

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 4



STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI BIOLOGIA

2

EDITORIAL OFFICE: Republicii no. 24, 400015 Cluj-Napoca, Romania. Phone: 0264-40.53.52

SUMAR – CONTENTS – SOMMAIRE – INHALT

- P.-V. BELDEAN, Suprafamilia *Pentatomoidea* (*Insecta, Heteroptera*) în împrejurimile localității Buru (Jud. Cluj, România) * The Suprafamily *Pentatomoidea* (*Insecta, Heteroptera*) in the Environs of Buru Locality (Cluj County, Romania) 3
- P.-V. BELDEAN, Suprafamilia *Pentatomoidea* (*Insecta, Heteroptera*) în zona rezervației Cheile Runcului (Jud. Alba, România) * The Suprafamily *Pentatomoidea* (*Insecta, Heteroptera*) in Cheile Runcului Nature Reserve (Alba County, Romania) ... 11
- E. SEVIANU, I. COROIU, Small Mammals of the Central Transilvanian Plain: Species Composition, Diversity and Abundance..... 19
- K. BARTÓK , F. CRIȘAN, Studiul genului *Opegrapha* Ach. în România * Study of the Genus *Opegrapha* Ach. in Romania 33
- V. BERCEA, A. NICOARĂ, N. DRAGOȘ, Studiul pigmentilor ciclului xantofilic la alga verde *Scenedesmus opoliensis* P. Richter în condiții de fotoinhibiție indusă prin intensități mari ale luminii * The Study of Xanthophyll Cycle Pigments in *Scenedesmus Opoliensis* P. Richter Green Alga under Conditions of Photoinhibition Induced by Higher Light Intensities 49
- V. BERCEA, A. NICOARĂ, N. DRAGOȘ, Efectele intensității luminii și a duratei de expunere asupra manifestării fotoinhibiției în alga verde *Chlorella fusca* Shihira et Krauss * The Effects of Light Intensity and of the Duration of Exposure on the Manifestation of Photoinhibition in *Chlorella Fusca* Shihira et Krauss Green Alga..... 61

A. BUTIUC-KEUL, L. FODORPATAKI, C. DELIU, Organizarea membranelor tilacoidale și funcționarea lor sub influența stresului fotic * Thylakoid Membranes Organization and Functioning under High Light Stress	73
L. FODORPATAKI, C. BARTHA, Salt Stress Tolerance of a Freshwater Green Alga under Different Photon Flux Densities	85
M.-A. RUSU, Chemical Hepatectomy and the "Hepatic Fracture Lines"	95
A. FLOREA, C. CRĂCIUN, Melitina, componenta majoră a veninului de albine și principalul compus activ al acestuia * Mellitin, the Major Component of the Honey Bee Venom and its Main Active Compound	105
C. PUICĂ, A.M. BASHA, C. CRĂCIUN, Aspecte ultrastructurale adenohipofizare privind efectul protector al unor compuși antioxidanți în neurotoxicoza indusă de L-glutamatul monosodic la șobolanii albi juvenili * Ultrastructural Pituitary Aspects Regarding the Protective Effect of Some Antioxidant Compounds Against L-Monosodium Glutamate Induced Neurotoxicosis in White Juvenile Rats	117
A. MÎNDRUȚ, M. DRĂGAN-BULARDA, Microbiota nămolurilor activ și fermentat de la Stația de tratare a apei uzate Bistrița (Jud. Bistrița-Năsăud) * Microbiota of Activated and Digested Sludge from the Bistrița Wastewater Treatment Plant (Bistrița-Năsăud County).....	133

IN MEMORIAM

Prof.dr. Béla Kis (1924-2003) (L. RAKOSY)	139
Prof.dr. Kiss Ștefan (1926-2004) (M.DRĂGAN-BULARDA).....	141

RECENZII - BOOK REVIEWS - COMPTES RENDUS - BUCHBESPRECHUNGEN

Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, FAL, Braunschweig, Methoden zur quantitativen Bestimmung und Charakterisierung der mikrobiellen Biomasse im Boden. Zusammengestellt von R. Martens (STEFAN KISS)	145
Katalin Bartók, A növénykórtan alapjai (STEFAN KISS)	146

SUPRAFAMILIA *PENTATOMOIDEA* (INSECTA, HETEROPTERA) ÎN ÎMPREJURIMILE LOCALITĂȚII BURU (JUD. CLUJ, ROMÂNIA)

PAUL-VASILE BELDEAN*

SUMMARY. – The suprafamily *Pentatomoidea* (Insecta, Heteroptera) in the environs of Buru locality (Cluj county, Romania). In the studied area, the biological material was collected from 5 ecosystems: mixed forest, hay field with medium humidity, hay field with high humidity, riverside coppice and roadside vegetation. There were collected at least 9 samples of each collecting points. We revealed a number of 189 *Pentatomoidea*, belonging to 22 species, 15 genera and three family. The majority of the species (19) and individuals (147) belongs to the family *Pentatomidae*. Most of the species (15) live in the hay field with medium humidity and less of the species (5) live in the riverside coppice. The highest values of the relative abundance were shown by *Dolycoris baccarum* in the mixed forest, *Eurygaster maura* in the riverside coppice, and *Eurydema oleraceum* in the hay field with medium humidity, the hay field with high humidity and the roadside vegetation. The highest diversity had been recorded in the hay field with medium humidity, and the highest equitability in the riverside coppice. A proportion of 63.64% of the species are polyphagous. From all of the species 40.9% belong to the Palearctic Region.

Localitatea Buru este situată în aval de gura de vărsare a văii Iara în râul Arieș. Zona este situată în amonte de ieșirea Arieșului din spațiul Munților Apuseni, altitudinea fiind de 350 m în aval de localitatea Buru și de 400 m în amonte. Clima este caracteristică poziției geografice submontane, cu valori ale temperaturii medii anuale situate în jur de 8°C, iar cantitatea de precipitații variază între 650-750 mm/an [4].

Anterior cercetărilor noastre, nu au fost publicate lucrări referitoare la fauna de *Pentatomoidea* din zona localității Buru.

Material și metode. Materialul biologic analizat a fost colectat pe parcursul anilor 2002-2004. Din fiecare punct de colectare au fost prelevate cel puțin 9 probe, prin metode specifice tipului de vegetație existent: cu fileul entomologic din vegetația ierboasă (50 cosiri/probă) și prin scuturarea coronamentului arborilor și arbuștilor în plasa umbrelă. Pentru fiecare probă a fost notată data și punctul de colectare. Materialul colectat a fost omorât în alcool 70% și păstrat în alcool cu aceeași concentrație în tuburi de plastic, separat pe probe.

* Universitatea "Babeș-Bolyai", Catedra de Taxonomie și Ecologie, Cluj-Napoca, 400006, România.
E-mail: beldeanp@yahoo.com

Au fost prelevate probe din următoarele ecosisteme:

1. Pădure de amestec de foioase (făgeto-cărpinet): pe versantul stâng al Arieșului, cu expoziție sudică. Alături de fag (*Fagus sylvatica*) și carpen (*Carpinus betulus*), se întâlnesc frecvent jugastrul (*Acer campestre*) și alunul (*Corylus avellana*).

2. Fânaș mezofil situat pe versantul cu expoziție sudică, în apropierea pădurii de amestec de foioase din partea stângă a Arieșului, la aproximativ 420 m altitudine. Este format din specii de *Festuca* și *Agrostis* la care se adaugă specii de: *Urtica*, *Trifolium*, *Mentha*, *Lotus*, *Vicia*, *Melilotus*, *Onobrichis*, *Coronilla*, *Centaurea* și *Cirsium*. Apar și tufe de arbuști și arbori: *Corylus avellana*, *Crataegus monogyna*, *Rosa canina* și *Acer campestre*.

3. Fânaș higrofil situat pe malul drept al Arieșului, lângă podul peste râu, fiind frecvent genul *Juncus*, alături de care se dezvoltă specii de: *Carex*, *Myosotis*, *Rumex* și *Mentha*. Apar și tufe de *Salix* și *Populus*.

4. Zăvoi pe malul Arieșului, la aproximativ 400 m altitudine. Stratul lemnos este format predominant din *Alnus*, *Salix* și *Sambucus* iar în stratul ierbos predomină genurile *Lamium*, *Mentha*, *Trifolium* și *Urtica*.

5. Vegetație ruderală formată predominant din: *Urtica dioica*, *Capsella bursa-pastoris*, *Mentha longifolia*, *Carduus nutans* și *Carduus acanthoides*.

Determinarea speciilor de pentatomoidee a fost efectuată în laborator cu ajutorul stereo-microscopului, folosind diverse surse bibliografice [2, 3, 6]. Pentru fiecare specie este prezentat numărul de indivizi colectați, dominanța și abundența relativă. În vederea stabilirii spectrului trofic și zoogeografic al fiecărei specii au fost consultate diverse surse bibliografice [1, 2, 3, 5, 6, 7].

Rezultate și discuții. Din împrejurimile localității Buru au fost colectați 189 indivizi de *Pentatomoidea* aparținând la 22 de specii, 15 genuri și trei familii. Cel mai bine reprezentată este familia *Pentatomidae* cu 19 specii și 147 de indivizi. Familia *Scutelleridae* este reprezentată prin două specii cu 35 de indivizi, iar familia *Plataspidae* prin 7 indivizi aparținând unei singure specii (Tabel 1).

Cele 22 de specii semnalate sunt distribuite diferit în cele 5 puncte de colectare studiate (Fig. 1). Deoarece majoritatea speciilor acestui grup sunt fitofage și preferă ecosistemele deschise și însorite, numărul cel mai mare de specii (15) a fost colectat din fânașul mezofil. Tot din acest ecosistem a fost colectat și cel mai mare număr de indivizi, vegetația ierboasă fiind bine dezvoltată, iar influența antropică redusă (o cosire/an). Cele 15 specii semnalate aici, reprezintă 68,18% din numărul total de specii colectate din zona studiată. Din fânașul higrofil au fost colectate 12 specii, vegetația ierboasă fiind foarte bine dezvoltată iar influența antropică reprezentată de asemenea de o cosire/an. Și vegetația ruderală a fost formată dintr-un număr mare de specii vegetale, astfel că din acest ecosistem, au fost colectate 11 specii de pentatomoidee. Din pădure au fost colectate 6 specii, iar din zăvoi 5 specii, numărul de specii de pentatomoidee arboricole prezente în fauna României fiind redus [2].

Tabel 1

**Numărul de indivizi, dominanța și abundența relativă a speciilor de
Pentatomoidea colectate din împrejurimile localității Buru.**

Familia, subfamilia, specia	N	D %	Pădure de amestec		Fânaț mezofil		Fânaț higrofil		Zăvoi		Vegetație ruderală	
			N	Ar%	N	Ar%	N	Ar%	N	Ar%	N	Ar%
Suprafamilia Pentatomoidea Reuter 1910	189		21		70		48		11		39	
Familia Plataspidae Dallas, 1851	7				6						1	
<i>Coptosoma scutellatum</i> (Geoffroy, 1785)	7	3,703			6	8,58					1	2,56
Familia Scutelleridae Leach, 1815	35				11		12		5		7	
Subfamilia Eurygasterinae Stal, 1872	35				11		12		5		7	
<i>Eurygaster maura</i> (Linné, 1758)	17	8,994			1	1,42	8	16,67	3	27,27	5	12,82
<i>Eurygaster testudinaria</i> (Geoffroy, 1785)	18	9,523			10	14,28	4	8,34	2	18,18	2	5,13
Familia Pentatomidae Leach, 1815	147		21		53		36		6		31	
Subfamilia Podopinae Dallas, 1851	6				2		1				3	
<i>Graphosoma lineatum</i> (Linné, 1758)	6	3,174			2	2,85	1	2,08			3	7,7
Subfamilia Pentatominae s. str.	139		21		49		35		6		28	
<i>Sciocoris (Aposciocoris) homalonotus</i> Fieber, 1851	1	0,529			1	1,42						
<i>Sciocoris (A.) microphthalmus</i> Flor, 1860	1	0,529					1	2,08				
<i>Aelia acuminata</i> (Linné, 1758)	10	5,291			9	12,86	1	2,08				
<i>Aelia rostrata</i> Boheman, 1852	1	0,529			1	1,42						
<i>Eusarcocoris fabricii</i> Kirkaldy, 1904	1	0,529									1	2,56
<i>Eusarcocoris aeneus</i> (Scopoli, 1763)	6	3,174	4	19,05			2	4,16				
<i>Eusarcocoris inconspicuus</i> (Herrich-Schäffer, 1844)	1	0,529			1	1,42						
<i>Stagnomus (S.) amoenus</i> (Brullé, 1832)	3	1,587			3	4,28						
<i>Holcostethus (H.) vernalis</i> (Wolff, 1904)	8	4,232	3	14,28			1	2,08	2	18,18	2	5,13
<i>Carpocoris purpureipennis</i> (De Geer, 1773)	11	5,82	1	4,76	5	7,14	3	6,25			2	5,13
<i>Carpocoris pudicus</i> (Poda, 1761)	1	0,529					1	2,08				
<i>Dolycoris baccarum</i> (Linné, 1758)	28	14,814	5	23,81	10	14,28	3	6,25	2	18,18	8	20,51
<i>Palomena prasina</i> (Linné, 1761)	4	2,116	4	19,05								
<i>Piezodorus lituratus</i> (Fabricius, 1794)	7	3,703			2	2,85	4	8,34			1	2,56
<i>Pentatoma rufipes</i> (Linné, 1758)	4	2,116	4	19,05								
<i>Eurydema dominulus</i> (Scopoli, 1763)	4	2,116			3	4,28					1	2,56
<i>Eurydema oleraceum</i> (Linné, 1758)	48	25,396			14	20	19	39,59	2	18,18	13	33,34
Subfamilia Amyotinae Leston, 1953	2				2							
<i>Zicrona coerulea</i> (Linné, 1758)	2	1,058			2	2,85						
Numărul total de specii			6		15		12		5		11	

Abrevieri: Ar - Abundența relativă. D- Dominanța. N - Numărul de indivizi.

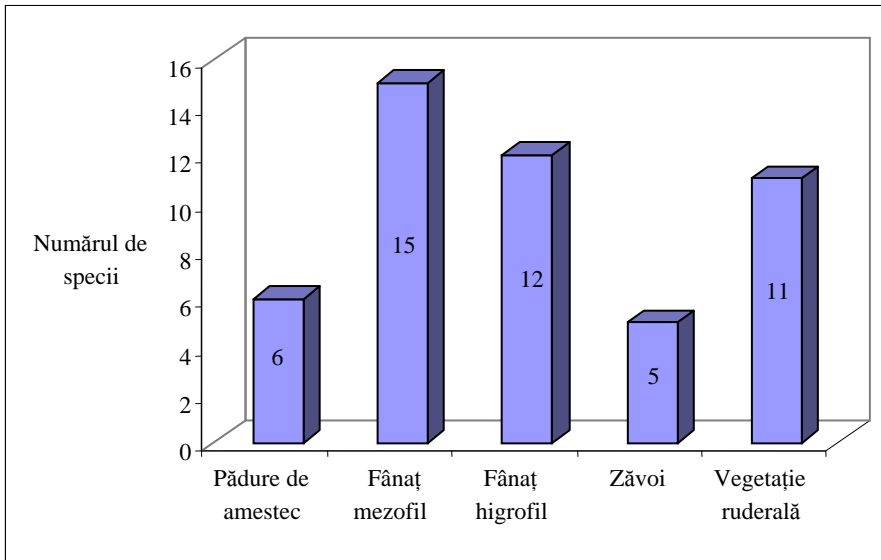


Fig. 1. Numărul de specii de Pentatomoidea înregistrat în punctele de colectare studiate.

