazei molidului-fagului-bradului*. Este vremea când bradul a devenit codominant în pădurile din zonă, fie ele *brădeto-făgeto-molidișuri*, fie *făgeto-brădeto-molidișuri*, la altitudini de 850-1.200 m.s.m., contemporane cu nominalizata *subfază molid-brad-fag* de la altitudini mai ridicate (1.400–2.000 m.s.m.). Este timpul când făgetele coborau spre altitudini mai scăzute (± 400 m.s.m.), în timp ce molidișurile pure urcau spre culmi mai înalte (1.600–1.800 m.s.m.).

Caracterul dominant al bradului în structurile acestor păduri de amestec “rășinoase-foioase” este confirmat de valorile polenului său, extrem de ridicate (43,33-46,33%), însă întotdeauna apărute după revenirea subatlantică a carpenului și după prima maximă polinică ($\pm 40\%$) a fagului. Asemenea păduri cu mult brad nu sunt cunoscute în nordul Carpaților Orientali [19, 26, 29], însă apar constituite, mai târziu, în împrejurimile sudice ale Munților Rodnei [14], sau în Munții Maramureșului [37].

După aprecierile noastre [18], în Munții Apuseni pădurile au început să se îmbogățească cu fag cândva în Subboreal, cu ± 4.000 de ani în urmă, iar cu brad puțin mai târziu (± 3.500 de ani). Datarea cu C^{14} efectuată în mlaștina de la Căpățâna, din bazinul superior al Someșului Rece, nu exclude vârsta aproximată de noi, dar întărește ideea că, pentru pădurile cu mult brad din Munții Apuseni, granița rațională a polenului de brad este în avans cu cel puțin 1.500 de ani, comparativ cu ceea ce se cunoaște în nordul Carpaților Orientali (ex. Dorna-Lucina).

Decalajul în timp presupus de noi pare să fie real, pentru că datările cu C^{14} efectuate în sedimentele organo-minerale de la Iezerul Căliman (alt. 1.665 m.s.m.) indică o vârstă de 1.710 ± 240 ani B.P. [22] pentru revenirea subatlantică a carpenului, iar momentul expansiunii (= granița rațională) bradului acum ± 2.700 de ani. Și în această situație apare un avans al bradului în Munții Apuseni (± 800 de ani), luând ca reper Munții Căliman, distanțați cu ± 40 km sud-est de zăcămintele turboase din bazinul Dornelor.

Pentru istoria subatlantică a pădurilor din Munții Apuseni, C i o b a n u [10] a identificat la Mluha (alt. 1.240 m.s.m.), stațiune situată cu cca. 45 km la sud și în afara axului central al Munților Apuseni, o variantă locală a istoriei pădurilor, mult asemănătoare cu ce s-a descoperit, mai târziu [13, 35], în Carpații Meridionali, îndepărtați cu ± 150 km la sud de Mluha.

Indiferent că admitem sau nu împărțirea climatului postglaciar în climatul pinului, molidului și al fagului, corespunzător celor trei faze silvestre (*faza pinului, faza molidului și faza fagului*), ultimele două împărțite de C i o b a n u în subfaze sau etape, apreciem că *subfaza molid-brad-fag*, atribuită în acest caz sfârșitului fazei molidului, însă după *subfaza molidului cu carpen* este corectă. Admițând această succesiune, nominalizată *subfază a molidului cu carpen* nu este altceva decât *faza molidului și carpenului*, iar *subfaza molid-brad-fag*, care-i succede, aparține debutului fazei fagului (= faza molid-fag-brad) și se caracterizează printr-un avans valoric remarcabil al polenului de brad (16,33-33,33%) față de cel de fag (3,33-19,33%).

Revenirea subatlantică a carpenului apare la Mluha după prima maximă valorică a polenului de brad (37%), însă înaintea celei absolute (38%), de la care, spre suprafață începe să devină dominant polenul fagului (34,33-81%) atât asupra celui de brad (33,33-8,66%), cât și de molid (34,33-5,33%). Fenomenul palinologic surprins la Mluha la începutul fazei *molid-fag-brad* (= Subatlanticul timpuriu) redă caracterul dominant al bradului în structurile silvestre, mai timpuriu decât al fagului, episod opus celui identificat în celelalte mlaștini din Munții Apuseni.

Asemenea informație fitoistică a fost descoperită și în mlaștinile de turbă din etajul alpin-subalpin al Carpaților Meridionali, unde avansul brădetelor este și mai evident față de făgete. După timpul maximei procentuale absolute a polenului de brad ($\pm 31\%$ în Munții Retezat și Parâng), cu mult în devans față de revenirea subatlantică a carpenului, nu este exclusă posibilitatea ca evenimentul de la Mluha să reprezinte o etapă intermediară a migrării bradului în perimetrul central al Munților Apuseni.

2. *Munții Banatului - Masivul Semenic*. Revenirea subatlantică a carpenului în pădurile din sud-vestul țării noastre, cu mențiune specială din Masivul Semenic [9] a fost reconsiderată de noi [17], iar mai nou confirmată, aproximativ, ca vârstă și cu C¹⁴ [42]; rămâne suficient de dificil să se stabilească granița rațională a polenului de brad, pe care o apreciem cu mult anterioară celei din Munții Apuseni (± 3.500 de ani în urmă), sau din nordul Carpaților Orientali (± 1.500 de ani).

În studiul efectuat de C i o b a n u [9] se constată o prezență cu valori procentuale treptat mai ridicate ale polenului de brad, dar și de fag, începând cu *faza molidului* (= *faza molidului cu alun și stejăriș amestecat*), când polenul bradului și fagului participă la construcția spectrelor polinice cu valori extrem de oscilante (2,5-24%) de la un orizont la altul, în cadrul aceluiași sediment turbos, dar și între diferitele sedimente turboase înșiruite altitudinal (800–1.400 m.s.m.).

Asemenea valori polinice, variate procentual de la orizont la orizont în același profil, ar putea reflecta existența unui proces turbogenic frecvent întrerupt în Postglaciar, reflectând o istorie a pădurilor destul de sincopată, atât între fazele silvestre cât și pe durata acestora. Presupunerea noastră a fost, mai recent, confirmată cu C¹⁴ [42], unde între două datări, distanțate între ele doar de un strat de turbă de 10 cm grosime, apare o diferență de ± 3.000 de ani, durată care ar acoperi mai mult de jumătate din Atlantic și Subboreal ($6.781 \pm 57 - 3.859 \pm 47$ ani B.P.).

Din acest motiv considerăm că în cadrul fazei *molidului* nu apare suficient de bine localizată granița rațională a polenului de brad, tot mai ridicat valoric, probabil în *faza molidului și carpenului* neidentificată de C i o b a n u [9], însă considerată de noi

și aici, ca desfășurată în Subboreal, bazându-ne pe caracterul unitar al istoriei pădurilor din România [17]. Mai recent, aplicându-se și determinarea vârstei cu metoda C^{14} [42], presupunerea noastră a fost confirmată, stabilindu-se un moment din *faza molidului și carpenului* petrecut cu ± 4.200 ani în urmă.

De la această vârstă, mai timpurie comparativ cu alte regiuni din România, credem că începe curba rațională a bradului, devansând-o aici și mai categoric pe cea a fagului, la începutul *fazei fagului*. Această realitate polen-analitică l-a determinat pe C i o b a n u [9] să afirme că *faza fagului* în sud-vestul țării începe cu *subfaza bradului*, urmată de *subfaza de concurență fag-molid-brad* în care a identificat revenirea subatlantică a carpenului și care s-a terminat cu *subfaza fagului*.

Nu este lipsit de temei științific faptul că C i o b a n u [9] a identificat, în câteva sedimente bazale ale unor mlaștini de turbă din Munții Semenic, polenul bradului și fagului, este adevărat, în cantități mici (0,66-2,64%) și întrerupte, în timpul *fazei pinului*, în vremea aceea mai puțin sigur încadrată în timp (12.000–14.000 de ani). Aceste secvențe polen-analitice l-au determinat să afirme că *bradul se găsea destul de aproape de partea sud-vestică a țării noastre și a imigrat repede în Postglaciar din Balcani, unde își avea refugii glaciare* [9], confirmând astfel ideea exprimată de P o p [31] că *bradul a putut ajunge în țara noastră venind și din Balcani, pe calea Planinelor, până în Carpații românești*.

Ideea exprimată atunci pare verosimilă astăzi, când știm că în sud-vestul Peninsulei Balcanice, la Gramousti (alt. 285 m.s.m.) și Rezina (alt. 1.800 m.s.m.), situate în nord-vestul Greciei, W i l l i s [45,46] a identificat, polen-analitic, și existența bradului cu cca. 11.000-13.000 de ani în urmă, într-un context silvestru în afirmare, alcătuit din pin, stejar, ulm etc.

Îmbogățirea spectrelor polinice, în Postglaciarul din Munții Semenic, cu polenul bradului, mai ales în *faza molidului* (= *faza molidului cu alun și stejăriș amestecat*) ar putea reprezenta anumite momente din timpul migrării bradului spre nord, pe măsură ce se apropia, tot mai mult, de țara noastră. Presupunerea noastră are ca suport documentar analizele de polen din Bulgaria, însoțite de datări de vârstă prin metoda C^{14} , toate indicând apariții mai timpurii în sud-vestul Bulgariei, în perimetrul muntos Vitoș-Rila-Pirin-Rodopi [5, 6], sau în vestul Bulgariei [44], comparativ cu zonele centrale (Sredna Gora) și nord-vestice (Stara Planina) [23].

Ideea esențială este că în Atlanticul mediu (6.500-6.000 ani B.P.) apare granița rațională a polenului de brad, acesta devenind palinologic dominant în Subboreal (± 4.700 - 4.300 ani B.P.), alcătuind un etaj propriu cu *Pinus peuce* în regiunile sud-sud-vestice (Munții Rila și Rodopi) și vestice (Munții Konjavska), în timp ce în zona centrală (Munții Sredna Gora) granița rațională este mai tardivă (± 5.000 ani B.P.), iar valorile maxime ale polenului de brad se încadrează între 4.000-2.000 ani B.P., cu ceva mai timpurii decât cele din Stara Planina.

Prezența timpurie a bradului în Peninsula Balcanică a fost identificată, cu prioritate, de Č e r n j a v s k i [8], în mlaștinile de turbă stivuite în depresiunea Vlasina (Serbia), situate la altitudinea de ± 1.200 m.s.m. Autorul a descoperit o *fază a bradului*, după *cea a stejarului*, încadrându-se temporal *fazei molidului cu stejăriș amestecat și alun* de la noi. Perioada stabilită atunci are suficient suport științific, gândindu-ne că în

vestul Bulgariei, în Munții Konjavska [44], în vecinătatea graniței cu Serbia, polenul bradului se afirmă în Atlanticul mediu (± 6.300 ani B.P.), devenind dominant în Subboreal, până acum ± 3.500 ani, când a alcătuit un etaj propriu.

Urmărind, cu precădere, existența bradului în afara granițelor țării noastre, de-a lungul Postglaciarului, ca sursă potențială de imigrare a acestuia spre țara noastră, considerăm suficient de edificatoare și informațiile polen-analitice din Slovenia. Se știe sigur că acum ± 7.000 de ani, la Ledine, stațiune din Alpii Juliani, din nord-vestul Sloveniei, bradul și fagul au început să domine structurile silvestre, ajungându-se la un stadiu de climax *Abieti-Fagetum*, stadiu perturbat acum ± 1.000 de ani, ca urmare a colonizărilor accentuate din acele timpuri [15, 43].

Informațiile palinologice din Slovenia ar părea să reflecte un decalaj, ca timp postglaciar (± 7.000 ani B.P.) al bradului, raportat la cel din Bulgaria (± 6.300 ani B.P.), poate și din Serbia. Considerând acest decalaj ca fiind real, nu este exclusă ideea migrării lui din vest spre noi, prin culoarele muntoase (Alpii Dinarici, Predinarici etc.), cât mai aproape de Planine, unde ar fi făcut joncțiunea cu culoarul sud-nord, imigrând apoi în sud-vestul României, cu un avans de ± 2.500 de ani față de regiunile nordice ale Carpaților Orientali.

Carpații Meridionali. 1. *Munții Țarcu – Godeanu – Cernei.* Luând ca realități valorile concurențiale ale polenului de fag și brad identificate în spectrele polinice ale mlaștinilor turboase din Munții Țarcu-Godeanu-Cernei, B o ș c a i u [2] admite că fagul apare mai timpuriu în structurile silvestre bănățene decât bradul. Autorul crede că fagul a poposit, migrând din sudul Peninsulei Balcanice, la începutul Atlanticului, iar bradul cândva în prima parte a Atlanticului. Trebuie reținut faptul că în majoritatea investigațiilor polen-analitice apare un ușor avans al graniței raționale a polenului de fag, comparativ cu cea a bradului, însă există și cazuri când valorile curbei raționale a polenului de brad sunt în avans față de cele ale fagului. În această situație brădetele premerg făgetelor.

Spre deosebire de informațiile polen-analitice identificate în mlaștinile de turbă din Masivul Semenic, situat în vecinătatea sud-vestică a Munților Țarcu-Godeanu-Cernei, sau în Carpații sud-vestici (de exemplu în Munții Retezatului, Munții Parângului), la estul zonei cercetate de B o ș c a i u, unde s-a înregistrat revenirea subatlantică a cărpinetelor, acest “efemer” episod silvestru nu poate fi aici identificat.

Acceptând că împărțirea istoriei vegetației subboreal-subatlantice în cele trei subfaze este cea reală, apar suficiente argumente în cunoașterea pădurilor cu mult brad. După opinia lui B o ș c a i u, *subfaza brad* (31,66%), *molid* (21,33%), *fag* (10,66%) și *carpen* (18,66%), derulată după *faza molidului cu carpen*, cuprinde cea mai mare parte a Subborealului și este urmată de *subfaza fagului* (26,66%), *bradului* (38,70%) și *carpenului* (10,66%), care acoperă ultima parte a Subborealului și începuturile Subatlanticului; este subfaza când brădetele înscriu cea mai ridicată valoare polinică ($\pm 38,70\%$), pe care B o ș c a i u o consideră ca aparținând Subborealului, însă *nu exclude posibilitatea apartenenței la Subatlanticul timpuriu!*

Acceptând a doua alternativă, înseamnă că acest maxim procentual al bradului apare și aici, ca în Munții Retezat [35] și Munții Parâng [13], cândva în prima parte a Subatlanticului (= *subfaza molid-brad-fag*, din cadrul *fazei molidului-fagului*-

bradului, posibil cu un ușor avans în vegetația silvestră din Munții Țarcu-Godeanu-Cernei). Fenomenul a fost deja identificat și suficient stabilit pentru istoria pădurilor din Munții Semenicului [9] și nominalizat ca *subfaza bradului* de la începutul Subatlanticului. Ceea ce a mai rămas din Subatlantic este acoperit de *subfaza fagului* ($\pm 48,60\%$) și *bradului*, ale cărui valori polinice, în scădere, oscilează între 20,66% și 5,33%.

Pentru istoria pădurilor din sud-vestul Carpaților Meridionali (=Munții Țarcu-Godeanu-Cernei) nu trebuie neglijate valorile relativ ridicate ale polenului de carpen (18,66%) din *subfaza brad-molid-fag-carpen* (=subfaza *brad-molid-carpen-fag*, după procentajele descrescânde ale competitorilor!), mult asemănătoare cu cele din *faza molidului și carpenului*; sunt realități procentuale care pot atesta o durată mai îndelungată a cărpinetelor, asemănător cu cele cunoscute din Carpații sudici și sud-estici, deja confirmate cu metoda radio-carbonului ($\pm 6.500-2.900$ ani B.P.). Este perioada când s-au instalat brădetele, mai timpuriu decât făgetele, dispersând și, în final, smulgând un extins areal al fostelor molidișuri, al căror rol fitosociologic este, treptat, preluat de brădeto-făgete, iar în final de făgete.

Dozimetria cu C^{14} , atestând prezența polenului de brad în pădurile din Munții Semenicului cu ± 4.200 de ani în urmă, rămânem la ideea că granița rațională a polenului de brad ar putea fi stabilită acum ± 4.000 de ani, iar expansiunea pădurilor cu brad dominant ar fi contemporană cu cea din nord-vestul Bulgariei (Stara-Planina, 4.000-2.000 de ani).

2. *Munții Parângului*. Revigorarea subatlantică a carpenului în pădurile din împrejurimile Munților Parâng apare mai evidentă în mlaștinile de turbă dispersate pe versantul sudic (10,66-13,33% polen), comparativ cu cele de pe clina nordică; aici polenul pinului (*Pinus mugo*) apare suprareprezentat (25,33-45%), cauzând estomparea procentajelor polenului de brad și fag. Pe versanții sudici jnepenișele sunt mai puțin răspândite, probabil ca efect al pantei, mult mai domoală aici, favorizând o activitate pastorală intensă, timpurie, în etajul subalpin. În contrast cu aceasta, expoziția nordică apare abruptă, plină de grohotișuri, ici-colo cu lăculețe glaciare, rămășițe ale foștilor ghețari care coborau spre bazinul transilvan. Expoziția nordică a Munților Parâng, fiind mai puțin prielnică activității pastorale, își menține încă aspectul biogeografic natural în golurile alpine.

Caracteristicile esențiale ale istoriei pădurilor din acest areal sunt: apariția aproximativ simultană a polenului de brad și fag, cu valori procentuale subunitare, în *faza molidului și carpenului*, înaintea maximei absolute ($\pm 24,66\%$) a polenului de carpen, fază silvestră mai timpurie și mai de durată în Carpații Meridionali decât în cei nordici Orientali, recent confirmată și cu C^{14} [22]; granița rațională a polenului de brad (*Abies*) apare în a doua parte a Subborealului (± 3.800 de ani), iar curba sa polinică rațională urcă la 30,66%, cauzând reculul celei de molid (77,33-43,33%); maxima valorică procentuală a polenului de brad devansează revenirea subatlantică a carpenului; granița rațională a polenului de fag (*Fagus*) este ușor mai tardivă decât a bradului, însă curba sa rațională poate atinge valori de 34-56%, apărute totdeauna după maxima procentuală a polenului de brad; *pădurile cu mult brad premurg celor cu mult fag*.

În arealul Munților Parâng *faza molidului-fagului-bradului* începe cu subfaza *molidului-bradului-fagului* (44,66%, 30,66%; 12,66%), desfășurată înaintea revenirii subatlantice a carpenului și aproximată de noi, ca durată, în intervalul 3.500-2.000 de ani B.P.

Între istoria pădurilor din Munții Parâng [13] și cea din Munții Retezat [35] există un sincronism remarcabil în ultimii 10.000 de ani, motiv pentru care renunțăm să mai prezentăm fitoistoria din Masivul Retezat și împrejurimi [38]. Insistăm doar asupra informațiilor palinologice de la Tăul Zănoștii, unde nu s-a surprins tipica *subfază a molidului-bradului-fagului*, ca în alte mlaștini din zonă, lăsând impresia unei neconcordanțe fitoistoreice.

În anii 1970 am bănuțit că întretăierea bruscă a curbilor polinice ale carpenului și fagului ar reflecta mai degrabă un lent proces în sedimentarea zăcămintului turbos, decât o explozie a făgetelor în zonă. Presupunerea s-a confirmat aplicându-se, mai recent [22], metoda C¹⁴, care a stabilit o lipsă în procesul de sedimentare de ± 2.450 ani, lacună care cuprinde intervalul 5.275 ± 55 ani B.P. – 2.820 ± 70 ani B.P., reprezentând amurgul Atlanticului și întregul Subboreal; este timpul *fazei molidului și carpenului*, mai timpurie aici, însă sincopată, atât aceasta cât și faza silvestră care a urmat (*faza molidului-fagului-bradului*), în perioada ei de instalare (= *subfaza molid-brad-fag*).

3. *Munții Făgărașului*. În arealul Munților Făgăraș, situat în extremitatea sud-estică a Carpaților Meridionali există numeroase date fitoistoreice subboreal-subatlantice, descifrate polen-analitic în numeroase mlaștini de turbă cuibărite în etajul alpin (1.950-2.150 m altitudine), niciodată împădurit în Holocen [16]. Este motivul pentru care le considerăm ca cele mai expresive informații fitoistoreice, sintetic surprinse. Aici *faza molidului și carpenului* rămâne cea mai detaliat evidențiată, avându-și obârșia (= granița rațională a polenului de carpen) cândva în Atlanticul mediu, iar primul maxim al cărpinetelor (30% polen) a fost probabil atins acum 5.780 ± 60 ani [22].

Este posibil ca atât granița rațională a polenului de brad, cât și a fagului să apară sincron în arealul făgărașan, ce le atestă simultaneitatea în pădurile din a doua parte a *fazei molidului și carpenului* (± 3.500 de ani în urmă), cu mult înaintea revenirii subatlantice a carpenului, aici mai de durată, mai extinsă altitudinal - 10-15,33% polen - procentaje înjumătățite comparativ cu cele găsite în mlaștinile din depresiunea Făgărașului, la altitudinea de 440 m.s.m. [1]. Revenirea subatlantică a carpenului apare după prima maximă a polenului de fag ($\pm 40\%$), însă înaintea celei de brad (20-28%), aspect polen-analitic asemănător cu cel din Munții Apuseni, unde totuși fagul are un avans, ușor sesizabil, față de brad.

Carpații Orientali. *Bisoca, Comandău, Pângărăciu*. Studiul polen-analitic al zăcămintelor de turbă de la Comandău și Bisoca, situate de o parte și alta a Carpaților de Curbură, ca entitate geomorfologică sudică a Carpaților Orientali rămâne interesant pentru problema urmărită de noi. Și aici se poate desluși revenirea carpenului, în Subatlantic, însă competiția dintre granița rațională a bradului și a fagului pe de o parte și distanța în timp a acesteia, luând ca reper revigorarea subatlantică a carpenului presupune un avans substanțial al fagului în pădurile de la Cotul Carpaților, comparativ cu bradul.

P o p și C i o b a n u [34] constată că polenul fagului este întâlnit cu valori mici în spectrele polinice de la Bisoca, atunci când stejarul (*Quercus*) înregistrează cea mai mare valoare polinică (50-70%) din *faza stejărișului amestecat*, derulată după *faza pinului*, însă înaintea *fazei carpenului*, aici cu mult mai timpurie decât în nordul Carpaților Orientali, nefiind exclusă posibilitatea nici comparativ cu alte zone! Atât la Comandău cât și la Bisoca făgetele erau dominante ($\pm 50\%$, respectiv $\pm 69\%$) pe vremea revenirii subatlantice a carpenului, bradul abia atingând 4,66-7,50% polen; granița rațională a bradului este mai timpurie decât cea din Bazinul Dornelor, însă mai tardivă decât cea din Munții Făgăraș. Durata acestor brădete ar putea cuprinde intervalul 2.200–1.000 de ani B.P.

Din informațiile polen-analitice de care dispunem, pădurile cu mult brad de-a lungul Carpaților Orientali apar, probabil, caracteristice numai etajului montan extracarpatic, pentru că atât la Bisoca, cât și la Pângărăcior (alt. ± 800 m.s.m.), stațiune situată în partea sudică a Munților Stânișoarei, cu mult mai nordică decât Bisoca s-au identificat [3] valori foarte ridicate ale polenului de brad (59,33%), necunoscute până acum în Carpații Orientali, însă depășite de cele de la Gărâna (84,42%) din Munții Semenicului [9].

Considerăm, totuși, că valorile de 44-47% polen de brad înregistrate în majoritatea mlaștinilor de turbă din Munții Apuseni, precum și cele de 30-40% descoperite în numeroase "smârcuri turboase" alpine din Carpații Meridionali reflectă arealul maxim al brădetelor, deloc neglijabil, și în aceste zone ale țării noastre.

Este interesant că la Pângărăcior, aceste brădete succed în timp unor făgete, extinse ca durată și areal, după cele 60% polen ale acestora. Noutatea acestor evenimente fitoistorice rămâne descifrarea, și aici, a *subfazei brad-fag-molid*, așa cum aceasta fusese cunoscută în arealul Munților Apuseni la altitudini de 900–1.150 m.s.m., dar contemporană cu *subfaza molid-brad-fag*, nominalizată pentru mlaștinile de turbă "cuibărite" la altitudini de peste 1.300 m.

Pentru Subatlantic, istoria pădurilor de la Pângărăcior apare deosebită de cea din Bazinul Dornelor [29], pentru că *subfaza brad-fag-molid* n-a fost surprinsă nici în perioade mai apropiate vremurilor noastre. Deși nu s-a identificat granița rațională a polenului de brad, se admite [3] că bradul a fost absent în cea mai mare parte a Subborealului, însă polenul său apare identificat, cu valori reduse, la începutul Subatlanticului. Toate aceste realități polen-analitice, descifrate la Pângărăcior conduc la ideea că granița rațională a polenului de brad este mai timpurie decât în nordul Carpaților Orientali (ex. Dorna-Lucina), însă mai tardivă decât cea de la Bisoca și din Carpații Meridionali.

Comportamentul bradului în structurile silvestre din perimetrele intracarpatică est-transilvane, înșiruite de-a lungul bordurii vestice a Carpaților Orientali apare profund modificat, începând de la Comandău, ca stațiunea cea mai sud-estică și terminând cu platoul Oaș-Maramureș din nordul Transilvaniei. Pe acest culoar (traseu), revenirea subatlantică a carpenului este identificabilă (9-12% polen de carpen), însă granița rațională a polenului de brad devine mai greu detectabilă, din cauza valorilor maxime extrem de scăzute: Comandău $\pm 7,50\%$ [34]; Mohoș $\pm 9,33\%$ [36]; Ruț – 5,33% [7]; Depresiunile Ciuc și Gheorgheni $\pm 4\%$ [40, 41]; Munții Căliman $\pm 4\%$ [21].

Asemenea informații palinologice atestă caracterul întâmplător al bradului în structurile silvestre, încă de la sfârșitul *fazei molidului și carpenului*, iar participarea lui mai remarcabilă apare evidentă în Subatlanticul mediu (2.000–1.000 ani B.P.). Cunoscându-se astăzi condițiile fizico-geografice și pedoclimatice ale zonelor est-transilvane, bântuite de temperaturi extrem de scăzute iarna (-37°C), cu lungi perioade de îngheț la sol, cu precipitații mai abundente, lichide sau solide, decât în restul Transilvaniei, putem presupune că acest climat subatlantic cu nuanță pronunțat continentală a fost și este de lungă durată (\pm 3.000 de ani), stânjenind participarea bradului în fitocenozele silvestre ale acestui extins areal est-transilvan.

Calea nordică de pătrundere a bradului în România rămâne incertă, iar dacă s-a produs este de dată recentă. Se știe sigur că între două stațiuni central-europene, sudul Bavariei [25] și sud-vestul Boemiei [24], situate de-a lungul căii principale de migrare alpino-sudetică a bradului apare un decalaj de \pm 3.000 de ani; în sudul Bavariei pădurile cu brad dominant s-au desfășurat în Atlanticul 2-Subboreal (5.600–3.900 ani B.P.), iar în sud-vestul Boemiei, maxima expansiune a bradului a avut loc în Subatlantic (acum 2.500–1.500 ani).

Între sud-vestul Boemiei și nordul României este o distanță estică de \pm 500 km, aproximativ egală cu cea dintre sudul Bavariei și sud-vestul Boemiei, pe care a trebuit s-o parcurgă bradul. Durata desfășurării acestui fenomen ar trebui, prin analogie, să fie egală cu cea de pe ruta principală alpino-sudetică! Comparând brădetele din sud-vestul Boemiei, ca areal și timp, cu cele din Munții Apuseni, ele pot fi considerate sincrone în Subatlantic.

Concluzii. 1. Prezența bradului în pădurile din nordul Carpaților Orientali (ex. Dorna-Lucina) are caracter mult mai tardiv decât în alte zone montane ale țării, în mod special zonele sud-vestice; acest decalaj, în timp, poate fi de \pm 2.500 de ani.

2. Calea sudică de pătrundere a bradului în România este o realitate.

3. Sosirea bradului în țara noastră, migrând din Peninsula Balcanică s-a petrecut cu \pm 4.200 de ani în urmă.

4. Răspândirea bradului pe teritoriul românesc, începând din sud-vestul țării s-a desfășurat atât pe direcția nordică, de-a lungul Carpaților Occidentali, ca lanț muntos vestic al Carpaților românești, cât și pe direcția estică, pe culoarul montan al Carpaților Meridionali, până la Carpații de Curbură, ca entitate muntoasă sud-estică a Carpaților Orientali. De aici, în direcția nord-nord-vestică, migrarea masivă a bradului s-a realizat pe bordura extracarpatică a Carpaților Orientali și mult, mult mai redusă pe cea intracarpatică, est-transilvană.

BIBLIOGRAFIE

1. Bartmus, A., *Analize de polen în turba mlaștinilor de la Avrig*, "Comun. Bot.", **10**, 1969, 25-34.
2. Boșcaiu, N., *Flora și vegetația Munților Țarcu, Godeanu și Cernei*, Ed. Acad. Rom., București, 1971.
3. Boșcaiu, N., Lupșă, V., Ichim, I., *Analiza sporo-polinică a sedimentelor din mlaștina Pângărăciur*, "An. Muz. Ști. Nat. Piatra Neamț, Geol.-Geogr.", **3**, 1976, 367-378.
4. Boșcaiu, N., Rădulescu, D., *Analiza sporo-polinică a turbei interstadiale de la Porumbacu de Sus (jud. Sibiu)*, "Stud. Comun. Muz. Brukenthal" (Sibiu), **22**, 1978, 203-205.

5. B o z i l o v a, E., P a n o v s k a, H., T o n k o v., S., *Pollen analytical investigations in the Kupena National Reserve, West Rhodopes*, "Geogr. Rhodopica", No. 1, 1989, 186-190.
6. B o z i l o v a, E., S m i t, A., *Palynology of Lake "Sucho Ezero" from South Rila Mountain (Bulgaria)*, "Fitologija", **11**, 1979, 54-67.
7. B u z, Z., *Cercetări palinologice în depozitele precuaternare și cuaternare în regiunea Sovata-Praid-Dealul*, Teză Dr., Univ. Cluj-Napoca, 1987.
8. Č e r n j a v s k i, P., *Pollenanalytische Untersuchungen der Sedimente des Vlasina-Moores in Serbien*, "Beih. Bot. Centralbl.", **60** (B), 1937, 229-326.
9. C i o b a n u, I., *Analize de polen în turba Masivului Semenic din Banat*, Teză Dr., Univ. Cluj, 1948.
10. C i o b a n u, I., *Analiza polinică a turbei de la Mluha (M. Apuseni)*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1958, 239-255.
11. C i o b a n u, I., *Analize de polen în turba unor mlaștini de pe cursul superior al Someșului Cald*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1965, 283-298.
12. C i o b a n u, I., *Analiza polinică a turbei din Molhașul de la Călățele (jud. Cluj)*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1968, 385-393.
13. C i o b a n u, I., D i a c o n e a s a, B., Ș u t e u, Ș., *Recherches palynologiques dans le Massif du Parîng (I)*, "Rev. Roum. Biol., Bot.", **12** (2-3), 1967, 141-148.
14. C i o b a n u, I., D i a c o n e a s a, B., Ș u t e u, Ș., *Analize de polen în unele mlaștini de turbă din zona sudică a Masivului Rodna*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1972, 37-43.
15. C u l i b e r g, M., Š e r c e l j, A., Z u p a n č i č, M., *Palynologische und phytözönologische Untersuchungen auf den Ledine am Hochplateau Jelovica*, "Razprave Slov. Akad. Znan. Umet., Razred 4", **23** (6), 1981, 175-193.
16. D i a c o n e a s a, B., *Mlaștinile de turbă din zona alpină a Munților Făgăraș. Importanța lor fitoistorică*, Teză Dr., Univ. București, 1969.
17. D i a c o n e a s a, B., F ă r c a ș, S., *Contribuția carpenului în structurile silvestre cuaternare din România*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **43** (1-2), 1998, 11-26.
18. D i a c o n e a s a, B., M i t r o e s c u, S., *Analize de polen în mlaștinile de turbă din bazinul superior al Someșului Rece – Munții Apuseni*, "Contrib. Bot." (Cluj-Napoca), 1986, 79-88.
19. D i a c o n e a s a, B., Ș t e f u r e a c, T., *Analiza sporo-polinică și unele considerații fitoistorice asupra tinovului Valea Stâniei*, "Stud. Cerc. Biol., Ser. Bot.", **23** (5), 1971, 381-388.
20. D y a k o w s k a, J., *Analyse pollinique de quelques tourbières dans les Tatras*, "Acta Soc. Bot. Pol.", **9**, 1932, 473-530.
21. F ă r c a ș, S., *Istoria vegetației din Carpații românești, în analizele palinologice de la Iezerul Căliman, Munții Căliman*, "Contrib. Bot." (Cluj-Napoca), 1995-1996, 83-92.
22. F ă r c a ș, S., de B e a u l i e u, J.L., R e i l l e, M., C o l d e a, G., D i a c o n e a s a, B., G o e u r y, C., G o s l a r, T., *Premières datations ¹⁴C de séquences polliniques tardiglaciaires et holocènes de Carpates roumaines*, "C.R. Acad. Sci., Sci. Vie, Paris", **322**, 1999, 799-807.
23. F i l i p o v i t c h, L. A., *Late postglacial development of the forest vegetation of Stara Planina and Sredna-Gora*, Éd. Acad. Bulg. Sci., Sofia, 1976.
24. J a n k o v s k a, V., *Paläogeobotanische Rekonstruktion der Vegetationsentwicklung im Becken Třeboňská pánev während des Spätglazials und Holozäns*, Academia, Praha, 1980.
25. K ü s t e r, H., *Vom Werden einer Kulturlandschaft*, în B e r g l u n d, B.E., B i r k s, H. J. B., R a l s k a – J a s i e w i c z o w a, M., W r i g h t, H. E. (Eds.), *Palaeoecological Events During the Last 15000 Years*, p. 543-544, Wiley, New York, 1996.
26. L u n g u, L., *Sucesiunea postglaciară a vegetației muscinale din tinovul de la Criștișor (jud. Suceava)*, în *Progrese în palinologia românească*, p. 237-242, Ed. Acad. Rom., București, 1971.
27. L u p ș a, V., *Mlaștinile de turbă de la Bălcești-Călățele (Munții Apuseni). Flora, vegetația și istoricul vegetației*, Teză Dr., Univ. "Babeș-Bolyai", Cluj, 1971.

28. P e t e r s c h i l k a, F., *Pollenanalytische Untersuchung der "Borysüpfе" in Polen*, "Ber. Deutsch. Bot. Ges.", **45**, 1927, 368-373.
29. P o p, E., *Analize de polen în turba Carpaților Orientali (Dorna-Lucina)*, "Bul. Grăd. Bot. Muz. Bot. Univ. Cluj", **9** (3-4), 1929, 81-210.
30. P o p, E., *Contribuții la istoria vegetației cuaternare din Transilvania*, "Bul. Grăd. Bot. Muz. Bot. Univ. Cluj", **12** (1-2), 1932, 29-102.
31. P o p, E., *Contribuții la istoria pădurilor din Nordul Transilvaniei*, "Bul. Grăd. Bot. Muz. Bot. Univ. Cluj-Timișoara", **22** (1-4), 1942, 101-177.
32. P o p, E., *Cercetări privitoare la pădurile diluviale din Transilvania*, "Bul. Grăd. Bot. Muz. Bot. Univ. Cluj-Timișoara", **25**, 1945, 1-92.
33. P o p, E., *Primele determinări de vârstă cu radiocarbon în turba noastră cuaternară, în Progrese în palinologia românească*, p. 193-204, Ed. Acad. Rom., București, 1971.
34. P o p, E., C i o b a n u, I., *Analize de polen în turba de la Cotul Carpaților*, "Bul. Univ. V. Babeș și Bolyai, Ști. Nat.", **2** (1-2), 1957, 453-474.
35. P o p, E., C i o b a n u, I., D i a c o n e a s a, B., S o r a n, V., *Palynologische Untersuchungen in der Wissenschaftlichen Zone des Nationalparks Retezat*, "Rev. Roum. Biol., Sér. Bot.", **11** (6), 1966, 403-419.
36. P o p, E., D i a c o n e a s a, B., *Analiza palinologică a turbei din tinovul Mohoș (Tușnad)*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1967, 297-303.
37. P o p, E., D i a c o n e a s a, B., B o ș c a i u, N., *Analiza polinică a turbei de la Tăul Obcioarei (raion Vișău, reg. Maramureș)*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Ser. Biol.", 1966, **11** (1), 53-55.
38. P o p, E., L u p ș a, V., B o ș c a i u, N., *Diagrama sporo-polinică de la Tăul Zănoștii (Munții Retezat)*, în *Progrese în palinologia românească*, p. 219-225, Ed. Acad. Rom., București, 1971.
39. P o p o v i c i, R., *Abies din stațiunea paleolitică Voronovița*, "Bul. Fac. Ști." (Cernăuți), **7**, 1934, 15-20.
40. R a ț i u, F., *Cercetări palinologice în complexul mlăștinis eutrof Voșlăbeni (jud. Harghita)*, "Contrib. Bot." (Cluj), 1969, 307-316.
41. R a ț i u, F., *Evoluția postglaciară a pădurilor din Bazinul Giurgeului, reconstituită pe baza analizelor palinologice*, în *Progrese în palinologia românească*, p. 231-235, Ed. Acad. Rom., București, 1971.
42. R ö s c h, M., F i s c h e r, E., *A radiocarbon dated Holocene pollen profile from the Banat Mountains (Southwestern Carpathians, Romania)*, "Flora", **195**, 2000, 277-286.
43. Š e r c e l j, A., *Pelodne analize pleistocenskih in holocenskih sedimentov Ljubljanskega barja*, "Slov. Akad. Znan. Umet., Razprave Diss." (Ljubljana), **9**, 1966, 431-472.
44. T o n k o v, S., B o z i l o v a, E., *Palaeoecological investigation of Tschokljovo marsh (Konjavska mountain)*, "Ann. Univ. Sofia St. Kliment Ohridski, Fac. Biol.", **83** (2), 1992, 5-16.
45. W i l l i s, K. J., *The late Quaternary vegetational history of North-West Greece. I. Gramousti lake*, "New Phytol.", **121**, 1992, 101-117.
46. W i l l i s, K. J., *The late Quaternary vegetational history of North-West Greece. II. Rezina marsh*, "New Phytol.", **121**, 1992, 119-138.