În urma calculului abundenței relative, speciile cel mai bine reprezentate în punctele de colectare studiate în împrejurimile localității Buru sunt: *Dolycoris baccarum* în pădurea de amestec (Ar=23,81%), *Eurydema oleraceum* în fânașul mezofil (Ar= 20%), în fânașul higrofil (Ar=39,59%) și în vegetația ruderală (Ar=33,34%) și *Eurygaster maura* în zăvoi (Ar=27,27%) (Tabel 1).

Valorile dominanței numerice, arată că *Eurydema oleraceum* este specia cel mai bine reprezentată în zona studiată, această specie fiind oligofagă întâlnită pe crucifere, dar frecvență atât în biotopuri higrofile cât și în biotopuri xerofile sau xero-termofile. Alături de *Eurydema oleraceum*, valori ridicate ale dominanței s-au mai înregistrat la speciile *Dolycoris baccarum*, *Eurygaster testudinaria* și *E. maura* (Tabel 1). Cele 4 specii, sunt printre cele mai frecvente pentatomidee din fauna României [2].

Dintre cele 22 de specii semnalate, conform literaturii de specialitate [2, 3, 6] doar două specii sunt stenobionte: *Sciocoris (Aposciocoris) homalonotus* -xerotermofilă și *Eusarcoris inconspicuus* -termofilă. Dintre celelalte specii, deși unele trăiesc în diferite tipuri de ecosisteme, au anumite preferințe: *Aelia acuminata* și *Piezodorus lituratus* preferă biotopurile xerofile; *Eusarcoris fabricii* și *Eurydema dominulus* preferă biotopurile higrofile; *Palomena prasina* și *Pentatoma rufipes* preferă pădurile de foioase; *Eurygaster maura* preferă biotopurile xerotermofile.

Dintre cele 22 de specii, doar *Dolycoris baccarum* a fost colectată din toate cele 5 ecosisteme studiate, iar 5 specii au fost colectate din câte 4 ecosisteme. Două specii au fost colectate din câte trei ecosisteme, 4 au fost colectate din câte două ecosisteme iar 10 specii au fost colectate din câte un singur ecosistem.

Sciocoris (Aposciocoris) homalonotus Fieber, 1851 este xerotermofilă, mediteraneană, întâlnită pe diferite graminee (*Poa*, *Bromus*, etc.). Este considerată rară în fauna României.

În vederea stabilirii diversității, am utilizat indicele de diversitate Shanon-Wiener. Diversitatea cea mai mare a fost înregistrată în fânașul mezofil. Valori ridicate și apropiate între ele, au fost înregistrate în punctele de colectare reprezentate de vegetație ruderală și fânaș higrofil. Valorile cele mai scăzute ale diversității au fost înregistrate în pădurea de amestec și în zăvoiu studiat. Valorile indicelui de diversitate Shanon-Wiener, demonstrează încă odată faptul că, speciile de pentatomoidee preferă ecosistemele ierboase, deschise (Tabel 2).

În ceea ce privește echitabilitatea, cea mai ridicată valoare a fost înregistrată în zăvoi, aici, aproape toate speciile semnalate fiind reprezentate printr-un număr redus și egal de indivizi. Situația este asemănătoare și în pădurea de amestec, speciile prezente fiind reprezentate tot printr-un număr redus de indivizi, dar mai variabil comparativ cu zăvoiu studiat. Echitabilitatea este mai scăzută în ecosistemele ierboase, unde majoritatea speciilor sunt de asemenea prezente printr-un număr redus de indivizi, însă câteva specii comune în fauna României sunt prezente printr-un număr mult mai mare de indivizi. Astfel, indicele de echitabilitate înregistrează valoarea minimă în fânașul higrofil, unde majoritatea speciilor sunt reprezentate prin 2-4 indivizi, în timp ce *Eurydema oleraceum* este reprezentată prin 19 indivizi iar *Eurygaster maura* este reprezentată prin 8 indivizi. Și în fânașul mezofil, indicele de echitabilitate este scăzut, majoritatea speciilor fiind prezente printr-un număr mic de indivizi, în timp ce *Eurydema oleraceum* este reprezentată prin 14 indivizi, *Eurygaster testudinaria* și *Dolycoris baccarum* prin 10 indivizi, iar *Aelia acuminata* este reprezentată prin 9 indivizi.

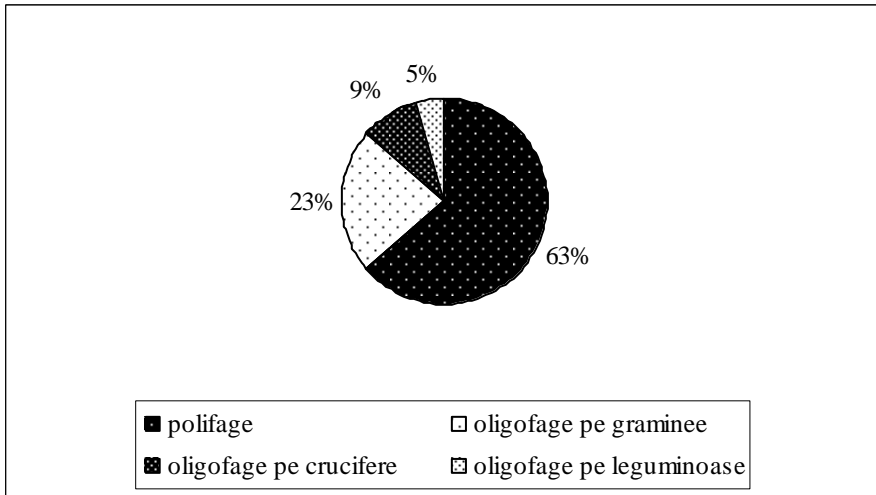
Tabel 2

Diversitatea și echitabilitatea ecosistemelor studiate în funcție de populațiile de *Pentatomoidea*.

	Pădure de amestec	Fânaș mezofil	Fânaș higrofil	Zăvoi	Vegetație ruderală
H'	0,725	0,92	0,834	0,685	0,847
E	0,931	0,782	0,772	0,981	0,813

Abrevieri: E - Indicele de echitabilitate. H' - Indicele de diversitate Shanon-Wiener.

Spectrul trofic. Dintre cele 22 de specii colectate, 5 sunt oligofage întâlnite pe graminee (*Eurygaster maura*, *E. testudinaria*, *Sciocoris (Aposciocoris) homalonotus*, *Aelia acuminata*, *A. rostrata*), două sunt oligofage întâlnite pe crucifere (*Eurydema dominulus*, *E. oleraceum*), o specie (*Coptosoma scutellatum*) este oligofagă întâlnită pe leguminoase iar restul speciilor (14) sunt polifage (Fig. 2). Dintre speciile polifage, unele au preferințe pentru anumite familii de plante: *Graphosoma lineatum* preferă umbeliferele, *Eusarcoris fabricii* și *E. aeneus* preferă labiatele.



Fi g. 2. Spectrul trofic al pentatomoideelor semnalate în împrejurimile localității Buru.

Analiza zoogeografică. Dintre cele 22 de specii colectate, 9 sunt răspândite în Palearctica (*Eurygaster maura*, *E. testudinaria*, *Graphosoma lineatum*, *Aelia acuminata*, *Eusarcoris fabricii*, *E. aeneus*, *Holcostethus (H.) vernalis*, *Palomena prasina*, *Eurydema oleraceum*), trei sunt eurosiberiene (*Carpocoris purpureipennis*, *Pentatoma rufipes*, *Eurydema dominulus*), trei sunt Sud-palearktice (*Eusarcoris inconspicuus*, *Stagnomus (S.) amoenus*, *Piezodorus lituratus*), iar trei sunt holarctice (*Sciocoris (Aposciocoris) microphthalmus*, *Dolycoris baccarum*, *Zicrona coerulea*). Celelalte unități zoogeografice prezente sunt reprezentate prin câte o singură specie: *Sciocoris (Aposciocoris) homalonotus* (mediteraneană), *Coptosoma scutellatum* (eurasiatică), *Aelia rostrata* (răspândită în Asia Mică și Europa) și *Carpocoris pudicus* (răspândită în Asia Vestică și zona Mediteraneană).

Concluzii.

1. Din zona studiată au fost colectate 22 de specii de pentatomoidee aparținând la 15 genuri și trei familii. Cel mai bine reprezentată este familia *Pentatomidae* cu 19 specii.

2. Distribuția speciilor este diferită în cele 5 puncte de colectare studiate: numărul cel mai mare de specii a fost înregistrat în fânașul mezofil, iar numărul cel mai mic în zăvoi.

3. Speciile cel mai bine reprezentate sunt: *Dolycoris baccarum* în pădurea de amestec, *Eurygaster maura* în zăvoi și *Eurydema oleraceum* în fânașe și în vegetația ruderală.

4. Specia *Sciocoris (Aposciocoris) homalonotus* este considerată rară în fauna României.

5. Diversitatea cea mai mare a fost înregistrată în fânașul mezofil iar diversitatea cea mai scăzută în zăvoi. Valorile indicelui de diversitate Shanon-Wiener, demonstrează că, speciile de pentatomoidee preferă ecosistemele ierboase, deschise.

6. Cea mai ridicată valoare a echitabilității a fost înregistrată în zăvoi, iar cea mai scăzută valoare a fost înregistrată în fânașul higrofil.

7. Dintre cele 22 de specii colectate, 5 sunt oligofage întâlnite pe graminee, două sunt oligofage întâlnite pe crucifere, o specie este oligofagă întâlnită pe leguminoase iar restul speciilor (14) sunt polifage.

8. Dintre cele 22 de specii colectate, 9 au răspândire Palearctică, trei sunt Eurosiberiene, trei sunt Sud-Palearctice, iar trei sunt Holarctice. Celelalte unități zoogeografice prezente, sunt reprezentate prin câte o singură specie.

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

1. K i s, B., *Contribuții la cunoașterea heteropterelor pentatomoide din România*. A II-a consfătuire de entomologie, Craiova, 1980, 335-345.
2. K i s, B., *Insecta, Heteroptera: Partea generală și suprafamilia Pentatomoidea*, Fauna R. S. R., **VIII**(8), București, 1984.
3. L e h r, P. A., *Keys to the insects of the Far East of the USSR*. U. S. Department of Agriculture, English translation, 2001.
4. P o p, G. P., *Depresiunea Transilvaniei*, Editura Presa Universitară Clujeană, 2001.
5. S c h n e i d e r, E., *Suprafamilia Pentatomoidea Reut. 1910 (Heteroptera) în colecțiile Muzeului de Istorie Naturală din Sibiu*, "Muz. Brukenthal, Stud. Comun., Ști. Nat.", **15**, 1970, 225-245.
6. S c h u h, R. T., S l a t e r, J. A., *True Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera). Classification and Natural History*, Cornell Univ. Press, New York, London, 1995.
7. S o u t h w o o d, T. R. E., L e s t o n, D., *Land and Water Bugs of the British Isles*, Frederick Warne, London, 1959.

SUPRAFAMILIA *PENTATOMOIDEA* (INSECTA, HETEROPTERA) ÎN ZONA REZERVAȚIEI CHEILE RUNCULUI (JUD. ALBA, ROMÂNIA)

PAUL-VASILE BELDEAN*

SUMMARY. – The suprafamily *Pentatomoidea* (Insecta, Heteroptera) in „Cheile Runcului” Nature Reserve (Alba county, Romania). „Cheile Runcului” Nature Reserve are located in the Apuseni Mountains. The biological material was collected starting with May, until September 2003 from five ecosystems: shrubbery, hay field, grassland, coppice and roadside vegetation. We revealed a number of 279 *Pentatomoidea*, belonging to 27 species, 20 genera and 5 family. The majority of the species (19) and individuals (198) belong to the family *Pentatomidae*. Most of the species (24) live in the hay field and less of the species (5) live in the coppice. The highest values of the numerical and relative abundance were shown by *Dolycoris baccarum*, *Carpocoris purpureipennis* and *Eurydema oleraceum*. The highest number of adults was recorded in August. A proportion of 66.67% of the species are polyphagous. From all of the species 37% belong to the Palearctic Region.

Cheile Runcului sunt situate în Munții Apuseni, în amonte de depresiunea Ocoliş (altitudine aproximativ 420m) din bazinul Arieșului [4]. Conform legii nr. 5 din 6 martie 2000, Cheile Runcului sunt rezervație naturală, având o suprafață de 20 de hectare [8].

Anterior cercetărilor noastre, nu au fost publicate lucrări referitoare la fauna de *Pentatomoidea* din Cheile Runcului.

Material și metode. Materialul biologic analizat a fost colectat în perioada mai-septembrie 2003. Au fost prelevate 15 probe (3/lună) din fiecare punct de colectare prin metode specifice tipului de vegetație existent: cu fileul entomologic din vegetația ierboasă (50 cosiri/probă) și prin scuturarea coronamentului arborilor și arbuștilor în plasa umbrelă. Pentru fiecare probă a fost notată data și punctul de colectare. Materialul colectat a fost omorât în alcool 70% și păstrat în alcool cu aceeași concentrație în tuburi de plastic, separat pe probe.

În zona rezervației Cheile Runcului au fost prelevate probe din următoarele stațiuni:

1. Tufăriș situat pe versantul stâng al Cheilor Runcului cu expoziție sudică, la aproximativ 450 m altitudine. Predominant se întâlnesc: arin negru (*Alnus glutinosa*), mesteacăn (*Betula pendula*), măceș (*Rosa canina*), păducel (*Crataegus monogyna*), porumbar (*Prunus spinosa*), păr (*Pyrus sylvestris*), specii de salcie (*Salix sp.*), alun (*Corylus avellana*) și zmeur (*Rubus idaeus*).

* Universitatea ”Babeș-Bolyai”, Catedra de Taxonomie și Ecologie, Cluj-Napoca, 400006, România.
E-mail: beldeanp@yahoo.com

2. Fânaț situat pe malul stâng al văii Ocoliș, la intrarea în Cheile Runcului din aval. Este format din specii de *Festuca* și *Agrostis* la care se adaugă, *Trifolium pratense*, *Mentha longifolia* etc. Pe alocuri se dezvoltă specii ale genurilor *Carex*, *Juncus*, *Myosotis* și *Rumex*.

3. Pășune situată la aproximativ 420 m altitudine pe partea stângă a văii Ocoliș. Sunt frecvente specii ale genurilor *Festuca*, *Trifolium*, *Mentha*, *Verbascum*, *Achillea* etc.

4. Zăvoi situat la aproximativ 420 m altitudine în Cheile Runcului, pe ambele maluri ale văii Ocoliș. Alături de *Salix sp.* apar și specii de *Populus* și *Alnus*, iar stratul ierbos este bine reprezentat, fiind format predominant din: *Urtica dioica*, *Mentha sp.*, *Verbascum sp.*, *Carex sp.*, *Juncus sp.* etc.

5. Vegetație ruderală formată predominant din: *Urtica dioica*, *Capsella bursa-pastoris*, *Mentha longifolia*, *Carduus nutans* și *Carduus acanthoides*, alături de care apar *Verbascum blattaria* și *Lepidium campestre*.

Determinarea speciilor de pentatomoidee a fost efectuată în laborator cu ajutorul stereo-microscopului, folosind diverse surse bibliografice [2, 3, 6, 7]. Pentru fiecare specie este prezentat numărul de indivizi colectați, abundența numerică și abundența relativă. În vederea stabilirii spectrului trofic și zoogeografic al fiecărei specii au fost consultate diverse surse bibliografice [1, 2, 3, 5].

Rezultate și discuții. Din rezervația Cheile Runcului au fost colectați 279 indivizi de *Pentatomoidea*, aparținând la 27 de specii, 20 de genuri și 5 familii. Cel mai bine reprezentată este familia *Pentatomidae*, căreia îi aparțin 19 specii, urmată de familia *Scutelleridae* cu 4 specii, familia *Cydnidae* cu două specii și familiile *Plataspidae* și *Acanthosomidae*, fiecare fiind prezente prin câte o singură specie.