CONSIDERAȚII ASUPRA COMUNITĂȚILOR VEGETALE DISTRIBUITE PE CUPRINSUL CÂMPIEI DIN NORD-VESTUL ROMÂNIEI

PETRU BURESCU*

SUMMARY. - Considerations on Plant Communities Distributed on the North-Western Plain of Romania. The present paper is dedicated to the study of plant communities that edify the vegetation cover of the North-Western Plain of Romania. The research led to identification of four plant associations new for science: *Carici paniculatae-Alnetum glutinosae*, *Irideto-Caricetum otrubae*, *Angelico-Cirsietum cani*, *Callitrichetum palustris*, seven subassociations: *Caricetum gracilis -equisetetosum palustris*, *Glycerietum fluitantis -alismato-eleocharietosum*, *Alismato-Eleocharidetum -eleocharietosum palustris*, *Calthetum laetae -caricetosum leporinae*, *Echinochloo-Polygonetum lapathifolii -chlorocyperetosum glomerati*, *Ceratophylletum demersi -myriophylletosum spicati*, *-lemnetosum minoris*, new for the investigated area. Seven plant associations: *Lemno-Salvinietum natantis*, *Lemno-Utricularietum vulgaris*, *Najadetum minoris*, *Zannichellietum pedicellatae*, *Hottonietum palustris*, *Nymphaeetum albo-luteae* and *Stratiotetum aloidis* represent phytocoenoses with rare plant populations, most of them in peril of extinction which must become the subject of a special protection.

Primele mențiuni floristice asupra Câmpiei din nord-vestul României ne parvin din lucrările autorilor K i t a i b e l (1796) (citat de K a n i t z [19]), S i m o n k a i [29], P r o d a n [27]. Cercetări fitosociologice în această regiune au efectuat P o p [25], R e s m e r i ț ă și colab. [28], K a r á c s o n y i [20-22] ce au fost completate mai recent de B u r e s c u [7-16], B u r e s c u și D o n i ț ă [17].

Comunitățile plantelor identificate au fost încadrate într-un sistem cenotaxonomic utilizat și în Europa Centrală de către O b e r d o r f e r [24], M u c i n a și colab. [23], P o t t [26], B o r h i d i [6], B a l á t o v á - T u l á č k o v á [2-4].

Din punct de vedere fitogeografic, teritoriul cercetat se încadrează în zona de silvostepă a Câmpiei de Vest.

1. Păduri de luncă

Acestea sunt amplasate pe terasa inferioară, mai rar inundabilă, a râurilor Valea Ierului, Crasna, Someș, Barcău. Comunitățile forestiere sunt încadrate în:

Quercu-Fagetea Br.-Bl. & Vlieger in Vlieger 1937 em. Borhidi 1996

Fagetalia sylvaticae (Paw.) 1928 Tx. et Diem. 1936

Alno-Ulmion Br.-Bl. et Tx. 1943 em. Müller et Görs 1958

Ulmenion (Tx. 1952) Oberd. 1953

* *Universitatea din Oradea, Facultatea de Protecția Mediului, 3700 Oradea, România.*
E-mail: carbunar@yahoo.com

Fraxino-Ulmetum (Tx. 1952) Oberd. 1953 em. Pop 1979 (Syn.: Querco-Ulmetum Issler 1924, Querco-Fraxinetum Rudski 1949, Fraxino pannonicae-Ulmetum Soó 1960).

Specii de recunoaștere: *Ulmus laevis*, *U. minor*, *Fraxinus excelsior*, *F. angustifolia* ssp. *oxycarpa*, *Quercus robur*, *Populus alba*, *Frangula alnus*, *Acer campestre*, *Cornus sanguinea* etc. Actualmente, asociația se prezintă sub forma unor enclave în lunca Văii Ierului la Cadea, Săcueni, Șiter-Ganaș, Hotoan.

2. Păduri de lunci joase la margini de râu cu băltiri

În această categorie aparțin comunitățile forestiere încadrate în:

Alnetea glutinosae Br.-Bl. et Tx. ex Westhoff et al. 1946

Alnetalia glutinosae Tx. 1937

Alnion glutinosae Malcuit 1929

Carici paniculatae-Alnetum glutinosae Burescu et Doniță 1999

Specii caracteristice asociației: *Alnus glutinosa* și *Carex paniculata*. Caracteristice alianței: *Carex pseudocyperus*, *C. acutiformis*, *C. gracilis*, *Thelypteris palustris*, *Urtica kioviensis*, *Eupatorium cannabinum*. Caracteristice ordinului și clasei: *Solanum dulcamara*, *Caltha palustris* ssp. *laeta*, *Menyanthes trifoliata*, *Myosoton aquaticum*, *Galium palustre*, *Lycopus europaeus*, *Lythrum salicaria*, *Symphytum officinale*, *Poa palustris*. Aceste păduri se prezintă sub formă de benzi longitudinale în Lunca Văii Ierului la Diosig, Lacul Plaurul Vărgat Săcueni. De asemenea, acest aniniș a fost identificat și în comuna Foieni.

Salicetalia auritae Doing 1962

Salicion cinereae Müller & Görs ex Pass. 1961

Thelypteridi-Salicetum cinereae Šamšak 1963

Specii de recunoaștere: *Salix cinerea* și *Thelypteris palustris*. Formează tufărișuri dese pe terenuri depresionare, permanent inundate, cu soluri organice de natură turboasă din Lunca Văii Ierului la Diosig, Săcueni și Piru Nou.

3. Vegetația halofilă

Pe terenuri joase cu soluri salinizate (solonețuri, lăcoviști solonețizate), mai rar inundabile, exemplificăm asociațiile studiate de B a l á z s [5], A s v a d u r o v și D r a g u [1], D r a g u și A s v a d u r o v [18], K a r á c s o n y i [20, 22], încadrate în cenotaxonii:

Festuco-Puccinellietea Soó 1968

Artemisio-Festucetalia pseudovinae Soó 1968

Festucion pseudovinae Soó 1933

Artemisio-Festucetum pseudovinae Soó in Máthé 1933 corr. Borhidi 1996

Specii de recunoaștere: *Festuca pseudovina* și *Artemisia maritima* ssp. *monogyna*. În prezent, asociația ocupă suprafețe restrânse pe solurile sărăturoase cu excedent de apă primăvara și uscate vara, aflate în lungul Văii Ierului pe aliniamentul Diosig-Săcueni-Andrid-Hotoan.

Peucedano officinalis-Asteretum punctati (Rapaics 1927) Pop 1968, apud Borhidi 1996 (= *Peucedano-Festucetum pseudovinae* Pop 1968)

Specii caracteristice asociației: *Festuca pseudovina* și *Peucedanum officinale*. Actualmente, această asociație ocupă suprafețe restrânse pe lăcoviștile sărăturate de la Diosig, Sălacea, Hotoan.

Fragmentar, în Câmpia de nord-vest mai apar următoarele asociații de sărături: *Hordeetum hystricis* Wendelbg. 1943, *Puccinellietum distantis* Soó 1937, *Agrostio-Caricetum distantis* Rapaics ex Soó 1938, *Camphorosmetum annuae* (Rapaics 1916) Soó 1933 corr. Soó 1968, *Heleochloëtum (Crypsis) schoenoidis* (Soó 1933) Țopa 1939.

4. Mlaștini parțial acoperite cu apă

Aici aparțin următoarele asociații frecvent răspândite și încadrate în:

Phragmitetea R.Tx. et Preising 1942

Phragmitetalia Koch 1926

Phragmition communis Koch 1926

Glycerietum maximae Hueck 1931

Specie caracteristică asociației: *Glyceria maxima*. Fitocenozele asociației sunt de talie înaltă și dese, vegetând pe soluri măloase acoperite de apă la marginea bălților, canalelor, lacurilor, mlaștinilor din localitățile Șimian, Valea lui Mihai, Vășad, Tarcea, Otomani, Hotoan etc.

Phragmitetum communis Soó 1927 em. Schmale 1939

Specie caracteristică asociației: *Phragmites communis*. Formează stufărișuri compacte în mlaștini, crovuri, bălți, lacuri din Câmpia Ierului, la Săcueni, Diosig, Șimian, Galoșpetreu, Otomani, Ghenci etc.

Typhetum angustifoliae Pignatti 1953

-facies cu *Lemna minor* Burescu 2000

Specie caracteristică asociației: *Typha angustifolia*. Diferențială pentru facies: *Lemna minor*. Formează păpurișuri pure în bălțile, canalele, lacurile cu apă permanentă din Câmpia Ierului, la Vășad, Șilindru, Valea lui Mihai, Galoșpetreu, Otomani, Tarcea, Ghenci.

Schoenoplectetum lacustris Chouard 1924

-facies cu *Lemna minor* Burescu 2000

Specie caracteristică asociației: *Schoenoplectus lacustris*. Formează colonii în bălți, canale, lacuri fără stuf, pe soluri nisipo-nămoloase acoperite permanent cu apă la Vășad, Galoșpetreu, Otomani, Tarcea, Hotoan.

Bolboschoenetum maritimi Eggler 1933

Specie caracteristică asociației: *Bolboschoenus maritimus*. Fitocenozele asociației se prezintă sub formă de centuri la marginea lacurilor, bălților, mlaștinilor slab salinizate din Câmpia Ierului, la Vășad, Valea lui Mihai, Otomani, Hotoan.

Magnocaricetalia Pignatii 1953

Magnocaricion elatae Koch 1926

Caricion gracilis (Neuhäusl 1959) Oberd. et al. 1967

Caricetum gracilis Almquist 1929

-*equisetetosum palustris* Burescu 1999

Specie caracteristică asociației: *Carex gracilis*. Diferențială pentru subasociație: *Equisetum palustre*. Rogozișul de mlaștini acide permanent inundate este răspândit în Câmpia Ierului, la Cadea, Săcueni, Șimian, Căuaș, Hotoan.

***Caricetum acutiformis* Egger 1933**

-facies cu *Phragmites communis* Burescu 2000

-facies cu *Mentha aquatica* Burescu 2000

Specie caracteristică asociației: *Carex acutiformis*. Diferențiale pentru facies: *Phragmites communis*, *Mentha aquatica*. Cuprinde fitocenoze sub formă de benzi la marginea bălților, lacurilor, mlaștinilor din Câmpia Ierului, la Șimian, Șilindru, Vășad, Diosig, Galoșpetreu, Otomani, Hotoan.

***Irideto-Caricetum otrubae* Burescu 2000**

Specii caracteristice asociației: *Carex otrubae* și *Iris pseudacorus*. Caracteristice subalianței: *Mentha aquatica*, *Carex riparia*, *C. vesicaria*, *C. vulpina*, *Poa palustris*. Caracteristice alianței și ordinului: *Galium palustre*, *Lysimachia vulgaris*, *Lathyrus palustris*, *Calamagrostis canescens*. Caracteristice clasei: *Lycopus europaeus*, *Stachys palustris*, *Calystegia sepium*, *Polygonum amphibium f.terrestre*, *Glyceria maxima*, *Myosotis scorpioides*, *Berula erecta*, *Eleocharis palustris*, *Alisma plantago-aquatica*.

Asociația a fost găsită în Mlaștina Ecedea comuna Căpleni, Balta Resighea comuna Piscolt, Balta Ghenci comuna Ghenci, lunca Someșului comuna Pomi.

La această clasă mai aparțin și alte asociații cum sunt: *Typhetum latifoliae* Lang 1973, *Glycerietum fluitantis* Egger 1933 – *alismato-eleocharietosum* Burescu 1999, *Sparganietum erecti* Roll. 1938, *Alismato-Eleocharidetum* Kovács & Máthé 1967 - *eleocharietosum palustris* Burescu 1999, *Rorippo amphibiae-Oenanthetum aquaticae* (Soó 1928) Lohmeyer 1950, *Caricetum ripariae* Soó 1928, *Caricetum vesicariae* Chouard 1924.

Molinio-Arrhenatheretea R.Tx. 1937

Molinietales Koch 1926

Calthion R.Tx.1937

***Angelico-Cirsietum cani* Burescu 1998**

Specii caracteristice asociației: *Cirsium canum* și *Angelica sylvestris*. Caracteristice alianței: *Caltha palustris* ssp. *laeta*, *Equisetum palustre*, *Galium uliginosum*, *Lysimachia nummularia*, *Trifolium hybridum*, *Cirsium rivulare*, *Senecio barbaraeifolium*, *Juncus articulatus*, *Holcus lanatus*. Caracteristice ordinului: *Symphytum officinale*, *Lythrum salicaria*, *Mentha longifolia*, *Lychnis flos-cuculi*, *Myosoton aquaticum*, *Potentilla anserina*, *Valeriana officinalis*, *Festuca arundinacea*. Caracteristice clasei: *Ranunculus acris*, *Centaurea jacea*, *Eupatorium cannabinum*, *Tanacetum vulgare*, *Achillea millefolium*, *Pulicaria vulgaris*, *Lathyrus pratensis*, *Lotus tenuis*, *Trifolium strictum*, *T. pratense*, *Vicia cracca*, *Plantago lanceolata*, *Carex hirta*.

Fitocenozele asociației se prezintă sub formă de pajiști umede pe terenuri depresionare lipsite de scurgere, cu apa freatică la suprafață, amplasate în lungul văilor din Câmpia Ierului la: Șilindru, Săcueni, Tarcea, Galoșpetreu, Ghenci, din Câmpia Buduslăului: Mlaștina Pârâu Crestur, Lacul Plaurul Vărgat Săcueni, din Câmpia Careiului, Mlaștina Curtuișeni.

Calthetum laetae Krajina 1933

- *caricetosum leporinae* Burescu 1999

Specie caracteristică asociației: *Caltha palustris* ssp. *laeta*. Diferențială pentru subasociație: *Carex leporina*. Cuprinde fitocenoză sub formă de pâlcuri ce se dezvoltă în cuvete lacustre, crovuri cu apă semipermanentă pe soluri hidromorfe din Câmpia de nord-vest, la Șimian, Săcueni, Tarcea, Hotoan.

Agrostion stoloniferae Soó (1933) 1971

Agrostetum stoloniferae (Ujvárosi 1941) Burduja et al. 1956

-facies cu *Phragmites communis* Burescu 1999

-facies cu *Juncus effusus* Zaharia 1972;

-facies cu *Juncus inflexus* Zaharia 1972

Specie caracteristică asociației: *Agrostis stolonifera*. Cuprinde pajiști umede situate pe terenuri joase fără de scurgere, supuse periodic inundațiilor, în lungul Văii Ierului, Săcueni, Tarcea, Otomani, Hotoan.

Caricetum hirtae (non Soó 1927) Dihoru 1975 em. Burescu 1999

Specie caracteristică asociației: *Carex hirta*. Caracteristice alianței: *Agrostis stolonifera*, *Alopecurus pratensis*, *Galium debile* (*G. constrictum*). Caracteristice ordinului: *Lythrum salicaria*, *Symphytum officinale*, *Equisetum palustre*, *Rumex crispus*, *Mentha longifolia*, *Eupatorium cannabinum*, *Pulicaria dysenterica*, *Lychnis flos-cuculi*. Caracteristice clasei: *Tanacetum vulgare*, *Carduus crispus*, *Potentilla reptans*, *Rorippa sylvestris*, *Lathyrus pratensis*, *Vicia cracca*, *Ranunculus sardous*, *Juncus inflexus*, *Calamagrostis epigeios*. Cuprinde pajiști scunde pe terenuri cu soluri aluvionar-nisipoase, supuse periodic inundării în lunca Văii Ierului, la Diosig, Otomani, Sălăcea, Tarcea, din Câmpia Barcăului, Lacul Steluța, Șișterea comuna Cetariu, Lacul Vițeilor, Tăutelec comuna Cetariu.

Pe suprafețele mlăștinoase mai apar următoarele asociații încadrate în această clasă: *Scirpetum sylvatici* Ralski 1931, *Ranunculeto (strigulosi)-Equisetum palustris* Popescu (1974) 1975, *Calamagrostietum pseudophragmites* Kopecki 1968, *Poëtum pratensis* Răvăruf, Căzăceanu et Turenschi 1956, *Poëtum trivialis* Soó 1940, *Carici vulpinae-Alopecuretum pratensis* (Kovács & Máthé 1967) Soó 1971 corr. Borhidi 1996, *Agrostio-Deschampsietum caespitosae* (Soó 1928), Ujvárosi 1947, *Juncetum effusi* Soó (1931) 1949, *Juncus inflexi-Menthetum longifoliae* Lohmeyer 1953.

Comunitățile buruienișurilor nitrofile încadrate în *Bidentetia tripartitae* Tx. et al. in Tx. 1950, *Bidentetalia Br.-Bl. & Tx. ex Klika & Hadac* 1944, *Bidentetion tripartiti* Nordhagen 1940 em. Tx. in Poli et Tx. 1960: *Polygono hydropiperis-Bidentetum* Lohm. in Tx. 1950, *Polygono lapathifolio-Bidentetum* Klika 1935, *Xanthio strumarii-Bidentetum* Timár 1947, *Bidentetum cernui* Slavnič 1951, *Echinochloo-Polygonetum lapathifolii* Soó et Csűrös 1947 – *chlorocyperetosum glomerati* Burescu 1999, se dezvoltă pe soluri bogate în azotați și substanțe organice la marginea lacurilor, canalelor și râurilor din nord-vestul României.

5. Vegetația acvatică

Ocupă bălțile naturale și brațele închise ale Văii Ierului, permanent pline cu apă. Sunt mai răspândite următoarele asociații încadrate în:

Lemnetea de Bolós et Masclans 1955

Lemnetalia minoris de Bolós et Masclans 1955

Lemnion minoris de Bolós et Masclans 1955

Lemnetum minoris Soó 1927

Specii caracteristice asociației: *Lemna minor*, *L. trisulca*, *Spirodela polyrhiza*.

Cuprinde fitocenoze natante bistratificate ce se dezvoltă în apele stătătoare și lin curgătoare, bogate în săruri minerale ale bălților canalelor și Văii Ierului la Șimian, Cadea, Săcueni, Diosig, Tarcea, Hotoan.

Lemno-Hydrocharitetum morsus-ranae (Oberd.) Pass. 1978

Specii caracteristice asociației: *Hydrocharis morsus-ranae* și *Lemna minor*.

Cuprinde fitocenoze de hidrofite natante ce se dezvoltă în apele puternic eutrofice, cu reacție bazică ale bălților, canalelor și lacurilor îmbătrânite aflate în locuri ferite de vânt și însorite la Șilindru, Diosig, Adoni, Tarcea, Otomani, Hotoan, Piru Nou.

Lemno-Salvinietum natantis Miyawaki et Tx. 1960

-facies cu *Lemna minor* Burescu 1999

Specii caracteristice asociației: *Salvinia natans*, *Lemna minor*, *Utricularia vulgaris*.

Cuprinde fitocenoze natante cu specii rare și vulnerabile ce vegetează în bălțile îmbătrânite, canale înfundate cu apă permanentă, biotopuri ferite de vânt, ochiuri și luminișuri din păpuriș la Diosig, Adoni, Tarcea, Otomani, Sălacea.

Stratiotetum aloidis Novinski 1930

- facies cu *Lemna trisulca* Burescu fac.nov.

Specii caracteristice asociației: *Stratiotes aloides*, *Hydrocharis morsus-ranae*, *Lemna trisulca*. Reunește fitocenoze bistratificate care în trecut vegetau pe suprafețe mari în apele liniștite ale canalelor, gârlelor și bălților aflate într-un stadiu mai avansat de colmatare. Astăzi, asociația se mai regăsește la Otomani și Hotoan, fiind periclitată.

Ceratophylletum demersi Hild 1956

- *myriophylletosum spicati* Burescu 1999

- *lemnetosum minoris* Burescu 1999

Specii caracteristice asociației: *Ceratophyllum demersum*, *Najas minor*, *Utricularia vulgaris*, *Myriophyllum spicatum*. Cuprinde fitocenoze submerse din apele bălților și lacurilor îmbătrânite la Șilindru, Șimian, Galoșpetreu, Vășad, Hotoan.

Din această clasă mai sunt prezente în nord-vestul României și alte asociații cum sunt: *Lemnetum gibbae* Bennemma et al. 1943 em. Miyawaki et. Tx. 1960, *Spirodeletum polyrhizae* Koch 1954, *Lemno-Utricularietum vulgaris* Soó 1928, *Salvinio-Hydrocharitetum* (Oberd. 1957) Boșcaiu 1966.

Potametea R.Tx. et Preising 1942

Potametalia Koch 1926

Potamion lucentis Rivas Martinez 1973

Myriophyllo-Potametum Soó 1934

Specii caracteristice asociației: *Myriophyllum spicatum* și *Potamogeton crispus*.

Cuprinde fitocenoze submerse ce vegetează în apele canalelor, bălților și lacurilor bogate în nămol sapropelic, influențate antropic, din localitățile Diosig, Săcueni, Adoni, Tarcea, Otomani, Vășad.

Callitricho-Batrachietalia Passarge 1978

Ranunculion aquatilis Passarge 1964

Ranunculetum aquatilis Géhu 1961

Specii caracteristice asociației: *Ranunculus aquatilis*, *Utricularia vulgaris*, *Myriophyllum spicatum*, *Ceratophyllum demersum*. Cuprinde fitocenoze submerso-natante care vegetează în apa puțin adâncă a bălților, canalelor și lacurilor, la Vășad, Otomani, Hotoan.

Callitrichetum palustris (Dihoru 1975 nom.nud.) Burescu 1999

-facies cu *Lemna minor* Burescu 1999

Specie caracteristică asociației: *Callitriche palustris*. Caracteristice alianței, ordinului și clasei: *Ranunculus aquatilis*, *R. trichophyllus*, *Potamogeton crispus*, *Sagittaria sagittifolia*. Cuprinde fitocenoze natanto-submerse care vegetează în ape limpezi, oxigenate, puțin adânci, aflate pe un substrat nămolos-nisipos din canale lin curgătoare, ochiuri cu ape limpezi din trestiișuri, în lungul Văii Ierului, din Câmpia Buduslăului: Mlaștina Pârâu Crestur, Lacul Buduslău Canton Silvic, Lacul plaurul Vărgat comuna Săcueni, din Câmpia Barcăului: canal Tămășeu Barcău comuna Biharia, din Câmpia Careiului, mlaștina Via Baroti comuna Curtuișeni.

Asociații cu o răspândire limitată cuprinzând specii periclitare și vulnerabile sunt: *Potametum nodosi* (Soó 1960) Segal 1964, *Najadetum minoris* Ubrizsy 1948, *Zannichellietum pedicellatae* Nord. 1954 em. Pott 1992, *Hottonietum palustris* Tx. 1937, *Nymphaeetum albo-luteae* Nowinski 1928.

6. Pajiștile seminaturale

Acestea cuprind asociațiile *Lolio-Potentilletum anserinae* (Rapaics 1927) Knapp 1946, *Trifolio (fragifero)-Cynodontetum* Br.-Bl. et Bolos 1958, *Alopecuretum pratensis* Soó 1938, *Festucetum pratensis* Soó 1938, *Agropyretum repentis* Felföldy 1942 etc. și sunt destinate creșterii animalelor.

Concluzii. 1. În teritoriul cercetat, cuprinzând luncile râurilor din nord-vestul României, vegetația lemnoasă a fost tăiată până aproape de exterminare, încât noi am identificat numai 3 asociații, *Fraxino-Ulmetum*, *Carici paniculatae-Alnetum glutinosae*, *Thelypteridi-Salicetum cinerreae*, ocupând suprafețe mici la marginea lacurilor și râurilor.

2. Vegetația palustră ierboasă aparținând asociațiilor *Glycerietum maximae*, *Phragmitetum communis*, *Typhetum angustifoliae*, *Schoenoplectetum lacustris*, *Bolboschoenetum maritimi*, *Caricetum gracilis*, *Caricetum acutiformis*, *Calthetum laetae*, *Agrostetum stoloniferae* ș.a. ocupă în prezent un teritoriu foarte îngust la marginea lacurilor de acumulare și în lungul canalelor colectoare.

3. Fitocenozele asociațiilor acvatică, *Lemnetum minoris*, *Lemno-Hydrocharitetum*, *Stratiotetum aloidis*, *Ceratophylletum demersi*, *Myriophyllo-Potametum*, *Ranunculetum aquatilis* ș.a., au o prezență sporadică dezvoltându-se în apele stătătoare ale unor lacuri și bălți, care încă nu au fost desecate de om, pentru reintroducerea suprafețelor respective în circuitul agricol.

4. Ne-am adus aportul prin descrierea sau emendarea a 4 asociații: *Carici paniculatae-Alnetum glutinosae*, *Angelico-Cirsietum cani*, *Irideto-Caricetum otrubae* și *Callitrichetum palustris*.

5. Credem că ceea ce a mai rămas din flora și vegetația acestui ținut pot constitui nucleu pentru reamenajări ecologice, în care să se conserve biodiversitatea floristică și să fie contracarată agresiunea umană asupra mediului natural.

BIBLIOGRAFIE

1. A s v a d u r o v , H., D r a g u , I., *Cercetări geobotanice în Câmpia Someșului*, "Dări Seamă Șed. Comit. Geol. Rom.", **53** (2), 1967, 331-336.
2. B a l á t o v á – T u l á ě k o v á , E., *Phytophänologische Charakteristik des Angelico-Cirsietum palustris*, "Doc. Phytosoziol." (Vaduz), **4**, 1979, 1-8.
3. B a l á t o v á – T u l á ě k o v á , E., *Feuchtwiesen des Landschaftsschutzgebietes Šumava*, "Folia Mus. Rer. Nat. Bohem. Occid., Bot." (Plzeň), **18-19**, 1985, 1-82.
4. B a l á t o v á – T u l á ě k o v á , E., *Naß- und Feuchtwiesen der Südwestböhmischen Region Blatensko*, "Folia Mus. Rer. Nat. Bohem. Occid., Bot." (Plzeň), **37-38**, 1993, 1-60.
5. B a l á z s , F., *Nagymajtényi sik*, "Debreceni Szemle", **17** (1), 1943, 16-20.
6. B o r h i d i , A., *Critical Revision of the Hungarian Plant Communities*, Janus Pannonius Univ., Pécs, 1996.
7. B u r e s c u , P., *Plante acvatică și palustre noi pentru Câmpia de Nord-Vest și rare în România*, "Contrib. Bot." (Cluj-Napoca), 1995-1996, 21-26.
8. B u r e s c u , P., *Flora acvatică și palustră din nord-vestul României*, "Nymphaea" (Oradea), **26**, 1998, 179-246.
9. B u r e s c u , P., *Die Vegetation der Sumpfländer im Nordosten Rumäniens*, "Nymphaea" (Oradea), **26**, 1998, 247-256.
10. B u r e s c u , P., *Contributions to the study of reed swamp and moor vegetation in North-Western Romania. Angelico-Cirsietum cani ass. nova*, "Rev. Roum. Biol., Sér. Biol. Vég." (București), **43** (2), 1998, 165-172.
11. B u r e s c u , P., *Conspectul asociațiilor acvatică și palustre din nord-vestul României*, "An. Univ. Oradea, Fasc. Silvic.", **4**, 1999, 107-114.
12. B u r e s c u , P., *Vegetația acvatică din nord-vestul României*, "An. Univ. Oradea, Fasc. Silvic.", **4**, 1999, 151-172.
13. B u r e s c u , P., *La végétation aquatique fixée sur le substrat au nord-ouest de la Roumanie*, "Nymphaea" (Oradea), **27**, 1999, 97-102.
14. B u r e s c u , P., *Vegetația palustră din nord-vestul României*, "Nymphaea" (Oradea), **27**, 1999, 103-132.
15. B u r e s c u , P., *Contribuții la cunoașterea vegetației palustre din nord-vestul României cuprinzând asociațiile din clasa Phragmitetea Tx. et Preising 1942*, "Nymphaea" (Oradea) **28**, 2000, 91-142.
16. B u r e s c u , P., *Vegetația acvatică și palustră din nord-vestul României*, Teză Dr., Univ. "Babeș-Bolyai", Cluj-Napoca, 2001.
17. B u r e s c u , P., D o n i ț ă , N., *Vegetația lemnoasă palustră din nord-vestul României, aninișurile de mlaștină: asociația Carici paniculatae-Alnetum glutinosae ass. nova*, "An. Univ. Oradea, Fasc. Silvic.", **4**, 1999, 91-106.
18. D r a g u , I., A s v a d u r o v , H., *Vegetația naturală din Câmpia Crasnei în legătură cu răspândirea solurilor*, "An. Inst. Cercet. Pedol. Agrochim." (București), **40**, 1974, 281-291.
19. K a n i t z , A., *Reliquiae Kitaibelianae*, "Verh. K.K. Zool. Bot. Ges.", **3-4**, 1893, 57-118.
20. K a r á c s o n y i , C., *Cercetări asupra asociației Peucedano-Festucetum pseudovinae în stațiunile din nord-vestul României*, "Stud. Comun." (Satu Mare), **5-6**, 1981-1982, 597- 608.

COMUNITĂȚI VEGETALE PE CÂMPIA DIN NORD-VESTUL ROMÂNIEI

21. K a r á c s o n y i, C., *Flora Câmpiei Eriului (județul Satu Mare și Bihor)*, "Stud. Comun." (Satu Mare), **7-8**, 1986-1987, 373-420.
22. K a r á c s o n y i, C., *Vegetația terenurilor cu exces de umiditate din Câmpia Ierului*, "Crisia" (Oradea), **20**, 1990, 603-611.
23. M u c i n a, L., G r a b h e r r, G., E l l m a u e r, T., *Die Pflanzengesellschaften Österreichs, Teil I*, Fischer, Jena, 1993.
24. O b e r d o r f e r, E., *Süddeutsche Pflanzengesellschaften, I-IV*, Fischer, Jena, 1992.
25. P o p, I., *Zur Flora und Vegetation der eutrophen Sümpfe von Otomani (Kreis Bihor)*, "Rev. Roum. Biol., Sér. Bot." (București), **13** (5), 1968, 313-319.
26. P o t t, R., *Pflanzengesellschaften Deutschlands*, 2 Aufl., Ulmer, Stuttgart, 1995.
27. P r o d a n, I., *Aspecte din vegetația zonei de vest a R.P.R.*, "Bul. Științ., Ser. Biol. Agric.", **8** (1), 1956, 5-45.
28. R e s m e r i ț ă, I., S p â r c h e z, Z., C s ũ r ö s, Ș., M o l d o v a n, I., *Flora și vegetația nisipurilor din nord-vestul României*, "Comun. Bot." (București), 1971, 39-75.
29. S i m o n k a i, L., *Nagyvárad és vidéke növényvilága*, "Nagyvárad Természetrája" (Oradea), **5**, 1890, 47-137.

CYCLOPIDES DU PARC NATIONAL DES MONTS APUSENI.
I. *ACANTHOCYCLOPS PLESAL* N. SP. ET *ACANTHOCYCLOPS*
BALCANICUS BISAETOSUS N. SSP. (CRUSTACEA, COPEPODA)

SANDA IEPURE*

SUMMARY. – Cyclopides in the National Park of the Apuseni Mountains. I. *Acanthocyclops plesai* n. sp. and *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* n. ssp. (Crustacea, Copepoda). One species and one subspecies of the genus *Acanthocyclops* Kiefer, 1927 are described from the Fața Răchitei pothole and the Alunului Cave, respectively (Apuseni Mountains, NW Romania). *Acanthocyclops plesai* n. sp. and *A. balcanicus bisaetosus* n. ssp. belong to the „*kieferi*” complex which reunites palaeoendemic species distributed over Eastern and Western Europe. The taxonomic, zoogeographic and ecological statutes of the genus are also discussed.

This work, the first of a series dedicated to the problems of the taxonomic and zoogeographic statute of the „*kieferi*” species complex, is a part of a complex study concerning the subterranean aquatic fauna in the Apuseni Mountains.

Acanthocyclops, l'un des genres de Cyclopides les plus communs dans les eaux douces du monde, comprend plus de 50 espèces et sous-espèces, dont 8 ont été signalées jusqu'à présent dans les eaux souterraines de Roumanie [6]. Son statut taxonomique complexe a déterminé la répartition des taxons en cinq groupes: *viridis*, *capillatus*, *gordani*, *robustus-vernalis* et *kieferi* [8]. En tenant compte des principaux caractères morphologiques, les deux formes nouvelles décrites dans le présent travail font partie du groupe *kieferi*.

Matériel et méthodes. Les exemplaires étudiés ont été collectés de deux biotopes aquatiques souterrains (bassins et gours) de l'Aven de Fața Răchitei (Plateau karstique de Padiș) et de la Grotte d'Alun (bassin de Someșul Cald). Ils ont été fixés en alcool 87% et transférés ensuite dans un mélange de glycérine et lactophénol en vue de l'examen des caractères morphologiques. Le matériel est déposé dans la collection de l'Institut de Spéléologie „Emile Racovitza” de Cluj-Napoca, Roumanie.

Description des taxons

Cyclopidae Burmeister, 1834
Cyclopinae Dana, 1853 Kiefer, 1927
Acanthocyclops Kiefer, 1927
Acanthocyclops plesai n. sp.

* Institut de Spéléologie „Emile Racovitza”, 3400 Cluj-Napoca, Roumanie. E-mail: for_sanda@yahoo.com

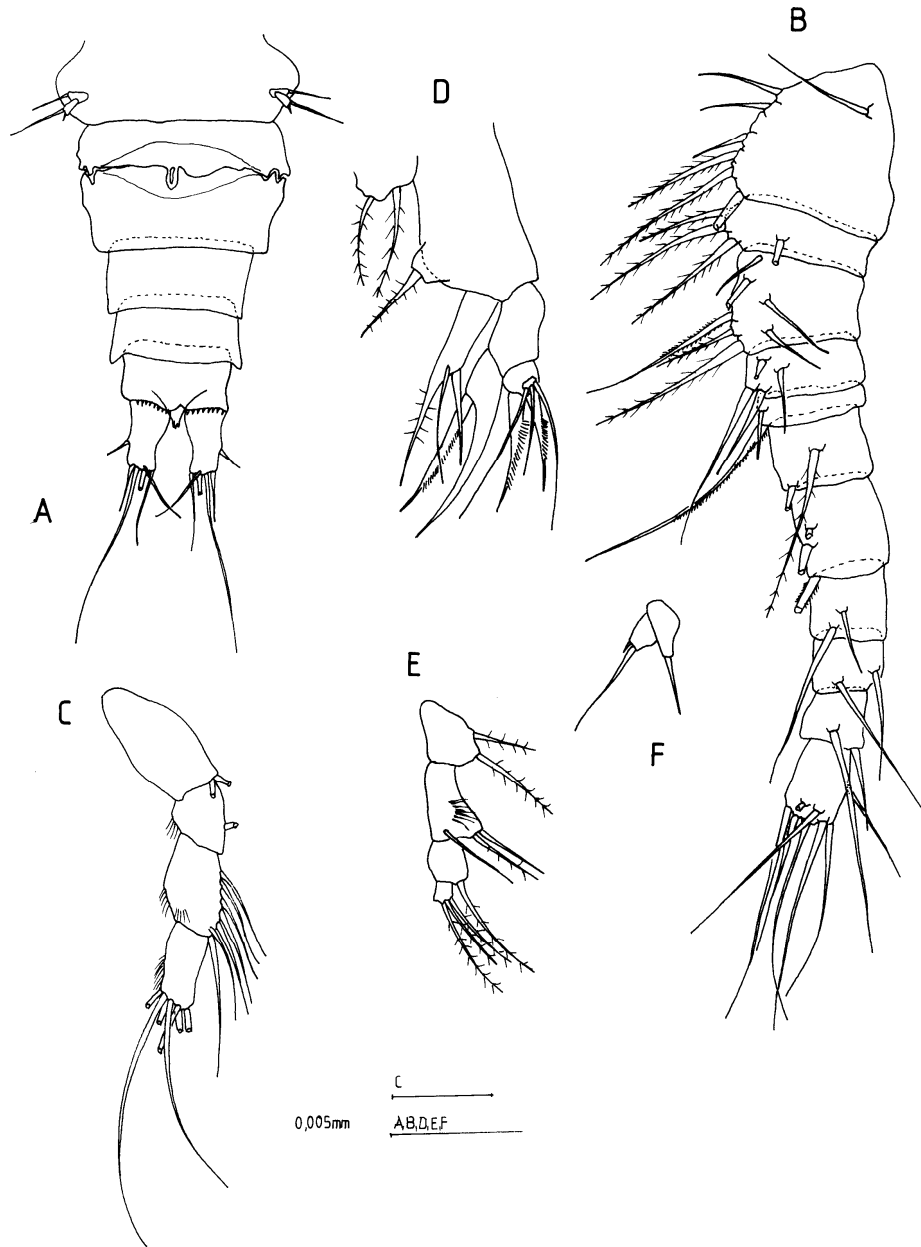


Fig. 1. *Acanthocyclops plesai* n. sp., femelle.
A – Abdomen, réceptacle séminale et furca, vue dorsale. B – Antennule. C – Antenne.
D – Maxille. E – Maxillipède. F – P5.

CYCLOPIDES DU PARC NATIONAL DES MONTS APUSENI

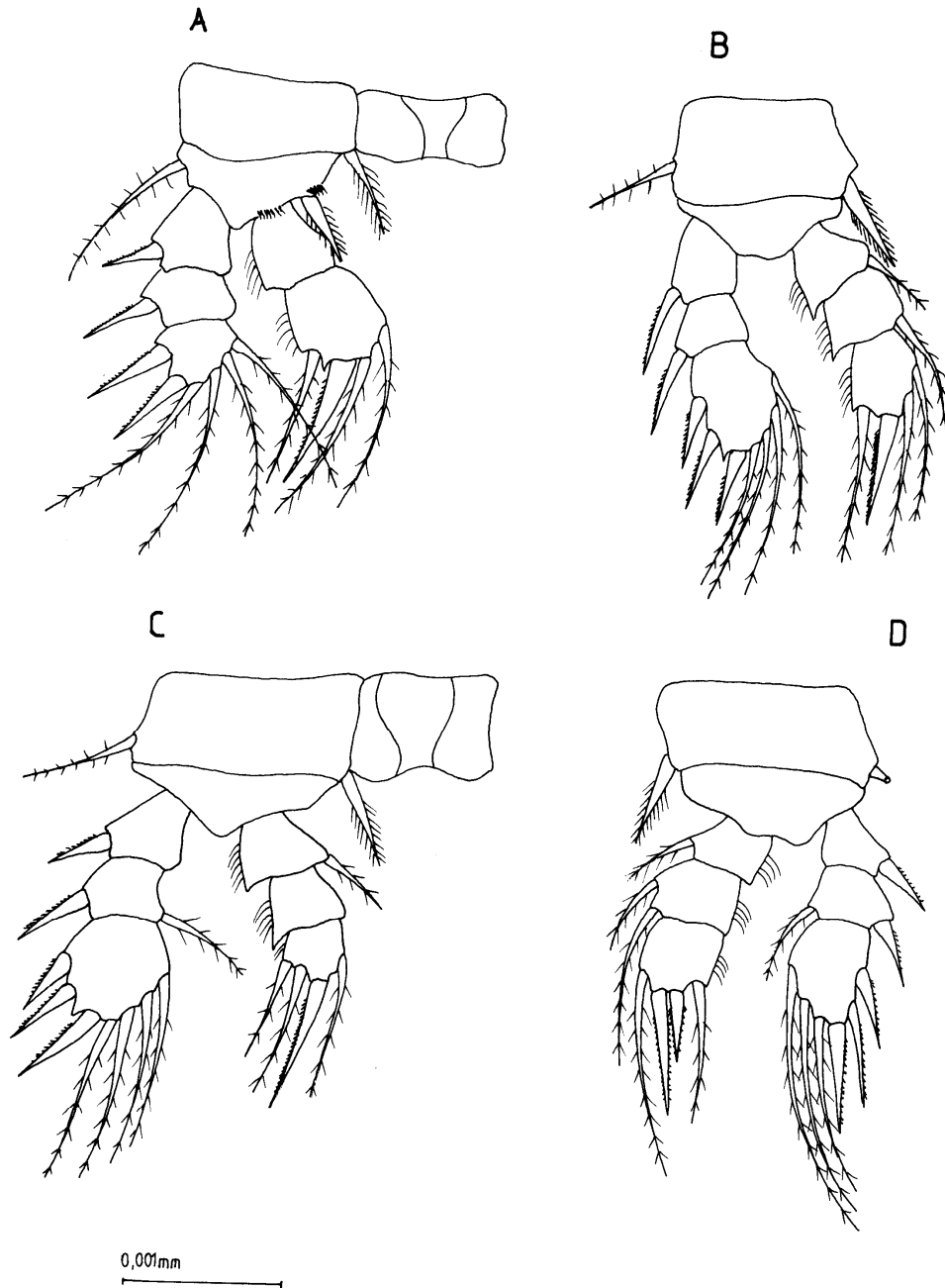


Fig. 2. *Acanthocyclops plesai* n. sp., femelle.
A – P1. B – P2. C – P3. D – P4.

Matériel examiné: une femelle, récoltée le 3 août 2000 (échantillon P I. 0190 de la collection de l'auteur).

Biotope: bassins aquatiques souterrains.

Localité type: Aven de Fața Răchitei (numéro du *Catalogue systématique des grottes de Roumanie* [1] – 3441/3), situé dans la Vallée des Cetățî (Plateau karstique de Padiș), à 1135 m d'altitude.

Étymologie: l'espèce est dédiée au Dr. Corneliu Pleșa.

Femelle: Longueur du corps (sans les soies furcales) 0,487 mm. Largeur maximum du céphalothorax 0,180 mm. Somites urosomaux dépourvus d'ornementation aussi bien sur la face dorsale que sur celle ventrale. Réceptacle séminale similaire à celui de l'espèce type *A. kieferi*. Segment anal avec une rangée de petites épines insérées ventralement; opercule anal en forme de „V” (Fig. 1 A).

Branches furcales courtes, 1,79 fois plus longues que larges (0,336/0,192 mm), légèrement divergentes. Soie apicale interne plus longue que celle externe (0,0288 mm contre 0,0264 mm, rapport 1,09). Soie dorsale insérée dans la moitié postérieure, de longueur à peu près égale à celle des branches furcales.

Antennule à 11 segments. Nombre de soies (chiffres arabes), épines (ép) et aesthètes (ae) sur les segments (chiffres romains): I (6 + 1 ae), II (4), III (6+1 ae), V (1+1 ép), VI (2), VII (2 + 1ae), VIII (1 + 1ae). IX (2), X (2), XI (8) (Fig. 1 B).

Antenne: Basipodite dépourvu d'ornementation, armé de deux soies; l'exopodite manque (Fig. 1 C). Premier segment de l'endopodite porte une soie, le deuxième 6 soies dont une apicale, robuste; bord externe avec une rangée de soies. Dernier segment de l'endopodite armé de 6 soies insérées apicalement, bord externe avec une rangée de soies longues.

Pièces bucales semblables à celles de l'espèce type (Fig. 1 D, E).

Pattes natatoires: Exopodites triarticulés; endopodite P1 biarticulé: 3.2/3.3/3.3/3.3 (Fig. 2 A, B, C, D). Formule des soies et des épines des articles distaux: 2.3.3.3, respectivement 3.4.4.4. La soie insérée sur le basipodite P1 (précoxa) atteint la moitié de l'article distal de l'exopodite. Sclérites intercoxaux sans ornementation visible. Rapport longueur/largeur de l'article distal de l'endopodite P4: 1,29 (0,168/0,216 mm). Rapport entre la longueur des épines apicales interne et externe: 1,71 (0,24/0,14). P5 formée de deux articles nettement distincts; épine interne de l'article distal courte; l'épine externe dépasse trois fois en longueur l'article distal (Fig. 1 F). P6 à peine visible.

Mâle: inconnu.

Observations taxonomiques. *Acanthocyclops plesai* se distingue des autres taxons du genre notamment par les quatre caractères suivants:

- la formule de pattes natatoires;
- la soie de l'article distal de la P5 trois fois plus longue que l'article;
- l'opercule anal aigu et denté;
- la longueur de la soie précoxale de la P1, qui dépasse le premier article.

Il se rapproche d'*A. balcanicus* par plusieurs caractères: la segmentation des pattes natatoires, la forme du segment génital, du réceptacle séminale et du segment distal de l'endopodite de la P4, mais il en diffère nettement par la forme de l'opercule

anal, la longueur de la soie de l'article distal de la P5, la longueur de la soie précoxale de la P1 et l'ornementation des articles des pattes natatoires. Notons que l'opercule anal présente la même forme chez *A. reductus propinquus* aussi, mais les autres caractères en sont bien différents [7].

Acanthocyclops balcanicus bisaetosus n. ssp.

Matériel examiné: 19 femelles et 5 mâles, dont 5 femelles et 1 mâle récoltés le 2 août 1999 (P I. 0087) et 14 femelles et 5 mâles récoltés le 27 novembre 1999 (P I. 0103). Tous les individus ont été disséqués et déposés dans la collection de l'Institut de Spéléologie „Emile Racovitza”.

Biotope: bassins aquatiques concrétionnés (gours). Température de l'eau le 2 août 1999: 4,9°C.

Localité type: Grotte d'Alunul Mic (3413/1), située dans la vallée d'Alunul Mic, à 1150 m d'altitude.

Autres stations: Grotte de Humpleu (3416/2).

Étymologie: la sous-espèce est nommée en référence au caractère le plus discriminant.

Femelle: La description est faite sur 11 individus.

Aspect général semblable à celui des formes qui composent le complexe „*kieferi*” (Fig. 3 A). Longueur du corps (sans les soies apicales des branches furcales) 0,668 mm. Segment génital typique pour le genre, de 0,984 mm de largeur (Fig. 3 B). Bord postérieur du segment anal dentée ventralement. Opercule anal arrondi, ne dépassant pas le bord du segment. Branches furcales courtes, légèrement divergentes et glabres dans la région médiane (Fig. 3 C). Rapport longueur/largeur de branches furcales 1,85. Longueur des soies apicales caudales (considérées de l'extérieur vers l'intérieur) 0,180; 0,111; 0,127, 0,390 mm. Soie dorsale longue, insérée dans la partie distale des branches. Soie antérolatérale insérée au milieu des branches, légèrement plus près du sommet.

Antennule composée de 11 segments (Fig. 3 D). Nombre de soies (chiffres arabes), épines (ép) et aesthètes (ae) sur les segments (chiffres romains): I (7 + 1 ae), II (3), III (7 + 1 ae), IV (2 + 1 ae), V (1 + 1 ép), VI (2), VII (3), VIII (1 + 1 ae), IX (2), X (2), XI (8).

Antenne (Fig. 4 A): formée de quatre segments. Basipodite avec une seule rangée d'épines sur le bord interne, armé de 2 soies. Exopodite absent. Premier segment de l'endopodite avec une soie, le deuxième avec 7 soies, le troisième avec 7 soies apicales et une rangée d'épines sur le bord interne.

Pièces buccales (maxille, maxillule et maxillipède) sans caractéristiques particulières (Fig. 4 B, C, D). Labre avec des dents fines et faiblement arrondies (Fig. 4 E).

Pattes natatoires: Exopodites P2-P4 triarticulés. Endopodite P1 biarticulé. Endopodites P2-P4 triarticulés: 3.2/3.3/3.3/3.3. Formule des épines 2.3.3.3, formule des soies 4.4.4.4. Segment distal de l'endopodite P4 armé de 2 soies et 2 épines inégales. Sclérites intercoxaux P1 – P4 dépourvus d'ornementation (Fig. 5 A, B, C, D).

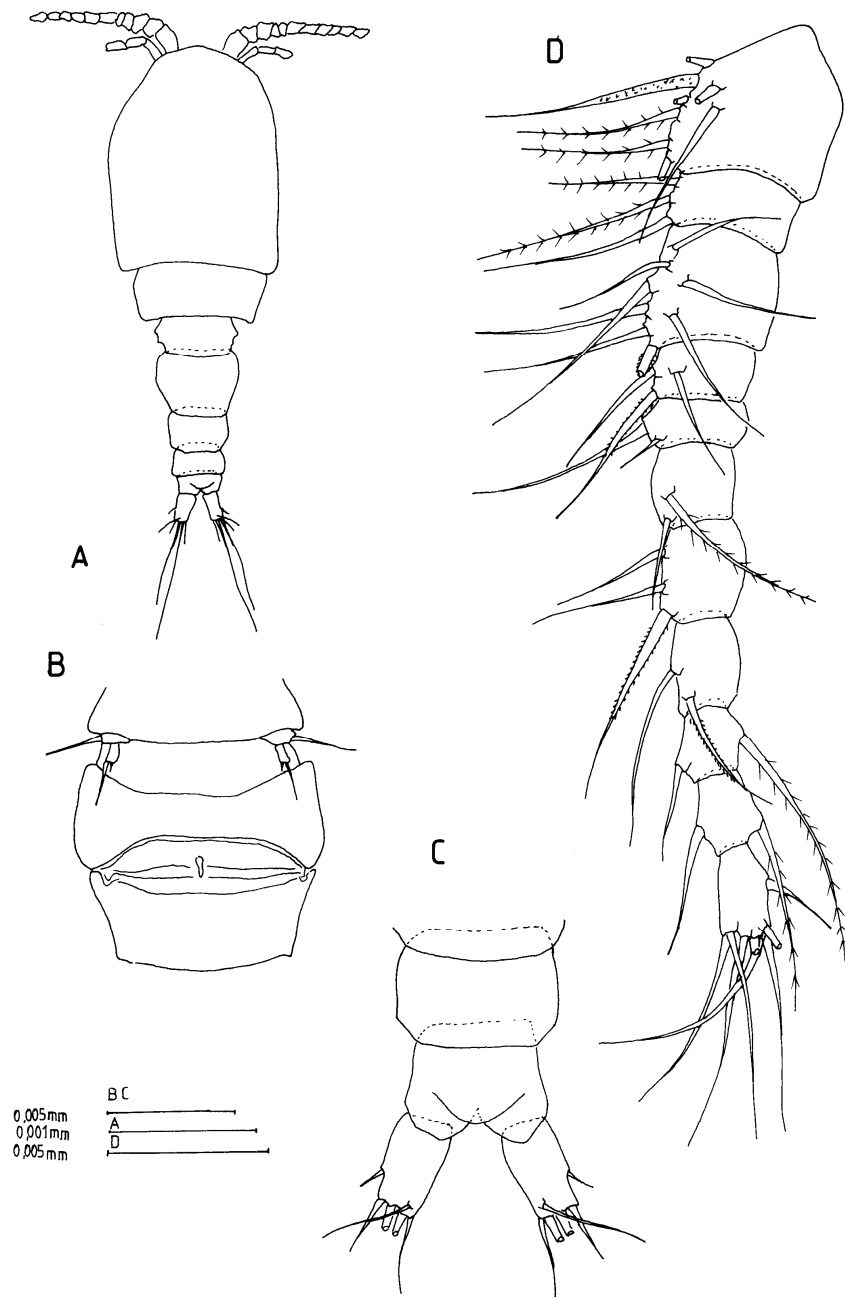


Fig. 3. *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* n. ssp., femelle.
A – Aspect général, vue dorsale. B – Segment génital. C – Furca, vue dorsale. D – Antennule.

CYCLOPIDES DU PARC NATIONAL DES MONTS APUSENI

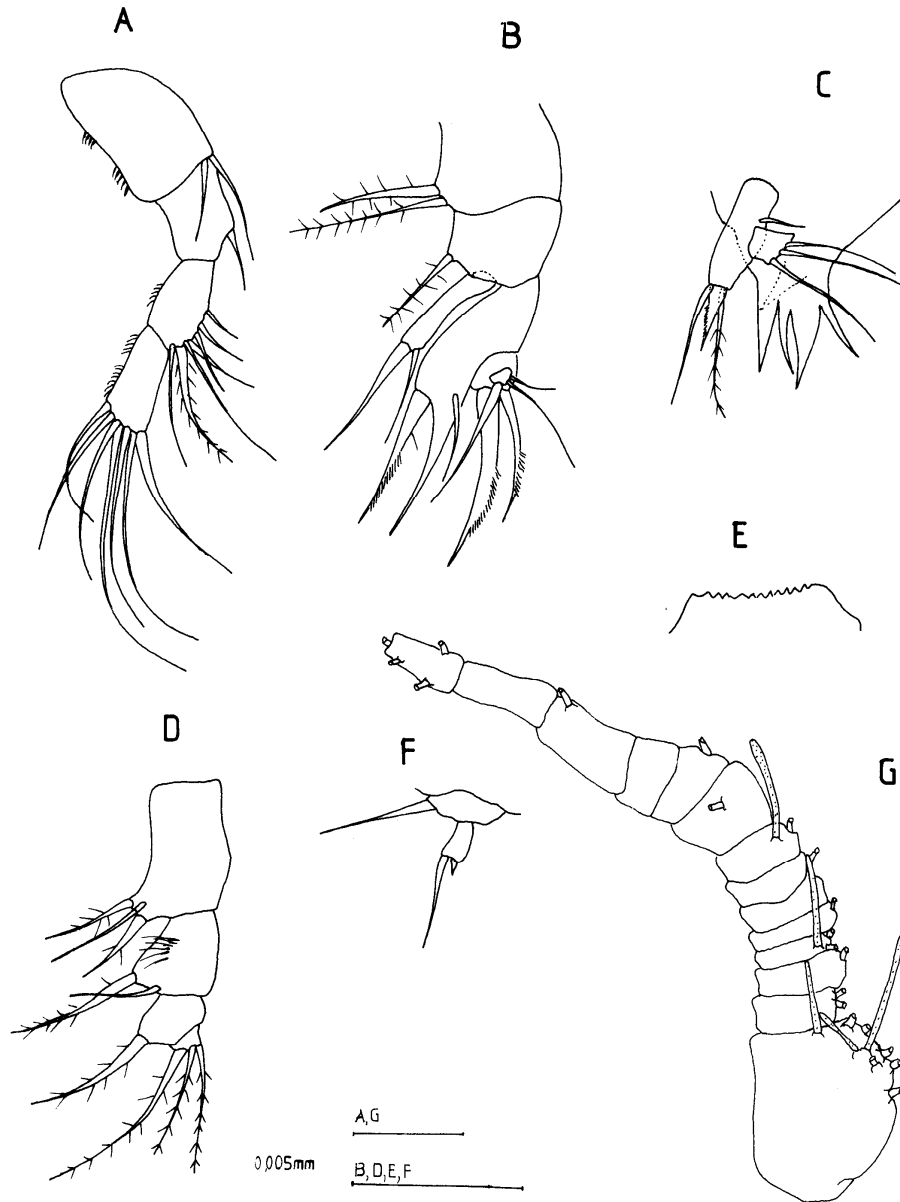


Fig. 4. *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* n. ssp.
Femelle: A – Antenne. B – Maxille. C – Maxillule. D – Maxillipède. E – Labrum. F – P5.
Mâle: G – Antennule.

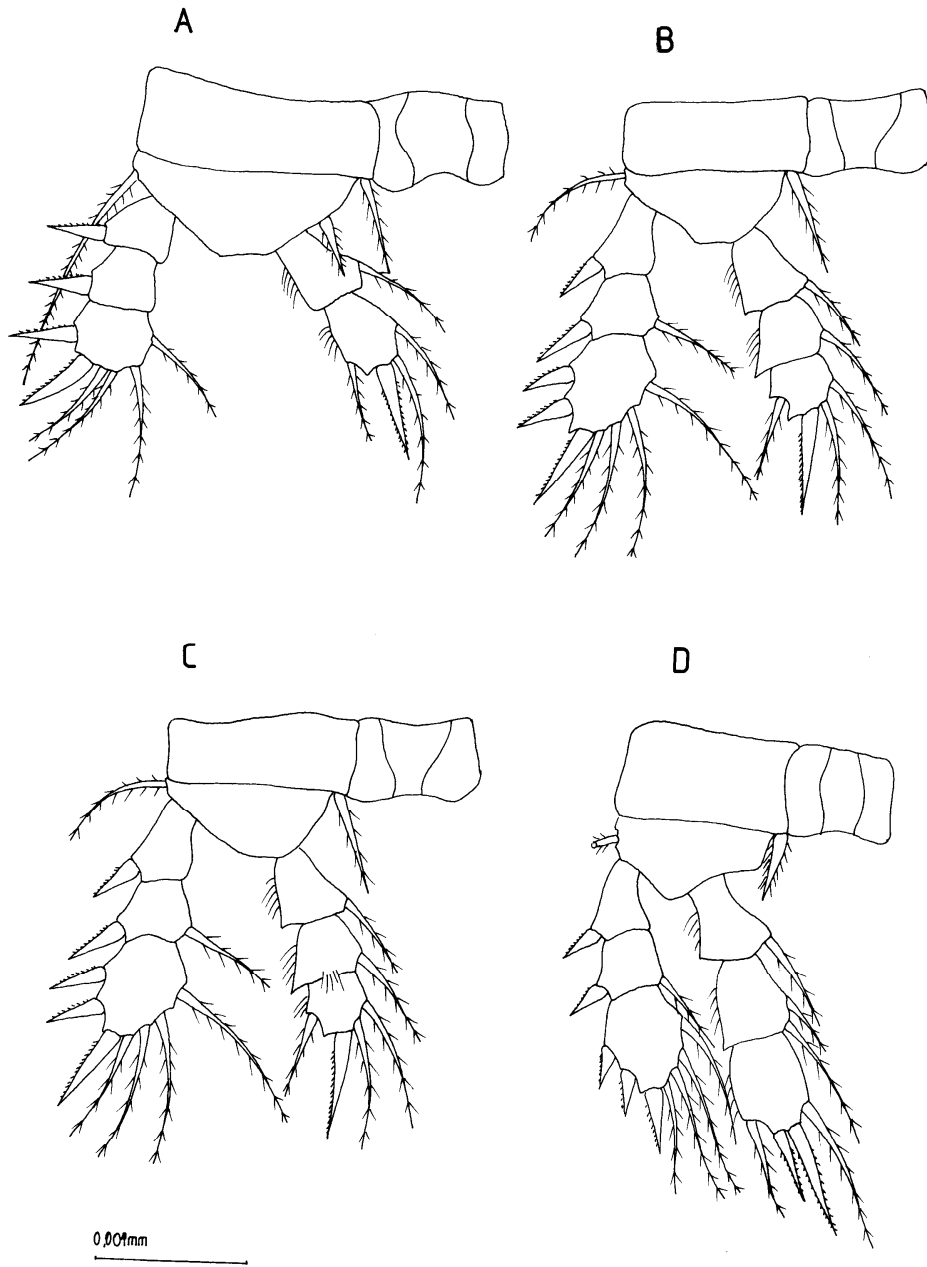


Fig. 5. *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* n. ssp., femelle.
A – P1. B – P2. C – P3. D – P4.

Soie insérée sur l'article précoxal P 1 très longue, dépassant l'article distal de l'exopodite. Rapport longueur/largeur du segment distal de la P4 1,15; rapport entre la longueur des épines apicales externe et interne 1,57 (0,264/0,168 mm). La P5 formée de deux articles nettement distincts; article basal avec une soie pennée, article terminal armé d'une épine apicale et d'une soie qui dépasse deux fois la longueur de l'article (Fig. 4 F). P6 faiblement visible.

Mâle: la description est faite sur deux individus.

Longueur du corps (sans les soies apicales des branches furcales) 0,524 mm. Largeur du céphalothorax 0,135 mm. Rapport longueur/largeur des branches furcales 2,16. Longueur des soies apicales caudales similaire à celle de la femelle.

Antennule (Fig. 4 G): formée de 14 articles. Premier segment à 3 aesthètes, les segments 4 et 8 à un aesthète, dont la pointe atteint les articles 7 et, respectivement, 10.

P1 – P4 semblables à celles de la femelle.

P6 peu développé, armé de 3 soies.

Observations taxonomiques. Les caractères morphologiques les plus importants par lesquels *Acanthocyclops balcanicus bisaetosus* se rapproche de l'espèce type *A. balcanicus* sont l'aspect général, la structure de la P5, la forme du réceptacle séminal et de l'opercule anal et la formule des pattes natatoires [3]. Il s'en distingue néanmoins par plusieurs traits particuliers qui justifient à notre avis son statut de sous-espèce, à savoir la longueur de la soie de l'article précoxal de la P1, l'ornementation de l'article 2 des P2 et P3, le nombre de soies insérées sur le segment distal de l'endopodite de la P4 et le rapport entre la longueur des soies externe et interne. Une synthèse comparative des principaux caractères d'*Acanthocyclops balcanicus* et *A. b. bisaetosus* est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1

Caractères morphologiques comparés des femelles d'*Acanthocyclops balcanicus* et *A. b. bisaetosus* n. ssp.

Caractères	<i>A. balcanicus</i>	<i>A. b. bisaetosus</i>
Longueur du corps (mm)	0,623	0,451–0,686
Largeur du corps (mm)	?	0,135–0,226
Opercule anal	arrondi	arrondi
Rapport longueur/largeur des branches furcales	2,07	1,75–2,14
Longueur des soies caudales (interne/externe) (mm)	0,055/0,032	0,028/0,026
P1 – P4	3.2/3.3/3.3/3.3	3.2/3.3/3.3/3.3
Formule des épines	2.3.3.3	2.3.3.3
Formule des soies	4.4.4.4	4.4.4.4
Rapport longueur/largeur de l'article distal de la P4	1,15	1,12–1,28
Rapport de la longueur des épines de l'article distal P4	1,38	1,11–2,20
Nombre de soies de l'article distal P4	3	2
Biotope	sources karstiques, fontaines, rivières souterraines	gours

Notons que, de même que chez plusieurs espèces du genre *Diacyclops*, l'antenne des exemplaires examinés est dépourvue d'exopodite, caractère que certains auteurs considèrent comme une adaptation au milieu souterrain [2, 5]. Des études récentes montrent cependant qu'il n'y a aucune relation significative entre l'absence de cet appendice et le caractère stygobionte des Cyclopidés, car elle a été observée également chez des formes stygophiles de *Diacyclops* (F. Stoch, communication verbale).

Discussions. *Acanthocyclops plesai* et *A. balcanicus bisaetosus* doivent être intégrés dans le complexe d'espèces „*kieferi*” sur la base de plusieurs caractères essentiels. Ce sont: la longueur des branches furcales, le nombre de segments de l'antennule, la forme des épines et des soies des articles distaux des P1 – P4 et la forme du réceptacle séminal, auxquels s'ajoute le milieu de vie. Dans ce complexe, Pandourski [4] inclut 14 espèces paléoenclémiques appartenant aux genres *Acanthocyclops* et *Diacyclops* et répandues à peu près sur toute l'étendue de continent européen: *A. kieferi* Chappuis, 1925 (Europe Occidentale, Macédoine, Slovénie, Roumanie), *A. balcanicus* Naidenow & Pandourski, 1992 (Bulgarie), *A. biarticulatus* Monchenko, 1972 (Kazakhstan), *A. hispanicus* Kiefer, 1937 (nord de l'Espagne, Italie), *A. iskrecensis* Pandourski, 1992 (Bulgarie), *A. macedonicus* Petkovski, 1954 (Macédoine), *A. petkovski* Pesce & Latinger, 1983 (Yougoslavie), *A. radevi* Pandourski, 1993 (Bulgarie), *A. reductus reductus* Chappuis, 1925 (Roumanie), *A. r. propinquus* Pleša, 1957 (Roumanie, Bulgarie), *D. chappuisi* Naidenow & Pandourski, 1992 (Bulgarie Occidentale), *D. strimonis* Pandourski, 1994 (Bulgarie), *D. stygius stygius* Chappuis, 1924 (Europe Centrale, Roumanie) et *D. s. deminutus* Chappuis, 1925 (Roumanie).

En renfermant des taxons appartenant à deux genres, ce complexe reste néanmoins hétérogène et sa systématique reste confuse, ce qu'impose une révision approfondie de toutes les espèces du genre *Acanthocyclops*.

Les espèces du groupe „*kieferi*”, y compris celles citées jusqu'à présent de Roumanie, sont des stygobiontes, cantonnées uniquement dans des biotopes souterrains [4], et c'est justement à cause de leur absence des eaux superficielles qu'on les considère comme de véritables rélictés. Du fait qu'ils ont été identifiés dans des bassins aquatiques des grottes, les deux taxons nouveaux décrits dans ce travail peuvent être inclus dans cette même catégorie écologique.

En Roumanie, à l'exception d'*A. reductus propinquus* décrit de la Grotte de Măgura mais signalé ultérieurement de trois grottes des Carpates Méridionales, les cinq autres espèces du complexe „*kieferi*” sont endémiques pour les Monts Apuseni [6].

BIBLIOGRAPHIE

1. Goran, C., *Catalogul sistematic al peșterilor din România, 1981*, Ed. Cons. Naț. Ed. Fiz. Sport, București, 1982.
2. Monchenko, V. I., *O dvukh simpatricheskikh chernomorskikh solonovatovodnykh tsiklopakh roda Diacyclops (Crustacea, Copepoda)*. „Zool. Zh.” (Moscou), **61** (2), 1982, 182-189.
3. Naidenow, T.W., Pandourski, I., *Zwei neue Höhlencyclopiden (Copepoda, Cyclopoida) aus den Grundgewässern Bulgariens*, „Fragm. Balc. Mus. Maced. Sci. Nat.”, **15** (2/314), 1992, 7-14.

CYCLOPIDES DU PARC NATIONAL DES MONTS APUSENI

4. P a n d o u r s k i, I., *Composition, origine et formation de la faune cyclopidienne stygobie de Bulgarie et définition du groupe „kieferi” du Genre Acanthocyclops* (Crustacea, Copepoda, Cyclopoida), „Bull. Mus. Reg. Sci. Nat.” (Torino), **15** (2), 1997, 197-279.
5. P e s c e, G. L., G a l a s s i, D.P., *Due nuovi Diacyclops del complesso “languoides”* (Copepoda: Cyclopoida) *di aque sotterranee di Sardegna e considerazioni sul significato evolutivo dell’antenna nei copepodi stigobionti*, „Boll. Mus. Civ. St. Nat.” (Verona), **12**, 1985, 411-418.
6. P l e ș a, C., *Conspectul sistematic al Cyclopidelor (Crustacee, Copepode) cunoscute până în prezent din R. P. R.*, „Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.”, **3** (7), 1958, 137-150.
7. P l e ș a, C., *Redescription of the subterranean freshwater Cyclopoid Acanthocyclops reductus propinquus Plesa*, „Copepoda Crustaceana”, **3** (1), 1961, 47-55.
8. S t o c h, F., *The ecological and historical determinants of crustacean diversity in groundwaters, or: why are so many species ?*, „Mém. Biospéol.”, **22**, 1995, 139-160.

THE TERRESTRIAL ISOPOD FAUNA IN THE SUPERIOR BASIN AREA OF THE SOMEŞUL CALD RIVER

NICOLAE TOMESCU*, DANIELA MUREŞAN* and VALENTIN POPA*

SUMMARY. - In 1998 and 1999 we have studied the terrestrial isopod fauna from the superior basin of the Someşul Cald River, from the area of gorges and downstream from the gorges. The biological samples have been collected using pitfall traps. We have collected a total number of 1073 individuals belonging to 8 species, of which six are paludicolous species (*Ligidium hypnorum*, *L. germanicum*, *Hyloniscus transsylvanicus*, *H. mariae*, *H. siculus*, *Trichoniscus pygmaeus*) and two sylvan species (*Protracheoniscus politus* and *Trachelipus wächterli*). Distribution of the species in the region of the superior basin of the Someşul Cald River is diverse. *Ligidium germanicum* and *Trichoniscus pygmaeus* live only in the ecosystems located within the gorges, *Ligidium hypnorum* and *Hyloniscus siculus* live only in the ecosystems found downstream from the gorges, while the rest of the species live in the gorges as well as downstream from the gorges. The paludicolous species form communities with the sylvan species only in damp microhabitats with moderate temperatures, and not in the other biotopes of the ecosystems. The sylvan species live under the litter layer and have a much wider distribution compared to the paludicolous species. In two of the 11 studied ecosystems, the three species of genus *Hyloniscus* cohabit, and the cohabitation of congener species is a rare situation for terrestrial isopods. In the majority of ecosystems the numerically dominant species is *Protracheoniscus politus*. In some ecosystems the dominant species were *Hyloniscus mariae*, *H. siculus* and *Trachelipus wächterli*. Except for the species of genus *Ligidium*, the females were dominant in the populations of the other species.

The superior basin of the Someşul Cald River consists of a relatively large area, from the springs to the anterior extremity of the basin of the Fântânele Reservoir (Fig. 1). The studied area is characterised by great ecological diversity, but the areas covered with spruce forest and the meadows are predominant. There are also mixed forests, deforested areas, and coppices of alder trees on the shores of the river, swamps and rocky areas. The ecological conditions also differ in the spruce forest and meadows, according to the aspect and inclinations of the slopes, structure of the soil, density of the trees, the extent to which the area is covered by shrubbery and herbaceous layers.

The ecological diversity of the studied area is also reflected in the isopod communities that exist in the biocoenosis of the ecosystems.

Material and methods. The research has been performed in 1998 and 1999. We have chosen 11 stations that were representative for the ecosystems in the superior basin of the Someşul Cald River, 8 stations downstream from the gorges and 3 stations in the area of gorges.

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

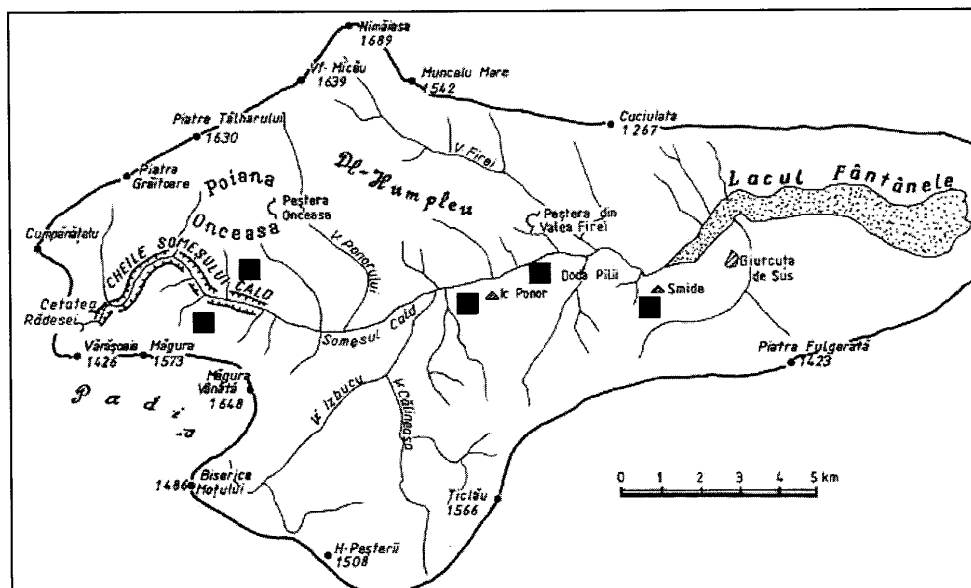


Fig. 1. The superior basin of the Someșul Cald River with the sampling sites.

The biological samples have been collected using pitfall traps. At the beginning of June, we have located a number of 8 traps in each of the 11 stations (a total of 88 pitfall traps). In the traps we placed a 4 % formaldehyde solution, in order to preserve the captured individuals. The biological material has been collected from the traps at the end of July, after approximately 50 days. Aside from the fact that we used the pitfall traps, we have also collected samples directly from under rocks and fallen trees.

Results and discussion. In the researched ecosystems of the Someșul Cald Basin we have collected a number of 1073 individuals of terrestrial isopods, belonging to 8 species and 5 genera. From the ecological point of view, 6 species are included in the category of the paludicolous species (*Ligidium hypnorum*, *L. germanicum*, *Hyloniscus transsylvanicus*, *H. mariae*, *H. siculus* and *Trichoniscus pygmaeus*) and 2 species are sylvan (*Protracheoniscus politus* and *Trachelipus wächterli*). In spite of the fact that in the studied region there are meadows and rocky areas that are intensely insolated, we could not find any praticolous species, which are characteristic to these types of ecosystems, such as: *Trachelipus nodulosus*, *Armadillidium vulgare*, *A. versicolor*. Their absence is probably determined by the low values of the average annual temperatures, a phenomenon that was established by us also for the Dorna Depression [1].

Distribution of the species in the studied ecosystems is different, in relation to the ecological conditions that exist in each ecosystem, and to the tolerance of the species to the ecological factors. We have studied the structure of the isopod communities, separately in each spruce forest, since the ecological conditions that exist

in this type of forest differ according to the aspect and inclination of the slope, density of the shrubbery and herbaceous vegetation, thickness of the litter layer and humidity of the soil. *Hyloniscus transsylvanicus* and *Protracheoniscus politus* have a large distribution and are found in all studied stations and ecosystems, which suggests that the two species have ecological valences with broader ranges compared to the rest of the species that live only in certain ecosystems.

The communities of isopod species are generally alike in the spruce forests, except for the forest in which the layer formed by the bilberry bushes was very abundant. There are only two species that live here, and numerically reduced populations represent these.

During the research that was performed in the Someșul Cald area and during previous studies [1-4] we have established that the paludicolous species have an insular dispersion in the ecosystems, reduced strictly to microhabitats with very high and constant humidity of the soil. In such microhabitats there are also found individuals belonging to sylvan species, *Protracheoniscus politus* and *Trachelipus wächtleri*. This is the only place where the paludicolous and sylvan species form coenosis, and not in the rest of the surface of the forests, where the sylvan species have a wider spreading on large surfaces under the litter substratum.

The values of the relative abundance (Table 1) show that in the majority of the sylvan ecosystems the dominant species is *Protracheoniscus politus*. It is excepted for the coppice of alder trees and the deforested areas of the gorges, with the average temperatures are much lower compared to the downstream forests, where other species are dominants. The numerical dominance in some ecosystems was also recorded for the following species: *Hyloniscus mariae*, *H. siculus* and *Trachelipus wächtleri*.

The species that are represented by a small number of individuals and that appeared in a small number of samples are not considered by us to be accidental species in those ecosystems, as is it indicated by the frequency values, since their distribution is strictly limited to very damp microhabitats. Their appearance in the samples is determined by the number of traps placed in such microhabitats, which is small compared to the number of traps placed in the rest of the area.