Dintre cei 279 indivizi de *Pentatomoidea* colectați pe parcursul anului 2003, 198 aparțin familiei *Pentatomidae* iar 54 familiei *Scutelleridae*. Familia *Plataspidae* este reprezentată prin 23 indivizi, familia *Cydnidae* prin trei indivizi iar familia *Acanthosomidae* printr-un singur individ (Tabel 1).

Deoarece majoritatea speciilor acestui grup sunt fitofage și preferă vegetația ierboasă, numărul cel mai mare de specii de *Pentatomoidea* (24) a fost colectat din fânaț, aici vegetația ierboasă fiind bine dezvoltată. Din pășunea studiată, unde vegetația ierboasă este mult mai slab dezvoltată comparativ cu fânațul studiat, au fost colectate 10 specii, toate practice, în timp ce din tufăriș au fost colectate 8 specii, fiind prezente atât specii practice cât și specii arboricole și arbusticole. Tot 8 specii au fost colectate și de pe vegetația ruderală, iar numărul cel mai mic de specii (5) a fost colectat din zăvoi (Fig. 1).

Valorile cele mai ridicate ale abundenței numerice și relative au fost înregistrate la speciile *Dolycoris baccarum* în tufărișuri (A=1, Ar=34,88), *Carpocoris purpureipennis* în fânaț (A=1,27 Ar=16,52), *Eurydema oleraceum* în pășune (A=1,07, Ar=30,19), *Carpocoris purpureipennis* și *Dolycoris baccarum* în zăvoi (A=0,47, Ar=35) și *Carpocoris purpureipennis* în vegetația ruderală (A=0,73, Ar=22,92).

Tabel 1

Numărul de indivizi, abundența numerică și abundența relativă a speciilor de *Pentatomoidea* colectate din zona rezervației Cheile Runcului.

Familia, subfamilia, specia	N	Tufăriș			Fânaț			Pășune			Zăvoi			Veg. ruderală		
		N	A	Ar%	N	A	Ar%	N	A	Ar%	N	A	Ar%	N	A	Ar%
Suprafamilia Pentatomoidea	279	43			11			53			20			48		
Reuter 1910					5											
Familia Plataspidae Dallas, 1851	23															
<i>Coptosoma scutellatum</i> (Geoffroy, 1785)	23				13	0.87	11.3	7	0.47	13.2				3	0.2	6.25
Familia Cydnidae Billberg, 1820	3															
Subfamilia Sehirinae Amyot et Serville, 1843	3															
<i>Tritomegas bicolor</i> (Linné 1758)	2				1	0.07	0.87	1	0.07	1.88						
<i>Tritomegas sexmaculatus</i> (Rambur, 1842)	1				1	0.07	0.87									
Familia Scutelleridae Leach, 1815	54															
Subfamilia Odontotarsinae Stal, 1872	2															
<i>Odontotarsus purpureolineatus</i> (Rossi, 1790)	2				2	0.13	1.74									
Subfamilia Eurygasterinae Stal, 1872	52															
<i>Eurygaster austriaca</i> (Schrank, 1776)	1				1	0.07	0.87									
<i>Eurygaster maura</i> (Linné, 1758)	19				9	0.6	7.82	4	0.27	7.55				6	0.4	12.5
<i>Eurygaster testudinaria</i> (Geoffroy, 1785)	32				15	1	13.04	11	0.73	20.75	2	0.13	10	4	0.27	8.33
Familia Pentatomidae Leach, 1815	198															
Subfamilia Podopinae Dallas, 1851	20															
<i>Graphosoma lineatum</i> (Linné, 1758)	20	3	0.2	6.98	8	0.53	6.95	2	0.13	3.78	1	0.07	5	6	0.4	12.5
Subfamilia Pentatominae s. str.	178															
<i>Sciocoris (S.) deltocephalus</i> Fieber, 1861	1				1	0.07	0.87									
<i>Aelia acuminata</i> (Linné, 1758)	7				5	0.33	4.34	2	0.13	3.78						
<i>Neottiglossa leporina</i> (Herrich-Schäffer, 1830)	1				1	0.07	0.87									
<i>Neottiglossa pusilla</i> (Gmelin, 1789)	1				1	0.07	0.87									
<i>Stagnomus (S.) amoenus</i> (Brullé, 1832)	1				1	0.07	0.87									
<i>Staria lunata</i> (Hahn, 1834)	2				2	0.13	1.74									
<i>Holcostethus (H.) vernalis</i> (Wolff, 1904)	6	3	0.2	6.98	3	0.2	2.6									

Tabel 1 (continued)

<i>Holcostethus (Dryocoris) sphacelatus</i> Fabricius, 1794	3				1	0.07	0.87	2	0.13	3.78						
<i>Carpocoris purpureipennis</i> (De Geer, 1773)	53	11	0.73	25.58	19	1.27	16.52	5	0.33	9.43	7	0.47	35	11	0.73	22.92
<i>Carpocoris pudicus</i> (Poda, 1761)	1				1	0.07	0.87									
<i>Dolycoris baccarum</i> (Linné, 1758)	42	15	1	34.88	11	0.73	9.56	3	0.2	5.66	7	0.47	35	6	0.4	12.5
<i>Antheminia lunulata</i> (Goeze, 1778)	2				2	0.13	1.74									
<i>Palomena prasina</i> (Linné, 1761)	3	3	0.2	6.98												
<i>Piezodorus lituratus</i> (Fabricius, 1794)	4				2	0.13	1.74						2	0.13	4.17	
<i>Rhaphigaster nebulosa</i> (Poda, 1761)	2	2	0.13	4.65												
<i>Pentatoma rufipes</i> (Linné, 1758)	1	1	0.07	2.32												
<i>Eurydema ventrale</i> Kolenati, 1846	1				1	0.07	0.87									
<i>Eurydema oleraceum</i> (Linné, 1758)	47	5	0.33	11.63	13	0.87	11.3	16	1.07	30.19	3	0.2	15	10	0.67	20.83
Familia Acanthosomidae Stal, 1865	1															
<i>Elasmucha betulae</i> (De Geer, 1773)	1				1	0.07	0.87									
Numărul total de specii	8				24			10					5			8

Abrevieri: N - Numărul de indivizi. A - Abundența numerică. Ar - Abundența relativă.

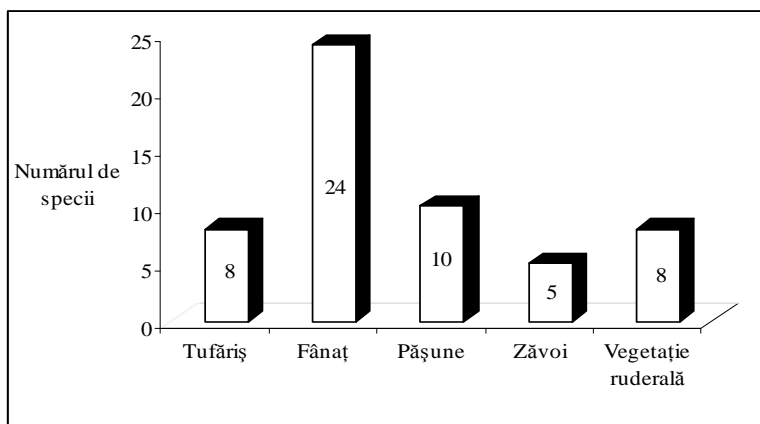


Fig. 1. Numărul de specii de Pentatomoidea înregistrat în punctele de colectare studiate.

Dintre cele 27 de specii, 4 au fost colectate din toate cele 5 puncte de colectare, o specie a fost colectată din 4 ecosisteme, două au fost colectate din câte trei ecosisteme, 5 au fost colectate din câte două ecosisteme iar 15 specii au fost colectate din câte un singur ecosistem.

Dinamica populațiilor. În vederea efectuării studiilor de dinamică a populațiilor de *Pentatomoidea* în rezervația Cheile Runcului, au fost efectuate colectări lunare în perioada mai-septembrie (Tabel 2). Atât numărul de indivizi cât și numărul de specii variază pe parcursul anului (Fig. 2).

Pentatomoideele iernează în stadiul de adult astfel că în mai, când populațiile ies din diapauză și sunt în perioada de împerechere, se înregistrează un număr mare de specii și indivizi, în timp ce în lunile iunie și iulie, când majoritatea speciilor sunt în stadiul de ou sau larve de diverse vârste, numărul de indivizi adulți și de specii scade.

În ecosistemele ierboase, atât numărul maxim de indivizi cât și numărul maxim de specii se înregistrează în luna august, când apar indivizii adulți din noua generație. În septembrie numărul de indivizi și de specii scade datorită migrației unor specii din aceste ecosisteme ierboase deschise spre ecosistemele de tip forestier, unde are loc iernarea. Aceasta explică și atingerea maximumului în septembrie în tufărișurile studiate.

Tabel 2

Dinamica populațiilor de *Pentatomoidea* în punctele de colectare studiate în zona rezervației Cheile Runcului.

Perioada colectării	Tufăriș		Fânaț		Pășune		Zăvoi		Vegetație ruderală		Numărul total	
	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	nr. ind.	nr. sp.	ind.	sp.
Mai	8	5	12	6	13	2	3	2	10	4	46	11
Iunie	7	3	10	3	4	4	2	1	5	3	28	6
Iulie	9	4	20	5	11	5	6	3	9	4	55	8
August	9	5	53	17	17	6	5	3	14	5	98	21
Septembrie	10	6	20	10	8	5	4	2	10	5	52	13

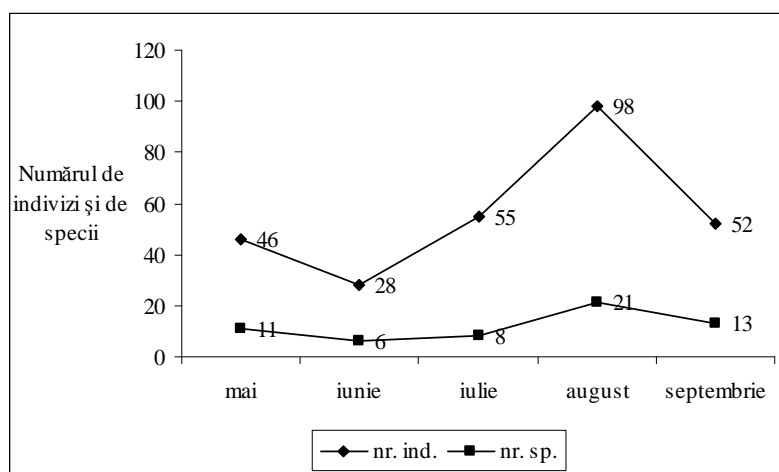
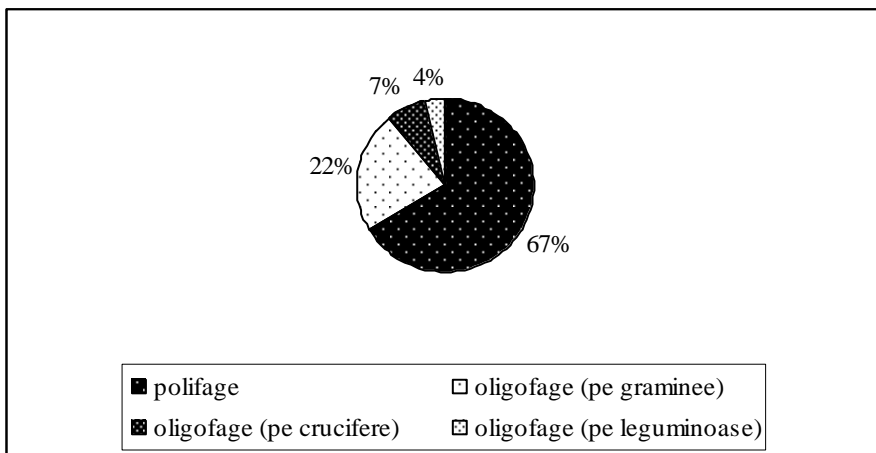


Fig. 2. Dinamica suprafamiliei *Pentatomoidea* în zona rezervației Cheile Runcului.

Spectrul trofic. Dintre cele 27 de specii colectate, 6 sunt oligofage pe graminee (*Eurygaster austriaca*, *E. maura*, *E. testudinaria*, *Aelia acuminata*, *Neottiglossa leporina*, *Neottiglossa pusilla*), două sunt oligofage pe crucifere (*Eurydema ventrale*, *E. oleraceum*), o specie (*Coptosoma scutellatum*) este oligofagă pe leguminoase iar restul speciilor (18) sunt polifage (Fig. 3).

Analiza zoogeografică. Dintre cele 27 de specii colectate, 10 au răspândire Palearctică (*Tritomegas bicolor*, *Eurygaster maura*, *E. testudinaria*, *Graphosoma lineatum*, *Aelia acuminata*, *Neottiglossa pusilla*, *Holcostethus (Holcostethus) vernalis*, *Holcostethus (Dryocoris) sphaelatus*, *Palomena prasina*, *Eurydema oleraceum*), trei sunt Eurosiberiene (*Carpocoris purpureipennis*, *Pentatoma rufipes*, *Elasmucha betulae*), trei sunt Sud-Palearctice (*Stagnomus (Stagnomus) amoenus*, *Piezodorus lituratus*, *Raphigaster nebulosa*), două sunt Mediteraneene (*Staria lunata*, *Eurydema ventrale*) iar două sunt Ponto-Mediteraneene (*Odontotarsus purpureolineatus*, *Sciocoris (Sciocoris) deltocephalus*). Celelalte unități zoogeografice prezente sunt reprezentate prin câte o singură specie: Eurasia (*Coptosoma scutellatum*); Europa Centrală (*Eurygaster austriaca*); Europa Centrală și Mediterana (*Tritomegas sexmaculatus*); Asia Mică, Asia Centrală și Sudul Europei (*Neottiglossa leporina*); Asia Vestică și Mediterana (*Carpocoris pudicus*); Holarctica (*Dolycoris baccarum*); Europa Sudică și Centrală și Asia Vestică și Centrală (*Anthemina lunulata*).



Fi g. 3. Spectrul trofic al pentatomoideelor semnalate în zona rezervației Cheile Runcului.

Concluzii.

1. Din ecosistemele studiate în zona rezervației Cheile Runcului au fost colectați 279 indivizi de *Pentatomoidea* din 27 de specii, care aparțin la 20 de genuri și 5 familii. Atât din punct de vedere al numărului de specii, cât și al numărului de indivizi semnalati cel mai bine reprezentată este familia *Pentatomidae*.

2. Cel mai mare număr de specii de a fost colectat din fânaț, iar cel mai mic număr a fost colectat din zăvoi.

3. Cele mai ridicate valori ale abundenței numerice și relative au fost înregistrate de către speciile *Dolycoris baccarum*, *Carpocoris purpureipennis* și *Eurydema oleraceum*.

4. Atât numărul maxim de indivizi cât și numărul maxim de specii se înregistrează în luna august, când apar indivizii adulți din noua generație.

5. Dintre cele 27 de specii colectate, 18 sunt polifage, 6 sunt oligofage pe graminee, două sunt oligofage pe crucifere, iar una este oligofagă pe leguminoase.

6. Din punct de vedere al spectrului zoogeografic, cel mai bine reprezentate sunt speciile Palearctice, urmate de cele Eurosiberiene, Sud-Palearctice, Mediteraneene și Ponto-Mediteraneene. Celelalte unități zoogeografice prezente sunt reprezentate prin câte o singură specie.