An aspect that is less noted in the literature is the cohabitation of the congener species belonging to genus *Hyloniscus*, which were found together in the mixed forest and in a swampy area in a region covered with a meadow. In our previous research [1-4] we have established that only the congener species, which are paludicolous, can cohabit in the same microhabitat, and not the sylvan and praticolous species, which have a much wider distribution in a biotope.

For the species for which the number of captured individuals was higher, we have also calculated the sex ratio. Except for the species that belong to genus *Ligidium*, for the rest of the species the females are predominant. A relatively balanced situation was recorded for *Trachelipus wächtleri*. The numerical dominance of the females enhances the biotic potential of the isopod species, being known the fact that for this group of terrestrial crustaceans the mortality rate is very high, over 98%, at young ages.

Table 1
Distribution of the terrestrial isopod species in the superior course of the Someşul Cald River - the relative abundance and the sex ratio

Crt. no.	Species	no. / %	Number of stations / Ecosystem											Sum	% M/F	
			Downstream from the gorges			In the gorges										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
1	<i>Ligidium hypnorum</i>	no. %	4 1.9	5 4.2	1 3.1	3 6.0								13	1.2	54/56
2	<i>Ligidium germanicum</i>	no. %								21 14.1				21	2.0	76/24
3	<i>Hyloniscus transsylvanicus</i>	no. %	21 10.1	3 2.5	4 2.1	7 2.8	4 2.0	8 16.6	5 10.0	33 15.6	32 21.4	5 17.2	1	123	11.5	17/83
4	<i>Hyloniscus mariae</i>	no. %			12 5	5 15.6	120 60.3	3 6.0		66 44.4				206	19.2	17/83
5	<i>Hyloniscus siculus</i>	no. %	6 2.9	9 7.5		2 1.0			28 56.0					45	4.2	16/84
6	<i>Trichoniscus pygmaeus</i>	no. %											6	6	0.5	
7	<i>Protracheoniscus politus</i>	no. %	176 85.1	103 85.8	19 59.5	65 32.7	16 33.3	11 22.0	11 22.0	177 84.0	21 14.1	8 27.6	2	598	67.2	25/75
8	<i>Trachelipus wächterli</i>	no. %				8 4.0	24 50.1	1 0.4		9 6.0	16 55.2	3	61	5.7	48/52	
	Total number of individuals		207	120	16	32	199	48	50	211	149	29	12	1073		
	%		19.3	11.2	1.5	3.0	18.5	4.5	4.6	19.7	13.9	2.7	1.1			
	Number of species		4	4	2	4	5	3	5	3	5	3	4			

Studied ecosystems: 1 - Spruce forest on a plane and swampy area. 2 - Spruce forest with southeastern aspect, inclination of 15 degrees. 3 - Spruce forest with abundant bilberry shrubs, southeastern aspect, inclination of 10 degrees. 4 - Spruce forest, northwestern aspect, inclination of 30 degrees. 5 - Mixed forest, southeastern aspect, inclination of 30-35 degrees. 6 - Coppice with alder trees on a plane area of the river-side. 7 - Meadow on a plane area. 8 - Meadow with southeastern aspect, inclination of 25-30 degrees. 9 - Spruce forest in the gorges. 10 - Mixed forest in the gorges. 11 - At the bottom of the rocks in the gorges. M - Males. F - Females.

Conclusions. 1. Eight species of terrestrial isopods live in the ecosystems of the superior basin of the Someșul Cald River.

2. Their distribution in the studied area is different. The species *Hyloniscus transylvanicus*, *H. mariae*, *Protracheoniscus politus* and *Trachelipus wächtleri* are found in the gorge's ecosystems and also downstream from there. The species *Ligidium germanicum* and *Trichoniscus pygmaeus* live only in the gorge's ecosystems; *Ligidium hypnorum* and *Hyloniscus siculus* live only downstream from the gorges.

3. In the majority of ecosystems *Protracheoniscus politus* is numerically dominant.

4. Females (52-84 %) mainly represent the populations of terrestrial isopods in the ecosystems of the superior basin of the Someșul Cald River, except for the species of genus *Ligidium*.

REFERENCES

1. Olariu – Dolnițchi, L., Tomescu, N., *Aspect écologique de la population d'isopodes terrestres de la zone de Dornas*, "An.Muz.Nat.Bucov.", **14** (XIV), 1997, 81-92.
2. Tomescu, N., Accola, S., Berciu, C., *Reproduction of terrestrial isopods of Cheile Turzii Natural Reservation (Romania)*, "Stud.Univ.Babeș-Bolyai, Biol.", **37** (2), 1992, 39-45.
3. Tomescu, N., Accola, S., Pașca, C., *Ecology of the populations of terrestrial isopods (Crustacea: Isopoda) in Cheile Turzii*, "Stud.Univ.Babeș-Bolyai, Biol.", **40** (1-2), 1995, 78-94.
4. Tomescu, N., Ardelean, G., Mureșan, D., Popa, V., *Ecology of terrestrial isopods in the Nature Reserve Scărița-Belioara, Romania*, "Stud.Univ.Babeș-Bolyai, Biol.", **45** (1), 2000, 57-64.

DISTRIBUTION OF ^{137}Cs IN EXPERIMENTALLY CONTAMINATED
CELLS OF THE LICHEN *PELTIGERA MEMBRANACEA*

KATALIN BARTÓK^{*}, IOSIF CHEREJI^{**}, ANA NICOARĂ^{***} and
MARINELA SIMIHAIAN^{****}

SUMMARY. – For studying intra- and extracellular locations of ^{137}Cs , discs were cut from thalli of *Peltigera membranacea*, sampled in an unpolluted deciduous forest near Bristol, England and contaminated with $^{137}\text{CsCl}$ in a laboratory experiment. The method of sequential elution was used and it was found that the ^{137}Cs taken up by the lichen discs was located to a larger extent intracellularly than extracellularly. Nickel(II) chloride was a more efficient eluting agent than were strontium and cesium chlorides.

The use of lichens as bioindicators of the radioactive pollution of environment was the topic of a great number of studies published since the nuclear weapon tests in the 1960s and after the accident at the Chernobyl nuclear power station [1-3, 8, 11, 12, 14]. In emissions from damaged nuclear power stations, ^{137}Cs , which is one of the most persistent radionuclides due to its long half-life time (30.2 years), is accompanied by ^{134}Cs having a half-life time of 2.1 years.

^{137}Cs and the other metal ions in lichens and other plants are located extra- and intracellularly. The extracellular location means that the metal ions are bound to some chemical groups of the cell wall or membrane polymers, whereas the ions entering the cells remain in soluble form or are used for the synthesis of metallo-organic compounds [4, 6, 7, 13].

For studying the extra- and intracellular distribution of ^{137}Cs and other metal ions the best method is the sequential elution [10].

We have studied the cellular distribution of ^{137}Cs in the foliate, terricolous cyanobacterial lichen *Peltigera membranacea*, a species sensitive to different pollutants. The lichen sampled in an unpolluted area was artificially contaminated with $^{137}\text{CsCl}$ in a laboratory experiment. Applying the sequential elution method, NiCl_2 and SrCl_2 served as eluting (exchangeable) agents [4, 5, 9, 10, 15], and additionally we have also used the nonradioactive CsCl as an eluting agent.

Material and methods. The unpolluted area, where the lichen was sampled is a deciduous forest over limestone rocks, at Goblin Combe, Avon, near Bristol, England. The samples were transported in Romania, where they were immediately submitted to the laboratory experiment. The samples were cleaned from soil and plant residues. The rhizines were removed, then discs (5-mm diameter) were cut from the cleaned thalli and washed in deionised water. To contaminate the discs, 0.3 ml of a $^{137}\text{CsCl}$ solution

^{*} Babeş-Bolyai University, Department of Plant Biology, 3400 Cluj, Romania.

E-mail: bartok_katalin@yahoo.com

^{**} Institute of Isotopic and Molecular Technology, Laboratory of Isotopic Abundance, 3400 Cluj, Romania

^{***} Biological Research Institute, Department of Ecology, 3400 Cluj, Romania. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

^{****} Environmental Protection Agency, 3400 Cluj, Romania. E-mail: msimihaiian@hotmail.com

(exhibiting a radioactivity of 7,400 Bq/ml) were added to each disc. The exposure of discs to the action of the $^{137}\text{CsCl}$ solution lasted 30, 60 or 90 minutes, then the discs were sequentially eluted in three steps.

First, the contaminated discs were washed with deionized water (2 x 10 ml for 40 minutes each). In the second step, for eluting the ^{137}Cs taken up extracellularly, the lichen discs were treated with 20 mM solution of CsCl , SrCl_2 or NiCl_2 (2 x 10 ml for 40 minutes each). The third step served for elution of the ^{137}Cs taken up intracellularly by the lichen discs, which were treated with 1 M HNO_3 solution (10 ml for more than 1 hour), then also treated with the eluting Cs, Sr or Ni chloride. The solutions obtained at the end of the three steps represent the water, exchangeable and acid fractions, respectively. Radioactivity of the fractions was measured by γ -spectrometry, using an 80 x 80-mm NaI (TI) detector connected to a pulse analyser.

Results. The analysis of radioactivity in the exchangeable fraction gave the results presented in Fig. 1. One can deduce from the eluted amounts of ^{137}Cs that the extracellular ^{137}Cs uptake by the lichen discs was a rapid process, as it was accomplished in 30 minutes; it may be characterised by first order kinetics. Fig. 1 also shows that the eluting efficiency of the three agents was similar.

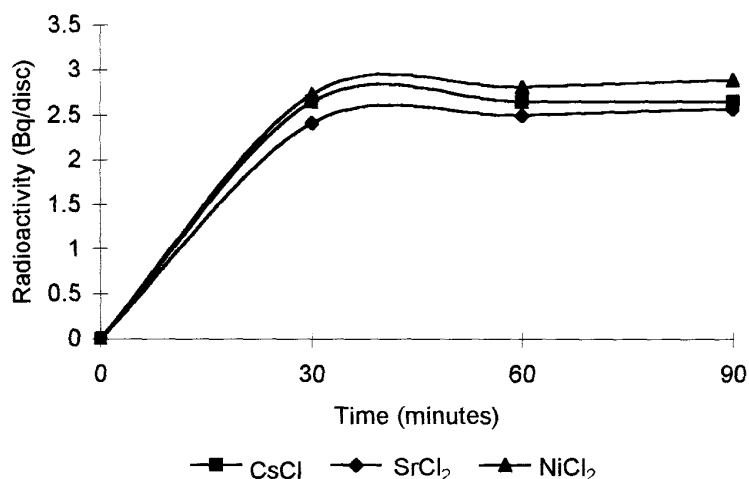


Fig. 1. Elution of ^{137}Cs taken up extracellularly as influenced by the exposure time of lichen discs to $^{137}\text{CsCl}$ solution and by the nature of eluting agents.

Values of radioactivity, *i.e.* eluted amounts of ^{137}Cs in the acid fraction, presented in Fig. 2, indicate that the intracellular uptake of ^{137}Cs had a nearly linear relationship with the 90-minute exposure time of the lichen discs to the $^{137}\text{CsCl}$ solution. It is also evident from this figure that the eluting efficiency of the three agents increased in the order: $\text{Cs} < \text{Sr} < \text{Ni}$. However, none of the eluting agents was able to remove the whole quantity of ^{137}Cs taken up intracellularly, as extrapolation of the linear elution (and intracellular uptake) to zero exposure time gives non-zero intercepts.

DISTRIBUTION OF $^{137}\text{CESIUM}$ IN THE LICHEN *PELTIGERA MEMBRANACEA*

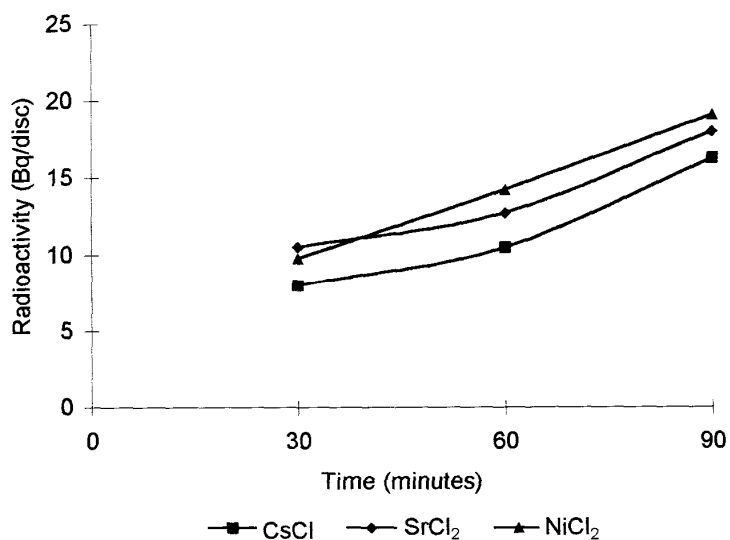


Fig. 2. Elution of ^{137}Cs taken up intracellularly as influenced by the exposure time of lichen discs to $^{137}\text{CsCl}$ solution and by the nature of eluting agents.

A comparison of Figs. 1 and 2 makes it possible to establish that the intracellular uptake of ^{137}Cs was much more intense than the extracellular one. Consequently, the total ^{137}Cs uptake (Fig. 3) increased with exposure time of lichen discs to the $^{137}\text{CsCl}$ solution, and the eluting efficiency showed again the order: $\text{Cs} < \text{Sr} < \text{Ni}$.

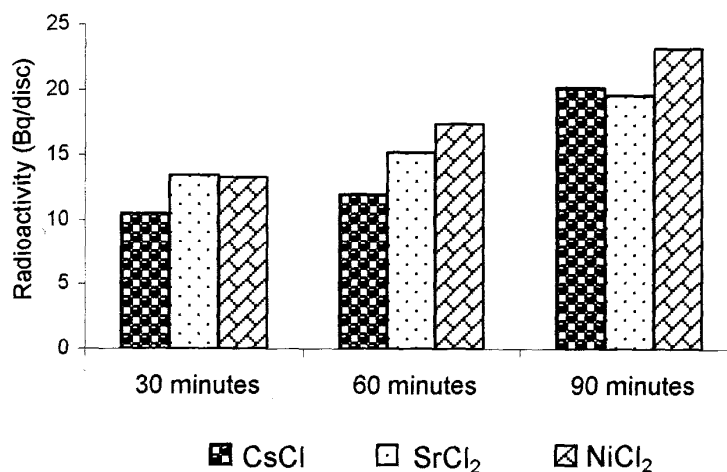


Fig. 3. Elution of ^{137}Cs taken up extra- and intracellularly as influenced by the exposure time of lichen discs to $^{137}\text{CsCl}$ solution and by the nature of eluting agents.

Conclusions. 1. Discs cut from thalli of the lichen *Peltigera membranacea*, sampled in an uncontaminated area, were artificially contaminated with $^{137}\text{CsCl}$ in a laboratory experiment.

2. For establishing the cellular distribution of ^{137}Cs , the contaminated lichen discs were submitted to sequential elution and it was found that much more ^{137}Cs was taken up intra- than extracellularly.

3. Of the three eluting agents used (CsCl , SrCl_2 and NiCl_2), NiCl_2 was found to be most efficient in eluting ^{137}Cs from the lichen discs.

Acknowledgements. We are greatly indebted to Dr. Dennis H. Brown, Department of Botany, The University, Bristol, U.K. for collecting and providing of the biological material, and also for the supervision of the laboratory experiment.

REFERENCES

1. Bartók, K., Dezső, Z., Bolyós, A., *Lichenii și mușchii – bioindicatori ai radioactivității mediului în Carpații Orientali*, "Stud. Cercet. Ști. Nat." (Bistrița), **3**, 1997, 87-93.
2. Bartók, K., Mócsy, I., *Studies upon lichen radioactivity*, "Rev. Roum. Biol., Sér. Biol. Vég.", **35**, 1990, 61-65.
3. Bartók, K., Mócsy, I., Bolyós, A., Dezső, Z., *Biomonitoringul pasiv, cu plante inferioare, al radioactivității din M-ții Vrancei*, "An. Univ. Oradea, Fasc. Biol.", **3**, 1996, 118-128.
4. Brown, D. H., *Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring*, in Deyer, A. F., Duckett, J. G. (Eds.), *The Experimental Biology of Bryophytes*, pp. 229-255, Acad. Press, New York, 1984.
5. Brown, D. H., *Lichen mineral studies - currently clarified or confused?*, "Symbiosis", **11**, 1991, 207-223.
6. Brown, D. H., Avalos, A., *Chemical control of cadmium uptake by Peltigera*, "Symbiosis", **11**, 1991, 299-311.
7. Brown, D. H., Avalos, A., *The role of calcium in intracellular cadmium uptake by the lichen Peltigera membranacea*, "Ann. Bot.", **71**, 1993, 467-473.
8. Brown, D. H., Bartók, K., Chereji, I., Nicoară, A., Simihăian, M., *Cellular location of ^{137}Cs in lichens from Romania*, in Pais, I. (Ed.), *Proc. 8th Int. Trace Element Symp. 1998. New Perspectives in the Research of Hardly Known Trace Elements and Importance of the Interdisciplinary Cooperation*, pp. 33-40, Univ. Hort. Food Sci., Budapest, 1999.
9. Brown, D. H., Bates, J. W., *Bryophytes and nutrient cycling*, "Bot. J. Linn. Soc.", **104**, 1990, 129-147.
10. Brown, D. H., Wells, J. M., *Sequential elution technique for determining the cellular location of cations*, in Glime, J. M. (Ed.), *Methods in Bryology*, pp. 227-233, Hattori Bot. Lab., Nichinan, Japan, 1988.
11. Feige, G. B., Niemann, L., Jahnke, S., *Lichens and mosses - silent chronists of the Chernobyl accident*, "Bibliotheca Lichenol.", **38**, 1990, 63-77.
12. Garty, J., *Lichens as biomonitors for heavy metal pollution*, in Markert, B. (Ed.), *Plants as Biomonitors, Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*, pp. 194-263, VCH Publ., Weinheim, 1993.
13. Nedič, O., Stankovič, A., Stankovič, S., Krainčanič, M., *Chemical localization of ^{137}Cs in the lichen Cetraria islandica*, "Arch. Environ. Contam. Toxicol.", **29**, 1995, 380-383.
14. Nimis, P. L., Lazzarin, G., Lazzarin, A., Skert, N., *Biomonitoring of trace elements with lichens*, "Sci. Total Environ.", **225**, 2000, 97-111.
15. Wells, J. M., Brown, D. H., *Ionic control of intracellular and extracellular cadmium uptake by the moss Rhytidiadelphus squarrosus (Hedw.) Warnst.*, "New Phytol.", **116**, 1990, 541-553.

BIOTRANSFORMAREA DIGITOXINEI DE CĂTRE CULTURILE DE SUSPENSII CELULARE DE *DIGITALIS LANATA*

COSTANTIN DELIU*, CORNELIA MUNTEANU-DELIU, CRISTINA
BOTA***, ADELA HALMAGYI* și ANCA KEUL-BUTIUC***

SUMMARY. - Biotransformation of Digitoxin by Cell Suspension Cultures of *Digitalis lanata*. Of the three *Digitalis lanata* cell lines studied (11, 21-C50 and 13-C100), only the 13-C100 cell line proved to be capable of the biotransformation of digitoxin. The only product resulting from the substrate bioconversion was purpurea glycoside A, independently of the composition of the biotransformation medium, the moment at which the digitoxin was added or the moment when the cells were harvested. The use of mannitol, alone or in combination with glucose as carbon sources, resulted in the formation of purpurea glycoside A and also of other five still unidentified cardenolides, in concentrations between 3 and 300 $\mu\text{g/g}$ of dry weight. In UV-light, their chromatographic spots have a yellow fluorescence and their R_f value is 0.41, 0.46, 0.54, 0.56 and 0.60, respectively.

Potențialul biochimic mare al celulelor vegetale cultivate *in vitro* rezidă și în capacitatea lor de a biotransforma specific substraturi naturale sau sintetice. Reacțiile de biotransformare sau de bioconversie, realizate prin intermediul culturilor de celule vegetale, sunt de cele mai multe ori stereospecifice și implică, în majoritatea cazurilor, adăuția sau îndepărtarea anumitor grupări chimice. Dintre aceste reacții, cele mai importante sunt glucozilarea și hidroxilarea. Până în prezent, au fost publicate peste 160 de lucrări cu privire la bioconversia terpenoizilor, steroizilor, fenolilor, alcaloizilor și a altor compuși [3, 15, 16, 19, 20].

Digoxina se extrage, împreună cu digitoxina, numai din plantele de *Digitalis lanata*. Singura diferență dintre digitoxină și digoxină este reprezentată de gruparea hidroxil, care, în cazul digoxinei, este inserată în poziția C-12 a moleculei agliconului [3]. Amândouă substanțele au efect cardiotonic, dar, datorită proprietăților farmacocinetice superioare, digoxina este preferată digitoxinei. Din acest motiv, digitoxina, rămasă în urma extracției, se acumulează în cantități din ce în ce mai mari. Acest compus nu poate fi transformat prin mijloace chimice sau microbiologice în digoxină, ci numai prin intermediul culturilor de suspensii celulare vegetale.

Capacitatea culturilor celulare vegetale de a modifica molecula cardenolidelor a fost investigată intens. Cercetările au fost orientate cu precădere asupra reacțiilor de hidroxilare a metildigitoxinei sau a digitoxinei, reacții catalizate de către celulele diferitor specii de *Digitalis* cultivate *in vitro*. În urma unor astfel de reacții, acești compuși au fost transformați în metildigoxină și respectiv în digoxină numai de culturile de suspensii celulare de *D. lanata* [1, 2, 6, 9, 10, 16, 17].

* Institutul de Cercetări Biologice, 3400 Cluj-Napoca, România. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

** Universitatea "Babeș-Bolyai", Catedra de biologie vegetală, 3400 Cluj-Napoca, România

*** Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", 3400 Cluj-Napoca, România

În cadrul acestei lucrări am studiat mai multe aspecte privind modul și capacitatea de biotransformare a digitoxinei de către unele linii celulare de *Digitalis lanata* izolate de noi.

Material și metode. a) *Liniile celulare de Digitalis lanata utilizate au fost:* 11, 21-C50 și 13-C100. Modul de selecție și de izolare a acestor linii au fost descrise într-o lucrare anterioară [4].

b) *Mediul de creștere.* S-a folosit mediul bazal M u r a s h i g e-S k o o g (MS) [13] la care s-au adăugat zaharoză (3%), glutamină (250 mg/l), cazeină hidrolizată (250 mg/l), AIA (1 mg/l) și chinetină (2 mg/l). Acest mediu a fost utilizat permanent pentru menținerea suspensiilor celulare. Transferul culturilor celulare s-a efectuat la intervale de 14 zile. Raportul dintre volumul inoculului și cel al mediului proaspăt a fost de 1:6. Suspensiile celulare au fost crescute în vase conice de 300 ml (cu 30 ml mediu lichid/vas), vase care au fost agitate pe un agitator rotativ orizontal (100 rpm) și menținute la întuneric, la o temperatură de $25 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Creșterea celulară s-a determinat atât prin măsurarea densității celulare, respectiv a volumului sedimentului celular (VSC), la anumite intervale de timp, cât și prin cântărirea biomasei celulare recoltată prin filtrarea suspensiilor din 3 – 4 vase per variantă.

c) *Mediul de producție.* S-a folosit mediul MS modificat după K r e i s și R e i n h a r d [10], alcătuit din mediul bazal MS fără fitohormoni, cu 340 mg/l KH_2PO_4 și 8% glucoză. Celulele de *D. lanata* au fost cultivate în acest mediu doar pentru urmărirea procesului de biotransformare a digitoxinei. La începutul experimentelor, cantitatea de biomasă celulară inoculată în mediu (30 ml/vas) a fost de cca 4,5 g substanță proaspătă per vas, ceea ce corespunde la o densitate celulară inițială (sau VSC) de 13% și la o cantitate de cca 4,2 g/l substanță uscată. Suspensiile celulare au fost menținute în aceleași condiții de agitare, lumină și temperatură ca cele descrise mai sus. Timpul de incubare a celulelor în prezența digitoxinei a fost cuprins între 2 și 14 zile.

d) *Procedeu de biotransformare.* În scopul determinării capacității de bioconversie a digitoxinei de către cele trei linii celulare de *D. lanata*, în primele experimente, digitoxina a fost dizolvată în alcool metilic și adăugată aseptice în mediul de cultură al liniilor respective. În următoarele etape, când celulele au fost transferate în mediul de producție, digitoxina a fost dizolvată în dimetilsulfoxid (DMSO) și adăugată aseptice în vasele de cultură, la intervale diferite de timp. După anumite perioade de incubare în prezența digitoxinei, celulele au fost recoltate prin filtrare, spălate și apoi uscate la 60°C , timp de 24 de ore. Din aceste probe au fost extrase și dozate cardenolidele.

e) *Analiza cardenolidelor.* Cardenolidele au fost extrase atât din substanța uscată, cât și din mediu cu 20 ml metanol (70%), prin refluxare la 70°C timp de 20 min și dozate după metoda dată de J o n e s și V e l i k y [7]. Identificarea glicozidelor cardiotonice s-a realizat prin compararea cromatografică a extractelor cu probe etalon. Pentru determinarea cantitativă, plăcile cromatografice au fost citite la 380 nm cu un densitometru CD 200. Curba etalon a fost realizată pentru concentrații de 0,2–0,6 μg digitoxină, digoxină sau glicozida purpurea A/spot. Dozarea cantitativă a glicozidelor neidentificate s-a efectuat după curba etalon a digitoxinei, deoarece în lumina UV toate spoturile respective prezentau o fluorescență galbenă caracteristică glicozidelor din seria A, din care fac parte și digitoxina și glicozida purpurea A. Glicozidele din seria C

(digoxina, lanatozida C și altele) se deosebesc cromatografic de cele din seria A prin fluorescența albăstruie a spoturilor (R_f : digitoxina = 0,65; digoxina = 0,57; lanatozida C = 0,32; glicozida purpura A = 0,30).

Rezultate și discuții. Liniile celulare 11, 21-C50 și 13-C100 de *Digitalis lanata* selecționate de noi [4] și-au păstrat aproape neschimbate, pe durata a trei ani de subcultivări succesive în același tip de mediu, o serie de caracteristici cum sunt: creșterea celulară, modificarea pH-ului mediului de cultură, raportul dintre substanța proaspătă și cea uscată sau intensitatea absorbției zaharozei din mediu. După această perioadă de timp s-a constatat că nici una din cele trei linii nu mai sintetizează cardenolide (digitoxină și digoxină). Fenomenul de scădere sau chiar de pierdere a capacității de biosinteză a metaboliților secundari a mai fost semnalat și de alți autori care au efectuat experimente asemănătoare cu culturi celulare de *Digitalis*, dar s-a remarcat și la alte specii [11, 12]. Cauzele care conduc la diminuarea sau pierderea acestei capacități sunt multiple și în mare parte necunoscute.

Biotransformarea digitoxinei de către suspensiile celulare de Digitalis lanata

Primele rezultate obținute în urma studiilor efectuate cu culturi celulare de *Digitalis*, în care s-a utilizat β -metildigitoxina ca substrat pentru biotransformare, au fost deosebit de încurajatoare, deoarece peste 90% din acest compus a fost convertit în β -metildigoxină [16, 17]. Totuși, metoda propusă de K r e i s și R e i n h a r d [9, 10] pentru utilizarea digitoxinei în loc de β -metildigitoxină are următoarele avantaje: 1) digitoxina nu necesită nici o modificare chimică înainte de biotransformare, iar dacă principalul produs este deacetil-lanatozida C, el se poate deglucozila și deacetila foarte ușor până la digoxină; 2) substratul poate fi adăugat la mediul de cultură al suspensiilor celulare după diferite durate de cultivare și în cantități diferite. Acestea au fost motivele care ne-au determinat să folosim și noi ca substrat de biotransformare digitoxina. Pentru determinarea capacității de biotransformare a substratului de către cele trei linii celulare de *D. lanata* selecționate de noi, în mediul suspensiilor aflate în ziua a 10-a de cultură am introdus o cantitate mai mică de digitoxină (40 mg/l). În urma analizelor calitative și cantitative se observă că după 4 zile de incubare, liniile celulare transformă digitoxina în mod diferit (Tabel 1). Astfel, linia 11 este complet lipsită de capacitatea de a converti substratul, linia 21-C50 îl biotransformă într-o proporție de 32%, iar linia 13-C100 îl transformă aproape complet. Unicul produs rezultat în urma bioconversiei digitoxinei este glicozida purpura A (GpA). Acest fenomen a fost constatat și de alți cercetători care au folosit ca substrat digitoxina [3, 5, 10, 16, 17]. De fapt, procesul constă într-o reacție de glucozilare catalizată de enzima glucoziltransferază, existentă în celulele de *Digitalis*, în urma căreia o moleculă de glucoză este atașată de lanțul glucidic (D-D-D-; D = β -D-digitozoză) al agliconului digitoxinei care se transformă în GpA [5, 8].

Ca urmare a rezultatelor obținute, în experimentele ulterioare am folosit doar linia celulară 13-C100. De asemenea, pentru biotransformare am utilizat sistemul de cultivare în două etape descris de K r e i s și R e i n h a r d [9, 10]. Într-un astfel de sistem, celulele de *D. lanata* au fost transferate din mediul de creștere într-un așa-numit "mediu de producție". Acesta este un mediu MS modificat după formula dată de cei doi autori, și a fost considerat optim pentru biotransformarea digitoxinei în digoxină.

Tabel 1

Biotransformarea digitoxinei de către suspensiile celulare de *Digitalis lanata* cultivate în mediul MS de creștere^a

Linia celulară	Conținutul relativ în cardenolide ^b	
	Digitoxina (%)	Glicozida purpura A (%)
11	100	-
21-C50	68,3	31,7
13-C100	1,2	98,8

^a Digitoxina a fost introdusă în mediu în ziua a 10-a de cultură, iar celulele au fost recoltate după 4 zile de incubare.

^b Conținutul total procentual în cardenolide a fost calculat pe baza concentrației lor reale determinată atât din biomasa celulară, cât și din mediu (mg/g substanță uscată și μg/ml mediu).

Urmărind creșterea liniei 13-C100 utilizată de noi, cultivată atât în mediul MS de creștere, cât și în cel modificat, se remarcă faptul că celulele se adaptează destul de bine la mediul de producție, VSC mărindu-se de la 13% (ziua 0 de cultură) la 23% (ziua 10 de cultură) (Fig. 1). Totuși, nici în acest mediu de producție, celulele liniei 13-C100 nu biotransformă digitoxina în digoxină, principalul produs al bioconversiei fiind tot GpA.

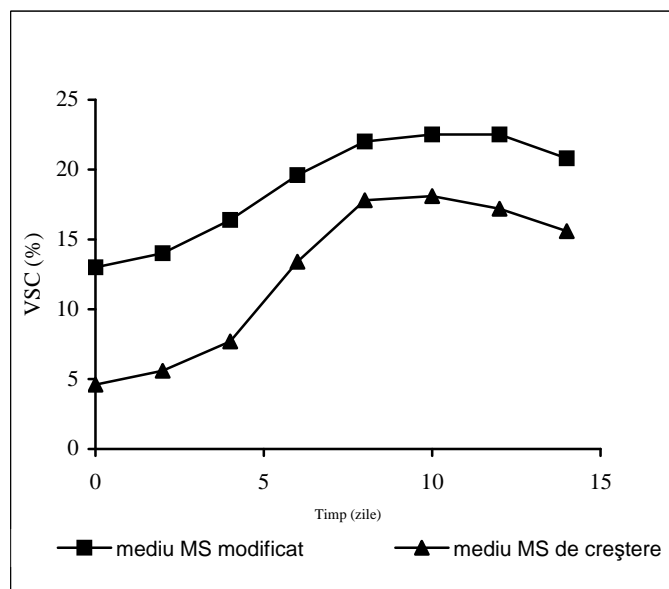


Fig. 1. Creșterea celulară la linia 13-C100 de *Digitalis lanata* cultivată în mediul MS modificat (mediu de producție) și în mediul MS de creștere, ambele fără adaos de digitoxină.

Pentru a determina cantitatea de digitoxină care poate fi transformată în glicozida purpura A de către celulele liniei 13-C100, am mărit concentrația substratului de la 40 mg/l la 300 mg/l. Sporirea concentrației de digitoxină este posibilă, deoarece, așa cum arătau și alți autori, prin mărirea densității celulare inițiale, în cazul nostru de

BIOTRANSFORMAREA DIGITOXINEI

la 4,5% (în mediul MS de creștere) la 13% (în mediul de producție), are loc o scădere a cantității de substrat per celulă, astfel că acesta nu devine toxic. Digitoxina, ca și alte glicozide cardiotonice, poate intra în celule prin difuzie, acumulându-se în vacuole [10].

Rezultatele obținute de noi relevă că la această densitate celulară inițială (13%) linia 13-C100 de *D. lanata* nu a transformat în totalitate substratul nici după ziua a 10-a de cultură (Fig. 2). Deoarece fenomenul se poate datora în principal cantității insuficiente de biomasă celulară care participă la biotransformare, în experimentele ulterioare am studiat influența densității inițiale a celulelor (cantitatea de biomasă celulară inoculată, per volum de mediu proaspăt) asupra capacității de biotransformare a digitoxinei introdusă în mediu în diferite concentrații. Așa cum se observă și în Fig. 3, între intensitatea procesului de bioconversie a digitoxinei în GpA și mărimea densității celulare inițiale există o corelație direct proporțională. Bazându-ne pe aceste rezultate, în continuare toate experimentele au fost realizate cu o concentrație a digitoxinei de 0,3 g/l și cu o densitate inițială a celulelor de 16,5%. Peste această valoare a densității celulare inițiale, producția de biomasă celulară crește foarte mult pe durata perioadei de incubare, astfel că agitarea suspensiilor celulare la o viteză de 100 rpm devine aproape imposibilă.

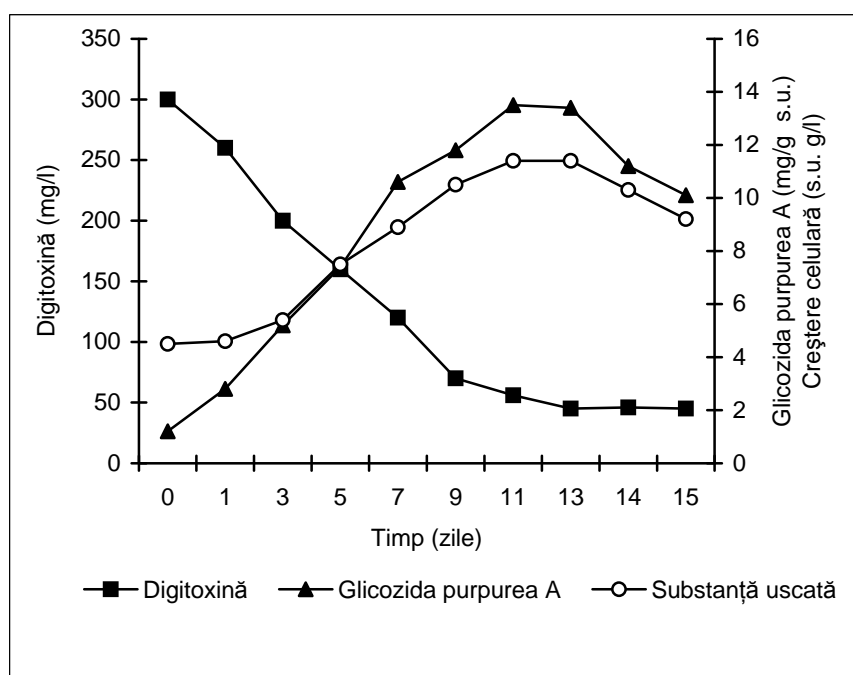


Fig. 2. Creșterea celulară și biotransformarea digitoxinei de către linia 13-C100 de *Digitalis lanata* cultivată în mediul MS modificat (mediu de producție). Digitoxina (0,3 g/l) a fost adăugată în mediul de cultură la 3 zile după transferul celulelor în mediul de producție proaspăt (ziua 0 în grafic). Densitatea inițială a celulelor a fost de 13 % (cca 4,5 g/l substanță uscată).

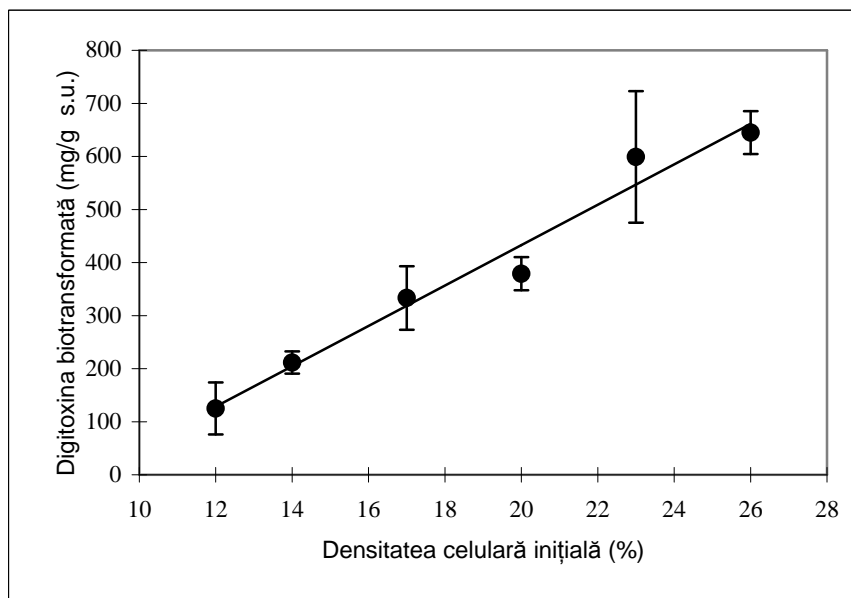


Fig. 3. Corelația dintre densitatea celulară inițială (% VSC) și capacitatea de biotransformare a digitoxinei de către linia celulară 13-C100 de *Digitalis lanata* cultivată în mediul de producție. Digitoxina a fost adăugată în mediul în ziua a 3-a de cultură în diferite concentrații, iar biomasa celulară a fost recoltată după 8 zile de incubare. Principalul compus care rezultă în urma biotransformării este glicozida purpurea A. Fiecare punct reprezintă media \pm DS a 4 măsurători, r = coeficientul de regresie lineară.