BIBLIOGRAFIE

1. K i s, B., *Contribuții la cunoașterea heteropterelor pentatomoide din România*. A II-a consfătuire de entomologie, Craiova, 1980, 335-345.
2. K i s, B., *Insecta, Heteroptera: Partea generală și suprafamilia Pentatomoidea*, Fauna R. S. R., VIII(8), București, 1984.
3. L e h r, P. A., *Keys to the insects of the Far East of the USSR*. U. S. Department of Agriculture, English translation, 2001.
4. P o p e s c u – A r g e ș e l, I., *Valea Arieșului*. Editura Sport-Turism, București, 1984.
5. S c h n e i d e r, E., *Suprafamilia Pentatomoidea Reut. 1910 (Heteroptera) în colecțiile Muzeului de Istorie Naturală din Sibiu*, "Muz. Brukenthal, Stud. Comun., Ști. Nat.", 15, 1970, 225-245.
6. S c h u h, R. T., S l a t e r, J. A., *True Bugs of the World (Hemiptera: Heteroptera). Classification and Natural History*, Cornell Univ. Press, New York, London, 1995.
7. S o u t h w o o d, T. R. E., L e s t o n, D., *Land and Water Bugs of the British Isles*, Frederick Warne, London, 1959.
8. *** *Legea nr. 5 din 6 martie 2000 privind aprobarea planului de amenajare a teritoriului național- Secțiunea a III-a - zone protejate*. Monitorul oficial, nr. 152/12 aprilie 2000.

SMALL MAMMALS OF THE CENTRAL TRANSYLVANIAN PLAIN: SPECIES COMPOSITION, DIVERSITY AND ABUNDANCE

ELIANA SEVIANU* and IOAN COROIU**

SUMMARY. - The paper presents the results of the research carried out during 2002 and 2003, regarding the diversity of small mammal communities in two areas of the Fizeş Basin, using live-traps set on linear transects. Our study resulted in capturing 200 individuals belonging to 2 orders and 8 species: one insectivore species (*Crocidura leucodon*) and seven rodent species (*Microtus arvalis*, *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Myoxus glis* and *Dryomys nitedula*). The species composition is different in the two areas: *Crocidura leucodon*, *Clethrionomys glareolus*, *Myoxus glis* and *Dryomys nitedula* are missing from our captures in Păstăraia Valley, while *Apodemus agrarius* could not be captured in Huşuieru Valley. Biodiversity indices show that species diversity is greater in Huşuieru Valley than in Păstăraia Valley and that the greatest number of species ($S=5$), the highest species diversity ($H=1.45$, $c=0.269$) and abundance (24.76 ind./100 trap-nights) in different types of habitats were recorded in the meadow. In the overgrazed pasture, no small mammal species could be captured. The most abundant species in the two areas is *Apodemus sylvaticus* (44.01 ind./100 trap-nights) and the less abundant (excepting the arboreal species) is *Clethrionomys glareolus* (2.19 ind./100 trap-nights).

There are only few research regarding the small mammal fauna of the Transylvanian Plain [2, 3, 5, 11, 20, 21, 25, 30], some of the papers containing no more than several references on species present here, but no data regarding our study area are available. The aim of our research is to determine the composition of populations of the small mammal communities in the Fizeş Basin and the species distribution and abundance in the major habitat types present in the Transylvanian Plain.

Methods. *General description of the area.* The study was carried out during two years (2002 - 2003) in the Fizeş Basin, situated in the central, northwestern part of the Transylvanian Plain (Fig. 1), on a surface of 516 km² and a length of 67 km between the source and the confluence with the Someşul Mic River, 3 km downstream from Gherla town [28]. Hills and valleys dominate the relief, with altitudes ranging

* The Focal Centre for Biodiversity Monitoring and Conservation, 400609 Cluj-Napoca, Romania
E-mail: eliana_sevianu@clujnapoca.ro

** "Babes-Bolyai University", dept. of Taxonomy and Ecology, 400006, Cluj-Napoca, Romania
E-mail: icoroiu@biolog.ubbcluj.ro

between 300 and 415 m and slopes with inclination of 7-35 degrees [24]. The predominant soil types are clay and sandy, favoring water drainage [31]. The entire area suffers from a significant water shortage due to the scarcity of water sources, both subterranean and surface waters. The cultivated fields cover more than 85% of the entire surface, while the forests occupy less than 7% (according to sources from the Ministry of Agriculture, Forests and Rural Development). Sessile oak (*Quercus petraea*), hornbeam (*Carpinus betulus*) and downy oak (*Q. pubescens*), forming different plant communities depending on the slope exposure, dominate the woodlands of the Fizeş Basin. On dry slopes, with well draining soils, grows *Quercus pubescens*, a xerothermophilous oak species. Turkey oak (*Quercus cerris*) is also present on the slopes with southern exposure, while beech (*Fagus sylvatica*) grows on the ones with northern exposure.

The research was focused on two different areas: Păstăraia Valley situated in the E-SE of the “Sic Reed Beds” Natural Reserve, with a surface of approximately 150 ha, and Huşuieru Valley situated to the west of the Fizeş River, with a surface of approximately 1,230 ha (Fig. 1).

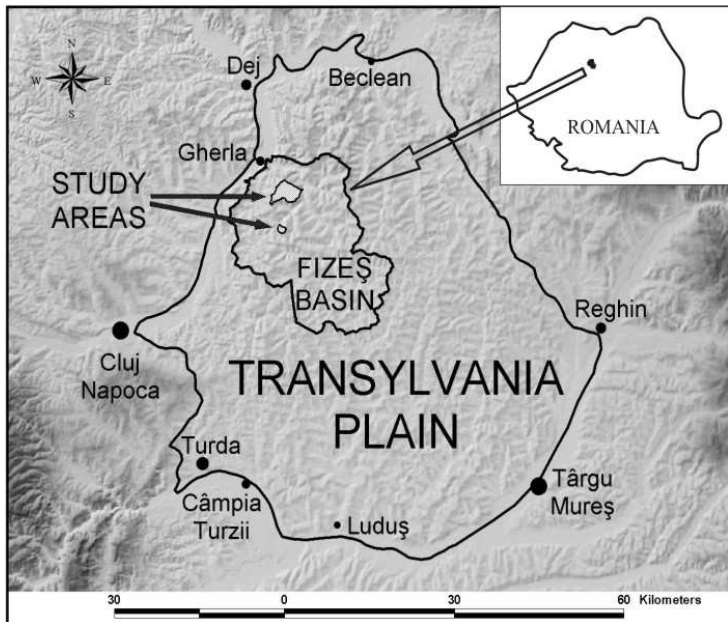


Fig. 1. Study areas location in the Fizeş Basin

In Păstăraia Valley, we investigated four major habitat types, which occupy different proportion of the entire area (Fig. 2), and the boundary zone [8] between woodland and the neighboring habitats:

- deciduous woodland of sessile oak and hornbeam, forming *Quercus petraeae* – *Carpinetum* plant association [15], relatively young, growing on slopes (10-18° inclination) with NE exposure, together with other tree species like *Cerasus avium*, *Tilia cordata* and *Acer campestre* and herbaceous plants like *Asarum europaeum*, *Anemone nemorosa*, *Hepatica nobilis*, *Corydalis cava*, *C. solida*, *Vicia silvatica*, *Mercurialis perennis*, *Oxalis acetosela* and *Symphytum tuberosum*;
- meadows, situated at the foothill of the slope with NE exposure (*Agrostidetum* – *Festucetum sulcatae* plant association), with *Agrostis tenuis*, *Festuca sulcata*, *F. pratensis*, *Trifolium campestre*, *Medicago lupulina*, *Veronica chamaedrys*, *Verbascum blattaria* and *Carduus acanthoides* [23];
- degraded and overgrazed pasture at the foothill of the slope with SW exposure, with *Agrostis tenuis*, *Festuca sulcata*, *Xeranthemum foetidum*, *Eryngium campestre*, *Urtica dioica* [23];
- pasture with thorny shrubs like *Crataegus monogyna*, *Prunus spinosa* and *Rosa canina* (*Prunus spinosae-Crataegetum* plant association), grown on the slope (25-30°) with SW exposure;
- ecotone areas between the sessile oak-hornbeam woodland and the meadow, and between the woodland and the pasture with thorny shrubs.

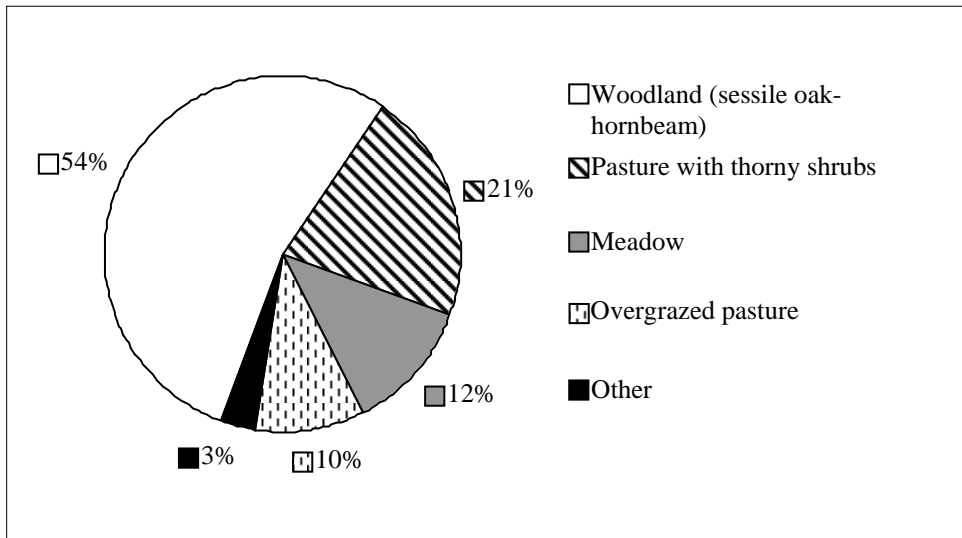


Fig. 2. Habitat types proportion in Păștăraia Valley

Other existing habitats, like abandoned farmland, orchard, dense shrubbery, etc., were not investigated during our study.

In Hușuieru Valley we investigated four major habitats types, as well the boundary area between the woodland and the adjacent habitats. In Hușuieru Valley there still exists a small part of the ancient oak forest and the habitat types proportion

are slightly different (Fig. 3) from Păstăraia Valley, due to the presence of other habitat types like cultivated fields, dense shrubbery, which were not included in our research.

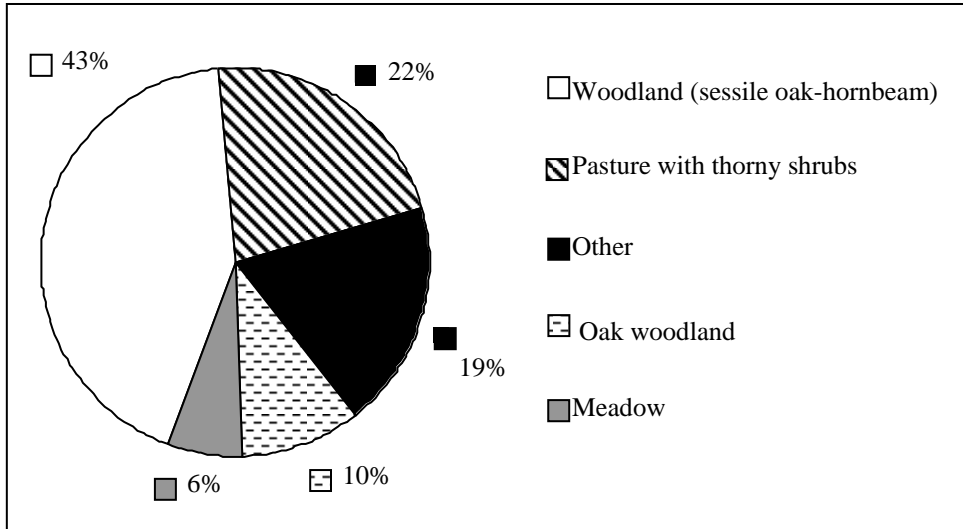


Fig. 3. Habitat types proportion in Hușuieru Valley

The habitats investigated in Hușuieru Valley were:

- deciduous woodland of sessile oak and hornbeam growing on slopes with N exposure (same plant association as in Păstăraia Valley);
- meadows, situated at the foothill of the slope with N exposure (same plant association);
- pasture with thorny shrubs grown on the slope with S exposure (same plant association);
- oak woodland (*Quercetum robori-petraea* plant association) with *Quercus petraea*, *Q. robur*, *Q. pubescens* and *Q. cerris* and rather dense shrubbery and abundant herbaceous vegetation, on the slope with S exposure;
- ecotone area [8] between the sessile oak-hornbeam woodland and meadow and between the oak woodland and the pasture with thorny shrubs.

Standard methods were applied for capturing small mammals [13]. At each location, we used 100 live-traps set in two parallel lines placed at 15 m distance, passing through the habitats described above (Fig. 4, Fig. 5). Each trap-line contained 50 traps set at the interval of 15 m. We used roasted sunflower seeds, bits of walnuts and lard as bait. The traps were checked once a day, in the morning. All trapped individuals were marked by having shaved a small surface of fur on their backs. Upon capture, each mammal was anesthetized and the following parameters were noted: capture point coordinates, species, sex, weight, biometrical measurements and

the status of external sexual characters. The individuals were then released at capture point. In cases when species identification could not be made with accuracy in the field, the specimens were studied in the laboratory, using dentition as criteria for identification [20, 21, 27]. The number of species captured in the whole area was calculated, as well as the number of species in both locations and in each different habitat. The species diversity and distribution of small mammals in the habitats were evaluated applying Shannon's (H) and Simpson's (c) indices [9, 10, 16]. The abundance was evaluated according to the number of individuals caught in 100 trap-nights (ind./100 trap-nights) [17]. In Păstăraia Valley, the traps were active between 29.07.2002 and 03.08.2002 resulting in a number of 600 trap-nights. The traps in Huşuieru Valley were active between 17.07.2003 and 22.07.2003 resulting in a number of 600 trap-nights, with a total of 1,200 trap-nights on both locations.

Results and discussions. *Species composition and the diversity of small mammal communities.* During the two years of investigations were captured 200 small mammals belonging to 2 orders and 8 species. In Păstăraia Valley, we captured 105 individuals and 95 in Huşuieru Valley (Table 1).

Table 1

The species and number of individuals captured in Păstăraia and Huşuieru Valleys, and their relative abundance

No. Crt	Species/number of individuals	Păstăraia Valley	Huşuieru Valley	Total no. of individuals	Relative abundance %
	Order Insectivora				
1	<i>Crocidura leucodon</i>	0	9	9	4.5
	Order Rodentia				
2	<i>Microtus arvalis</i>	18	9	27	13.5
3	<i>Clethrionomys glareolus</i>	0	5	5	2.5
4	<i>Apodemus agrarius</i>	8	0	8	4.0
5	<i>Apodemus flavicollis</i>	19	28	47	23.5
6	<i>Apodemus sylvaticus</i>	60	39	99	49.5
7	<i>Myoxus glis</i>	0	1	1	0.5
8	<i>Dryomys nitedula</i>	0	4	4	2.0
	Total	105	95	200	

The *Insectivora* order represents 4.5% of the total captured individuals, being represented by one single species. The rest of 95.5% are rodents, the majority being the species of the *Muridae* family (77%), followed by *Arvicolidae* (16%), the smallest percentage being held by the *Myoxidae* family (2.5%).