Urmărind evoluția acumulării în celule și în mediul de cultură a GpA, rezultată în urma biotransformării digitoxinei, s-a remarcat că intensitatea maximă a procesului are loc în ziua a 6-a de la introducerea digitoxinei în vasele cu suspensii, după care scade brusc (Fig. 4). Apariția în mediul de cultură a unei cantități extrem de mici (cca 1,5 μ g/ml mediu) de glicozida purpurea A se poate datora lizei celulelor. Scăderea cantității de GpA care se acumulează în celule poate fi urmarea descompunerii ei în compuși pe care nu am reușit să-i identificăm.

Într-o altă etapă, am studiat efectul mai multor parametri cum sunt: vârsta celulelor utilizate ca inocul, momentul optim de introducere a digitoxinei în suspensiile celulare și de recoltare a biomasei celulare, precum și sursa de carbon, asupra biotransformării digitoxinei de către celulele liniei 13-C100 de *D. lanata*. Indiferent însă de parametrii folosiți pentru influențarea acestui proces, produsul final al bioconversiei substratului a fost tot glicozida purpurea A. Singurele modificări notabile au apărut atunci când s-au utilizat diferite surse de carbon.

Efectul sursei de carbon asupra biotransformării digitoxinei

Pentru determinarea influenței sursei de carbon asupra capacității de biotransformare a suspensiilor celulare de *D. lanata* au fost efectuate o serie de experimente. Astfel, s-a testat acțiunea glucozei, zaharozei, fructozei, maltozei, manitolului și a sorbitolului, toate fiind adăugate în mediul de producție în concentrația de 80 g/l (concentrația s-a exprimat în moli) (Tabel 2).

BIOTRANSFORMAREA DIGITOXINEI

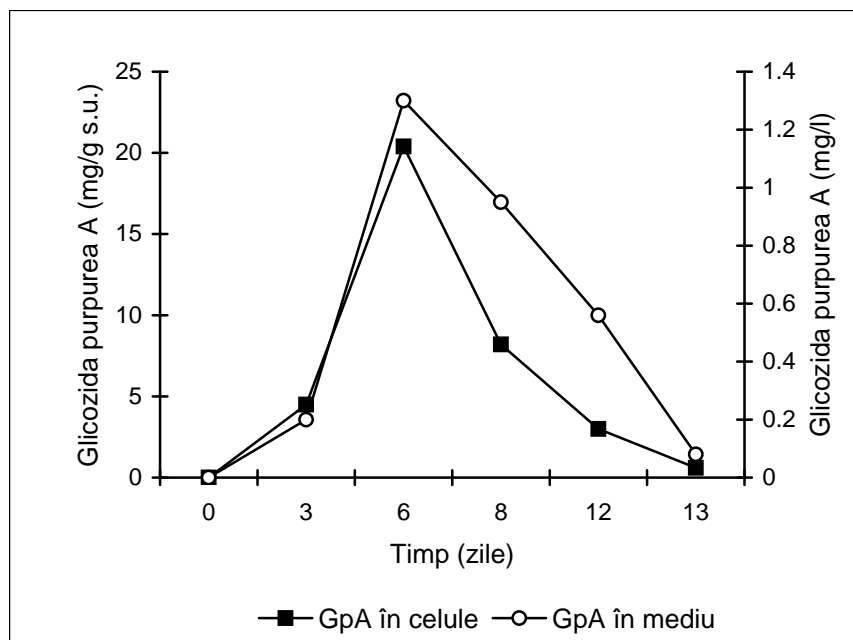


Fig. 4. Acumularea glicozidei purpurea A (rezultată în urma biotransformării digitoxinei) în celulele liniei 13-C100 de *Digitalis lanata* și în mediu, pe durata timpului de cultivare. Digitoxina (0,3 g/l) a fost adăugată în vasele de cultură la 3 zile după transferul celulelor în mediul MS de producție (ziua 0 în grafic). Densitatea inițială a celulelor a fost de 16,5% (cca 6,5 g/l substanță uscată).

Se cunoaște că sursa de carbon poate influența uneori în mod decisiv biosinteza metaboliților secundari în culturile celulare vegetale. Așa cum se remarcă și din Tabelul 2, cantitatea cea mai mare de glicozida purpurea A, rezultată în urma biotransformării digitoxinei, se acumulează în celulele crescute în mediul cu glucoză. În acest sens, K r e i s și R e i n h a r d [10] au arătat că celulele de *D. lanata* pot să hidroxileze metildigitoxina timp de 20 de zile chiar dacă ele sunt crescute într-o soluție de glucoză.

În cazul liniei 13-C100 se observă că celulele crescute în mediul cu zaharoză prezintă o rată a biotransformării foarte apropiată de cea a celor cultivate în mediul cu glucoză. Fenomenul este explicabil, deoarece se știe că toate celulele vegetale conțin o invertază care scindează zaharoza în fructoză și glucoză. În privința celorlalte surse de carbon, se constată o scădere accentuată a biotransformării digitoxinei în glicozida purpurea A, în special în mediul cu manitol și în cel cu sorbitol. Tot în aceste medii, creșterea celulară este puternic inhibată, scăzând de la 12 g/l de biomasă celulară uscată, cât se acumulează în mediile cu glucoză sau zaharoză, până la 6 și respectiv 3 g/l. Procesul este explicabil, deoarece manitolul și sorbitolul, alături de alte substanțe ca și NaCl sau PEG (polietilenglicolul), sunt considerați ca agenți care induc stresul osmotic în culturile celulare vegetale. Astfel de agenți stimulează stresul de uscăciune prin reducerea potențialului apei (Ψ_w) din mediul de cultură [14].

Tabel 2

Efectul sursei de carbon asupra biotransformării digitoxinei de către linia celulară 13-C100 de *Digitalis lanata* crescută în mediul MS modificat (mediu de producție)^a

Sursa de carbon	Concentrație (M)	Conținutul în cardenolide		Creșterea celulară (s.u. g/l) ^e
		în celule (mg/g s.u.)	în mediu (μg/ml)	
Zaharoză	0,2339	23,07 ^b	4,7 ^b	12,32
Maltoză	0,2339	13,36 ^b	5,7 ^b	9,08
Glucoză	0,4444	23,89 ^b	8,1 ^b	12,61
Fructoză	0,4444	18,17 ^b	5,9 ^b	10,75
Manitol	0,4395	9,6 ^b CN ^c	4,2 ^b	6,42
Sorbitol	0,4395	5,2 ^b CN ^d	1,2 ^b	3,6

^a Digitoxina (0,3 g/l) a fost adăugată după 3 zile de creștere a celulelor în mediul de producție, iar conținutul în cardenolide și creșterea celulară au fost determinate după 6 zile de incubare.

^b Glicozida purpurea A.

^c Cardenolidă neidentificată ($R_f = 0,56$).

^d Cardenolidă neidentificată ($R_f = 0,54$).

^e Inoculul a fost de cca 6,5 g substanță uscată/l mediu (16% VSC).

Comparând productivitatea celulelor (mg/l GpA) crescute în mediul cu manitol sau cu sorbitol, cu cea a celulelor din mediul cu glucoză, se observă că ea este de două ori și respectiv de 6,75 ori mai mică. Rezultatele obținute de noi sunt în concordanță cu cele obținute de alți autori [10]. Totuși, trebuie subliniat faptul că în cromatogramele realizate din extractele probelor prelevate din celulele de *D. lanata* crescute de noi în mediul cu manitol sau cu sorbitol apare câte un spot al unei alte glicozide cardiotonice decât GpA, cu R_f de 0,56 și respectiv de 0,54 (Tabel 2). Datorită acestui fenomen, pe care nu l-am mai întâlnit citat în literatura de specialitate, am inițiat alte experimente în care am utilizat ca sursă de carbon fie manitolul singur sau în combinație cu glucoza, fie sorbitolul singur sau în combinație cu glucoza. Variantele experimentale sunt redate în Tabelul 3.

Tabel 3

Variantele utilizate pentru testarea acțiunii manitolului și sorbitolului asupra biotransformării digitoxinei de către linia celulară 13-C100 de *Digitalis lanata*

Varianta	Sursa de carbon (M)	Momentul recoltării celulelor după adăugarea digitoxinei în mediul suspensiei (zile)
M ₃₁ /S ₃₁	manitol/sorbitol (0,05) + glucoză (0,39)	3
M ₃₄ /S ₃₄	manitol/sorbitol (0,22) + glucoză (0,22)	3
M ₃₈ /S ₃₈	manitol/sorbitol (0,44)	3
M ₆₁ /S ₆₁	manitol/sorbitol (0,05) + glucoză (0,39)	6
M ₆₄ /S ₆₄	manitol/sorbitol (0,22) + glucoză (0,22)	6
M ₆₈ /S ₆₈	manitol/sorbitol (0,44)	6
M ₁₀₁ /S ₁₀₁	manitol/sorbitol (0,05) + glucoză (0,39)	10
M ₁₀₄ /S ₁₀₄	manitol/sorbitol (0,22) + glucoză (0,22)	10
M ₁₀₈ /S ₁₀₈	manitol/sorbitol (0,44)	10

BIOTRANSFORMAREA DIGITOXINEI

Din Tabelul 4 se poate observa că în variantele de mediu (M_{31} , M_{61} și M_{101}) recoltate după 3, 6 și respectiv 10 zile de incubare și în care concentrația de glucoză este de 0,39 M, iar cea de manitol de 0,05 M, proporția în care digitoxina este biotransformată este mult mai mare decât la celelalte variante în care concentrația manitolului crește la 0,44 M (M_{38} , M_{68} și M_{108}). De asemenea, la majoritatea variantelor, în funcție de durata de incubație și combinația sursei de carbon, în celule se acumulează și alte glicozide în afară de GpA. Fluorescența spoturilor acestor cardenolide, relevată în lumina UV prin cromatografie în strat subțire, este galbenă, iar R_f -ul lor are următoarele valori: 0,41; 0,46; 0,54 și 0,60. Ele pot să fie glicozide cardionice din seria A, așa cum este lanatozida A, sau din celelalte serii B, D și E și rezultă în urma bioconversiei digitoxinei de către linia celulară 13-C100. O singură excepție o constituie varianta M_{108} , recoltată după 10 zile de incubare, care în afară de glicozida purpurea A mai acumulează o glicozidă, al cărei R_f (0,56) este foarte apropiat de cel al digoxinei (0,57), dar a cărei fluorescență este tot galbenă.

Tabel 4
Efectul manitolului, singur sau în combinație cu glucoza, asupra creșterii liniei celulare 13-C100 de *Digitalis lanata* și a conținutului ei în cardenolide rezultate în urma biotransformării digitoxinei^a

Variante	Conținutul relativ în cardenolide ^c		Cardenolide neidentificate		Creșterea celulară (s.u. g/l) ^d
	Digitoxina (%)	Glicozida purpurea A (%)	(μ g/g s.u.)	R_f	
M_{31}	52	48	2,9	0,46	7,1
M_{34}	62	38	99,4	0,54	4,1
			166,0	0,60	
M_{38}	71	29	18,1	0,41	3,2
			101,2	0,54	
M_{61}	35	65	98,0	0,54	8,3
			244,2	0,60	
M_{64}	47	53	15,8	0,54	6,1
			233,28	0,60	
M_{68}	67	33	123,3	0,54	4,5
			117,4	0,60	
M_{101}	10	90	14,7	0,46	10,1
			42,3	0,54	
M_{104}	18	82	54,8	0,54	8,0
			54,9	0,60	
M_{108}	50	50	290,9	0,56	6,3

^a Digitoxina (0,3 g/l) a fost adăugată în mediu după 3 zile de cultură, iar biomasa celulară a fost recoltată după 3, 6 și 10 zile de incubare. Mediul de cultură utilizat este mediul de producție.

^b Semnificația variantelor de mediu este redată în Tabelul 3.

^c Valorile sunt calculate pe baza concentrațiilor cardenolidelor în mg/g de substanță uscată.

^d Inoculul de biomasă celulară a fost de cca 6,5 g substanță uscată/l (16,5% VSC).

Cantitatea acestor cardenolide neidentificate rezultate în urma bioconversiei digitoxinei este destul de scăzută și variază de la cca 3 μ g/g de substanță uscată (M_{31}) până la cca 300 μ g/g de substanță uscată (M_{108}). Dacă ne referim la creșterea celulară, se observă că manitolul are un efect inhibitor asupra acestui proces, efect care este

proporțional cu concentrația lui în mediu și se datorează, așa cum arătam, stresului osmotic pe care îl produce asupra celulelor vegetale cultivate *in vitro*.

Față de manitol, efectele negative ale sorbitolului atât asupra capacității de biotransformare a liniei celulare 13-C100, cât și a creșterii celulare sunt mult mai drastice (Tabel 5). Astfel, cantitatea de digitoxină rămasă netransformată după 10 zile de incubare a celulelor crescute în prezența digitoxinei într-un mediu ce are ca unică sursă de carbon sorbitolul în concentrație 0,44 M (S₁₀₈) este de cca 85%. Comparativ cu celulele crescute în mediu cu manitol în aceeași variantă, cele crescute în mediu cu sorbitol au o capacitate de biotransformare a digitoxinei în glicozida purpurea A de trei ori mai mică, iar spectrul celorlalte glicozide cardiotonice rezultate în urma procesului de bioconversie este mult mai redus. În acest sens, în extractele realizate din biomasa celulară uscată sunt prezente doar două noi cardenolide, al căror R_f este de 0,54 și de 0,60, toate spoturile având fluorescența galbenă. De asemenea, sorbitolul are o acțiune inhibitoare asupra creșterii celulare mult mai puternică decât cea a manitolului.

Tabel 5

Efectul sorbitolului, singur sau în combinație cu glucoza, asupra creșterii liniei celulare 13-C100 de Digitoxina lanata și a conținutului ei în cardenolidele rezultate în urma biotransformării digitoxinei^a

Variante	Conținutul relativ în cardenolide ^c		Cardenolide neidentificate		Creșterea celulară (s.u. g/l) ^d
	Digitoxina (%)	Glicozida purpurea A (%)	(μg/g s.u.)	R _f	
S ₃₁	68	32	53,6	0,54	5,1
			121,5	0,60	
S ₃₄	77	23	8,97	0,54	3,1
S ₃₈	86	14	107,7	0,54	2,8
S ₆₁	43	57	83,6	0,54	5,9
S ₆₄	50	50	90,1	0,54	4,4
			141,3	0,60	
S ₆₆	77	23	73,3	0,54	3,6
S ₁₀₁	37	63	138,1	0,56	7,8
			232,6	0,60	
S ₁₀₄	58	42	11,48	0,56	6,2
S ₁₀₈	85	15	63,7	0,60	4,2
			91,0	0,66	

^a Digitoxina (0,3 g/l) a fost adăugată în mediu după 3 zile de cultură, iar biomasa celulară a fost recoltată după 3, 6 și 10 zile de incubare. Mediul de cultură utilizat este mediul de producție.

^b Semnificația variantelor de mediu este redată în Tabelul 3.

^c Valorile sunt calculate pe baza concentrațiilor cardenolidelor în mg/g de substanță uscată.

^d Inoculul de biomasă celulară a fost de cca 6,5 g substanță uscată/l (16,5% VSC).

Acumularea metaboliților secundari în culturile celulare vegetale poate fi mărită și prin utilizarea unor factori de stres așa cum sunt: șocul osmotic, adăugarea de săruri anorganice ale metalelor grele, de omogenate fungice, precum și iradierea cu UV. Astfel de factori pot fi considerați elicitori, deoarece au capacitatea de a induce biosinteza metaboliților de stres, respectiv a fitoalexinelor [11, 14, 18]. Acțiunea manitolului sau a sorbitolului asupra metabolismului secundar a fost mult mai puțin cercetată față de alți

BIOTRANSFORMAREA DIGITOXINEI

elicitori. În acest sens, s-a constatat că sorbitolul, în concentrația de 0,2 M, a condus la mărirea biosintezei de catarantină în culturile celulare de *Catharanthus roseus* [18]. Totuși, este dificil de explicat fenomenul care are loc în culturile celulare de *D. lanata* datorită folosirii manitolului sau sorbitolului, singuri sau în combinație cu glucoza, drept sursă de carbon. Astfel, pe de o parte ei scad capacitatea celulelor de a transforma digitoxina în GpA, dar pe de altă parte induc apariția unor tipuri diferite de reacții de bioconversie, cel mai probabil de glucozilare a digitoxinei, care au ca rezultat formarea celor cinci cardenolide rămase încă neidentificate.

Concluzii. 1. După trei ani de subcultivări succesive în același tip de mediu, suspensiile celulare de *D. lanata* și-au pierdut capacitatea de a sintetiza digitoxină și/sau digoxină.

2. Trei dintre liniile celulare izolate de noi și luate în studiu sunt capabile să biotransforme digitoxina. Dintre ele, linia 13-C100 poate să biotransforme majoritatea cantității acestui substrat adăugată în mediul de cultură al suspensiilor.

3. Indiferent de cantitatea de digitoxină și de momentul adăugării ei în mediul suspensiilor celulare, precum și de momentul recoltării biomasei celulare, unicul produs rezultat în urma bioconversiei substratului, respectiv al glucozilării lui a fost glicozida purpurea A care se acumulează cu precădere în celule.

4. Utilizarea manitolului și a sorbitolului ca surse de carbon a avut două efecte contradictorii. Astfel, pe de o parte cei doi compuși au scăzut intensitatea biotransformării digitoxinei în glicozida purpurea A, iar pe de altă parte au indus anumite reacții de glucozilare, în urma cărora o parte din digitoxină se transformă în cinci compuși cardenolidici noi (neidentificați) care diferă prin valoarea R_f .

BIBLIOGRAFIE

1. Alfermann, A.W., Bergmann, W., Figur, C., Helmbold, U., Schwantag, D., Schuller, I., Reinhard, E., *Biotransformation of β -methyldigitoxin to β -methyldigoxin by cell cultures of Digitalis lanata*, în Mantell, S.H., Smith, H. (Eds.), *Plant Biotechnology*, p. 67-74, Univ. Press, Cambridge, 1983.
2. Alfermann, A.W., Boy, H., Doller, P.C., Hagedorn, W., Heins, M., Wahl, J., Reinhard, E., *Biotransformation of cardiac glycosides by plant cell cultures*, în Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M.H. (Eds.), *Plant Cell Culture and Its Bio-Technological Application*, p.125-141, Springer, Berlin, 1977.
3. Alfermann, A.W., Reinhard, E., *Biotransformation by plant tissue cultures*, "Bull. Soc. Chim. France", No. 1-2, 1980, 35-45.
4. Deliu, C., Bota, C., Munteanu-Deliu, C., Cristea, V., Mocanu, S., *Sinteza de cardenolide în culturi celulare de Digitalis lanata*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **43** (1-2), 1998, 77-84.
5. Diettrich, B., Aster, U., Greidziak, N., Roos, W., Luckner, M., *Glycosylation of digitoxin and other cardenolides in cell cultures of Digitalis lanata*, "Biochem. Physiol. Pflanzen", **182**, 1987, 245-255.

6. Fulzele, D., Kreis, W., Reinhard, E., *Cardenolide biotransformation by cultured Digitalis lanata cells: Semi-continuous cell growth and production of deacetyllanatoside C in a 40-l stirred-tank bioreactor*, "Planta Med.", **58** (Suppl.1), 1992, 601-A 602.
7. Jones, A., Veliky, I.A., *Biotransformation of cardenolides by plant cell cultures*, "Planta Med.", **42**, 1981, 160-166.
8. Kreis, W., May, U., Reinhard, E., *UDP-glucose:digitoxin 16'-O-glucosyltransferase from suspension-cultured Digitalis lanata cells*, "Plant Cell Rep.", **5**, 1986, 442-445.
9. Kreis, W., Reinhard, E., *Highly efficient 12 β -hydroxylation of digitoxin in Digitalis lanata cell suspension using two-staged culture method*, "Planta Med.", Short Lectures, 1986, 418-419.
10. Kreis, W., Reinhard, E., *12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured Digitalis lanata cells. Production of deacetyllanatoside C using a two-stage culture method*, "Planta Med.", **54**, 1988, 143-148.
11. Kutney, J.P., *Plant cell culture combined with chemistry - a powerful route to complex natural products*, "Acc. Chem. Res.", **26**, 1983, 559-566.
12. Luckner, M., Dietrich, B., *The integration of cardenolide biosynthesis in the differentiation program "somatic embryogenesis" of Digitalis lanata*, în Kurz, W.G.W. (Ed.), *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures II*, p.117-124, Springer, Berlin, 1989.
13. Murashige, T., Skoog, F., *A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, "Physiol. Plant.", **15**, 1962, 473-497.
14. Newton, R.J., Puryear, J.D., Bhaskaran, S., Smith, R.H., *Polyethylene glycol content of osmotically stressed callus cultures*, "J. Plant Physiol.", **135**, 1990, 646-652.
15. Pras, N., Woerdenbag, J.W., van Uden, W., *Bioconversion potential of plant enzymes for the production of pharmaceuticals*, "Plant Cell, Tissue Organ Cult.", **43**, 1995, 117-121.
16. Reinhard, E., *Biotransformations of plant tissue cultures*, în Street, H.E. (Ed.), *Tissue Culture and Plant Science*, p. 433-459, Acad. Press, New York, 1974.
17. Reinhard, E., Boy, M., Kaiser, F., *Umwandlung von Digitalisglykosiden durch Zellsuspensionskulturen*, "Planta Med.", (Suppl.), 1975, 163-168.
18. Smith, J.I., Smart, N.J., Kurz, W.G.W., Misawa, M., *The use of organic and inorganic compounds to increase the accumulation of indole alkaloids in Catharanthus roseus (L.) G. Don cell suspension cultures*, "J. Exp. Bot.", **38**, 1987, 1501-1506.
19. Suga, T., Hirata, T., *Biotransformation of exogenous substrates by plant cell cultures*, "Phytochemistry", **29**, 1990, 2393-2406.
20. Yokoyama, M., *Industrial application of biotransformation using plant cell cultures*, în Diosmo, F., Misawa, M. (Eds.), *Plant Cell Culture, Secondary Metabolism, Toward Industrial Application*, p. 79-121, CRC Press, Boca Raton, 1996.

STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL MODIFICATIONS INDUCED BY
TWO THERAPEUTIC DOSES OF *CIS*-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II)
(CISPLATIN) ON SOME LYMPHOID ORGANS IN WHITE WISTAR RATS

CRISTINA PAȘCA*, CONSTANTIN CRĂCIUN* and ERIKA KIS*

SUMMARY. - *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) (*cis*-DDP or Cisplatin) is an antineoplastic agent with vast therapeutic potential, especially against solid tumours, such as bladder, ovarian and testicular carcinomas. The major side effects of this anticancer drug are its nephrotoxicity and myelotoxicity. Our researches tried to establish the histological and ultrastructural modifications induced by two different doses of Cisplatin (10 and 20 mg/m² body surface) on some lymphoid organs, particularly on the thymus and spleen, in concordance with the moment of the sacrifice. The light and electron microscopy evidenced that both these therapeutic cytostatic doses (especially the high dose) had a significant toxic effect both on the cellular component (lymphocyte populations and reticulo-epithelial cells) and on the vascular component in these organs. The toxic action of Cisplatin on the lymphocytes was determined by its antimitotic activity, correlated with a drastic necrobiotic, necrotic and a moderate apoptotic effect. Sensitivity of the lymphocytes depended on their age, the most affected having been the lymphoblasts. Cisplatin induced a marked depletion of the thymic lobules and splenic nodules. Ultrastructurally, in the thymus, we could see that a very large number of lymphocytes was affected by some degenerative processes as demonstrated by the appearance of many modified (retracted and pycnotic) nuclei, with a cortical hyperchromatosis, and many swollen and vacuolised mitochondria. In the spaces which were created by the lysis processes, a discrete collagen proliferation could be noticed. The degenerative processes seemed to affect a moderate number of epithelio-reticular cells, which had a vacuolised cytoplasm and modified nuclei and cellular organelles. The destructive processes were correlated with a moderately increased number of eosinophils and a large number of macrophages. According to the toxic effect of Cisplatin on the vascular component in the two lymphoid organs, we could see that it resulted in the appearance of a severe congestion and stasis correlated with a change of the vascular permeability which determined massive perivascular oedemas and even a few microhaemorrhages. All these morphopathological aspects appeared immediately, in both thymus and spleen, developed progressively and significantly especially in the rats treated with the high dose. Besides, in rats treated with 20 mg Cisplatin/m² body surface we could notice a reactivation of the extramedullary hematopoiesis at the end of the experimental period.

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum (II) or *cis*-DDP) has been used as a chemotherapeutic agent for the treatment of several malignancies. The DNA adduct is known to be responsible for its therapeutic activity. Platination of proteins and enzymes by *cis*-DDP has also been reported, Cisplatin has been shown to be incorporated into proteins through methionine and cysteine [13, 14]. Also, platinum binding through disulfide (S-S) bond cleavage can cause marked effects on the secondary structures of the proteins as well as on their biological properties [7].

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

Unfortunately, this alkylating agent has a significant nephrotoxicity and hematotoxicity. One of the dose-limiting effects of Cisplatin is mainly myelotoxicity, particularly leukopenia and thrombocytopenia [3, 8, 11]. Therefore, our investigations tried to evaluate the histological and ultrastructural modifications induced by two therapeutic doses of Cisplatin on the thymus and spleen. According to previous studies, these lymphoid organs have a very important role in lymphopoiesis in the adult organisms. Both these two organs are an important source of small lymphocytes, especially if the individual has suffered depletion of the red marrow by irradiation or chemotherapy with cytostatics. Besides, the spleen is a hematopoietic organ which produces more types of blood cells [4].

Material and methods. Our experiments were carried out with the following seven groups of healthy adult male Wistar rats, weighing 190 ± 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;
- groups A₁, A₂ and A₃ treated i.v. with 10 mg Cisplatin/m² body surface and sacrificed 24 hours, 10 and 18 days after the treatment;
- groups B₁, B₂ and B₃ treated i.v. with 20 mg Cisplatin/m² body surface and sacrificed 24 hours, 10 and 18 days after the treatment.

The animals were not fed for 18 hours before the sacrifice. Having sacrificed the animals, we took fragments from the thymus and spleen. For light microscopic examination the fragments were fixed in 10 % neutral formol, processed by the paraffin technique and the sections of 6 μ m were stained by the hematoxylin-eosin and Masson-Goldner trichrome methods [5]. For ultrastructural investigations, fragments of thymus 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, 2, 9].

On the stained and contrasted sections we studied, by light and electron microscopic examinations the histological and ultrastructural modifications induced by the two different doses of Cisplatin on the structural components of these two lymphoid organs and on the lymphocyte populations in the spleen and thymus in correlation with the moment of sacrifice and compared to the untreated group.

Results and discussion. Our investigations demonstrated that the two doses of cytostatic used by us, but especially the high dose, induced significant histological and ultrastructural modifications both in the central (thymus) and peripheral lymphoid organs (spleen).

Concerning the thymus of the rats treated with 20 mg Cisplatin/m² body surface, obvious histological alterations already appeared 24 hours after the treatment, when we could notice the presence of significant smaller thymic lobules as compared to the untreated group, and the two zones of the lobules (the cortex and medulla) could not be clearly distinguished because of a drastic decrease of the lymphocyte number in the outer part of the most of the lobules. This thymocyte depletion seemed to be a consequence of the antimitotic and necrobiotic phenomena of the cells, these processes determining a less compact aspect and a decreased dimension of the cortical area (Fig. 1).

EFFECTS OF CISPLATIN ON SOME LYMPHOID ORGANS IN RATS

Nine days latter, the histological aspect of the thymus demonstrated a moderate increased toxic effect of this alkylating agent, materialized by the appearance of a more drastic cell depletion of the cortical zone, they having a certain homogeneousness tendency, so that in many thymic lobules the two areas could not be distinguished any more. Besides, the lobules were smaller. All over the section surface of the lobules, necrotic, necrobiotic and packing phenomena of the thymocytes could be seen (Fig. 2). In the lysis areas (both in the cortex and medulla) many macrophages appeared, which were responsible for the phagocytosis of the cell debris. No cell was seen in mitosis in the cortex of the thymic lobules, so that we could deduce that the cell division had stopped. The blood vessels also appeared affected by the cytostatic. Thus, grave enough congestions, stasis, perivascular oedemas and discrete microhaemorrhages accompanied the degenerative processes which affected the cells (Fig. 3).

Eighteen days after the treatment, the thymus was in an obvious recovery process, the lobules had almost the same dimensions as in the control group, the two areas of the lobules could be definitely distinguished, but the thymocyte density in the cortex was still low as compared to the untreated group (Fig. 4). The congestion, stasis and perivascular oedemas persisted, but they were discrete, and the microhaemorrhages had disappeared.

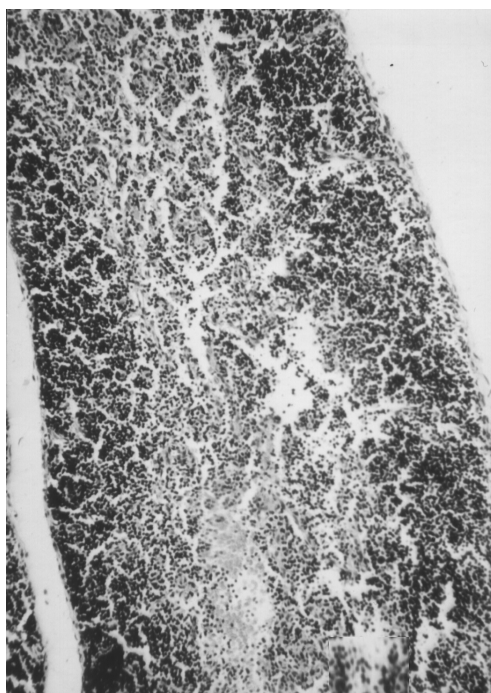


Fig. 1. Homogeneous tendency of the thymic lobules, thymocytolysis and packing phenomena especially in the cortical areas (x 320).

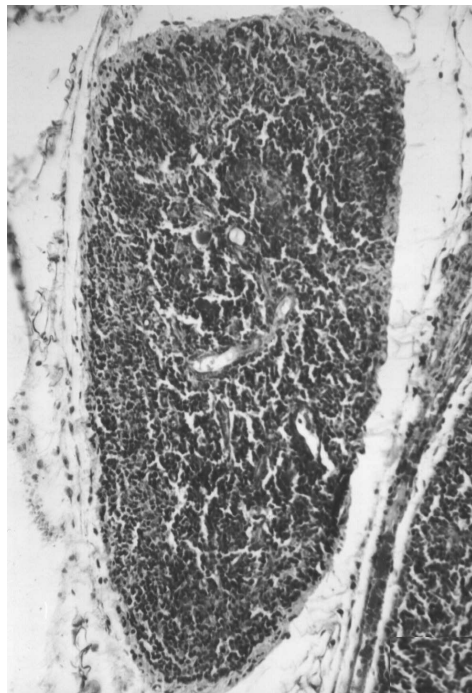


Fig. 2. Thymic atrophy correlated with an obvious homogeneousness of the lobules and thickening of the perilobular capsule (x 320).

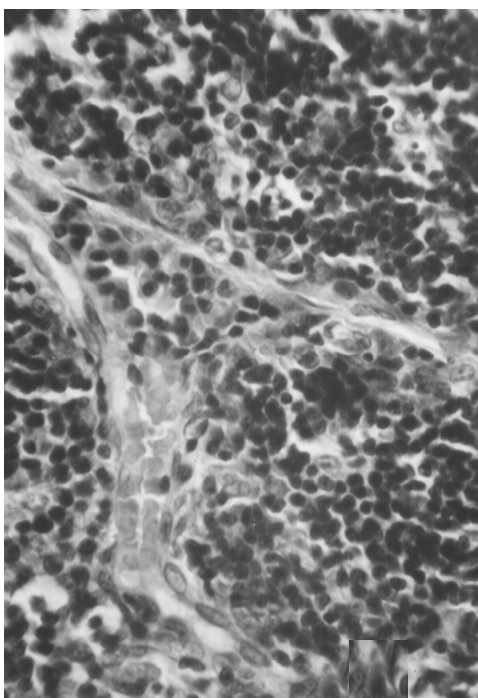


Fig. 3. Congestion of the intralobular vessels and zonal microhaemorrhages (x 1280).

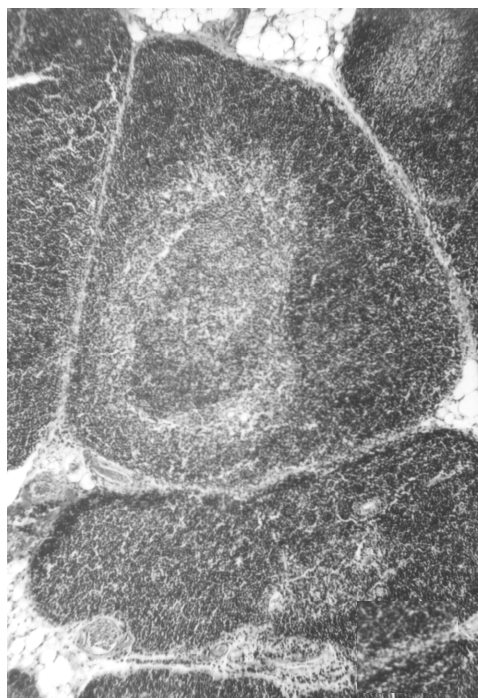


Fig. 4. Structural recovery of the thymic lobules with moderate packing phenomena and thymocytolysis (x 210).

The histological investigation of the thymus was correlated with some ultrastructural studies. The electron microscopy investigations confirmed the histological data. We could observe that this dose of cytostatic affected immediately and seriously both the cellular and the vascular components of the thymus. Then, the toxic effect of the drug aggravated progressively until the 10th day of the experiment, the recovery phenomena occurring and increasing in the next eight days. Thus, both in the cortex and medulla, the vessels seemed to be affected by a severe congestion and stasis correlated with a moderate modification of the vascular permeability which determined a discrete extravasation of the erythrocytes. These vascular changes maintained and aggravated the degenerative processes which affected the cellular component of the thymus. Between the thymocytes and epithelio-reticular cells, the first ones seemed to be more sensitive to this cytostatic. Thus, the thymocytes, initially between the cortex and medulla and then in cortex, appeared to be affected by some drastic degenerative processes consisting of the appearance of some modified nuclei, most of them being pycnotic, retracted, having a chromatin with a peculiar disposition and aspect (cortical hyperchromatosis). The cytoplasm of many thymocytes was vacuolised, and the mitochondria appeared swollen, vacuolised and with their cristae altered. The antimetabolic effect of this dose of cytostatic could be demonstrated by the absence of cells in

EFFECTS OF CISPLATIN ON SOME LYMPHOID ORGANS IN RATS

division. The necrobiotic and necrotic phenomena were correlated with a moderate apoptosis process demonstrated by the presence of a small number of apoptotic bodies both in the cortex and medulla (Fig. 5). Only in some thymic lobules, in the lysis areas, a moderate collagen proliferation could be seen (Fig. 6). The epithelio-reticular cells seemed to be

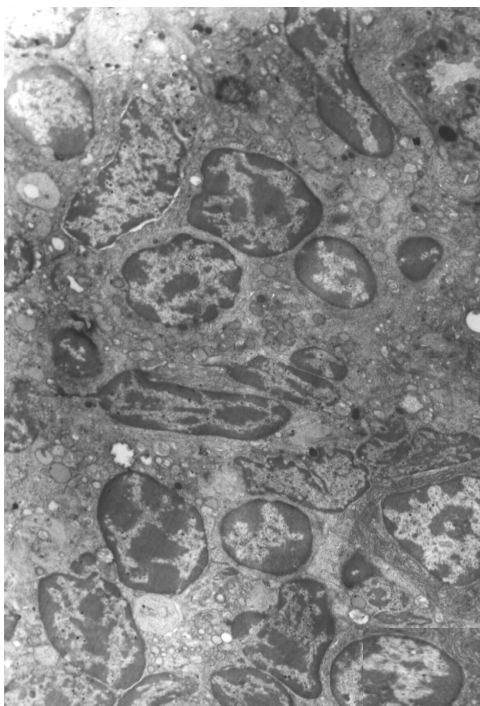


Fig. 5. *Thymocytes with modified nuclei and condensed chromatin and a few apoptotic bodies in the medulla of the thymic lobules (x 4560).*

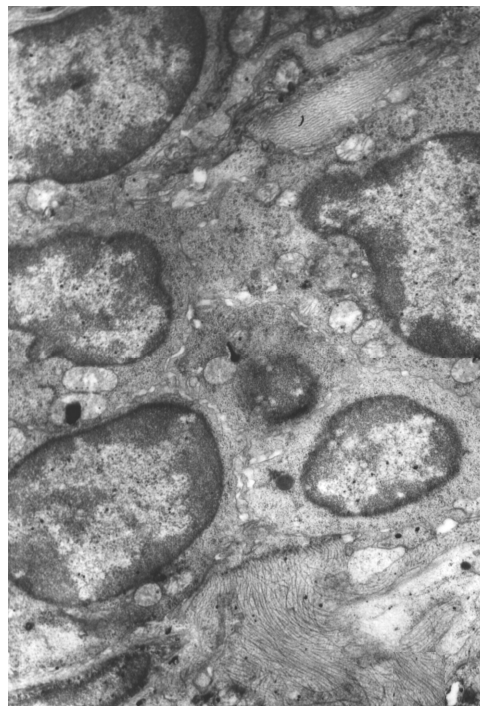


Fig. 6. *Intralobular collagen proliferation, cortical hyperchromatosis and swelling of the mitochondria of the thymocytes (x 11400).*

affected by the alterative phenomena, too. They appeared swollen, had a vacuolised cytoplasm, and the mitochondria were swollen and had disorganised matrix and cristae (Figs. 7 and 8). These massive degenerative processes in the thymic lobules were correlated with a discrete increase of the eosinophil and macrophage number (Figs. 8 and 9).

Cisplatin, administered in this dose of 20 mg/m^2 body surface, had a significant toxic effect also on the other lymphoid organ studied by us, the spleen. Obvious histopathological aspects appeared already 24 hours after the treatment, when we could see a serious congestion and stasis, correlated with a decrease of the lymphocyte number in the germinal centers in the white pulp, so that all the lymphatic nodules appeared smaller. Besides, as a consequence of the zonal necrotic and necrobiotic processes, a "starry sky" aspect of the nodules could be noticed (Fig. 10). Nine days latter,

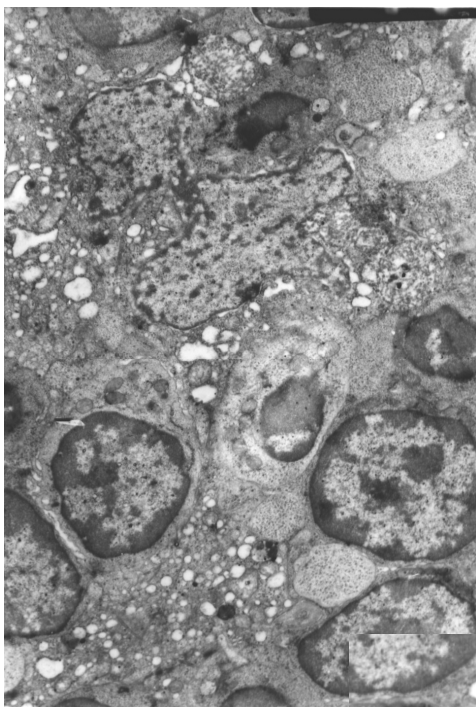


Fig. 7. Intracytoplasmic vacuolisation and nuclear modifications of the epithelio-reticular cells (x 7600).

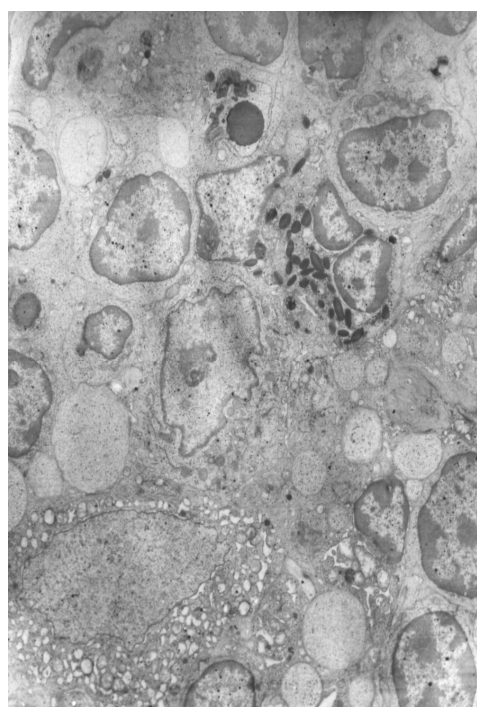


Fig. 8. Ultrastructural modifications of the epithelio-reticular cells and thymocytes, rare apoptotic bodies and an eosinophilic infiltrate in the cortex of the thymic lobules (x 4560).

these nodules were very small, many of them being atrophied, the germinal centres were difficult to observe or completely disappeared (Fig. 11). After 18 days from the treatment, although the lymphatic nodules were still smaller, a certain recovery process could be observed. Thus, a large number of lymphoblasts, granulocytes in different developing stages and megakaryocytes appeared in the centre of the nodules (Fig. 12).

Concerning the groups treated with 10 mg Cisplatin/m² body surface, the light and electron microscopic investigations of the thymus and spleen demonstrated that the toxic effect was less drastic. Although all the histopathological aspects previously described appeared immediately after the chemotherapy, they were less grave, and after 10 days from the treatment, obvious recovery processes could be noticed, so that, finally, both the thymus and the spleen of the treated rats appeared almost completely recovered. Besides, in these groups, we could not see any reactivation of the extramedullary hematopoiesis at the level of the spleen. That fact demonstrated that this dose of cytostatic had not a very hematotoxic effect, so that the hematopoietic marrow was still able to provide enough blood cells all the time of the experiment.

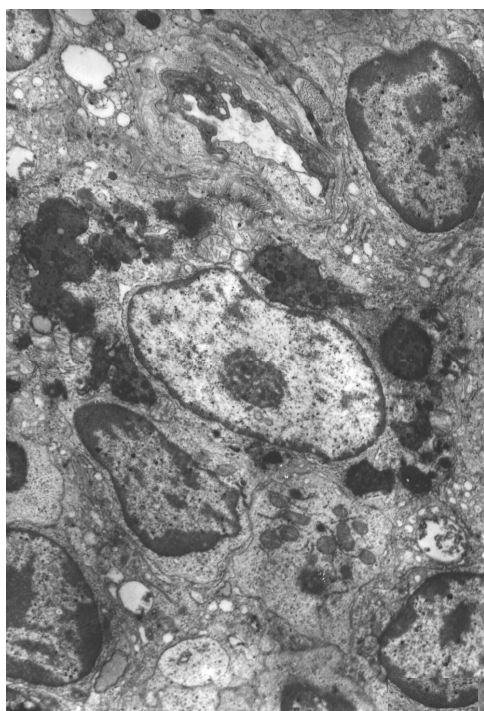


Fig. 9. Macrophage with an intense phagocytic activity in thymus (x 7600).

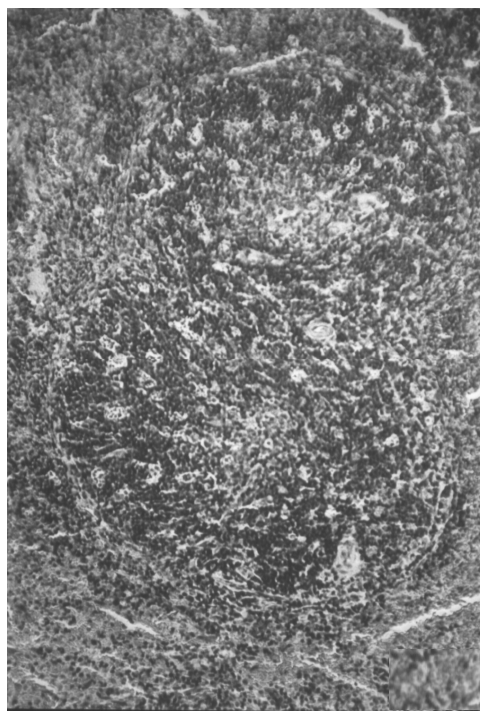


Fig. 10. A "starry sky" aspect of the splenic nodules and zonal cytolysis (x 320).

The light and electron microscopic studies evidenced the fact that both these two therapeutic doses of *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (but especially the high dose) had a significant toxic effect both on the central and peripheral lymphoid organs. The most affected seemed to be the thymus, which is responsible for the production of a pool of circulating lymphocytes, or T-cells. It is known that the T-cells migrate from the thymus to the other lymphoid organs, principally to the lymph nodes and spleen, where they settle down in so-called thymus-dependent zones, including the paracortical zones of the lymph nodes, the periaarterial sheaths in the white pulp of the spleen, and the lymphoid tissue of Peyer's patches in the small intestine. Thus, it could be explained why any alteration at the level of the lymphocyte populations in the thymus is correlated with a serious structural modification of the cellular component in the peripheral lymphoid organs.

The toxic action of Cisplatin on the lymphocytes in the two lymphoid organs studied by us was determined by its antimetabolic activity, correlated with a drastic necrobiotic, necrotic and a moderate apoptotic effect, this fact being demonstrated by a drastically decreased number of cells, both in the spleen and thymus, by the appearance of a large number of necrotic or necrobiotic remains of the lymphocytes, and by the presence of a few apoptotic corpuscles, especially in the groups treated with the high dose of cytostatic.

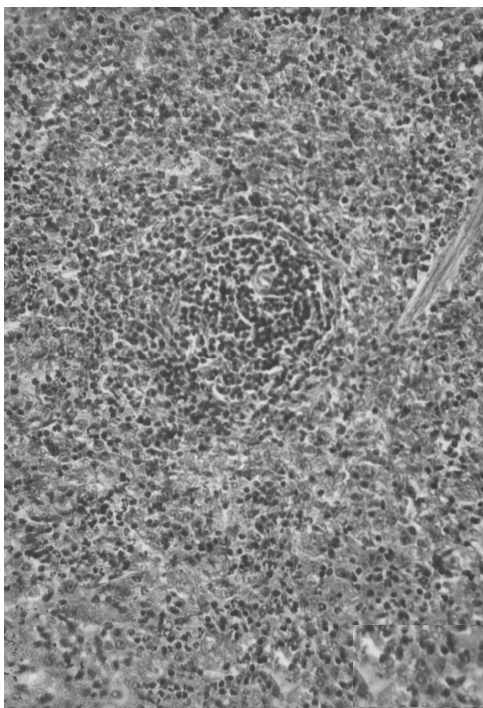


Fig. 11. *Atrophied splenic nodule*
(x 512).

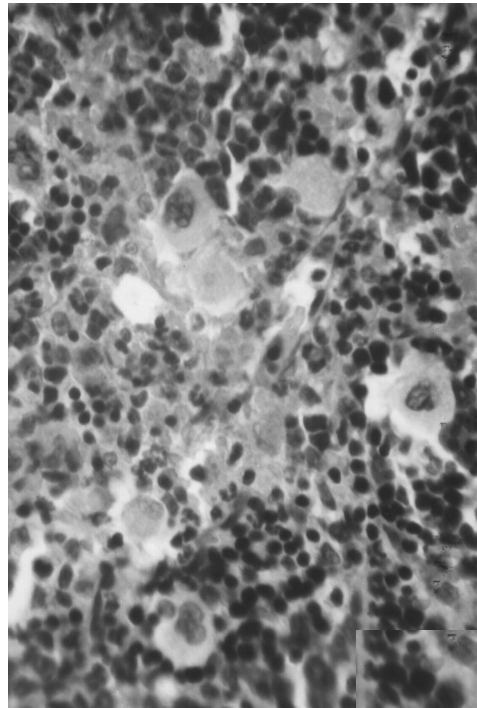


Fig. 12. *Many megakaryocytes, lymphoblasts*
and groups of granulocytes (eosinophils and
neutrophils) in different developing stages (x 1280).

This cytostatic affects especially the cellular component (lymphocyte populations and the reticulo-epithelial cells) in these lymphoid organs. However, the vascular component is also affected, the congestion, stasis, oedemas and microhaemorrhages maintaining and aggravating the degenerative processes which affect the cell in the thymus and spleen. The sensitivity of the lymphocytes seems to depend on their age, the most affected being the lymphoblasts, which usually occur in a large number both in the cortex of the thymic lobules and in the lymphatic nodules of the spleen. This explains the severe decrease of the cell number in the cortex of the thymic lobules and white pulp of the spleen. The mature lymphocytes were also affected by the drug, but not so fast and severely.

As a consequence of the toxic action on the lymphocyte populations this cytostatic has an immunomodulatory effect, the same as the other platinum compounds, this effect being not completely elucidated. However, it is known that most T-lymphocytes (which are severely affected by Cisplatin), through their association with epithelio-reticular cells, recognize non-self antigens when these antigens are associated on the cell surface with membrane glycoproteins encoded in the major histocompatibility complex (MHC). The MHC glycoproteins are thought to serve as antigen-binding receptors that activate the appropriate T-cell response to a specific

non-self antigen [4]. Besides, it is now known that platinum compounds (because of their toxic effect on the lymphoid organs), have an immunomodulatory effect, because they inhibit the proliferation of peripheral lymphocytes in response to mitogens or allogeneic cells, as well as the growth of T- and B-cells in culture [6]. Sfrikakis *et al.* [11] showed that Cisplatin, the same as Carboplatin, may inhibit lymphocyte activation and subsequent proliferation and modulate immune function *in vivo*, by directly suppressing the expression of IL-2 and IL-2R α genes. Binding of IL-2 on its specific, high-affinity, surface receptor results in vigorous lymphocyte proliferation [10, 12].

Our ultrastructural investigation demonstrated that the doses of Cisplatin exerted a significant toxic effect on the epithelio-reticular cells, too. This fact could contribute to the immunomodulatory action of this drug, because it is known that the thymus exerts a humoral effect upon other lymphoid tissues, particularly with regard to the stimulation of lymphocyte production and development of immunological competence. These substances (thymosin, thymoprotein, thymic humoral factor and serum thymic factor) are believed to be synthesized by the epithelio-reticular cells [4].

Only the dose of 20 mg Cisplatin/m² body surface had such a toxic effect on the hematopoietic structures (principally on the red marrow and thymus), so that the rat organism had to appeal to the extramedullary hematopoiesis in the spleen, where we could notice an intense lymphopoiesis, granulocytopenia and thrombocytopenia at the end of the experiment.

Our researches demonstrated that, although both doses induced significant histological and ultrastructural modifications in central and peripheral lymphoid organs, they were reversible, obvious recovery processes being noticed in the last eight days of the experiment.

Conclusions. 1. *cis*-Diamminedichloroplatinum(II), administered in doses of 10 or 20 mg / m² body surface in white Wistar rats has a toxic effect on the thymus and spleen, effect which depends on the dose, being graver in the case of the high dose.

2. The two doses induce significant but reversible structural and ultrastructural modifications in central and peripheral lymphoid organs.

3. These two therapeutic doses of cytostatic (but especially the high dose) had a significant toxic effect on both the cellular component (lymphocyte populations and epithelio-reticular cells) and the vascular component of these organs.

4. The toxic action of Cisplatin on the lymphocytes was determined by its antimitotic activity, correlated with a drastic necrobiotic, necrotic and a discrete apoptotic effect.

5. A discrete sclerosis tendency could be noticed especially in the thymus and white pulp of the spleen of the rats treated with the high dose.

6. Only in rats treated with 20 mg Cisplatin/m² body surface, we could notice a temporary reactivation of the extramedullary hematopoiesis (lymphopoiesis, granulocytopenia and thrombocytopenia) at the end of the experimental period.

REFERENCES

1. Brenda, S.W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, Butler & Tanner, London, 1981.
2. Kay, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
3. Koikawa, Y., Uozumi, J., Ueda, T., Yasumasu, T., Kumazawa, J., *Prophylactic effect of methylprednisolone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*, "Toxicol. Lett.", **66**, 1993, 281-285.
4. Leeson, C. R., Leeson, T. S., Paparo, A. A., *Textbook of Histology*, W. B. Saunders, Philadelphia, 1985.
5. Mureșan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Baba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
6. Ohnuma, T., Arkin, H., Minowada, J., Holland, J. F., *Differential chemotherapeutic susceptibility of human T-lymphocytes and B-lymphocytes in cultures*, "J. Cancer", **60**, 1978, 749-752.
7. Ohta, N., Yotsuyanagy, T., Chen, D., Ono, R., Ito, S., Ikeda, K., *Disulfide bond cleavage of human serum albumin and alterations of its secondary structure by cis-diamminedichloroplatinum(II)*, "Int. J. Pharmaceutics", **85**, 1992, 39-44.
8. Olas, B., Wachowicz, B., *Cisplatin induces changes in biological activity of blood platelets: thiol-related mechanisms*, "Anti-Cancer Drugs", **7**, 1996, 476-482.
9. Ploaie, P. G., Petre, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. Rom., București, 1979.
10. Schwartz, R. H., *Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy*, "Cell", **71**, 1992, 1065 - 1068.
11. Sfikakis, P. P., Souliotis, V. L., Katsilambros, N., Markakis, K., Vaiopoulos, G., Tsokos, G. C., Panaiotidis, P., *Downregulation of interleukin-2 and α -chain interleukin-2 receptor biosynthesis by Cisplatin in human peripheral lymphocytes*, "Clin. Immunol. Immunopathol.", **79**, 1996, 43-49.
12. Taniguchi, T., Minami, Y., *The IL-2/IL-2 receptor system: A current overview*, "Cell", **73**, 1993, 5-8.
13. Yasumasu, T., Ueda, T., Uozumi, J., Mihara, Y., Kumazawa, J., *Comparative study of Cisplatin and Carboplatin on pharmacokinetics, nephrotoxicity and effect on renal nuclear DNA synthesis in rats*, "Pharmacol. Toxicol.", **70**, 1992, 143-147.
14. Yotsuyanagy, T., Ohta, N., Futo, T., Ito, S., Chen, D., Ikeda, K., *Binding and aggregation of human gamma-globulin by cis-diamminedichloroplatinum(II) through disulfide bond*, "Chem. Pharm. Bull.", **39**, 1991, 3003-3011.

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF THE RAT THYMUS AFTER ADMINISTRATION OF EPIRUBICIN

**CRISTINA PAȘCA*, CONSTANTIN CRĂCIUN*, ERIKA KIS*
and VICTORIA-DOINA SANDU***

SUMMARY. - Among the cytostatics which belong to the anthracycline family, Epirubicin is an antineoplastic agent frequently used in the treatment of many malignant diseases in humans. Its antitumoural activity is correlated with a severe toxicity upon hematopoietic structures. Therefore, our investigations intended to evaluate the structural and ultrastructural modifications induced by a single therapeutic dose of 60 mg Epirubicin/m² body surface in the thymus of white Wistar rats. By light and electron microscopy it could be observed that this dose of Epirubicin determines certain alterations. Histologically, a marked necrosis could be seen, accompanied by necrobiosis and agglutination of the thymocytes, especially in the cortical areas, which contributes to an atrophied or vestigial aspect of the thymic lobules. Besides, these cellular modifications appear to be correlated with moderate vascular disturbances: stasis, congestion and massive extravasation of the erythrocytes. The electron microscopy confirms the histological data and shows that both the epithelio-reticular cells and thymocytes (but especially the latter ones) are affected by some degenerative processes consisting of the appearance of a vacuolised cytoplasm, many modified nuclei (pycnotic, retracted and with a peculiar disposition of the chromatin), swollen and greatly altered mitochondria and, in some areas, the cell membrane is broken and the cell constituents are split out. In addition, both in cortex and medulla of the lobules there was a large number of apoptotic bodies. In the spaces which were created by the lysis processes and in some perivascular areas a massive collagen proliferation appeared. The involution and fibrosis of the thymus were correlated with a marked increase of the eosinophil, macrophage and mastocyte number. The toxic effect of the Epirubicin could be observed immediately after the treatment and then, it aggravated progressively, with a moderate recovery tendency at the end of the experimental period.

The cells, tissues and organs of the immune system are responsible for our protection from exogenous (or foreign) macromolecules that contact or enter the body as free substances or attached to the surface of invading viruses, microorganisms or cells. The immune system also has a surveillance function, watching constantly for the appearance of abnormal endogenous constituents of the body.

The bone marrow and thymus are identified as primary or central lymphoid organs. Lymphocytes undergo their initial differentiation into immunocompetent cells in these organs, and then migrate to secondary or peripheral areas of the body where the lymphatic tissue is found in diffuse, encapsulated or organ form. During fetal life, the thymus is populated by stem lymphocytes from the liver. When blood cell formation

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

moves from the liver to the bone marrow, the marrow becomes the source of stem lymphocytes. Within the thymus there is large-scale cell death, so that most of the newly formed lymphocytes die within a few days. Nevertheless, the thymus releases large numbers of lymphocytes that are carried by the blood to the peripheral lymphoid organs, where they colonise specific parts of these structures [7]. This explains the interest of many scientists in the effect of different toxic substances, and especially of the cytostatics, on this central lymphoid organ. Nowadays, in the treatment of many types of cancer an anthracycline antibiotic called Epirubicin is used. Its dose limiting effect is mainly myelotoxicity, particularly leukopenia, due to the antimitotic activity of this drug [1, 3-5, 8]. The mechanisms which determine this leukopenia are not completely elucidated. Therefore, our investigations intended to evaluate the structural and ultrastructural modifications induced by a single therapeutic dose of 60 mg Epirubicin/m² body surface on the thymus, in white Wistar rats.

Material and methods. Our experiments were carried out with the following five groups of healthy adult male Wistar rats, weighing 190 ± 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 E₁, E₂, E₃ and E₄ - treated i.v. with 60 mg Epirubicin / m² body surface and sacrificed 24 hours, 4, 11 and 18 days after the treatment.

The animals were not fed for 18 hours before the sacrifice. Having sacrificed the animals, we took fragments from the myocardium. For light 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 and Masson-Goldner trichrome methods [9]. 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 was performed in a TESLA-BS-500 electron microscope [2, 6, 10].

On the stained and contrasted sections we studied, by light and electron microscopic examinations, the histological and ultrastructural modifications induced by Epirubicin on the thymus and its structural components, in concordance with the moment of sacrifice and compared to the untreated group.

Results and discussion. According to the light and electron microscopy investigations carried out by us, the dose of 60 mg Epirubicin/m² body surface has a significant toxic effect on the thymus of white Wistar rats which consisted of the appearance of certain modifications immediately after the chemotherapy, modifications which aggravated progressively in the next ten days, and decreased at the end of the experiment.

Histological modifications already appeared 24 hours after the treatment, they consisting of a thymocyte depletion in the cortex of the thymic lobules correlated with some packing phenomena of the thymocytes. All these processes determined a less compact aspect of the thymic cortex and, at the same time, the cortex had a decreased dimension (Fig. 1). In addition, a discrete congestion and stasis could be seen all over the section surface.

THE RAT THYMUS AS AFFECTED BY EPIRUBICIN

Four days after the chemotherapy, the depletion of this area was more severe as a consequence of the drastic necrotic and necrobiotic phenomena, the lobules had a certain homogeneous tendency, the two areas of the thymic lobules could not be distinguished any more because of a drastic decrease of the lymphocyte number in the outer portion of most of the thymic lobules, and the lobules were smaller (Fig. 2). Besides, discrete haemorrhages appeared, they maintaining and aggravating the degenerative processes which affected the thymocytes and epithelio-reticular cells.

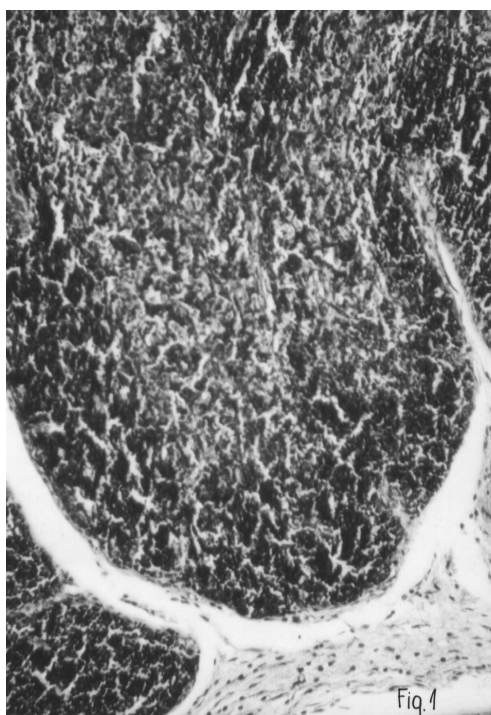


Fig. 1. Severe depletion and agglutination of the thymocytes in the cortex of the thymic lobules (x 512).



Fig. 2. Homogeneous tendency of the thymic lobules (x 201).

After 11 days from the treatment, a more marked toxic effect of Epirubicin on the thymus could be noticed, more exactly, besides an increased depletion of the cortex of the thymic lobules, a very significant congestion correlated with massive intralobular haemorrhages could be seen (Fig. 3). As a consequence of the thymocyte depletion, most of the thymic lobules were atrophied and, at the same time, a perilobular fibrosis tendency became obvious (Fig. 4).

At the end of the experiment, the toxicity of Epirubicin decreased, and a discrete recovery tendency of this central lymphatic organ was observed. Although the thymic lobules were still smaller than with the control group, the packing and lysis phenomena of the thymocytes decreased, and a small number of normal lymphocytes appeared all over the thymic lobule surface. The two areas of the thymic lobules

(cortex and medulla) could be distinguished, this histological aspect demonstrating that in this group the divisions in the cortical area were comparable with those in the control group, although the density of the thymocytes in the cortex was still low as compared to the untreated group. Besides, the congestion, stasis and haemorrhages were more discrete and had a zonal character.

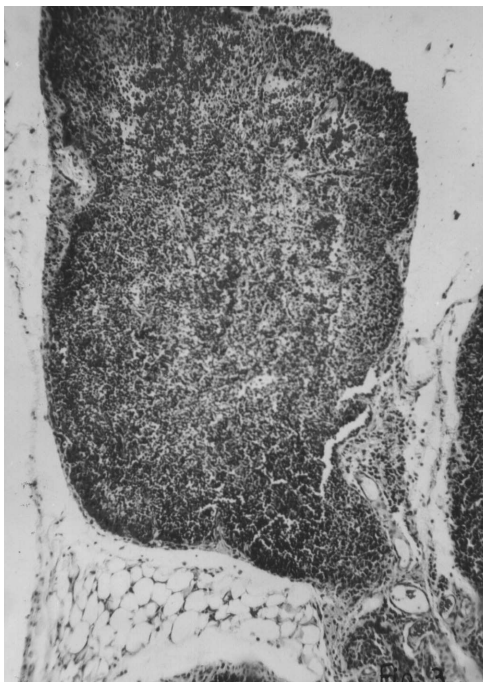


Fig. 3. *Intralobular haemorrhages in the thymus (x 201).*

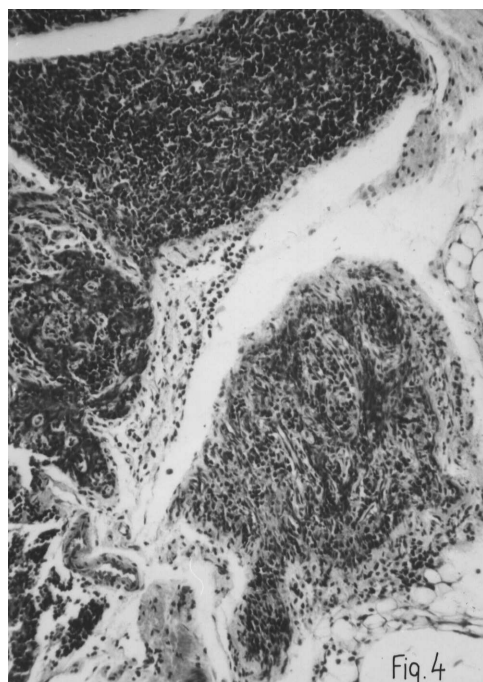


Fig. 4. *Atrophied thymic lobule having a vestigial aspect (x 320).*

The electron microscopy confirms the histological data mentioned above. Thus, both the vascular and cellular components of the thymus seemed to be seriously affected by this dose of Epirubicin. The vessels of the thymic lobules appeared to be affected both in the cortex and medulla, where we could see a severe congestion, stasis, a change of the vascular permeability which determined a massive extravasation of the erythrocytes after a few days from the drug administration. In addition, after 11 days from the treatment, some vessels seemed to have a thickened wall, as a consequence of a massive collagen proliferation.

The most affected by this drug seemed to be the thymic cells, especially the thymocytes in the cortex, but also in the medulla (Fig. 5). Thus, they appeared affected by some degenerative processes (necrosis and necrobiosis), consisting of the appearance of some modified nuclei, most of them being retracted or pycnotic, having a chromatin with a peculiar disposition and aspect (cortical hyperchromatosis). The cytoplasm of many thymocytes was vacuolised, the mitochondria appeared swollen and vacuolised and had a

THE RAT THYMUS AS AFFECTED BY EPIRUBICIN

rarefied matrix and cristae. In some areas of the lobules, a few thymocytes had a broken cell membrane, and the intracellular structures were split out between the remaining cells. In the spaces which were created by the drastic lysis processes, a massive collagen proliferation could be noticed, which demonstrates the obvious fibrosis tendency induced by this drug dose (Fig. 6). The involution of the thymus was correlated with a marked increase of the eosinophil and mastocyte number (Figs. 7 and 8). The necrotic and necrobiotic processes were correlated with certain apoptotic phenomena both in the cortex and medulla, where we could see a moderate number of apoptotic bodies. The degenerative processes seemed to affect a moderate number of epithelio-reticular cells, too (Fig. 9); these cells had a vacuolised cytoplasm and modified nuclei and cellular organelles. In the two areas of the thymic lobules, the number of macrophages was significantly increased, demonstrating a more intense phagocytic activity (Fig. 10). In addition, the Hassall corpuscles were rare, had small dimensions and a newly formed cell structure.

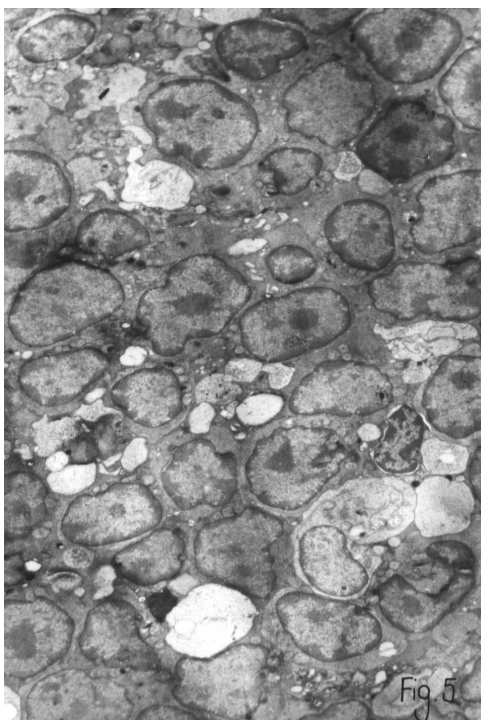


Fig. 5. *Thymocytes with nuclear modifications and vacuolisation of their cytoplasm, in the cortex of the thymic lobules (x 4370).*



Fig. 6. *Obvious fibrosis tendency of the thymus – massive collagen proliferation (x 7600).*

The results obtained by us contribute to the elucidation of the toxic effect of Epirubicin, administered in a therapeutic dose, on the thymus, which is an important lymphopoietic organ during fetal, early postnatal life, and adult organisms, if the individual has suffered depletion of the lymphoid organs by irradiation or chemotherapy.

Initially, we carried out just some histological investigations concerning the toxic effect exerted by three different doses of this drug (24.5, 44.5 and 89 mg/m² body surface) on the thymus and spleen. Those studies demonstrated that the appearance, gravity and dynamics of the lesions induced by this anticancer drug depended significantly on the dose, and the most affected lymphoid organ seemed to be the thymus. The structural and functional disturbances which appeared in thymus induced serious histological modifications in spleen, too. Therefore, we decided to complete the histological investigations of the thymus with some ultrastructural studies, which could contribute to a more complete understanding of the toxicity of this drug on the lymphoid organs.

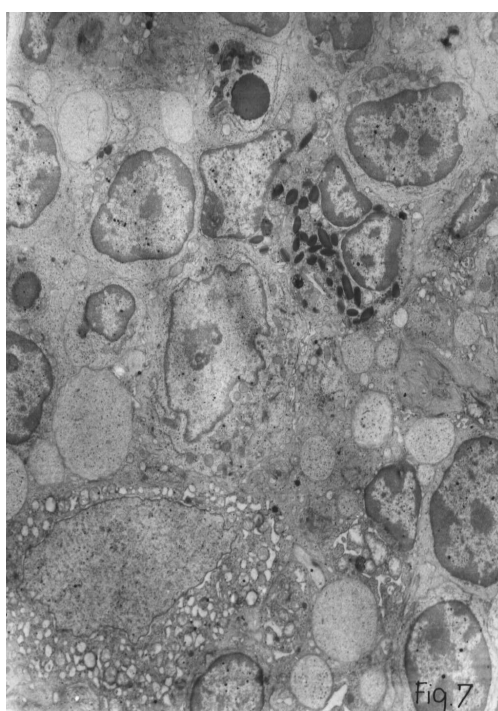


Fig. 7. *Intralobular eosinophilic infiltrate in the thymus (x 5320).*

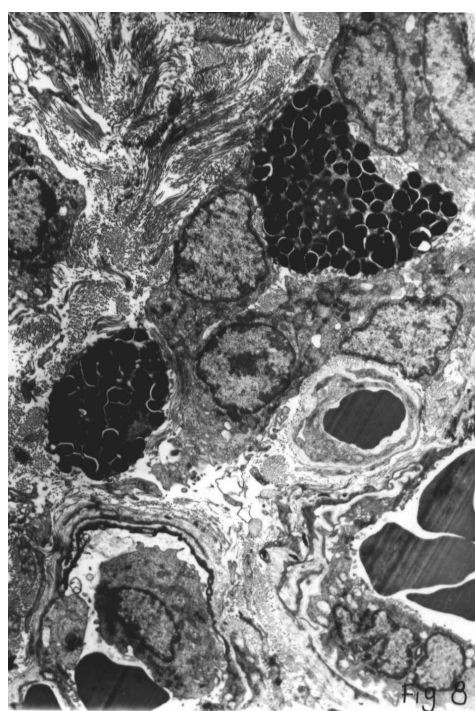


Fig. 8. *Mastocytes nearby the vessels in the thymus, vessels with thickened walls, and collagen proliferation (x 4940).*

Electron microscopy showed that Epirubicin, administered in this therapeutic dose exerts a significant toxic effect both on the vascular, and especially on the cellular component of the thymus. The circulatory disturbances correlated with serious perivascular and intralobular oedemas and haemorrhages leading to a severe swelling and disorganisation of the cell ultrastructure: (swelling and degeneration of the mitochondria, whose cristae appeared destroyed and whose matrix was rarefied, swelling of the nucleus, vacuolisation of the cytoplasm, and zonal breaking of the cell membrane). These modifications affected especially the thymocytes, but the epithelio-reticular cells

THE RAT THYMUS AS AFFECTED BY EPIRUBICIN

were also affected. They appeared immediately after the treatment, and aggravated progressively during the next 10 days, but they permitted a moderate recovery process at the end of the 18 days of the experiment.



Fig. 9. Mitochondrial modifications and vacuolisation of the cytoplasm of the epithelio-reticular cells in the thymus (x 7600).

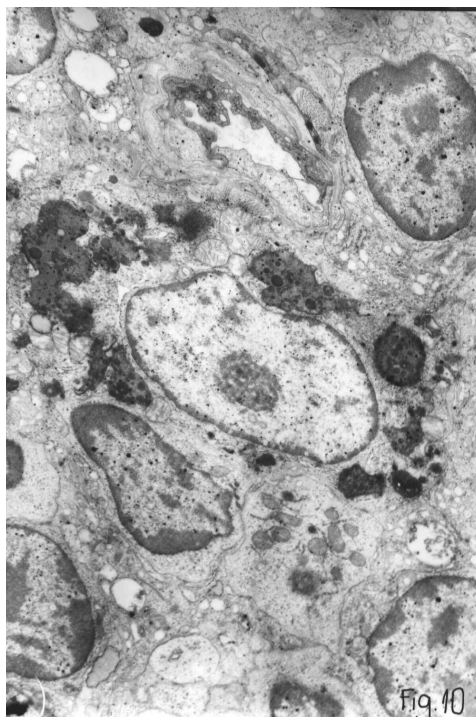


Fig. 10. Macrophage with an intense phagocytic activity in the thymus (x 7600).

The histological and ultrastructural aspects found by us are in concordance with the previous studies according to which Epirubicin exerts a serious myelotoxicity, particularly leukopenia, due to its antimetabolic activity [1, 3-5, 8]. Our researches demonstrated that the thymic depletion was a consequence of the antimetabolic effect of Epirubicin correlated with its necrotic, necrobiotic and apoptotic actions.

The lymphocytes released by the thymus are the T- lymphocytes, which participate in the cell-mediated immune response. The transformation of primitive or stem lymphocytes into T- lymphocytes is promoted by a thymic humoral factor called thymosin, which is produced by the epithelio-reticular cells. Nowadays, it is known that irradiation and most cytostatics, because of their toxic effect on the lymphoid organs, have an immunomodulatory effect, inhibiting the proliferation of peripheral lymphocytes [7]. But this effect is not completely elucidated. According to our ultrastructural investigations, this dose of Epirubicin exerts a significant toxic effect on the epithelio-reticular cells. That fact could contribute to the immunomodulatory action of this drug, because it is known that the thymus exerts a humoral effect upon other lymphoid tissues, particularly with regard to the stimulation of

lymphocyte production and development of immunological competence, owing to the thymosin, thymoprotein, thymic humoral factor and serum thymic factor which are synthesized by the epithelio-reticular cells [7].