Small mammals occupy distinct kinds of biotopes according to their specific ecological requirements. The species and number of individuals captured in Păstăraia Valley was different according to the type of habitat investigated (Fig. 4), as follows:

1) Woodland of sessile oak and hornbeam	
<i>Apodemus flavicollis</i>	7
<i>Apodemus sylvaticus</i>	27
2) Meadow	
<i>Microtus arvalis</i>	17
<i>Apodemus agrarius</i>	7
<i>Apodemus flavicollis</i>	4
<i>Apodemus sylvaticus</i>	9
3) Overgrazed pasture	
No captures	
4) Pasture with thorny shrubs	
<i>Microtus arvalis</i>	1
<i>Apodemus flavicollis</i>	6
<i>Apodemus sylvaticus</i>	14
5) Ecotone	
<i>Apodemus agrarius</i>	1
<i>Apodemus flavicollis</i>	2
<i>Apodemus sylvaticus</i>	10

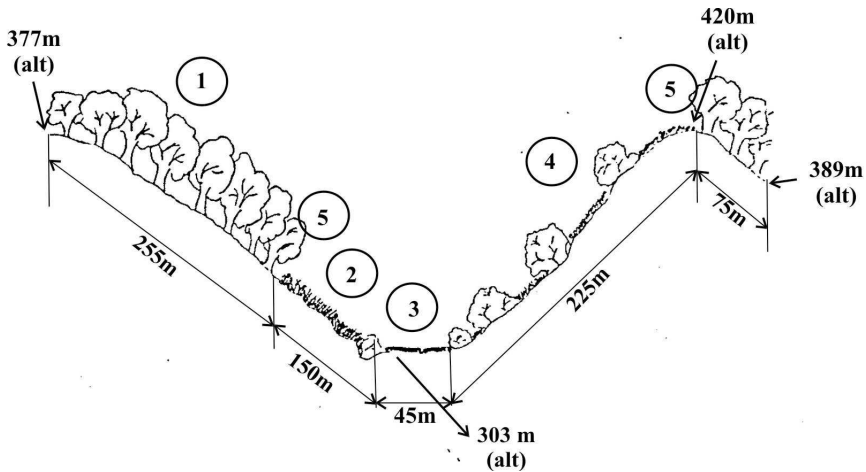


Fig. 4. The trap-lines position and the repartition of habitats in Păstăraia Valley
 Numbers 1-5 represents the habitats mentioned above

In Hușuieru Valley, the species and number of individuals captured varied according to the habitat type (Fig. 5) as follows:

1) Woodland of sessile oak and hornbeam	
<i>Clethrionomys glareolus</i>	3
<i>Apodemus flavicollis</i>	11
<i>Apodemus sylvaticus</i>	17
<i>Myoxus glis</i>	1
<i>Dryomys nitedula</i>	1

SMALL MAMMALS DIVERSITY IN TRANSYLVANIAN PLAIN

2) Meadow	
<i>Crocidura leucodon</i>	4
<i>Microtus arvalis</i>	6
<i>Apodemus flavicollis</i>	6
<i>Apodemus sylvaticus</i>	2
3) Pasture with thorny shrubs	
<i>Crocidura leucodon</i>	3
<i>Microtus arvalis</i>	3
<i>Apodemus flavicollis</i>	4
<i>Apodemus sylvaticus</i>	11
4) Oak woodland	
<i>Clethrionomys glareolus</i>	2
<i>Apodemus flavicollis</i>	5
<i>Apodemus sylvaticus</i>	9
<i>Dryomys nitedula</i>	3
5) Ecotone	
<i>Crocidura leucodon</i>	2
<i>Apodemus flavicollis</i>	2

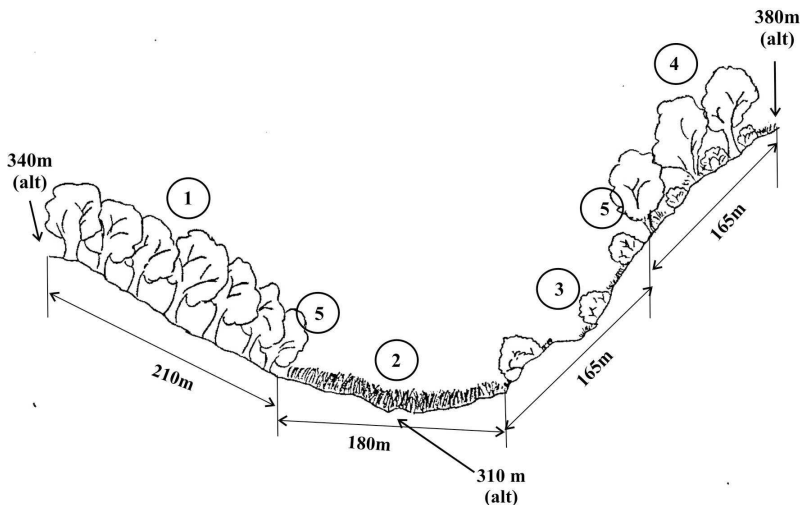


Fig. 5. Trap-lines position and the repartition of habitats in Huşuieru Valley
Numbers 1-5 represents the habitats mentioned above

The faunistic spectrum was quite different in the two areas. *Crocidura leucodon*, the only species of *Insectivora* captured during this research, was found only in Huşuieru Valley. *Clethrionomys glareolus*, *Myoxus glis* and *Dryomys nitedula* are missing from our captures in Păstăraia Valley, while *Apodemus agrarius* could not be caught in Huşuieru Valley.

Our research revealed that the small mammal community dwelling in the Huşuieru Valley had a relatively high diversity of species ($H=1.907$; $c=0.273$) compared to Păstăraia Valley, that shows a rather low species diversity ($H=1.112$;

$c=0.392$). These results might have appeared due to microhabitat differences between the two areas where trap-lines were set and due to the presence in Huşuieru Valley of fragments of the old oak forest, a habitat with the value of diversity indices bigger than for the entire Păstăraia Valley (Table 2). The species diversity in Huşuieru Valley is similar to the one found in Răcăţiu area (Apuseni mountains, Romania), situated at a much higher altitude (1,219 m), in mixed forest habitat type [4].

Our research showed that the highest specific diversity was recorded in the meadows (Table 2, Fig. 6). It seems that the meadow, with large number of tall herbaceous plants, offers better ecological conditions for small mammals than the other habitats investigated. Specific diversity in the meadows of the Fizeş Basin is greater ($c=0.269$) than in the natural meadows (with quite similar plant species) of Eastern Lithuania ($c=0.453$), in the Moletai district [17], probably due to climatic differences between the two areas.

The second habitat, in terms of species diversity, in the Fizeş Basin, was the oak woodland (Table 2, Fig. 6). The faunistic spectrum differs from a similar habitat in the Someşul Mic Basin (Transylvanian Plain) where only *Apodemus* species were caught, possibly because "they have removed other species by interspecific competition or, the other species, having a low abundance, didn't have the possibility to be caught" [3]. Beside *Apodemus* species, we captured *Clethrionomys glareolus* and *Dryomys nitedula*.

The pasture with thorny shrubs in the Fizeş Basin had lower species diversity, $c=0.425$, $S=4$ (Table 2) than in the similar habitat in the Someşul Mic Basin, where $c=0.17$ and $S=8$ [3]. The four species captured in the Fizeş Basin were actually the dominant ones in the Someşul Mic Basin. The absence of *Apodemus agrarius* in our captures might be related to the fact that no traps were placed in its preferred biotopes, which are cultivated fields [27] and damp habitats [21, 14]. *Microtus agrestis* could not be captured because it is a hygrophilous species which prefers high humidity and low temperature biotopes [22]. *Sorex araneus* and *Crocidura suaveolens* did not occur in our captures, although the habitat conditions seemed favourable for both species [20, 25].

The species diversity in ecotone habitats (forest-meadow, forest-pasture with thorny shrubs) was slightly higher than in pasture with thorny shrubs (Table 2), although the number of species captured was equal.

The lowest species diversity was recorded in the woodland of sessile oak and hornbeam (Table 2). This might be due to the lack of undergrowth and the rather poor herbaceous vegetation, habitat features that are important for the distribution and density of most small mammal species.

In the overgrazed pasture, no small mammal individual could be captured. Overgrazing gives birth to an even layer of short grasses with fewer flowers, having normally low value for small mammals [1]. Short grassy vegetation fails to provide shelter for small mammals, which are much more exposed to predators like *Buteo buteo*, *Falco tinnunculus* and *Lanius excubitor*.

Table 2

The species structure of small mammal communities in different habitats

Habitat	S	N	Shannon H'	Simpson c
Sessile oak-hornbeam woodland	5	67	0.894	0.506
Meadow	5	55	1.45	0.269
Pasture	0	0	-	-
Pasture with thorny shrubs	4	42	1.06	0.425
Oak woodland	4	19	1.23	0.333
Ecotone	4	17	1.07	0.419
Păstăraia Valley	4	105	1.122	0.392
Huşieru Valley	7	95	1.907	0.273
Overall area	8	200	1.421	0.323

S- number of species, N- number of individuals, H- Shannon's index, c- Simpson's index

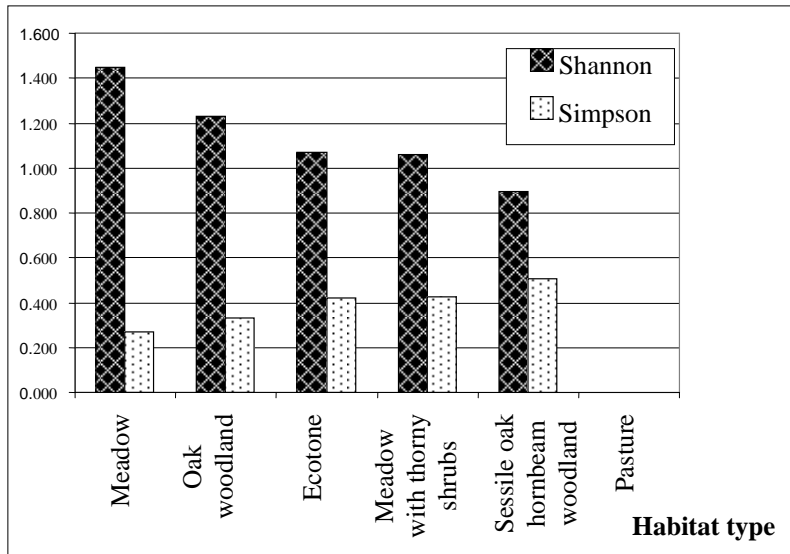


Fig. 6. The variation of biodiversity indices related to the type of habitat

The abundance and distribution of small mammals. The abundance of small mammals in the investigated habitats is variable and reflects the existence of suitable life conditions for certain species. The highest abundance of small mammal species was recorded in the meadow and ecotone areas and the lowest in the pasture with thorny shrubs (Table 3).

The meadow was the habitat with the greatest number, highest diversity and abundance of small mammal species. Lack of grazing in the beginning of summer allows many plants to bloom [1] and therefore offering a rich and diverse trophic source and shelter for small mammals.

Table 3

The abundance of species, expressed in number of individuals captured in 100 trap-nights/ habitat type

Species / Habitat	Woodland of sessile oak-hornbeam	Meadow	Degraded pasture	Pasture with thorny shrubs	Oak woodland	Ecotone
<i>Crocidura leucodon</i>	0	1.8	0	1	0	2.77
<i>Microtus arvalis</i>	0	10.36	0	1.33	0	0
<i>Clethrionomys glareolus</i>	0.68	0	0	0	1.51	0
<i>Apodemus agrarius</i>	0	3.15	0	0	0	1.38
<i>Apodemus flavicollis</i>	4.1	4.50	0	3.33	3.78	5.55
<i>Apodemus sylvaticus</i>	10.04	4.95	0	8.33	6.81	13.88
<i>Myoxus glis</i>	0.22	0	0	0	0	0
<i>Dryomys nitedula</i>	0.22	0	0	0	2.27	0

Ecological characterization of the species captured. Crocidura leucodon, the only *Insectivora* species captured during the research, was identified in the following habitats: meadow, pasture with thorny shrubs and ecotone areas. The species had low overall absolute abundance (5.57 ind./100 trap-nights). The greatest absolute abundance was recorded in ecotone areas (Table 3). Our research confirmed the findings of other studies [20, 12, 6] that the species inhabits open spaces and forest edges, preferring dryer conditions, probably because the insect fauna is richer here.

Microtus arvalis was captured only in open spaces covered with herbaceous vegetation, and it was most abundant in meadows (10.36 ind./100 trap-nights) and least abundant in the pasture with thorny shrubs (1.33 ind./100 trap-nights). Our study confirmed the results of other studies [19, 12, 27] that *M. arvalis* prefers open meadows lacking tree cover, also occupying the grassy places among shrubs on meadows.

Clethrionomys glareolus was captured only in forested habitats, but it had a low abundance (Table 3). The species was more abundant in the oak forest (1.51 ind./100 trap-nights) than in the sessile oak-hornbeam forest (0.68 ind./100 trap-nights). According to M u r r i u [21], the species prefers forests dominated by beech (*Fagus sylvatica*), grown on sunny slopes. I s t r a t e [12] remarked the preference of this species for oak forests with well developed undergrowth. Our research confirmed *C. glareolus* preference for oak forests (still situated on sunny slopes) with a certain amount of undergrowth. M i k l o s [19] also stressed the importance of undergrowth for the presence, density and spatial distribution for *C. glareolus*.

Apodemus agrarius was captured only in meadows and in ecotone areas. The species was most abundant in meadows (3.15 ind./100 trap-nights). The overall abundance of *A. agrarius* was low. According to some authors [21, 14], the species is mostly found in damp habitats. Our investigation did not include wet areas, neither agricultural field, another preferred habitat [27].

Apodemus flavicollis was captured in all investigated habitats. The highest abundance was recorded in ecotone areas (5.55 ind./100 trap-nights), and the lowest in pastures with thorny shrubs (3.33 ind./100 trap-nights). According to some authors [7, 21, 29,], the species is rarely encountered in open spaces, being closely associated with compact forests. The results of a study in Bulgaria [26] showed that *A. flavicollis* was captured mostly in wet forests and in other habitats characterized by high humidity, as for *A. sylvaticus* only on dry slopes and in cultivated fields. Our research showed that the species was present in all investigated biotopes, together with *A. sylvaticus*. I s t r a t e [12] obtained the same results during a research undergone in the Târnava Plateau (Transylvania). During a study in the mosaic landscape of Lithuania [17], the species was captured in meadows, croplands, drainage ditches with high herbaceous vegetation, shore of lakes and alder groves, proving to be a generalist species. *A. flavicollis* presence in the open spaces in our study area might be explained by the close vicinity of forests. The species was the second most abundant in the overall area (21.26 ind./100 trap-nights).

Apodemus sylvaticus was the species with the highest abundance (44.01 ind./100 trap-nights). We captured this species in all investigated habitats. It had the highest relative abundance in all researched habitats (Table 3), excepting the meadow. *A. sylvaticus* is a generalist species, being frequent in deciduous and mixed forests, but also in open areas [21]. The highest abundance was recorded in ecotone areas (13.88 ind./100 trap-nights), and the lowest (5.95 ind./100 trap-nights) in meadows.

A. sylvaticus and *A. flavicollis* are two species phylogenetically and taxonomically closely related, and their ecological preferences are slightly different but overlap [18] and they often live in the same habitat.

Myoxus glis and *Dryomys nitedula* were captured, as expected, only in forested habitats. *D. nitedula* is a species typical for deciduous forests, but might be also encountered in evergreen ones [27]. Both species are forest dwellers, but the estimation regarding their abundance has to be regarded cautiously as we did not set traps in the canopy, their natural habitat.

Conclusions. 1. As a result of the studies undergone during two years in the Fizeş Basin, we identified 8 small mammal species belonging to 2 orders (1 insectivore species and 7 rodents).

2. The efficiency rate of the traps, during our research, was of 16.66%.

3. The highest number of species ($S=5$), as well as the highest species diversity ($H=1.45$; $c=0.269$) and abundance (24.7 ind./100 trap-nights) of the small mammal species were recorded in meadows.

4. In ecotone habitats the abundance of species had a similar value (23.58 ind./100 trap-nights), with that recorded in the meadows but the species diversity was lower ($H=0.894$; $c=0.506$).