Conclusions. 1. Leukopenia induced by Epirubicin is correlated with a significant toxic effect exerted by this cytostatic on the central lymphoid organ – thymus.

2. The dose of 60 mg Epirubicin/m² body surface had a drastic effect, on both the cellular and vascular components of the thymus, which appeared immediately, developed progressively, and permitted a discrete recovery processes at the end of the experiment.

3. Epirubicin induces significant degenerative processes of both the epithelio-reticular cells and thymocytes, but especially of the latter ones.

4. The drastic decrease of the thymocyte number seemed to be a consequence of the antimetabolic activity of Epirubicin, correlated with a marked necrotic, necrotic and apoptotic effect.

5. Sensitivity of the thymocytes depends on their age, the most affected being the lymphoblasts in the cortex of the thymic lobules.

6. Zonally, the involution of the thymus determined by this anticancer drug has an irreversible character, being correlated with an active collagen proliferation process.

7. The congestion, stasis, oedemas and haemorrhages maintain and aggravate the degenerative processes which affect the cellular component of the thymus.

REFERENCES

1. B a n d a k, S., C z e j k a, M., S c h u l l e r, J., S c h e r n h a m m e r, E., *Pharmacokinetic drug interaction between epirubicin and interferon-a-2b in serum and red blood cells*, "Drug Res.", **45** (2), 1995, 212-215.
2. B r e n d a, S.W., *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, Butler & Tanner, London, 1981.
3. D r a n i s s a r i s, G., T r a n, T. M., *Economic analyses of toxicity secondary to anthracycline-based breast cancer chemotherapy*, "Eur. J. Cancer", **31A** (13-14), 1995, 2174-2180.
4. G o l d w a s s e r, F., P i c o, J. L., C e r r i n a, J., F e r n a n d e z, H., P o n s, J. C., C o s s e r, J. M., H a y a t, M., *Successful chemotherapy including epirubicin in a pregnant non-hodgkin's lymphoma patient*, "Leukemia Lymphoma", **20**, 1995, 173-176.
5. I o n g, S., Z i j l s t r a, J. G., V r i e s, E. G., M u l d e r, N. H., *Reduced DNA topoisomerase II activity and drug-induced DNA cleavage activity in an adriamycin-resistant human small cell lung carcinoma cell line*, "Cancer Res.", **50**, 1990, 304-310.
6. K a y, D., *Techniques for Electron Microscopy*, Alden & Mowbray, Oxford, 1967.
7. L e e s o n, C. R., L e e s o n, T. S., P a p a r o, A. A., *Textbook of Histology*, W. B. Saunders, Philadelphia, 1985.
8. M a z u e, G., W i l l i a m s, G. M., I a t r o p o u l o s, M. J., N e w m a n, A. J., S a m a r t i n i, U., P u l c i, R., C a s t e l l i n o, S., S c a m p i n i, G., B r u g h e r a, M., I m o n d i, A. R., P o d e s t a, A., *Anthracyclines: Review of genotoxicity and carcinogenicity studies*, "Int. J. Oncol.", **8** (3), 1996, 525-536.
9. M u r e ș 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 și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
10. P l o a i e, P. G., P e t r e, Z., *Introducere în microscopia electronică cu aplicații în biologia celulară și moleculară*, Ed. Acad. Rom., București, 1979.

EFFECTUL ANTIGLUCOCORTICOID AL PROPRANOLOLULUI

**ERIKA KIS*, VICTORIA-DOINA SANDU*, CRISTINA PAȘCA*
și CONSTANTIN CRĂCIUN***

SUMMARY. – **The Antiglucocorticoid Effect of Propranolol.** Hormone secretion by the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis is modulated by multiple factors which include the circadian rhythm, various types of stresses and glucocorticoids. It is also well demonstrated that multiple stimulatory agents can independently affect the function of the HPA axis. These stimulatory agents include catecholamines (CA) which exert their effect through a highly specific β -adrenergic receptor, vasopressin and the peptidic corticotropin-releasing hormone (CRH). Clinical and experimental data clearly demonstrate that synthetic topical corticosteroids widely used in human dermatology, beside their excellent local actions, exert adverse secondary systemic side effects, due to their percutaneous absorption capacity. Therefore, it is advisable that the topical use of these steroids for long-term therapy be limited. It is also recommended to find the proper conditions for improving the benefit/risk ratio between their local and systemic adverse side actions. Literature data have been reported that the short-term epicutaneous application of some halogenated or nonhalogenated topical dermocorticosteroids in white Wistar rats exert steroid-diabetogen secondary side effects, manifested by hyperglycemia, hepatic and thymic glucose overproduction, elevated serum lipids. All these metabolic disorders were accompanied by pancreatic islet damage, thymolysis and alteration of HPA axis structure and ultrastructure. Some of these endocrino-metabolic disorders, according to our recent observations, are reducible by *in vivo* β -adrenoreceptor blockage with Propranolol. Starting from the above findings and from the important physiological roles of the glucocorticoids in young organisms, we investigated the HPA axis reactions in prepubertal rats, after a short-term epicutaneous treatment with Clobetasol-propionate-containing cream, applied alone or associated with Propranolol, the β -adrenoreceptor blocking agent.

Glucocorticoizii topici (dermocorticoizi) reprezintă principala armă terapeutică în arsenalul dermatologic datorită, în special, proprietăților lor antiinflamatoare și antiproliferative. Efectele topice benefice ale corticoizilor, aplicați epicutan în formă de unguent sau creme în diferite afecțiuni dermice sunt bine cunoscute, dar efectele secundare locale și sistemice de risc cauzate prin absorbția transcutană a acestora sunt mai puțin elucidate, ceea ce limitează utilizarea lor și constituie un argument pentru continuarea cercetărilor.

Într-un studiu mai amplu, M a d a r și colab. [28-31, 33-35] au urmărit comparativ efectele secundare sistemice de risc ale dermocorticoizilor Fluocinolone-acetonid N, Clobetazol-propionat, Hidrocortizon-17-butirat și au constatat că absorbția transcutană a acestora induce la șobolanul alb un exces glucocorticoidic cu manifestări tipice, caracteristice diabetului steroidic, manifestat prin hiperglicemie, insulinorezistență tisulară,

*Universitatea Babeș-Bolyai, Catedra de Zoologie, 3400 Cluj-Napoca, România.
E-mail: ekis@hasdeu.ubbcluj.ro

hiperproducție hepatică și timică de glucoză și prin creșterea cantității lipidelor serice și a colesterolului. Rezultatele cercetărilor experimentale ale unor cercetători [8-11] în acest domeniu arată că modificările metabolice menționate sunt asociate cu modificări ultrastructurale ale unor glande endocrine de importanță majoră (suprarenală, timus, pancreas). Excesul glucocorticoidic, provocat de aplicarea unor dermocorticoizi puternici (dermocorticoizi halogenați), determină atrofierea suprarenalei, asociată cu o timoliză marcantă, acțiune direct proporțională cu gradul de potență a preparatelor utilizate.

O complicație relativ frecventă a tratamentului glucocorticoidic o constituie reacțiile psihice manifestate prin tulburări afective de tip excitator, euforic, uneori apar stări confuzive, alteleori predomină notele depresive și negativiste. Există date care arată că excesul glucocorticoidic determină la om atrofierea hipocampului, fenomen observat și la bolnavii cu sindromul Cushing [46].

Modificările sistemice, prin absorbția percutană a glucocorticoizilor (folosiți în tratamentul unor dermatoze mai ales eczematoase), apar mai ales la copii, deoarece aceștia au tegumentul mult mai subțire. În asemenea cazuri s-a observat în timp atât o supresie a glandei corticosuprarenale, cât și o încetinire a creșterii. Aceste manifestări sunt mult mai frecvente în cazul utilizării glucocorticoizilor puternici, cum este de exemplu Clobetazol-propionat sau Fluocinolone-acetonid N, după aplicații pe suprafețe extinse (care depășesc 30 % din suprafața corporală) și pe perioade lungi de peste 7 zile. Efectele sistemice constau în alterarea funcționării axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian (HHC) și uneori în apariția sindromului Cushing [1].

Axul hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian împreună cu sistemul simpato-adrenal reprezintă sisteme de importanță deosebită în menținerea homeostaziei organismului sub acțiunea diferiților factori stresanți. Corticoliberina (CRH), sintetizată de nucleul paraventricular (NPV) din hipotalamus, are un rol determinant atât în răspunsul axului față de factorii de stres cât și în cel al sistemului nervos autonom. Secreția neurohormonului cât și a adrenocorticotropinei (ACTH) este influențată atât de mediatori chimici cât și de neuropeptide. Neuronii hipotalamici din nucleul paraventricular și supraoptic prezintă inervație adrenergică și noradrenergică bogată. Recent s-a demonstrat că aceste fibre nervoase sunt prelungiri ale neuronilor din locus coeruleus situat sub fosa romboidală a ventricolului IV. Ca urmare, atât neuronii hipotalamici cât și celulele hipofizare prezintă receptori β -adrenergici. Modificarea activității acestor receptori în condiții de stres determină modificarea activității secretorii a axului HHC. Datele experimentale arată că modificările endocrino-metabolice induse de dermocorticoizi se datorează în mare parte activării receptorilor β -adrenergici [29]. Administrarea de Propranolol reduce considerabil efectul negativ al glucocorticoizilor datorită faptului că este un agent β -blocant.

Pornind de la aceste considerente și de la faptul că modificările metabolice au la bază perturbarea echilibrului hormonal și, implicit, a activității axului HHC, acțiune ce interferează cu activitatea receptorilor β -adrenergici, ne-am propus urmărirea modificărilor histologice ale organelor ce compun acest ax la șobolanii prepuberi, supuși tratamentului epicutan cu Clobetazol-propionat pe fondul administrării subcutanate a Propranololului.

Material și metode. Experiențele au fost efectuate pe șobolani Wistar masculi de 30 zile (prepuberi) ținuți în condiții bioclimatice și de hrănire standardizate. Ei au fost tratați timp de trei zile, consecutiv, fie numai cu 50 mg Clobetazol-propionat/100 g g.c./zi, prin ungerea pielii în regiunea inguinală pe o suprafață de aproximativ 1,5 cm², fie în combinație cu 50 μg/100 g g.c./zi Propranolol, injectat subcutan.

Animalele de experiență au fost repartizate în următoarele loturi:

Lotul M - 8 animale prepubere netratate –martor;

Lotul D - 8 animale prepubere (30 zile) tratate cu Clobetazol-propionat;

Lotul P+D - 8 animale prepubere (30 zile) tratate cu Clobetazol-propionat pe fondul administrării de Propranolol.

Clobetazol-propionatul a fost utilizat sub formă de cremă Dermovate, produsă de “Glaxo-Operation“ UK Ltd., Anglia, doza zilnică de 50 mg cremă conținând 25 μg glucocorticoid topic (bihalogenat: monofluorurat monoclorurat) /100 g greutate corporală.

Propranololul a fost utilizat sub formă de soluție injectabilă, produs de “Sicomed“ S.A. București.

La 24 ore după sistarea tratamentului de mai sus și în urma unei inaniții de 16-18 ore, loturile tratate, precum și martorii corespunzători au fost sacrificate prin decapitare și exsanguinizare. Organele prelevate (creier, adenohipofiză și glandele suprarenale) au fost prelucrate în vederea efectuării studiilor histologice. Evidențierea nucleilor hipotalamici s-a efectuat cu ajutorul metodei de colorare Kluver-Barrera; colorarea suprarenalei s-a realizat cu hematoxină – eozină, iar a celulelor adenohipofizare cu metoda H u r d u c și colab., redată în [37].

Rezultate. Examenul histologic al hipotalamusului.

Activitatea glandelor endocrine și a organelor interne de importanță metabolică majoră este controlată de hipotalamus. În nucleii hipotalamici are loc biosinteza și eliberarea unor neuropeptide cu rol de a controla activitatea adenohipofizei, și prin aceasta, și activitatea altor glande (tiroidă, suprarenală, gonade). Aceste neuropeptide pot stimula activitatea secretoare a adenohipofizei prin factori de eliberare sau o pot inhiba prin inhibitoare. Astfel, în nucleii hipotalamici are loc biosinteza și eliberarea mai multor neuropeptide printre care și a factorului de eliberare a adrenocorticotropului. Trebuie să specificăm faptul că în preparatele histologice obținute, activitatea neurosecretorie relevantă reprezintă întreaga gamă de neuropeptide secretate la nivelul nucleilor hipotalamici.

Examinarea activității neurosecretorie a nucleilor hipotalamici la *lotul martor* a relevat un aspect normal al neuronilor din NPV (Fig.1), nucleul supraoptic (NSO, Fig. 2) și arcuat (NA, Fig. 3), aflați în diferite faze ale activității secretorii, granulele de neurosecreție fiind moderat răspândite în pericarionul neuronal, precum și de-a lungul prelungirilor neuronale.

La *lotul D*, neuronii parvocelulari din NPV apar ușor modificați, observându-se o încărcare moderată a pericarionului neuronal cu granule de secreție (Fig.4). Se mai remarcă hipertrofierea neuronilor magnocelulari atât din NPV cât și din NSO (Fig.5). Neuronii din NA sunt hipertrofiați, iar pericarionii lor sunt încărcăți cu granule de secreție (Fig.6).

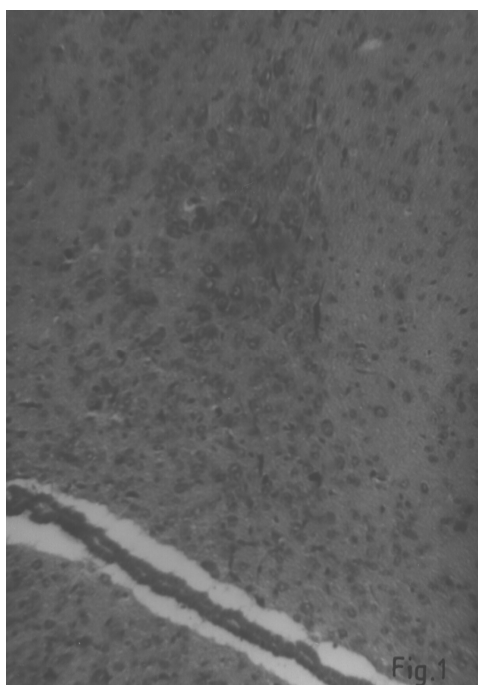


Fig. 1. Nucleul paraventricular la lotul M (x 60).

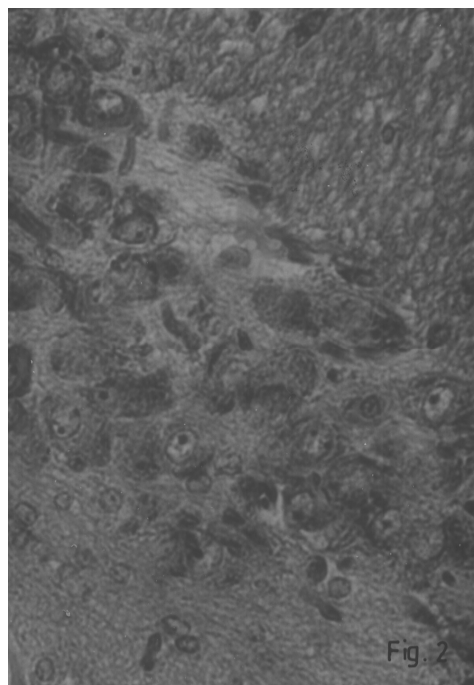


Fig. 2. Nucleul supraoptic la lotul M (x 200).

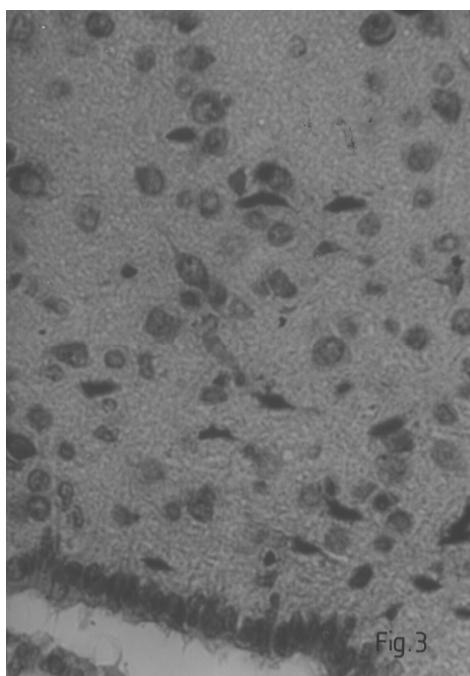


Fig. 3. Nucleul arcuat la lotul M (x 200).

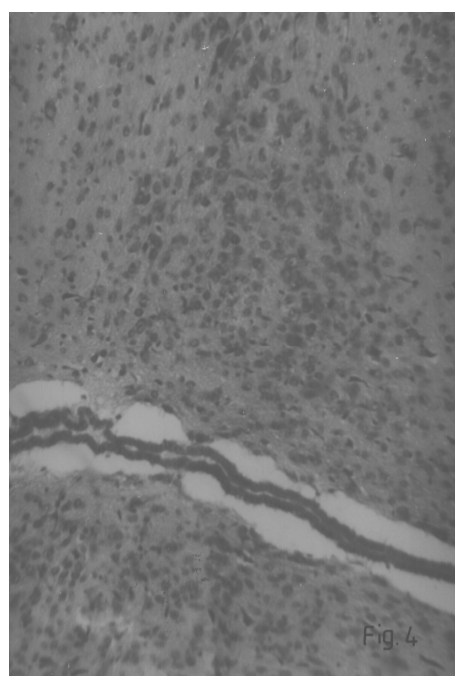


Fig. 4. Nucleul paraventricular la lotul D (x 60).

EFECTUL ANTIGLUCOCORTICOID AL PROPRANOLOLULUI

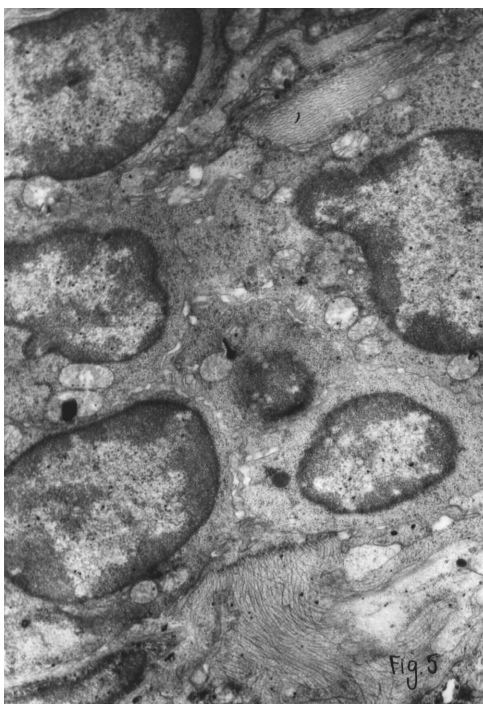


Fig. 5. Nucleul supraoptic la lotul D (x 200.)

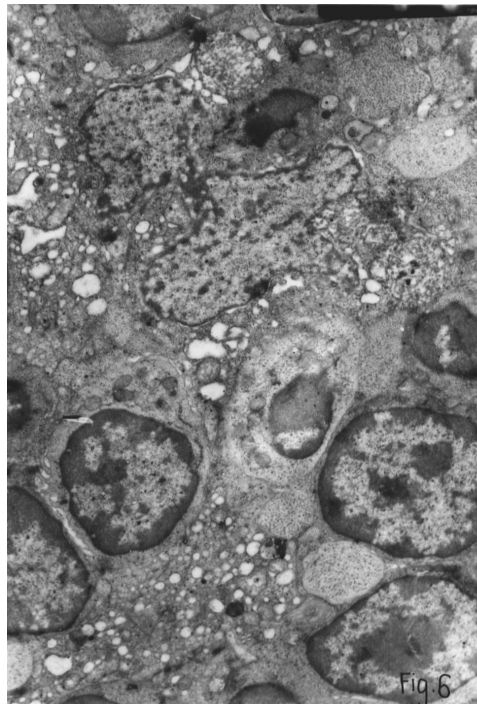


Fig. 6. Nucleul arcuat la lotul D (x 200).

La lotul *P+D*, modificările nucleilor hipotalamici sunt mult reduse față de lotul *D*. Neuronii din unitatea parvocelulară a NPV au un aspect apropiat de lotul *M*, conținând granule de secreție atât în pericarion cât și în fibrele nervoase (Fig.7). Neuronii secretori se află în diferite faze de secreție. Neuronii din unitatea magnocelulară a NPV, cei din NSO (Fig. 8) și NA (Fig. 9) par a fi sub inhibiție, fiind lipsiți de granule de secreție.

Examenul structural al adenohipofizei. Adenohipofiza la lotul *martor* (Fig. 10) prezintă aspectul citoarhitectonic normal caracteristic glandei, principalele tipuri celulare, respectiv celulele acidofile sunt colorate în diferite nuanțe de roșu- cărămiziu, celulele bazofile prezintă nuanțe de albastru sau albastru-violaceu, celulele gamma sunt de culoare albastru-azur, iar celulele cromofobe sunt incolore. La animalele normale există un raport specific, constant între celulele adenohipofizare, într-o anumită fază a dezvoltării ontogenetice sau în diferite faze ale activității diurne sau sezoniere.

Adenohipofiza la lotul *D* prezintă aspecte de hipertrofie și hiperplazie a celulelor bazofile, respectiv o creștere a bazofilismului glandular, ceea ce duce la modificarea raportului normal dintre celule, în favoarea celor bazofile (Fig. 11). Unele celule beta prezintă citoplasmele intens vacuolizate, cu un aspect spumos asemănător celulelor Crooke, care sunt prezente în condițiile expunerii organismului la diferiți factori de stres. Celulele acidofile prezintă, de asemenea, un aspect balonizat.

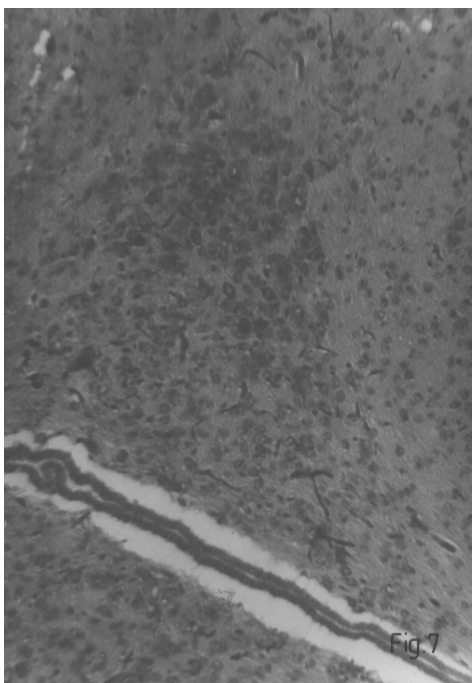


Fig. 7. Nucleul paraventricular la lotul P+D (x 60).

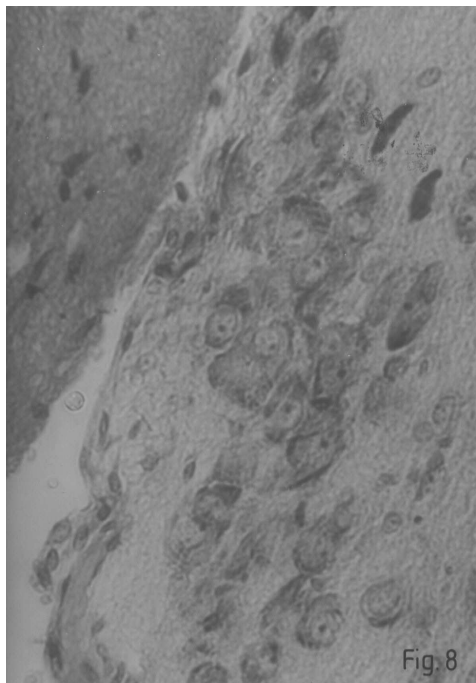


Fig. 8. Nucleul supraoptic la lotul P+D (x 200).

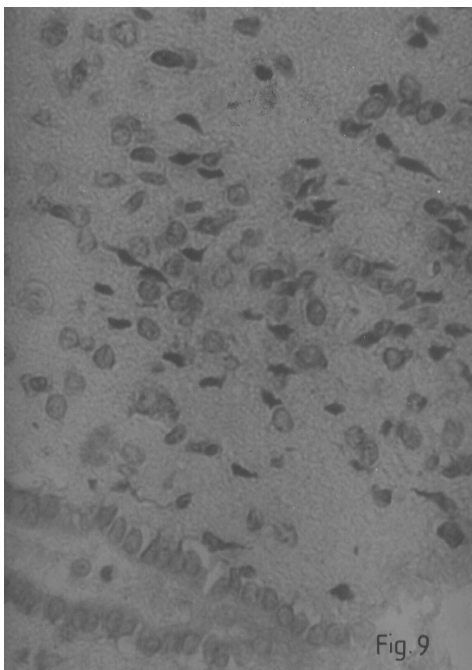


Fig. 9. Nucleul arcuat la lotul P+D (x 200).

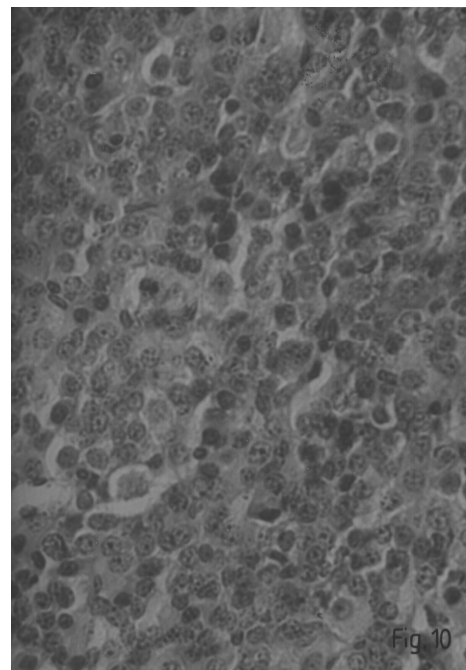


Fig. 10. Adenohipofiza la lotul M (x 200).

Adenohipofiza la *lotul P+D* prezintă un aspect apropiat de lotul martor. Au dispărut celulele balonizate, dar totuși se poate remarca predominanța celulelor bazofile (Fig.12).



Fig.11

Fig. 11. Adenohipofiza la lotul D (x 200).

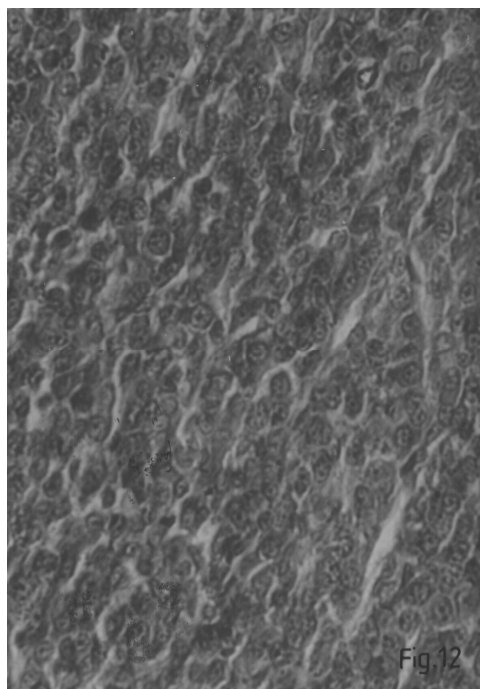


Fig.12

Fig. 12. Adenohipofiza la lotul P+ D (x 200).

Examenul structural al corticosuprarenalei. Corticosuprarenala la *lotul M* (Fig.13) prezintă aspectul normal, caracteristic glandei. Zona glomerulară, zona cea mai externă, este subțire și alcătuită din celule mici, rotunde, având nucleul sferic. Celulele acestei zone secretă mineralocorticoizi. Zona fasciculată continuă fără demarcație netă, zona glomerulară; prezintă un aspect lax cu spongiocite - celule vacuolizate - caracteristice suprarenalei. Celulele acestei zone secretă glucocorticoizi. Zona reticulată, zona profundă, situată între zona fasciculată și medulară, este mai puțin dezvoltată, prezintă celule mai mici decât celulele zonei fasciculate, și ea secretă sexosteroizi.

La *lotul D*, raportul dintre corticală și medulară este în favoarea medularei (Fig.14). Zona fasciculată este mai îngustă în comparație cu martorul, iar numărul spongiocitelor este mai redus. În medulară se observă hipertrofierea celulelor producătoare de catecolamine. Capilarele sanguine sunt puternic dilatate și încărcate cu produșii de secreție.

La *lotul P+D*, grosimea corticalei revine aproape la normal (Fig.15), numărul spongiocitelor este mai mare comparativ cu lotul D, dar este mai redus față de lotul M. Celulele din medulară nu sunt atât de compacte ca la lotul D, având activitate secretorie normală.

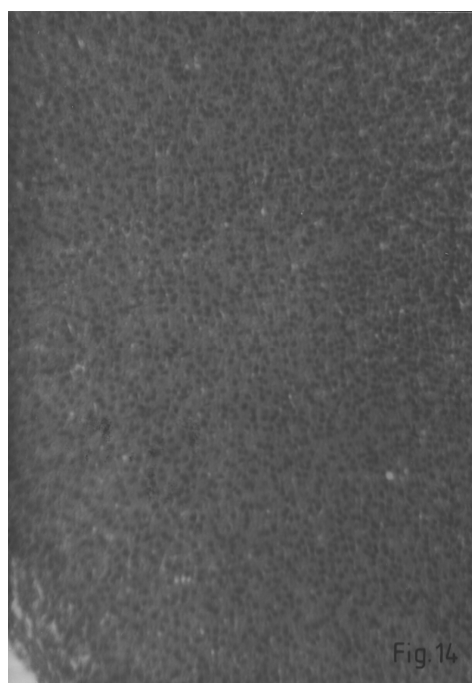
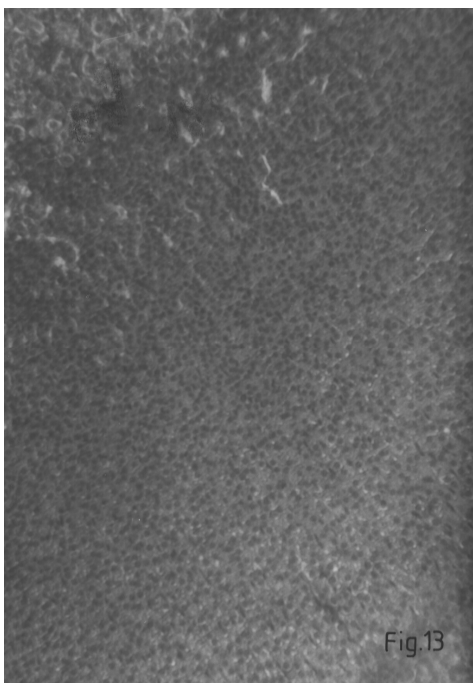


Fig. 13. Corticosuprarenala la lotul M (x 60). Fig. 14. Corticosuprarenala la lotul D (x 60).

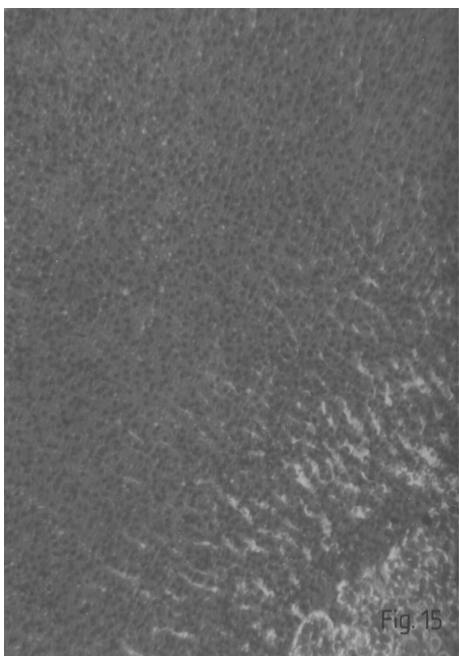


Fig. 15. Corticosuprarenala la lotul P+D (x 60).

Discuții. Datele din literatură [1, 16, 30-32, 34, 35, 45, 46], precum și rezultatele noastre au evidențiat faptul că excesul de glucocorticoizi, cauzat fie de tratamentele cu medicamente pe bază de glucocorticoizi fie de acțiunea diferiților factori de stres, induc modificări morfofiziologice ale axului HHC.

În condiții normale, principalii producători de CRH sunt neuronii parvocelulari ai NPV [19, 22, 38]. Neurosecreția ajunge în eminența mediană (EM) pe calea fibrelor paraventriculo-infundibulare, unde se descarcă în capilarele primare ale sistemului port hipotalamo-hipofizar, ajungând în final în adenohipofiză.

În condițiile experiențelor noastre, administrarea de Clobetazol-propionat în doza de 50 mg/100 g g.c./zi sub formă de cremă nu determină modificări intense la nivelul neuronilor

parvocelulari ai NPV. Mai mult se observă o ușoară activare a neuronilor magnocelulari din NPV și din NSO, producători, printre alte peptide, și de vasopresină, fapt reflectat de mărirea în volum a neuronilor secretori. Unii autori [2, 6, 17, 26, 44] presupun că vasopresina eliberată de NSO determină, pe de o parte, activarea neuronilor secretori de corticoliberină în mod paracrin, iar pe de altă parte poate acționa ca neuromodulator, influențând descărcarea neurohormonilor la nivelul EM.

Deși rezultatele noastre arată că activitatea secretorie a NPV sub acțiunea dermocorticoidului la doze de 50 mg/ 100 g g. c., din care substanța activă este 25 μg, nu este profund perturbată, în literatură se semnalează o inhibare a sintezei de corticoliberină sub acțiunea unor doze mult mai mari de glucocorticoizi. Astfel, M a k i n o și colab. [36] arată că excesul glucocorticoidic provocat prin administrarea de corticosteron în doze de 5 mg substanță activă/șobolan zilnic, timp de 14 zile, determină o scădere semnificativă a sintezei de corticoliberină din NPV, precum și din nucleii laterali ai nucleului amigdalian. De asemenea, ei arată că la o doză mai mare 10 mg substanță activă/șobolan timp de 7 zile, excesul glucocorticoidic determină o scădere semnificativă a sintezei ARNm al proteinelor receptoare pentru corticoliberină din celulele adenohipofizare.

Rezultatele noastre obținute la nivelul hipotalamusului sunt în concordanță cu cele înregistrate la nivelul adenohipofizei, unde celulele corticotrope prezintă modificări mai puțin intense comparativ cu alte celule hipofizare [24]. Celulele corticotrope au o activitate secretorie normală de ACTH, probabil datorită efectului stimulator al simpaticului.

S-a demonstrat experimental [22] prin lezarea NPV concomitent cu administrarea unor factori stresanți (alcool administrat intravenos) că secreția de ACTH nu este suprimată în totalitate. Această observație, ca și rezultatele noastre, sugerează ideea că regiunile extraparaventriculare ar putea declanșa secreția de ACTH prin intermediul vasopresinei, observație susținută de intensificarea neurosecreției în NSO, dar și în neuronii magnocelulari ai NPV.

Acest efect stimulator indus de glucocorticoizi la nivelul neuronilor magnocelulari din NPV și NSO, respectiv NA ar putea fi explicat prin intensificarea stimulării sistemului nervos simpatic. NPV, NSO și NA au inervație adrenergică bogată provenind din locus coeruleus [5, 47]. Excesul glucocorticoidic determină activarea simpaticului și, ca urmare, cresc descărcările de adrenalină, care determină intensificarea secreției în neuronii magnocelulari, fapt dovedit și de administrarea de Propranolol care este un agent β-blocant [7-9,11, 24, 25]. În ceea ce privește intensificarea activității secretorii a nucleului arcuat, noi încercăm să explicăm acest fenomen și prin intermediul intensificării secreției de somatostatina. Deși nu cunoaștem exact natura secreției din NA, datele din literatură arată că sub acțiunea excesului glucocorticoidic exogen, dar și endogen, crește nivelul somatostatinei din EM [15], precum și din nucleii arcuat, ventromedian, preoptic și suprachiasmatic ai hipotalamusului. Această explicație este în concordanță atât cu datele din literatură, dar și cu rezultatele noastre obținute la nivelul adenohipofizei în condițiile tratamentului cu Fluocinolone-acetonid N [23], unde apare clar că excesul glucocorticoidic determină modificări structurale și ultrastructurale la nivelul celulelor somatotrope, manifestate prin alterea profundă a structurii organelor celulare cu rol în sinteza hormonului de creștere, somatostatina fiind principalul inhibitor al secreției de STH.

S-a demonstrat experimental [42] că administrarea de cortizol la ovine Suffolk determină inhibiția sintezei hormonului de creștere, prin creșterea concentrației de somatostatina. Autorii respectivi consideră că somatostatina blochează secreția de STH fie direct, fie indirect prin intermediul blocării sintezei somatoliberinei hipotalamice.