5. In the over exploited and heavily grazed pasture no small mammal species could be captured.

6. The most abundant species was *Apodemus sylvaticus* (44.01 ind./100 trap-nights) and the least abundant (excepting the arboreal species) was *Clethrionomys glareolus* (2.19 ind./100 trap-nights).

7. *Apodemus flavicollis* was encountered in every investigated biotope, proving to be a habitat generalist and not a species restricted to forested areas.

REFERENCES

1. Ausden, M., Trewick, J., *Grasslands*, in Sutherland, W., Hill, D. (Eds.), *Managing Habitats for Conservation*, pp.197-229, Cambridge Univ. Press, 1995.
2. Banaru, V., Coroiu, I., *Preliminary data on the micromammalian fauna in the Someşul Mic Basin (Romania) according to Asio otus otus L. pellets*, „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, **42**, (1-2), 1997, 103-108.
3. Banaru, V., Coroiu, I., *Preliminary studies on micromammals fauna from Someşul Mic Basin (Cluj District) - Romania*, „Trav. Mus. Hist. Nat. Grigore Antipa”, **39**, 1997, 241-255.
4. Banaru, V., Coroiu, I., *Preliminary studies concerning the fauna of small mammals in some mountain zones of the Someşul Mic Basin, Apuseni mountains, Romania*. „Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.”, **42**, (1-2), 1997, 97-102.
5. Bieletz, E.A., *Die Fauna der Wirbelthiere Siebenbürgens nach ihrem jetzigen Bestande*, „Verhandl. u. Mittheil. des Siebenbürg. Vereins für Naturwiss. zu Hermannst.”, **38**, 1888, 15-36.
6. Churchfield, S., *The Natural History of Shrews*, Christopher Helm Publish., Kent, 1990.
7. Colli, L., Nieder, L., *Relazioni tra diversità ambientale e popolamenti microterologici negli habitat di Pian Cansiglio (Prealpi venete)*, „Stud. Trentini di Sci. Nat. Acta Biol.”, **78**, (2), 2001, 61-69.
8. Forman, T., *Land Mosaics. The Ecology of Landscapes and Regions*. Cambridge Univ. Press, 1995.
9. Fowler, J., Cohen, L., Jarvis, P., *Practical Statistics for Field Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1998.
10. Hammer, R., Harper, D., Ryan P., *PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. „Palaeontologia Electronica”, **4**, (1), 2001.
11. Ince, A., *Studiu faunistic asupra părţii nordvestice a Cîmpiei Transilvane*, „Rev. Ştiin. V. Adamachi”, **21**, (2-3), 1935, 93-96.
12. Istrate, P., *Les petites mammifères du plateau Târnava, Transylvanie (Roumanie)*. „Trav. Mus. Hist. Nat. Grigore Antipa”, **40**, 1998, 449-474.
13. Jones, C., McShea, W., Conroy, M., Kunz, T., *Capturing Mammals*, in Wilson, D.E., Cole, R.F., Nichols, J.D., Rudran, R., Foster, M.S. (Eds.), *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals*, pp.115-156, Smithsonian Inst. Press, 1996.

14. K e f e l i o g l u, H., T e z, C., G u n d u z, I., *The Taxonomy and Distribution of Apodemus agrarius (Pallas, 1771) (Mammalia: Rodentia) in the European Part of Turkey*, "Turk. J. Zool.", **27**, 2003, 141-146.
15. L a z ă r, C., M ă n ă i l ă, D., G r o z a, G h., *Goruneto-carpinetele din bazinul Fizeşului*, "Bul. USAMV-Cluj-Napoca", **57**, 2002.
16. L u d w i g, J.A., R e y n o l d s, J.F., *Statistical Ecology. A primer on Methods and Computing*, John Wiley & Sons, New York, 1988.
17. M a z e i k y t e, R., *Small mammals in the mosaic landscape of eastern Lithuania: species composition, distribution and abundance*, "Acta Zool. Lithuanica", **12**, (4), 2002, 381-391.
18. M i c h a u x, J., L i b o i s, R., F i l i p p u c c i, M., *So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (Apodemus flavicollis) and the Woodmouse (Apodemus sylvaticus) in the Western Palearctic region*, "Heredity", **94**, 2005, 52-63.
19. M i k l o s, P., Z i a k, D., *Microhabitat selection by three small mammals species in oak-elm forest*, "Folia Zool.", **51**, (4), 2002, 275 – 288.
20. M u r a r i u, D., *Fauna României. Mammalia. Insectivora*, Vol.XVI, (1), pp.71-142, Ed. Acad. Rom., Bucureşti, 2000.
21. M u r a r i u, D., P o p e s c u, A., *Fauna României. Mammalia. Rodentia*, Vol. XVI, (2), pp. 43-212, Ed. Acad. Rom., Bucureşti, 2001.
22. N i s t r e a n u, V., *Microtus agrestis (Mammalia: Rodentia) in Someşul Mic Basin (Cluj District, Romania)*, "Trav. Mus. Hist. Nat. Grigore Antipa", **42**, 2000, 235-242.
23. P o p, L., O l a r, O., G r o z a, G h., *Vegetația unor pajiști din Bazinul Fizeşului*, "Bul. USAMV-Cluj-Napoca", **57**, 2002.
24. P o p, P.G., *Depresiunea Transilvaniei*, Ed. Presa Univ. Clujeană, Cluj-Napoca, 2001.
25. P o p e s c u, A., B a r b u, P., *Date privind răspîndirea și frecvența soricidelor (Soricidae-Insectivora) în România*, „Ocrot. nat. med. înconj.”, **23**, (2), 1979, 163-168.
26. P o p o v, V., *Discriminant criteria and comparative study on morphology and habitat selection of Apodemus sylvaticus (Linnaeus, 1758) and Apodemus flavicollis (Melchior, 1834) (Mammalia, Rodentia, Muridae) in Bulgaria*. "Acta Zool. Bulgarica", **46**, 1993, 100-111.
27. P u c e k, Z., *Keys to Vertebrates of Poland. Mammals*, Polish Scien. Publish., Warszawa, 1981.
28. S ă n d u l a c h e, A l., *Lacurile dulci din Cîmpia Transilvaniei*, Cluj, 1962 (PhD. Thesis).
29. S i m i o n e s c u, V., *Contribuții la cunoașterea sistematicii și răspîndirii geografice a faunei de rozătoare (Glires) din Moldova*, "An. Științ. Univ. Al. Cuza Iași", Biol., **11**, (1), 1965, 127-141.
30. S z a b o, I., *Contribuții la cunoașterea faunei de mamifere mici din partea nord vestică a Republicii Populare Romîne*, "Stud. Univ Babeş-Bolyai, Biol.", **2**, (2), 1960, 119-126.
31. *** *Atlasul solurilor din România*, Ed. Acad. Rom. București, 1966.

STUDIUL GENULUI *OPEGRAPHA* ACH. ÎN ROMÂNIA

KATALIN BARTÓK* și FLORIN CRIȘAN*

SUMMARY. - **Study of the Genus *Opegrapha* Ach. in Romania.** The paper deals with the taxonomic review of the genus *Opegrapha*, eleven species occurring in Romania are presented, the actual nomenclature, synonymy, identification key and ecology are given. For each species distribution map is presented, using the UTM grid system of 50 x 50 km. Among these species, four are rare in Romania: *Opegrapha dolomitica*, *O. gyrocarpa*, *O. lyncea* and *O. vermicellifera*.

Din punct de vedere sistematic, apartenența genului *Opegrapha* este încă discutată. Înainte de 1980 familia *Graphidaceae* cuprindea și acest gen, alături de genurile *Graphis*, *Phaeographis*, *Enterographa*, *Lithographa* și *Xylographa*. După 1980 genul a fost inclus în familia *Opegraphaceae*, ordinul *Arthoniales*, iar în 1995 în familia *Lecanographaceae*, ordinul *Lecanographales*. În 2001 N a s h T. H. [62] include din nou familia *Opegraphaceae* (cuprinzând genurile *Lecanactis*, *Opegrapha* și *Sagenidiopsis*) în ordinul *Arthoniales*. În prezent există clasificări în care genul *Opegrapha* este inclus, alături de genurile *Lecanactis* și *Cresponea* în familia *Opegraphaceae*, ordinul *Opegraphales* [88].

Toate speciile din acest gen prezintă forma biologică crustoasă, epi - sau endofloidică, epi - sau endolitică, caracteristicile principale fiind apotecii liniare, neregulat ramificate, proeminente deasupra talului. Acest corp de fructificație numit histeroteciu, prin forma și dispoziția lui amintește de scrierea cuneiformă, caracter prin care acești licheni pot fi ușor identificați și separați de restul lichenilor.

Descrierea morfologică: tal crustos, în general cortical, rar saxicol, epilitic sau epi - endofloidic, subțire până la gros, de diferite culori: alb, gri, gri-marونی, marونی închis până la măsliniu-verzui, protal adesea prezent sub formă de mozaic. Fotobiontul este *Trentepohlia*. Ascomata constă dintr-o apotecie lirată, alungită, rar rotunjită, ramificată sau stelată, ± sesilă, rar imersată. Excipulul talin lipsește, rareori se dezvoltă un fals excipul talin; excipulul propriu-zis este negru, opac, dispus în mod continuu sub hipoteciu, cu K nu se colorează sau se colorează roșu-bruniu sau măsliniu-verzui, rareori galben-verzui, portocaliu sau alb-pruios. Epiteciul incolor la speciile cu discul apoteciei fisurat, brun la speciile cu apoteciu expus. Himeniul nu se colorează cu I sau poate da o colorație ± roșcat-brună sau ± albastră.

* Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Taxonomie și Ecologie, 400015 Cluj-Napoca, România, E-mail: bartok_katalin@yahoo.com și florincrisan1964@yahoo.com

Hipoteciul incolor până la gălbui pal, cu K nu se colorează sau se colorează ± măsliniu-verzui. Asce cu 8 ascospori, clavat-cilindrice, prezentând uneori un inel apical care se colorează cu I albastru, fisitunicat dehiscente. Ascospori multiseptați, fusiformi sau aciculari, I -, uneori prezentând un perispor subțire, incolori sau ornamentați și roșii-bruni la maturitate.

Chimism: variabil, nu au fost identificați produși lichenici, conțin pigmenți, unele specii conțin acid giroforic.

Ecologie: sunt mai ales specii corticole, pe ritidomul foioaselor tinere și mature (*Fagus*, *Quercus*, *Fraxinus*, *Carpinus*, *Sambucus*), rar pe conifere, în etajul colinar și montan. Mai apar pe stânci adăpostite, acide, neutre sau bazice, rar pe sol sau resturi vegetale. Talul speciilor corticole este în mare parte endofloidic și apare ca o pojghiță subțire, albicioasă sau cafenie, talul speciilor saxicole fiind de obicei mai gros.

Cheia de determinare

1a. Pe piatră.....	2
1b. Pe ritidom.....	5
2a. Atât pe roci calcaroase cât și pe roci silicioase	<i>O. calcarea</i>
2b. Exclusiv numai pe roci silicioase sau numai calcaroase.....	3
3a. Exclusiv pe roci silicioase	<i>O. gyrocarpa</i>
3b. Exclusiv pe roci calcaroase	4
4a. Cu I himeniul și subhimeniul se colorează în oranj-roșu	<i>O. dolomitica</i>
4b. Cu I himeniul se colorează în partea superioară în albastru și bazal în oranj-roșu, iar subhimeniul se colorează în albastru	<i>O. rupestris</i>
5a. Talul nu apare colorat în lumină UV.....	6
5b. Talul în lumină UV apare colorat în albastru.....	<i>O. lyncea</i>
6a. Protalul este prezent	7
6b. Protalul este absent	8
7a. Protal negru, histeroteciu proeminent	<i>O. rufescens</i>
7b. Protal alb-gălbui, ocră sau verde-oliv, rar negru, histeroteciu sesil.....	<i>O. viridis</i>
8a. Înălțimea histerotecielui 90-130 μm	9
8b. Înălțimea histerotecielui maximum 100 μm	<i>O. vulgata</i>
9a. Cu I himeniul nu se colorează.....	<i>O. vermicellifera</i>
9b. Cu I himeniul se colorează.....	10
10a. Cu I himeniul se colorează în albastru	<i>O. atra</i>
10b. Cu I himeniul se colorează în roșu aprins	<i>O. varia</i>

O. atra Pers. in Neue Ann. Bot., I. Stück, 1794, p. 20, tab. I, fig. 28. - *O. denigrata* var. *atra* Ach., Lichenogr. Univers., 1810, p. 260 et in Kgl. Vetensk.-Akad. Nya Handl., 1809, p. 101. - *O. cerasii* Chev. in Journ. Phys., Chim., Hist. Nat., vol. XCIV, 1822, p. 38 (non Pers.). - *Graphis scripta* var. *atra* Galloë in Bot. Tidsskrift, vol. XXVIII, 1908, tab. X, fig. 50.

Ecologia: specie comună, frecventă pe ritidomul de *Fagus*, *Fraxinus*, *Carpinus*, *Sambucus*, *Ilex*, rară pe conifere. Se dezvoltă optim în pădurile din etajul colinar și montan inferior (între 650-800 m altitudine), relativ bogate în precipitații. Specie fotoschiafilă-moderat schiafilă, xeromezofilă-mezofilă, moderat termofilă, moderat acidofilă L₄U₄T₆R₄.

Distribuția în România (Fig.1).

Județul Arad: Slatina de Mureș ES-91, Bîrzava ES-70, Cladova ES-50 [11].

Județul Bacău: Valea Oituzului MM-71, Valea Uzului MM-61/71, Ocloș MM-42, Pârjol MM-65/66/75/76, Dealul Măgura MM-62/72, Coșnea MM-24 [70], Poiana Sărăriei, Izvorul Alb, Dealul Prihodiștei, Plaiul Mocanului MM-42 [58].

Județul Bistrița-Năsăud: Arcalia KN-91 [22], Valea Satului LN-27 [7].

Județul Bihor: Vârful Răchita FS-35/36 [4], Valea Bulzului FS-28 [2], Valea Sighișel, Dealul Cornului, Zece Hotare FS-07/17/27 [40].

Județul Botoșani: Pădurile Horlăceni, Gorovei, Văculești MP-50, Vârful Câmpului [19], Hilișeu MP-50/51, Pădureni MP-41 [15].

Județul Brașov: Munții Făgăraș LL-25/35, Muntele Podragu LL-25 [49].

(București): Pădurea Snagov MK-21 [57].

Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [64, 65].

Județul Hunedoara: M-ții Poiana Ruscă sub Vf. Ruscata, Lunca FR-15/16 [2003 Hb BK].

Județul Iași: Pădurea Bîrnova NN-41 [77].

Județul Caraș-Severin: Remetea-Pogănici ER-63/64 [79], Băile Herculane FQ-17 [13, 35, 39, 47, 52, 53, 55, 61, 80, 81, 82], Belobreșca, Dealul Glavcina EQ-45, Valea Țigansca-Reca EQ-55 [72], Pescari EQ-54, Cozla EQ-84 [19], Mehadia, Muntele Străjuc FQ-16/17 [35, 39, 81], Muntele Domogled FQ-16/17 [13, 35, 39, 47, 81], Mihald FQ-07 [49].

Județul Cluj: Grădina Botanică din Cluj FS-97/98/GS-08 [33,49], Pădurea Baciou FS-98 [6], Valea Ierii FS-76/86 [9].

Județul Mehedinți: Plavișevița EQ-93 [13, 35, 39, 47, 52, 81].

Județul Neamț: Munții Ceahlău MN-20 [64,66], Pădurea Humăriei MN-52 [84], Gura Bărzăuței MM-50 [70].

Județul Suceava: Munții Rarău LN-95, Vârful Bodia, Piciorul Crestăturii, Turnuri, Piatra Zimbrului, Valea Seacă LN-95 [64, 83].

Județul Sibiu: lângă Sibiu KL-77/87 [45,46].

Județul Tulcea: Pădurea Letea PL-91 [12, 36, 39, 74]

Județul Vaslui: Pădurea Lipovăț NM-55, Pădurea Căpușeni NM-55 [84], Pădurea Dobrovăț NM-56 [39, 77].

Județul Vrancea: Pădurea Anghelești NM-00 [70], Pădurile Călugărescu, Urechești, Cioara NM-10 [70, 71].

Fără localitate: Transilvania [41, 43], Maramureș [47, 76], județul Suceava [41, 43].

O. calcarea Sm. in Engl. Bot., vol. XXV, 1807, tab. 1790. - *Opegrapha chevallieri* Leight. in Ann. and Magazin Nat. Hist., ser. 2., vol. XIII, 1854, p. 90, tab. V, fig. 4. - *O. trifurcata* var. *calcarea* Arn. in Flora, vol. LXVII, 1884, p. 662.

Ecologia: saxicolă, pe roci calcaroase sau silicioase în locuri umede, în etajul colinar și pe substrat antropogen (tencuieli), pereții clădirilor vechi. Specie rară. Schiafilă, mezofilă-mezo-higrofilă, micro-mezotermă, subneutrofilă-moderat bazofilă. L₂U₆T₅R₈.

Distribuția în România (Fig.2).

Județul Bistrița-Năsăud: Munții Rodnei LN-17/27 [28, 35, 39], Rodna LN-35 [35, 39, 81], Valea Vinului LN 35/36 [86].

Județul Alba: Cheile Întregalde FS-82 [28,29,30], Piatra Singuratică FS-93 [32].

Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [64].

Județul Suceava: Pietrele Doamnei LN-95 [64].

Județul Vâlcea: M-ții Buila KL-61 [29,30], M-tele Albu GR-21 [29].

Fără localitate: Maramureș [51,81].

O. dolomitica (Arnold) Körb. in Parerg. Lich., 1861, p. 251- *O. rupestris* var. *dolomitica* Arnold in Flora, vol. XLIII, 1860, p. 78. - *O. saxicola* f. *dolomitica* Arnold in Flora vol. LXVII, 1884, p. 660.

Ecologia: saxicolă, de obicei pe fețele verticale sau pe surplombele stâncilor. Xerofilă, bazofilă. U₂R₉.

Distribuția în România (Fig.3).

Județul Caraș-Severin: Muntele Domogled FQ-16/17 [49]

O. gyrocarpa Flot. in Flora, vol. VIII, 1825, p. 345. *O. rupestris* var. *arenaria* Stein apud Cohn, Kryptog.-Flora von Schlesien, vol. II, 2. Halfte, 1879, p. 268.

Ecologia: saxicolă, exclusiv pe roci silicioase. Schiafilă, higrofilă, micro-mezotermă, moderat acidofilă-subneutrofilă. L₂U₈T₅R₆.

Distribuția în România (Fig.4).

Județul Brașov: M-tele Solomon lângă Brașov LL-85/95 [39], M-ții Piatra Craiului LL-54/64 [39,53,54]

O. lyncea (Sm. In Sm & Sowerby) Borrer in Hooker in Sm., Engl. Flora, vol. V, 1833, p.144.- *Lichen lynceus* Sm. apud Sm. et Sowerb., Engl. Bot., vol. XII, 1801, tab. 809. - *Lecanactis lyncea* Fr., Lichenogr. Europ. Reform., 1831, p. 375.

Ecologia: pe ritidom uscat, rugos de *Quercus* sau neted de *Fagus*, expus la iluminare directă, ± abundentă în parcuri. Puternic fotofilă L₉.

Distribuția în România (Fig.5).

Județul Bihor: La Morminți FS-36 [4].

Județul Caraș-Severin: Băile Herculane, Valea Cernei FQ-17 [35,39,49,56,81, MNH BP 1151, BP 78622, Lojka 1877].

Județul Hunedoara: M-ții Poiana Ruscă sub Vf. Ruscata, Lunca FR-15/16, [2003 Hb BK].

O. rufescens Pers. in Neue Ann. Bot., I. Stück, 1794, p. 29, tab. II, fig. 3. – *O. herpetica* Ach., Method. Lich., 1803, p. 23, in Kgl. Vetensk.- Akad. Nya Handl., 1808, p. 98. – *O. siderella* Ach., Method. Lich., 1803, p. 25, in Kgl. Vetensk.- Akad. Nya Handl., 1808, p. 100.

Ecologia: specie cosmopolită, în locuri umbrite, pe ritidomul bogat în nutrienți de *Fraxinus*, *Fagus*, *Corylus*, *Acer*, *Ulmus*, foarte rară pe conifere. Moderat schiafilă, xeromezofilă-mezofilă, micro-mezotermă, moderat acidofilă-subneutrofilă. L₃T₅U₄R₆.

Distribuția în România (Fig.6).

Județul Arad: Slatina de Mureș ES-91 [11], Arad ES-20/21 [49], Radna ES-50 [35, 39, 49,76,81], Bîrzava ES-70 [11].

Județul Alba: M-ții Sebeșului FR-95 [35,38,39,42,81], M-tele Dealul Rece FR-96 [42,81].

Județul Bacău: Oituz MM-71, Pârjol MM-65/66/75/76, Târgu Ocna, Dealul Măgura MM-62/72 [70].

Județul Bistrița-Năsăud: Arcalia KN-91 [22,24].

Județul Botoșani: Dersca MP-41, Lozna MP-41, Hilișeu MP-50/51 [15].

Județul Brașov: Valea Mălăești LL-83 [35,39,81,86,87].

Județul Caraș-Severin: Belobreșca, Dealul Glavcina EQ-45 [39,72].

Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [64].

Județul Hunedoara: M-tele Aușelul FR-94 [35,38,39,42,81], Dealul Donea FR-87 [42], Valea Nucșoarei FR-53 [53,55], Gura Zlata FR-42 [10,35,39,81,87, MNH BP 61665 Fóriș 1913], Cugir, Domnea FR-87 [MNH BP 61644 Fóriș 1912], M-ții Poiana Ruscă sub Vf. Ruscata, Lunca 2003, FR-15/16, [2002 Hb BK].

Județul Iași: Pădurea Repedea NN-41 [39,77].

Județul Maramureș: Cicârlău FT-78/88 [MNH BP 61654, MNH BP 61647 Fóriș 1941].

Județul Mureș: Sân-Mihai de Pădure LM-37 [48].

Județul Neamț: M-ții Ceahlău MN-20 [64,66], Pădurea Humăriei MN-52 [39,77,84], Izvorul Muntelui MM-29 [64].

Județul Suceava: M-ții Rarău, Duruitoarea, Poiana Sihăstriei, Valea Seacă, Piciorul Maicilor LN-95 [64].

Județul Vaslui: Pădurea Căpușneni NM-55, Pădurea Gâdeasa NM-40 [39,77,84].

Fără localitate: Maramureș [51,81], județul Mureș [87].

O. rupestris Pers. in Neue Ann. Bot., I. Stück, 1794, p. 20. – *O. centrifuga* A. Massal, Miscell. Lich., 1856, p. 48. – *O. personii* Ach., Method. Lich., 1803, p. 17. – *O. saxicola* Ach., Synops. Lich., 1814, p. 71. – *O. saxatilis* DC. apud Lam. et DC., Flore Franc., edit. 3., vol. II, 1805, p. 312 et Synops. Plant., 1806, p. 66.

Ecologia: saxicolă, exclusiv calcaroasă. Foto-schiafilă - moderat fotofilă, mezo-higrofilă, moderat termofilă, bazofilă. L₆U₇T₆R₉.

Distribuția în România (Fig.7).

Județul Alba: Piatra Singuratică FS-93 [32], Cheile Râmețului GS-03 [28,32], Dealul Măgura FR-96 [68], M-tele Vulcan FS-52, Cheile Cibului FS-70, Cheile Bulzești FS-73, Scărița-Belioara FS-44 [28].

Județul Bacău: Târgu Ocna, Dealul Măgura MM-62/72, Valea Slănicului MM-51 [70].

Județul Bihor: Măgura Băiței FT-10 [27,28], Vadu Crișului FT-10 [28].

Județul Brașov: M-tele Solomon LL-54/55/64 [39,63], M-ții Piatra Craiului LL-54/55/64 [35,39,50,53,54,63], M-tele Arpaș LL-15/25 [35,39,44,45,47,50,81], Valea Crepătura LL-64 [86].

Județul Caraș-Severin: Băile Herculane, Valea Cernei FQ-17 [35,39,81,82, MNH BP 35564 Lojka 1877], M-tele Domogled FQ-16/17 [35,39,81,82], Pescari EQ-54, Cozla EQ-84 [19], Mehadia FQ-07 [49,81], Defileul Jelărău FQ-16/17 [82].

Județul Cluj: Cheile Turului GS-06/16 [20,28], Cheile Turzii GS-06 [28], M-tele Mare FS-75 [21], M-tele Pietrele Albe FS-38 [31], M-ții Piatra Roșie FS-83 [28].

Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [14,64], Gura Bicăjelului MM-08/18 [17].

Județul Hunedoara: Cheile Crăciunești FR-49 [28], Vârful Ceret FR-69 [26], Godinești FR-19 [28], Ohaba-Ponor FR-64 [MNH BP 35652 Lojka].

Județul Mehedinți: Ieșelnița FQ-05 [2002, 2004 Hb BK].

Județul Suceava: Pietrele Doamnei LN-95 [64].

Județul Sibiu: M-ții Făgărașului LL-15 [35,39,44,45,47,50,81].

Fără localitate: județul Brașov [87].

O. varia Pers. in Neue Ann. Bot., I. Stück, 1794, p. 30. – *O. cymbiformis* Flk. apud Hepp., Flecht.-Flora von Würzburg, 1824, p. 75. – *O. rimalis* Pers. apud Ach. in Kgl. Vetensk.- Akad. Nya Handl., 1809, p. 101.

Ecologia: specie corticolă, apare mai ales pe ritidomul arborilor cu pH neutru sau acid (*Fraxinus*, *Tilia*, *Quercus*, *Carpinus*, specii de pomi fructiferi), rar pe conifere. Moderat-schiafilă, mezofilă, moderat termofilă, moderat acidofilă-subneutrofilă. L₄U₅T₆R₆.

Distribuția în România (Fig.8).

Județul Alba: Hususău KM-71 [35,39,81], M-ții Sebeșului FR-95, M-tele Dealul Rece FR-96 [35,39,42,81].

Județul Arad: Arad ES-20/21 [35,39,49,72], Radna ES-50 [49], Slatina de Mureș ES-91 [11], fără localitate [MNH BP 1146 Hazslinszky].

- Județul Bacău: Târgu Ocna, Dealul Măgura MM-62/72, Valea Slănicului MM-51, Pădurea Cetățuia NM-00 [70], Vârful Tărhăuș NM-36 [67], Dealul Perchin MM-82, Valea Cașin NM-71/81, Zemeș MM-55, Valea Uzului NM-61/71, Coșnea MM-24, Pârjol MM-65/66/75/76, Oituz MM-71, Pralea MM-80, Camânca MM-35 [70], Plaiul Mocanului, Dealul Prihodiștei, Muntele Cleja MM-42 [58].
- Județul Bihor: Valea Bulzului FS-28 [2], la Morminți FS-36, Vârful Răchita FS-35/36 [4].
- Județul Bistrița-Năsăud: Arcalia KN-91 [22,24], Valea Vinului LN-35/36, M-ții Rodnei LN-17/27 [86], Valea Satului LN-27 [7].
- Județul Botoșani: Dersca MP-41, Pădureni MP-41 [15].
- Județul Brașov: Brașov LL.85/95 [34,39,45,74,85], Predeal LL-83 [34], M-ții Piatra Craiului LL-64 [49], M-ții Bucegi LL-73/LL-82 [34].
- Județul Caraș-Severin: Remetea-Pogănici ER-63/64 [35,79,81], Pescari EQ-54, Cozla EQ-84 [19], Băile Herculane Valea Cernei FQ-17 [35,39,49,53,55,80,81,82], M-tele Domogled FQ-16/17 [35,39,49,53,55,81], Belobreșca EQ-45 [39,72].
- Județul Cluj: lângă (Cluj) [35,39,49,81], Grădina Botanică din Cluj FS-97/98/GS-08 [33, MNH BP 51393 Codoreanu, Micle 1960], Ciucea FT-30 [35,39,81].
- Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [63], lângă Căpâlnița LM-93/94 [1], Piatra Poeni și Polițele Bardoșului MM-08 [64].
- Județul Hunedoara: M-tele Aușelul FR-94 [35,39,42,81], Valea Colți FR-42/43 [35,39,63,78,81], Valea Râușor FR-43 [55], Deva FR-48 [49], Valea Valeriasca FR-42/43 [39,82], Gura Zlata FR-42 [35,81,87], Suseni FR-43 [35,39,47,52,53,81], lângă Hunedoara FR-46/47 [35,39,42,49,81], Cugir FR-87 [MNH BP 61820, BP 50787, BP 61755 Fóris 1913].
- Județul Iași: Pădurea Bârnova NN-41 [77], Dealul Mare-Hârlău MN-95 [16], Grajduri NM-40 [77].
- Județul Maramureș: M-ții Maramureșului LN-29/GT-18, Cicârlău FT-78/88 [39, 43, 81, MNH BP 1697 Fóris 1913, BP 35580, BP 61813, BP 61811 Fóris 1918].
- Județul Mehedinți: Ogradena EQ-93, Cazanele Mici EQ-93/FQ-04 [61], Ieșelnița FQ-05 [2002, 2004 Hb BK].
- Județul Mureș: Sân-Mihai de Pădure LM-37 [48].
- Județul Neamț: Poiana Faloni MN-20 [64], Pădurea Cârligata MN-80 [16], Valea Tărcuței MM-37 [67], Gura Bărzăuței MM-50 [69], Izvorul Muntelui MM-29 [64], Pădurea Bălănești MM-79 [84].
- Județul Prahova: Sinaia LL-81/82 [39,45,74,85], M-ții Ciucaș Pădurea Zăganul ML-13 [39,73,75], M-ții Bucegi LL-73/LL-82 [34].
- Județul Satu-Mare: Bixad FU-71/81 [MNH BP 61804 Fóris 1941], Livada FU-50/60 [MNH BP 61730 Fóris 1938].
- Județul Sibiu: Sibiu KL-77/87 [39,81,86,87], Hususău KM-92 [43], Valea Cârțișoarei LL-16 [49,53,55], M-ții Cibinului KL-62/63 [60].
- Județul Suceava: Codrul secular Slătioara MN-04 [78], Masivul Rarău LN-95, Dealul Prașca, Poiana Sihăstriei, Valea Seacă LN-95 [64,83].

Județul Tulcea: Babadag PK-37[12].

Județul Vaslui: Pădurea Dobrovăț NM-56 [77], Pădurea Cociuba NM-40 [84].

Județul Vrancea: Pădurea Călugărescu NM-10 [70,71], Pădurea Cioara NM-10 [71].

Fără localitate: Transilvania [45,47], jud. Hunedoara [49].

O. vermicellifera (Kunze) J.R.Laundon, Lichenologist 2, 1963, p.139. - *Pyrenotheca vermicellifera* Kunze (in Reichenb. et Schub.) Lich. Exs. V., nr. 60, 1823 - *O. fuscella* (Fr.) Almb., Bot. Not. Suppl. 1 (2): 1948, p.1-254,. - *Pyrenotheca vermicellifera* Fries, Lichenographia Europea reformata Praemittuntur lichenologiae fundamenta. Lundae, 1831, p. 451.

Ecologia: corticolă, pe foioase, în special pe trunchiuri umbrite de *Ulmus*. Moderat schiafilă, xero-mezofilă-mezofilă, moderat termofilă, moderat acidofilă. L₃U₄T₇R₅.