Modificările structurale la nivelul adenohipofizei sunt evidente la lotul tratat cu dermocorticoid. Apar celule bazofile balonizate, vacuolizate, asemănătoare celulelor Crooke. Numărul celulelor acidofile s-a redus considerabil, iar cele prezente sunt balonizate. Deși în literatură [13, 39] se arată că excesul glucocorticoidic determină modificări ultrastructurale profunde ale celulelor corticotrope, manifestate prin vacuolizarea citoplasmei acestor celule, în condițiile experiențelor noastre aceste vacuolizări apar mai ales la celulele somatotrope și gonadotrope. Vacuolizarea citoplasmei, precum și scăderea numărului de granule de secreție sugerează inhibarea elaborării, dar și a eliberării produșilor de secreție din celulele somatotrope [23]. Inhibarea secreției de STH are consecințe grave asupra organismului (mai ales la organismul în curs de dezvoltare), deoarece determină o încetinire a creșterii, precum și scăderea greutateii corporale. Această observație este în concordanță cu datele din literatură [12, 16, 34, 42, 45, 46], conform cărora excesul glucocorticoidic provocat prin administrarea de glucocorticoizi (dermocorticoizi topici) determină o scădere a greutateii corporale. H u a n g [20], administrând 250 $\mu\text{g}/100 \text{ g.c.}$ Dexametazonă timp de 14 zile, a observat supresia totală a axului hipotalamo-hipofizo-corticosuprarenalian, manifestată prin blocarea sintezei de CRH, ACTH și glucocorticoizi, scăderea greutateii corporale, precum și a volumului corticosuprarenalei. D u p o u y și colab. [14], administrând Dexametazonă pe o perioadă de 6 zile la șobolani gestanți (în intervalul 15-21 zile de gestație), au observat o scădere a greutateii corporale la nou-născuți cu 66% față de martor, atrofierea corticosuprarenalei (cu 83%) concomitent cu scăderea nivelului de corticosteron (cu 74 % față de martor) și a concentrației plasmatice a ACTH (cu 93 % față de martor).

Cercetări ample [7-11] au arătat că excesul glucocorticoidic determină atrofierea timusului, splinei, pancreasului, suprarenalei, ceea ce poate fi explicat prin blocarea sintezei de STH. În condițiile administrării concomitente de Propranolol cu dermocorticoizi se observă o reducere marcantă a activității timolitice și adrenolitice a glucocorticoizilor, ceea ce sugerează că excesul glucocorticoidic acționează și prin intermediul receptorilor β -adrenergici.

Activitatea antisolmatotropă a dermocorticoizilor topici a fost determinată de unii cercetători și prin urmărirea dinamicii unor enzime cu rol în metabolismul proteic cum sunt glutamat-oxaloacetat (GOT) și glutamat-piruvat (GPT) transaminazele [7-9, 31, 34]. Acești parametri sunt indicatori extrem de sensibili ai excesului glucocorticoidic. Autorii semnaleză o creștere a activității acestor enzime, în dependență de vârsta șobolanilor. Excesul glucocorticoidic determină o mobilizare a proteinelor celulare, stimulând gluconeogeneza hepatică, dar și pe cea timică pe seama aminoacizilor glucoformatori eliberați din țesuturi, mecanisme care explică întârzierea procesului de creștere. Aceiași autori arată că sub acțiunea Propranololului scade semnificativ glicemia, precum și conținutul în glicogen al timusului, ceea ce arată că Propranololul blochează gluconeogeneza din aminoacizii glucoformatori.

Celulele corticotrope sunt mai puțin afectate de excesul glucocorticoidic. Această constatare ar putea fi explicată prin intervenția simpaticului care menține secreția de ACTH. Dar rezultatele noastre anterioare privind efectul unor dermocorticoizi asupra ultrastructurii celulelor adenohipofizare arată că, deși se secretă ACTH, eliberarea hormonului din hipofiză este blocată.

Pe baza experiențelor efectuate pe culturi de celule adrenocorticotrope, unii autori [39, 40] demonstrează că inhibiția glucocorticoidică are loc în două etape. Într-o primă etapă, glucocorticoizii inhibă eliberarea de ACTH fără a afecta sinteza, iar într-o a doua fază are loc blocarea sintezei hormonale. Glucocorticoizii acționează prin intermediul unor receptori intracelulari GR-II, care interacționează cu gena țintă, determinând eliberarea unei proteine GIP (GIP-glucocorticoid-induced protein). Autorii presupun că această proteină (natura căreia încă nu este precis stabilită, ar putea fi calmodulina) blochează activitatea PKA, respectiv PKC. De asemenea, ei sugerează că glucocorticoizii inhibă influxul de calciu prin canale de calciu voltaj-dependente fie direct, fie indirect, modificând potențialul de membrană prin activarea canalelor de potasiu. Proteinele GIP ar putea stimula efluxul de calciu (prin activarea ATP-azei) sau ar putea bloca eliberarea granulelor de secreție prin stabilizarea rețelei subplasmalemale a filamentelor de actină, împiedicând astfel fuzionarea granulelor de secreție de membrana celulară. În experiențele efectuate recent [27, 41, 43], autorii arată că sub acțiunea glucocorticoizilor are loc sinteza unei proteine cu rol în activarea canalelor de K (împiedicând inhibarea acestora de PKC) atât în prima, cât și în a doua fază a inhibiției glucocorticoidice.

În condițiile experimentului nostru, excesul glucocorticoidic acționează la nivelul hipofizei atât pe cale nervoasă prin stimularea simpaticului, cât și pe cale umorală, blocând eliberarea de hormoni. Tratamentul cu Propranolol anulează efectele adrenergice ale surplusului de glucocorticoid. Deși acțiunea excesului glucocorticoidic la nivelul hipofizei pare contradictorie, pe baza rezultatelor biochimice privind acțiunea excesului glucocorticoidic, putem afirma că acesta acționează asupra hipofizei și prin modificarea parametrilor metabolici. După cum se știe, efectul metabolic principal al glucocorticoizilor este creșterea glicemiei. Datele din literatură arată că hiperglicemia determină activarea neuronilor secretori de somatostatina.

Somatostatina acționează prin stimularea compartimentului inhibitor al adenilat-ciclazei, ceea ce determină inhibarea secreției de STH [3]. Reducerea grosimii zonei fasciculate a corticosuprarenalei în condițiile experiențelor noastre evidențiază, de asemenea, prezența unui exces glucocorticoidic de origine exogenă, care direct sau indirect printr-un mecanism feed-back negativ suprimă biosinteza glucocorticoizilor, fapt reflectat de absența picăturilor lipidice-hormonale. Aceste rezultate concordă cu datele din literatură [10, 20, 21, 34], conform cărora excesul glucocorticoidic determină atrofierea suprarenalei. Acest mod de acțiune a glucocorticoizilor poate fi explicat și prin inhibarea sintezei factorilor de creștere de către somatostatina, factori care în condiții normale determină intensificarea proliferării și diferențierii celulelor matcă din capsula conjunctivă a glandei. Tratamentul cu Propranolol determină, probabil, reducerea activării receptorilor β -adrenergici de la nivelul neuronilor secretori de somatostatina, ceea ce are ca rezultat activarea secreției factorilor de creștere, reducând atrofierea suprarenalelor.

Hristic și colab. [18] arată că atrofierea suprarenalei determinată de excesul glucocorticoidic provocat de administrarea de Dexametazonă la șobolani gestați, se datorează blocării mitozei celulelor progenitoare din capsula conjunctivă. Prin metode morfometrice ei au demonstrat că glucocorticoizii determină o reducere a numărului celulelor, precum și a volumului nuclear și explică această modificare ca fiind datorată absenței secreției de ACTH. Cu toate că în condițiile experiențelor noastre nu se observă o scădere bruscă a secreției de ACTH, totuși, pe baza rezultatelor de la nivelul suprarenalelor, precum și pe baza datelor din literatură, putem emite ipoteza că sub acțiunea Clobetazol-propionatului are loc blocarea eliberării de ACTH, factorul trofic principal al corticosuprarenalei, ceea ce are ca rezultat blocarea mitozei celulelor mame din capsula conjunctivă și, implicit, reducerea în grosime a zonei fasciculate.

În condițiile investigațiilor noastre, absența totală a picăturilor lipidice din celulele zonei fasciculate din corticosuprarenală sugerează, de asemenea, o eventuală blocare a eliberării de ACTH. Datorită acestui fapt nu are loc captarea colesterolului, mai mult este alterat echipamentul enzimatic răspunzător de sinteza steroizilor, ceea ce determină depleția totală de lipide. În absența sintezei hormonale crește concentrația colesterolului seric, fapt demonstrat și de alți cercetători [8, 9, 34]. Aceste observații concordă cu datele din literatură care arată că sub acțiunea Dexametazonei la cobai are loc o reducere a reticulului endoplasmic neted, al aparatului Golgi precum și a mitocondriilor din zona fasciculată a corticosuprarenalei [4] cu rol în elaborarea și eliberarea granulelor de secreție de natură lipidică.

Concluzii. 1. Excesul glucocorticoidic indus experimental determină modificări morfofiziologice ale axului HHC care interferează cu activarea receptorilor β -adrenergici.

2. Excesul glucocorticoidic la nivelul hipotalamusului acționează mai mult pe cale nervoasă, determinând activarea zonelor extraparaventriculare cu rol în stimularea secreției de CRH, respectiv de somatostatină.

3. La nivelul adenohipofizei, excesul glucocorticoidic blochează eliberarea secreției hormonale.

4. La nivelul corticosuprarenalei, excesul glucocorticoidic inhibă atât secreția hormonală cât și activitatea proliferativă.

5. Administrarea concomitentă a Propranololului cu Clobetazol-propionat reduce semnificativ modificările secundare ale axului HHC determinate de excesul glucocorticoidic.

6. Rezultatele noastre demonstrează efectul antiglucocorticoid al Propranololului.

REFERENCES

1. Alkaly, A. L., Klein, A. H., Nagel, R. A., Pomerance, J. J., *Evaluation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in premature infants treated with Dexamethasone*, "Am. J. Perinatol.", **13** (8), 1996, 473-477.
2. Antoni, F. A., Gink, G., Sheward, W. J., *Corticotropin-releasing peptides in rat hypophyseal portal blood after paraventricular lesions: a marked reduction in the concentration of corticotropin-releasing factor-41, but no change in vasopressin*, "J. Endocrinol.", **125**, 1993, 175-183.

3. Axelrod, J., *The relationship between the stress hormones, catecholamines, ACTH and glucocorticoids*, în Usdin, E., Kvetnansky, R., Axelrod, J. (Eds.), *Stress*, p. 3-13, Gordon Sci. Publ., New-York, 1984.
4. Black, V. H., Russo, J. J., *Stereological analysis of the guinea pig adrenal: effects of Dexamethasone and ACTH treatment with emphasis on the inner cortex*, "Am. J. Anat.", **159** (1), 1980, 85-120.
5. Bockstaele, E. J., Colago, E. E. O., Valentino, R.J., *Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: substrate for the co-ordination of emotional and cognitive limbs of the stress response*, "J. Neuroendocrinol.", **10**, 1998, 743-757.
6. Buma, P., Nieuwenhuys, R., *Ultrastructural characterization of exocytotic release sites in different layers of the median eminence of the rat*, "Cell Tissue Res.", **252**, 1988, 107-114.
7. Crăciun, C., Ardelean, A., Crăciun, V., Miclăuș, V., *Structural and ultrastructural modifications induced by simultaneous treatments with dermocorticoids and propranolol in the adrenal gland*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.225-245, Risoprint, Cluj-Napoca, 2000.
8. Crăciun, C., Frățila, S., Ardelean, A., Madar, I., Crăciun, V., *Ultrastructural and biochemical studies concerning the action of some topical dermocorticoids on prepubertal rat thymuses, before and simultaneously with the beta-adrenoreceptors blocking*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 209-248, Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
9. Crăciun, C., Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca, C., Puică, C., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the adrenal cortex structure and ultrastructure, in prepubertal rats treated with topical dermocorticosteroids*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p. 305-314, Risoprint, Cluj-Napoca, 1999.
10. Crăciun, C., Kis, E., Sandu, V.-D., Pașca, C., Puică, C., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the adrenal cortex structure and ultrastructure in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 91-98.
11. Crăciun, C., Miclăuș, V., Crăciun, V., *Histological and electron microscopic studies concerning the actions of some glucocorticoids upon the pancreas of prepubertal rats, before and concomitantly with the beta-adrenoreceptors blocking*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.194-224, Risoprint, Cluj-Napoca, 2000.
12. Dodic, M., Peers, A., Coghlan, J. P., Wintour, M., *Can excess glucocorticoid, in utero predispose to cardiovascular and metabolic disease in middle age?* "Trends Endocrinol. Metab.", **10** (3), 1999, 86-91.
13. Doniach, I., *Histopathology of the pituitary*, "Clin. Endocrinol. Metab.", **14** (4), 1985, 765-789.
14. Dupouy, J. P., Chatelain, A., Boudouresque, F., Conte-Devolx, B., Oliver, C., *Effects of chronic maternal Dexamethasone treatment on the hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat fetus*, "Biol. Neonate", **52** (4), 1987, 216-222.
15. Fife, S. K., Brogan, R. S., Giustina, A., Wehrenberg, W.B., *Immunocytochemical and molecular analysis of the effects of glucocorticoid treatment on the hypothalamic-somatotropic axis in the rat*, "Neuroendocrinology", **64** (2), 1996, 131-138.
16. Frank, L., Roberts, R. J., *Effects of low-dose prenatal corticosteroid administration on the premature rat*, "Biol. Neonate", **36** (1-2), 1979, 1-9.

17. Holmes, M. C., Antoni, F. A., Aquilera, G., Catt, K. J., *Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin*, "Nature", **319**, 1986, 326-329.
18. Hristic, M., Kalafatic, D., Plecas, B., Manojlovic, M., *The influence of prolonged Dexamethasone treatment of pregnant rats on the perinatal development of the adrenal gland of their offspring*, "J. Exp. Zool.", **279**, 1997, 54-61.
19. Hristic, M., Kalafatic, D., Plecas, B., Micic, Z., Manojlovic, M., *The paraventricular and supraoptic nuclei of fetal and neonatal offspring of rats treated with Dexamethasone during gestation*, "Acta Vet.", **47** (2-3), 1997, 95-106.
20. Huang, T. S., *Corticotropin secretagogues facilitate recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis suppressed by prolonged treatment with Dexamethasone*, "Metabolism", **43** (5), 1994, 544-548.
21. Huang, T. S., *Concomitant infusion of ovine corticotropin-releasing hormone does not prevent suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by Dexamethasone in male rats*, "J. Endocrinol. Invest.", **20** (7), 1997, 393-396.
22. Kathleen M. O., Lee, S., Rivier, C., *Role of arginine vasopressin and corticotropin-releasing factor in mediating alcohol-induced adrenocorticotropin and vasopressin secretion in male rats bearing lesions of the paraventricular nuclei*, "Brain Res.", **744**, 1997, 83-95.
23. Kis, E., Crăciun, C., Pașca, C., Sandu, V. - D., Crăciun, V., Madar, I., *Comparative studies of the ultrastructure of somatotrope, gonadotrope and corticotrope cells in mature rats treated with topical dermocorticosteroids*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **46** (1), 2001, 99-109.
24. Kis, E., Puică, C., Pașca, C., Sandu, V. D., Madar, I., *Attenuation of the Fluocinolone-acetonid N induced histological alteration of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by Propranolol in white Wistar rats*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai, Biol.", **44** (1-2), 1999, 127-134.
25. Kjær, A., Knigge, U., Bach, F. W., Warberg, J., *Stress-induced secretion of proopiomelanocortin-derived peptides in rats: relative importance of the anterior and intermediate pituitary lobes*, "Neuroendocrinology", **61** (2), 1995, 167-172.
26. Lengvári, I., Liposits, Zs., Vigh, S., Chally, V., Flerkó, B., *The origin and ultrastructural characteristics of corticotropin-releasing factor (CRF)-immunoreactive nerve fibers in the posterior pituitary of the rat*, "Cell Tissue Res.", **240**, 1985, 467-471.
27. Lim, M. C., Schipston, M. J., Antoni, F. A., *Depolarization counteracts glucocorticoid inhibition of adenohypophyseal corticotrop cells*, "J. Pharmacol.", **124** (8), 1998, 1735-1743.
28. Madar, I., Giurgea, R., Borda, D., Roman, I., Borșa, M., *Comparative data on the "in vivo" effects of Hydrocortison-17-butyrate and Clobetasol-propionate upon the thymus in prepubertal young rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.221-225, Risoprint, Cluj-Napoca, 1997.
29. Madar, I., Giurgea, R., Roman, I., Borda, D., *Age-related role of beta-adrenoreceptor activity during Clobetasol-induced thymolysis in male young rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, p.254-262, Risoprint, Cluj-Napoca, 1998.
30. Madar, I., Rusu, V. M., Șildan, N., Ilonca, A., *Attenuation of the stress-induced hyperglycemia, thymolysis, adrenal hypertrophy and liver adenylate- cyclase activity by Propranolol in immature and mature young rats*, "Rev. Roum. Biol., Biol. Anim.", **34** (1), 1989, 15-19.
31. Madar, I., Șildan, N., Borșa, M., Ilyes, I., *Effects of epicutaneous treatment with Fluocinolone unguent on glycemia, insulinemia and muscular sensitivity to insulin in various age-groups of Wistar rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.301-304, Mirton, Timișoara, 1996.

32. Madar, I., Șildan, N., Frecuș, G., *Age-related dynamics of diaphragmatic glucose uptake and liver glycogen content in young Wistar rats after formalin-induced stress and treatment with Phaseolus and Lupulus extracts*, "Rev. Roum. Biol., Biol. Anim.", **37** (2), 1992, 107-112.
33. Madar, I., Șildan, N., Ilyés, I., Crăciun, C., Frățilă, S., Găvan, N., Crăciun, A. R., *Age-related thymolytic and hyperglycemic effects of some percutaneously absorbed topical corticosteroids in rats*, în Crăciun, C., Ardelean, A. (Eds.), *Current Problems and Technique in Cellular and Molecular Biology*, p.305-310, Mirton, Timișoara, 1996.
34. Madar, I., Șildan, N., Maghiar, F., Crăciun, C., Ilyés, I., Borșa, M., Frecuș, G., Crăciun, A. R., *Modificări endocrinometabolice induse prin tratament topic cu Fluocinolone-acetonid N la șobolanii de vârste diferite*, "Rev. Med. Orădeană", **2** (2), 1995, 165-170.
35. Madar, I., Șildan, N., Tătaru A., *Effect of cutaneous treatment with Fluocinolone-acetonide N cream upon the muscular glucose uptake and insulin-sensitivity in young Wistar rats*, "Rev. Roum. Biol., Biol. Anim.", **38** (2), 1993, 147-150.
36. Makino, S., Schulkin, J., Smith, M. A., Pacák, K., Palkovits, M., Gold, P. W., *Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress*, "Endocrinology", **136** (10), 1995, 4517-4525.
37. Mureșan, E., Gaboreanu, M., Bogdan, A. T., Baba, A. I., *Tehnici de histologie normală și patologică*, Ed. Ceres, București, 1974.
38. Pacák, K., Palkovits, M., Kvetnansky, R., Matern, P., Hart, K., Kopin, I. J., Goldstein, S. D., *Catecholaminergic inhibition by hypercortisolemia in the paraventricular nucleus of conscious rats*, "Endocrinology", **136** (11), 1995, 4814-4819.
39. Saeger, W., *Effects of drugs on pituitary ultrastructure*, "J. Microsc. Res.Tech.", **20**, 1992, 162-176.
40. Shipston, M. J., *Mechanism(s) of early glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion from anterior pituitary corticotropes*, "Trends Endocrinol. Metab.", **6** (8), 1995, 261-266.
41. Shipston, M. J., Kelly, J. S., Antoni, F. A., *Glucocorticoids block protein kinase A inhibition of calcium-activated potassium channels*, "J. Biol. Chem.", **271** (16), 1996, 9197-9200.
42. Thompson, K., Coleman, E. S., Hudmon, A., Kemppainen, R. J., Soyoola, E. O., Sartin, J. L., *Effects of short-term cortisol infusion on growth hormone-releasing hormone stimulation of growth hormone release in sheep*, "Am. J. Vet. Res.", **56** (9), 1995, 1228-1231.
43. Tian, L., Philip, A.C., Shipston, M. J., *Glucocorticoid block of protein kinase C signalling in mouse pituitary corticotrop AtT20 D16:16 cells*, "J. Physiol.", **516** (3), 1999, 757-768.
44. Timothy G. D., *Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function*, "Life Sci.", **58** (20), 1996, 1683-1694.
45. Vallée, M., Mayo, W., Maccari, S., Moal, M., Hervé, S., *Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response*, "Brain Res.", **712**, 1996, 287-292.
46. Yehuda, R., *Stress and glucocorticoid*, "Science", **275**, 1997, 1662-1663.
47. Ziegler, D. R., Cass, W. A., Herman, J. P., *Excitatory influence of the locus coeruleus in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress*, "J. Neuroendocrinol.", **11**, 1999, 361-369.

CERCETĂRI PRIVIND PREPARAREA DE PLASMOLIZATE DIN CELULELE DROJDIEI DE BERE *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*

LETIȚIA OPREAN¹

SUMMARY. - **Researches Concerning the Preparation of Plasmolysates from Cells of the Beer Yeast *Saccharomyces carlsbergensis*.** Plasmolysates were prepared from cells of the beer yeast *S.carlsbergensis* by using sucrose and sodium chloride as plasmolytic agents in concentration of 15 and 25% relative to dry weight of yeast cells. In comparison with the supernatant on the sedimented nonplasmolysed yeast cells, the plasmolysates contain more total ash, total nitrogen, crude protein and fat and less carbohydrates. The most evident increase was registered in the crude protein content. The plasmolysates obtained are recommended as additives to some foodstuffs for improving their flavour as well as their amino acid and vitamin contents, whereas the sedimented plasmolysed yeast cells are considered useful as fodder additives.

Biomasa drojdiilor de bere, de panificație și de spirt reprezintă o materie primă pentru obținerea de extracte bogate în principii nutritive valoroase, mai ales în aminoacizi și vitamine. Compoziția chimică a extractelor de drojdie diferă în funcție de procedeul de obținere (plasmoliză, autoliză, termoliză, hidroliză, liză enzimatică), dar, în toate cazurile, în extracte se regăsesc în pondere majoritară substanțele cu azot. Plasmolizatele obținute din celulele vii de drojdie se caracterizează printr-o compoziție chimică favorabilă pentru a fi utilizate în alimentația umană, mai ales sub formă de extracte condimentare. Substanțele cu azot, în special aminoacizii din plasmolizate pot fi responsabili de aroma formată sau pot reprezenta "întăritori de aromă" și împreună cu vitaminele constituie componenții plasmolizatelor care contribuie atât la îmbunătățirea calității senzoriale a produselor alimentare în care se adaugă, cât și la ridicarea valorii nutriționale a acestora [1-4, 6].

În lucrarea de față descriem cercetări privind plasmoliza celulelor drojdiei de bere utilizând zaharoza și sarea de bucătărie drept agenți plasmolitici.

Materiale și metode. Am studiat drojdia de bere *Saccharomyces carlsbergensis*. Suspensia celulelor de drojdie a fost colectată în etapa de fermentație primară a mustului la o fabrică de bere din Sibiu. Suspensia s-a ținut în repaus pentru decantare, timp de 6 ore la 4⁰C. În acest timp, celulele de drojdie s-au depus, au format un sediment sub lichidul decantat (supernatant). Sedimentul de drojdie și, separat, supernatantul au fost analizate pentru determinarea următorilor parametri ai compoziției lor chimice: umiditatea, substanța uscată, cenușa totală, azotul total, proteina și grăsimea brută și glucidele. Pentru analize s-au aplicat metode standardizate [5, 7, 8].

¹ Universitatea "Lucian Blaga", Catedra de tehnologia produselor alimentare, 2400 Sibiu, România.
E-mail: oprean@jupiter.sibiu.ro

În vederea plasmolizei, sedimentul obținut prin decantarea celulelor de drojdie a fost resuspendat în apă, în proporție de 1 volum sediment la 1,5 volume de apă. Suspensia astfel obținută a fost tratată în 4 variante: cu zaharoză 15 și 25% și cu NaCl 15 și 25% față de substanța uscată a celulelor de drojdie din suspensie. Suspensia tratată cu agentul plasmolitic a fost omogenizată și incubată la 45°C timp de 6 ore, apoi supusă centrifugării timp de 10 minute la 5000 rpm. În continuare, fiecare supernatant a fost analizat pentru determinarea aceluiași parametri ai compoziției chimice care au fost specificați mai sus. Fiecare supernatant obținut în urma folosirii agenților plasmolitici reprezintă un plasmolizat. Supernatantul obținut din suspensia inițială, netratată cu agenți plasmolitici, a servit ca martor.

Rezultate. Rezultatele analizelor sunt trecute în Tabelul 1.

Tabel 1

Compoziția chimică a drojdiei neplasmolizate și a plasmolizatelor de drojdie *

Material analizat	Umiditate	Substanță uscată	Cenușă totală	Azot total	Proteină brută	Grăsimi brută	Glucide
Drojdie neplasmolizată							
- Sediment	89,61	10,36	9,51	7,13	44,62	3,14	42,73
- Supernatant	96,80	3,20	6,24	5,00	31,26	2,23	60,27
Plasmolizate cu zaharoză							
- 15 %	96,10	3,90	6,38	5,89	36,83	2,36	54,43
- 20 %	95,70	4,30	6,41	6,12	38,17	2,42	52,99
Plasmolizate cu NaCl							
- 15 %	96,30	3,70	6,49	6,06	37,93	2,85	52,73
- 20 %	95,80	4,20	7,40	6,54	41,34	2,89	48,37

* Umiditatea și substanța uscată se exprimă în g/100 g material umed, iar ceilalți parametri în g/100 g substanță uscată. Conținutul în proteină brută s-a calculat prin înmulțirea conținutului de azot total cu 6,25. Conținutul în glucide s-a estimat prin calcul de diferență. Fiecare valoare din tabel reprezintă media aritmetică a valorilor obținute în 3 serii de analize.

Datele tabelului arată că, în comparație cu supernatantul suspensiei de drojdie nesupusă plasmolizei, plasmolizatele au conținuturi mai ridicate în toți parametrii compoziției chimice, exceptând conținutul în glucide. Cea mai evidentă creștere s-a produs în cantitatea proteinei brute.

Agenții plasmolitici au fost mai efectivi în concentrație de 25% decât în cea de 15%. La aceeași concentrație de agent plasmolitic, sarea de bucătărie a avut un efect mai puternic decât zaharoza.

Plasmolizatele ca atare și plasmolizatele deshidratate, prin uscare la 40-60°C în etuvă cu ventilație, se recomandă ca adaosuri la unele alimente, cărora le conferă un gust plăcut, asemănător cu cel al ciupercilor, pe lângă îmbunătățirea calității lor nutriționale cu aminoacizi și vitamine. La rândul lor, sedimentele plasmolizatelor, uscate ca și plasmolizatele, sunt recomandate ca adaosuri la furaje.

Concluzii. 1. S-au preparat plasmolizate din celulele drojdiei de bere *Saccharomyces carlsbergensis* prin folosirea zaharozei și a clorurii de sodiu ca agenți plasmolitici în concentrații de 15 și 25% față de greutatea uscată a celulelor de drojdie.

2. În comparație cu supernatantul suspensiei celulelor de drojdie nesupusă plasmolizei, plasmolizatele conțin mai multă cenușă totală, azot total, proteină și grăsime brută și mai puține glucide.

3. Plasmolizatele obținute sunt recomandate ca adaosuri la unele alimente, iar sedimentele plasmolizatelor sunt considerate utile ca adaosuri la furaje.

BIBLIOGRAFIE

1. Bergander, J. P., *Biochimie und Technologie der Hefen*, p. 24-36, Springer, Dresden, 1979.
2. Cojocaru, C., *Valorificarea deșeurilor din industria alimentară*, p. 65-89, Ed. Tehn., București, 1985.
3. Cotea, V., *Tratat de oenologie, Vol. I*, p. 26-34, Ed. Ceres, București, 1985.
4. Guiraud, J. P., *Microbiologie alimentaire*, p. 132-154, Dunod, Paris, 1998.
5. Oprean, L., *Analiza biologică și microbiologică a produselor alimentare*, p. 27-29, Univ. Lucian Blaga, Sibiu, 1995.
6. Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., *Traité d'oenologie: Maturation du raisin. Fermentation alcoolique. Vinification, Vol. I*, p. 36-42, Dunod, Paris, 1969.
7. Stoicescu, A., Hopulele, I., *Îndrumar de laborator pentru industria alimentară*, p. 55-58, Univ. Dunărea de jos, Galați, 1982.
8. Segal, B., Segal, R., Teodorescu, V., *Caiet de lucrări practice pentru biochimie și bazele alimentației*, p. 33-35, 47-50, 85-87, Univ. Dunărea de jos, Galați, 1990.

RECENZII - BOOK REVIEWS

Carlos García and Teresa Hernández (Editors), **Investigación y Perspectivas de la Enzimología de Suelos en España. Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain**, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid and Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Murcia, 2000, 352 pages with 47 figures and 17 tables in the text.

This volume consists of Preface written by the distinguished Italian soil enzymologist, Professor Paolo Nannipieri and five chapters elaborated by 22 scientists working in research institutes in Moncada (Valencia), Murcia, Santiago de Compostela, Barcelona and Madrid. Each chapter was published in both Spanish and English with identical content; only the bibliographical list is common for the Spanish and English versions.

First, we present the authors and titles of the chapters:

Chapter I - R. Canet, R. Albiach and F. Pomares: Indexes of biological activity as tools for diagnosing soil fertility in organic farming;

Chapter II - C. García, T. Hernández, J.A. Pascual, J.L. Moreno and M. Ros: Microbial activity in soils of SE Spain exposed to degradation and desertification processes. Strategies for their rehabilitation;

Chapter III - C. Trasar-Cepeda, M.C. Leirós de la Peña, F. García-Fernández and F. Gil-Sotres: Biochemical properties of the soils of Galicia (NW Spain): their use as indicators of soil quality;

Chapter IV - M. Bonmatí, P. Jiménez, H. Álvarez, E. Calero, M. Julià, M. Morillo and E. Nuñez: Changes in enzyme activities during the reclamation of two soils from limestone quarries in Catalonia using high doses of sewage sludge; and

Chapter V - M.C. Lobo, I. Sastre and M.A. Vicente: Enzyme as a measurement of environmental impact on soils.

It is evident even from the chapter titles that the investigations described in this volume are related to major problems of agriculture, including soil degradation, pollution and rehabilitation. The results obtained constitute - as Professor Paolo Nannipieri also emphasises - valuable, original contributions of Spanish scientists to the advancement of soil enzymology. These results enriched soil enzymology with newer evidence proving the indicator role of enzyme activities and other biochemical parameters for evaluation of quality, fertility and health status of soils.

ŞTEFAN KISS

R. G. Burns (Editor), **International Conference on Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications**, Special Issue: No. 13, Vol. 32 of Soil Biology and Biochemistry, Pergamon, Oxford - Elsevier Science Ltd., Amsterdam, 2000, 174 pages (pp. 1815-1988) with 77 figures and 72 tables in the text.

The International Conference on Enzymes in the Environment was held in Granada, Spain, on 12-15 July, 1999, and comprised 10 symposia.

The volume containing the abstracts of the inaugural and closing lectures, of 36 oral and 150 poster presentations was edited by Professor R. P. Dick (Department of Crop and Soil Science, Oregon State University, Corvallis, OR, USA) in 1999. A review on this volume was published in *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Biologia* (2000, Vol.45, No.1, p. 143).

The Special Issue edited by Professor R. G. Burns (Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury, Kent, UK) contains a selection of the papers presented at the Granada Conference. The selection, which was due to

RECENZII

space limitation, made it necessary to reduce the number of the oral + poster papers published as abstracts to a smaller number of papers to be published as full texts. The reduction had the following extent for the papers of the ten symposia: I. Enzymes in soil systems (from 27 to 3); II. Limnic systems (from 18 to 2); III. Plants and soil enzymes (from 17 to 2); IV. Enzymes in solid/liquid phase (from 10 to 3); V. Nutrient cycling and organic matter decomposition (from 33 to 4); VI. Enzymic methodologies (from 15 to 1); VII. Bioremediation and extracellular enzymes (from 25 to 1); VIII. Bioremediation - genetically designed organisms and enzymes (from 4 to 0); IX.

Marine ecosystems (from 8 to 1); and X. Enzymes as environmental sensors (from 29 to 3).

Even these twenty papers published as full texts reflect - as Professor R.G. Burns emphasises - the current explosion of interest in enzymes as key components of process diversity in natural terrestrial and aquatic ecosystems. It should be added that this interest is also manifest, even to a larger extent, for the man-made ecosystems, including the anthropogenically disturbed soils.

STEFAN KISS

André – Michael Beer, Gerd Lüttig & Julian Lukanov (Herausgeber – Editors), **Moortherapie 2000. Peat Therapy on Its Way into the Next Millennium**, Balneologisches Institut, Bad Kissingen, Germany, 2000, 280 pages with 48 tables, 56 figures and 5 plates (25 photos) in the text.

This volume contains 27 papers (17 in English and 10 in German) elaborated by 47 authors from 10 countries (Belorussia, Bulgaria, Canada, Denmark, Germany, Greece, Hungary, Poland, Romania, Ukraine) and presented at the International Symposium on Peat Therapy, held in Bad Kissingen on 21-24 October 1999.

In the introductory lecture, "Peat therapy on its way into the next millennium", G. Lüttig reviews the past and the present and outlines the future (perspectives) of peat therapy. The other papers, which can be grouped under four headings, are specified below.

I. Papers on geology and botany, physical, chemical and biochemical properties and biological effects of peats: Type and composition of peat as basis of all therapeutic effects (G. Lüttig); Review on attempts for structural elucidation of humic substances-biological activity (M. Hübner); Metal distribution and binding in typical balneological peats and their extracts: a preliminary study (P. Burba *et al.*);

Enzymatic potential of some interstadial peats utilizable in balneotherapy (D. Paşca and S. Kiss); The influence of fulvic and ulmic acids, isolated from peat on the spontaneous contractile activity of smooth muscles (A.-M. Beer *et al.*); The effect of aqueous peat extract on the spontaneous contractile activity of smooth muscles (A.-M. Beer *et al.*); Thymomimetic effects of a peat-based preparation (PBP) given to hydrocortisone-suppressed mice (B. Obminska-Domoradzka); Influence of Pyridoxofot preparation on retina resistance to the damaging action of X-ray radiation (E.P. Sotnikova *et al.*).

II. Papers directly related to human medicine: Immunotropic activity of peat preparation Tolpa (PPT) (M.P. Dabrowski *et al.*); Peat therapy of rheumatic-degenerative diseases (S. Fetaj); Therapeutic effects of peat extract PPT in patients with prolonged viral B hepatitis – clinical and immunological assessment (M. Jablkowski *et al.*); Changes of the microcirculatory system in osteoarthritis with the help of peloid therapy (D. Krasteva and S. Petrova); Application of TPP (Tolpa peat preparation) in stomatological practice (Z. Janczuk); Immunological and clinical results of peat extract PPT application for the treatment of chronic sinusitis (W. Stankiewicz *et al.*); New peat preparations worked out according to V.P.

RECENZII

Filatov's method as hepatoprotectors (T.D. Lotosh *et al.*); Peat therapy in gynecology – experiences in Bohemia and Germany (R. Kovarik); Contribution of curative peat therapy to human health in Greece (V. Nastos and M. Garagounis); Therapeutic mud as raw material for obtaining medical and cosmetic products (P.A. Puntus and A.P. Puntus).

III. Papers directly related to veterinary medicine and animal breeding: Application possibilities of peat and humic acids in veterinary practice (J. Csicsor and A. Tóth); Experience with preparations of natural humic substances in veterinary medicine (V.G. Gryban *et al.*); Experimental research of the new peat enterosorbent – EST-1 (O. Panina); Impact of peat preparations on the reduction of post-vaccinal complications in chickens (L.M. Stepchenko and Y.T. Tikhonov); Use of humic acids in the veterinary medical therapy, prophylaxis as well

as dietetics (M. Kühnert and H. Knauf); Increase of productivity of farm animals with the help of oxidate, a peat humic preparation (O. Panina and T. Zilyakova).

IV. Papers on economic factors and marketing management in balneology: Economic factors in use of balneological peat in therapy (R. Forcher); Balneology from the viewpoint of a health resort director (S. von Dobschütz).

Moortherapie 2000 is a very valuable source of information not only for the specialists in peat therapy, but also for all experts dealing with the geological, physical, chemical and biological study, rational utilisation and protection of peatlands.

DANIELA PAȘCA and STEFAN KISS

G.A. Evdokimova & N.P. Mozgova, **Mikroorganizmy tundrovykh i lesnykh podzolov Kol'skogo Severa** (*Microorganisms of Tundra and Forest Podzols of the Kola North*), Institut problem promyshlennoi ekologii Severa, Kol'skii Nauchnyi Tsentr, Rossiiskaya Akademiya Nauk (Institute of Industrial Ecology Problems of the North, Kola Scientific Centre, Russian Academy of Sciences), Apatity, 2001, 184 pages including 91 tables and 16 figures.

The book is dedicated to synthetic description of soil investigations performed during many years in the tundra, forest-tundra and north-taiga zones of the Kola Peninsula. A great number of soil profiles and samples were studied in the three zones, namely 45, 21 and 62 profiles, and 184, 56 and 171 samples, respectively. The profiles are located on Russian territories, with the exception of 10 profiles located on the north-taiga zone in Norway. In

the area of all profiles botanical studies were also conducted. The soil samples were submitted to complex microbiological, enzymological and chemical analyses.

The results obtained made it possible to elaborate a unique soil microbiological map of the Kola Peninsula. The map is based on the so-called biogenity index, calculated from the bacterial and fungal biomass, organic carbon and nitrogen contents in soil. The authors consider that the natural fertility and self-purification ability of the soils can be characterised by this index.

This excellently written and illustrated book is a valuable source of information for students and experts in soil science, ecology and biogeography.

STEFAN KISS