Distribuția în România (Fig.9).

Județul Caraș-Severin: Băile Herculane FQ-17 [MNH BP 35596 Lojka 1874].

O. viridis Pers. apud Ach., Method. Lich., 1803, p. 22. – *O. viridescens* Rohling, Deutschl. Flora, vol. III, 2. Abth., 1813, p. 52. – *Zwackhia involuta* Korb., Syst. Lich. German., 1855, p. 286, tab. IV, fig. 3a et Parerg. Lich., 1861, p. 255.

Ecologia: specie corticolă, pe ritidomul foioaselor, comună în special pe ritidomul crăpat al copacilor tineri, la baza tulpinii, cel mai des pe *Carpinus*, *Fraxinus*, *Acer*, *Corylus*, *Ilex*, *Salix*. Moderat schiafilă, mezofilă, moderat termofilă, moderat acidofilă - subneutrofilă. L₃U₅T₇R₆.

Distribuția în România (Fig.10).

Județul Bacău: Valea Oituzului MM-61/71, Valea Uzului MM-61/71, Cașin MM-71/81, Zemeș MM-55, Coșnea MM-24, Pralea MM-80, Camânca MM-35, Pădurea Urechești NM-10, Dealul Măgura MM-62/72 [70], Plaiul Mocanului MM-42 [58].

Județul Bihor: Valea Bulzului FS-28 [2], Vârful Răchita FS-35/36 [4], Remeți FS-28 [5], Zece Hotare, Dealul Mare, Dealul Vasului, Valea Sighileș, Dealul Cornului, Valea Peștiș, Dâmbul Pietroasa FS-09/49-05/45 [40].

Județul Bistrița-Năsăud: Arcalia KN-91 [22,24], Valea Vinului LN-35/36 [86], M-ții Rodnei LN-17/27 [35,39,81], Valea Satului LN-27 [7], Rodna Veche LN-35/36 [35,39,81,86,87].

Județul Botoșani: Dersca, Pădureni MP-41, Hilișeu MP-50/51 [15], Vârful Câmpului MP-50, Pădurile Horlăceni, Gorovei, Văculești MP-50 [18].

Județul Brașov: lângă Predeal LL-83/84, M-ții Bucegi LL-73/LL-82 [39,85].

Județul Caraș-Severin: Valea Cernei Băile Herculane FQ-17 [35,39,56,61,81], Cozla EQ-84, Pescari EQ-54 [19], Defileul Jelărău FQ-16/17 [35,39,56,72].

Județul Cluj: Pădurea Baci FS-98 [6], Valea Ierii FS-76/86 [7], Dealul Capra FS-38/39 [5].

- Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [65], Cheile Mici MM-08 [17,64].
Județul Hunedoara: M-ții Retezat FR-42/43 [10,35,39,81], Valea Râului Bărbat FR-63 [55,81].
Județul Maramureș: M-ții Maramureșului LN-29/GT-18, Cicârlău FT-78/88 [39,43,81, MNH BP 61743 Főriss 1918].
Județul Neamț: Gura Bărzăuței MM-50 [70], Izvorul Muntelui MM-29 [64], Masivul Ceahlău MN-20 [66].
Județul Prahova: M-ții Bucegi LL-73/LL-82 [34].
Județul Sibiu: Valea Cârțișoarei LL-16 [53,55], M-ții Cibinului KL-62/63 [60].
Județul Suceava: Masivul Rarău LN-95 [83], Dealul Prașca, Poiana Sihăstriei, Valea Seacă, Piciorul Scurt LN-95 [64].
Județul Vrancea: Pădurea Cioara, Pădurea Urechești NM-10 [71].
 Fără localitate: Maramureș [51], Transilvania [87].

O. vulgata Ach., Method. Lich., 1803, p. 20 in Kgl. Vetensk.- Akad. Nya Handl., 1809, p. 100, Lichenogr. Univers., 1810, p. 255 et Synops. Lich., 1814, p. 73. – *O. cinerea* Chevall. in Journ. Phys., Chim., Hist. Nat., vol. XCIV, 1822, p. 41. – *O. vulgata* var. *cinerea* Blombg. et Forss., Enumer. Plant. Scand., 1880, p. 102.

Ecologia: specie corticolă, pe ritidom cu pH acid, cel mai des pe conifere, rar pe *Fagus*, *Carpinus*, *Fraxinus*, pe pante abrupte și pe *Acer*. Moderat schiafilă, higrofilă, micro-mezotermă, acidofilă. $L_3U_8T_5R_3$.

Distribuția în România (Fig.11).

- Județul Alba: Vidra FS-43, Avram Iancu FS-33/43 [25], M-ții Sebeșului FR-95 [39], M-tele Detunata FS-72 [39,81,82].
Județul Arad: Arad ES-20/21 [35,39,76,81], Slatina de Mureș ES-91 [11].
Județul Caraș-Severin: Valea Cernei Băile Herculane FQ-17 [39,63 MNH BP 35621 Lojka 1877, 35625 Lojka 1874], Mehadia FQ-07 [MNH BP 78671, 35676 Lojka], Cozla EQ-84, Pescari EQ-54 [19], M-tele Străjuc FQ-16/17 [39,73,75].
Județul Gorj: Gureni FQ-69 [39,63].
Județul Harghita: Cheile Bicazului MM-08 [64].
Județul Hunedoara: Valea Colți FR-42/43 [35,39,63,81,82], Valea Râușor FR-43 [39,55,63], Valea Valeriasca FR-42/43 [82], Valea Râul Mare FR-32 [35,39,47, 52,53,63,81], Valea Râul de Mori FR-43 [47], Deva FR-48 [35,37,39,49,81].
Județul Maramureș: Săpânța GU-01 [MNH BP 61668 Főriss 1943], Cicârlău, FT-78/88 [MNH BP 61735, 61673 Főriss 1918].
Județul Mehedinți: Cazanele Mici EQ-93/FQ-04 [61].
Județul Neamț: Izvorul Muntelui NM-29, Masivul Ceahlău MN-20 [64].
Județul Sibiu: M-ții Cibinului KL-62/63 [60].
Județul Suceava: Masivul Rarău, Stâncile Runculiciorului, Piciorul Nicanului, Piciorul Maicilor, Piciorul Odăii, Pietrele Doamnei LN-95 [64].
Județul Vâlcea: Valea Călinești KL-82 [23].
Județul Vrancea: Pădurea Cioara NM-10 [71].
 Fără localitate: județul Cluj [87], Maramureș [51].

BIBLIOGRAFIE

1. B a r t h, J., *Harghita hegység és szomszédságának flórája II*, Lichenes, "Magy. Bot. Lapok", IV, (Budapest), 1905, 9-12.
2. B a r t ó k, K., *Influența poluării atmosferice asupra florei lichenologice din zona industrială a Zlatnei*, "Contrib. Bot.", (Cluj-Napoca), 1980, 195-199.
3. B a r t ó k, K., *Flora și vegetația lichenologică a făgetelor din Munții Bihorului*, "Stud. Cerc. Biol. Ser. Biol. Veg.", **33** (1), 1981, 37-43.
4. B a r t ó k, K., *Flora și vegetația lichenologică a pădurilor de amestec din Munții Bihorului*, Stud. Cerc. Biol. Ser. Biol. Veg.", **34** (2), 1982, 101-106.
5. B a r t ó k, K., *Compoziția lichenologică a cenzelor din Masivul Vlădeasa (Bazinul Drăganului și Iadului)*, "Nymphaea, Fol. Nat. Bihariae", (Oradea), **10**, 1982-1984, 207-216.
6. B a r t ó k, K., *Cercetări asupra florei și vegetației lichenologice a unor quercete din Transilvania*, "Contrib. Bot.", (Cluj)-Napoca), 1986, 41-45.
7. B a r t ó k, K., *Cercetări lichenologice în unele făgete din nordul Transilvaniei*, "Contrib. Bot.", (Cluj-Napoca), 1987, 55-61.
8. B a r t ó k, K., *Comunități de licheni din ecosistemele montane ale Retezatului calcaros*, "Stud. Cerc. Biol. Ser. Biol. Veg.", **41** (2), 1987, 77-82.
9. B a r t ó k, K., *Recherches lichenologiques dans quelques forêts de mélange (hêtres et résineuses) de la Transylvanie*, "Contrib. Bot.", (Cluj-Napoca), 1988, 189-196.
10. B a r t ó k, K., *Structura și biomasa comunităților de licheni, în Parcul național Retezat, Studii ecologice*, 136-147, Ed. West Side, Brașov, 1993,
11. B a r t ó k, K., *Studiul florei de licheni din sud-estul Munților Zărandului*, "Stud. Univ. V. Goldiș", (Arad), **4**, 1994, 102-109.
12. B a r t ó k, K., *Lichens of the Danube Delta Biosphere Reserve*, "Research, Conservation, Management" Aggtelek, I, 1996, 283-294.
13. B o r z a, A., *Studii fitosociologice în M-ții Retezatului*, "Bul. Grăd. Bot. Muz. Bot. Cluj", **14** (1-2), 1934, 64-65.
14. B u r l a c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei lichenologice din R.P.R.*, "An. Ști. Univ. Al. I. Cuza Ser. II", (Iași), **9** (2), 1963, 122-135.
15. B u r l a c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei lichenologice a pădurilor din raionul Dorohoi (regiunea Suceava)*, "An. Ști. Univ. Al. I. Cuza Ser. II" (Iași), **13** (1), 1967, 167-172.
16. B u r l a c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei lichenologice din Moldova*, "Soc. Ști. Biol. R.S.R., Comun. Bot.", **8**, (București), 1969, 79-88.
17. B u r l a c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei lichenologice din Cheile Bicazului (jud. Bacău)*, "Comun. Bot." (Bacău), **11**, 1969, 207-215.
18. B u r l a c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei și vegetației lichenologice arboricole din pădurile Horlăceni, Gorovei, Văculești și Vf. Câmpului (jud. Botoșani)*, "An. Ști. Univ. Al. I. Cuza" (Iași), **15** (2), 1969, 369-379.
19. B u r l a c u, L., C i u r c h e a, M., C o d o r e a n u, V., *Contribuții la cunoașterea florei și vegetației lichenologice arboricole din pădurile dintre Cozla și Pescari (jud. Caraș - Severin)*, "An. Ști. Univ. Al. I. Cuza" (Iași), **15** (2), 1969, 357 - 368.
20. C i u r c h e a, M., *Contribuții la cunoașterea florei și vegetației lichenologice arboricole din Cheile Turului*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1965, 91-96.

21. C i u r c h e a, M., *Zur Flechtenvegetation des Muntele Mare und der Scărișoara Belioara*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai Ser. Biol.", (Cluj), **2**, 1967, 39-47.
22. C i u r c h e a, M., *Cercetări asupra florei și vegetației lichenologice arboricole din regiunea Arcalia*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1972, 133 - 139.
23. C i u r c h e a, M., *Vegetația stâncăriilor de pe valea Călinești (jud. Vâlcea)*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1972, 145 - 165.
24. C i u r c h e a, M., C o d o r e a n u, V., *Aspecte din flora și vegetația lichenologică a comunelor Vidra și Avram Iancu*, "Stud. Biol." (Cluj), **2**, 1967, 39-53.
25. C i u r c h e a, M., S z a b ó, T. A., *Licheni corticoli din Parcul Arcalia (R. Bistrița)*, "Studia Univ. Babeș - Bolyai Ser. Biol.", (Cluj), **11** (1), 1966, 13 - 23.
26. C o d o r e a n u, V., *Licheni calcicoli de la Băcăia și Cheile Cibului*, "Stud. Cerc. Biol.", **13** (2), (Cluj), 1962, 221-230.
27. C o d o r e a n u, V., *Flora și vegetația lichenologică de la Cheile Crăciunești*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1965, 97-106.
28. C o d o r e a n u, V., *Flora și vegetația lichenologică saxicolă de pe calcarele din Munții Apuseni*, Teză dr., Univ. Babeș-Bolyai, (Cluj), 1971.
29. C o d o r e a n u, V., C i u r c h e a, M., *Licheni calcicoli de la Cheile Întregalde și din Masivul Piatra Caprii din M-ții Apuseni*, "Stud. Cerc. Biol.", (Cluj), **13** (1), 1962, 53-68.
30. C o d o r e a n u, V., C i u r c h e a, M., *Licheni calcicoli de pe M-ții Piatra și Albu din Masivul Buila, raionul Vâlcea*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1962, 113-120.
31. C o d o r e a n u, V., C i u r c h e a, M., *Licheni calcicoli de pe pietrele Albe (Masivul Vlădeasa)*, "Stud. Univ. Babeș-Bolyai Ser. I", (Cluj) **1**, 1966, 7-12.
32. C o d o r e a n u, V., C i u r c h e a, M., Ș u t e u, Ș., *Flora și vegetația lichenologică saxicolă din Cheile Râmeșului (M-ții Apuseni)*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1968, 119-129.
33. C o d o r e a n u, V., Ț i u, R., M i c l e, F., *Licheni corticoli din Grădina Botanică din Cluj*, "Contrib. Bot.", (Cluj), 1960, 97-107.
34. C r e t z o i u, P., *Lichenii din regiunea Munților Bucegi (II)*, „Rev. Pădurilor”, **43** (5), (București), 1931, 403-413.
35. C r e t z o i u, P., *Lichenii din Transilvania și Banat publicați în Szatala lichenes Hungariae*, "Publ. Ref. la Flora Lichenologică a României", **3**, (București), 1931, 134.
36. C r e t z o i u, P., *Catalogul lichenilor cunoscute până acum din Dobrogea*, "Bul. Soc. Stud. Șt. Nat.", (București), 1934-1936, 126.
37. C r e t z o i u, P., *Contribuțiuni lichenologice din Herbarul Muzeului Botanic al Univ. din Cluj*, II, "Bul. Grăd. Muz. Bot.", **21**, 1941, 1-11.
38. C r e t z o i u, P., *Die Fundorte der bisher aus Rumänien bekanntgewordenen Arten der Gattung Usnea Wigg.*, "Bul. Politehn." (București), **13** (3-4), 1943, 400-411.
39. C r e t z o i u, P., *Conspectul lichenilor Gymnocarpi din România*, I, "An. ICEF Ser. I", (București), **9**, 1943, 38-45.
40. C r i ș a n, F., *Studii corologice, ecologice și cenologice asupra lichenilor foliacei și fruticuloși din Munții Piatra Craiului, jud. Bihor*, Teză dr., Univ. Babeș-Bolyai, (Cluj)-Napoca), 2001.
41. C s e r n i, B., *Gyulafehérvár környékének flórája*, "A Gyulafehérvári Rom. Kath. Gymn. 1887-1888 Értésit.", 1888.
42. F ó r i s s, F., *Adatok a kudsiri havasok zuzmóflorájának ismeretéhez. Beitrage zur Kenntnis der Flechtenflora der Kudzirer Hochgebirge*, "Bot. Közl.", (Budapest), **25**, 1928, 59-92.

43. F ó r i s s, F., *Adatok Szatmár-megye zuzmóinak ismeretéhez*, "Bot. Közl.", (Budapest), **34**, 1937, 1-5.
44. F u s s, M., *Specimen Florae Cryptogamae Vallis Arpasch Carpatae Transsilvani conscrip. L. eq. Heufler.*, "Verh. Mitth. Siebenb. Ver. Nat.", (Hermannstadt), **5**, 1854, 17.
45. F u s s, M., *Zur Cryptogamenflora Siebenbürgens*, "Verh. Mitth. Siebenb. Ver. Nat.", (Hermannstadt), **8**, 1857, 236-243.
46. F u s s, M., *Herbarium Normale Transilvanicum, Centuria IV*, "Verh. Mitth. Siebenb. Ver. Nat.", (Hermannstadt), **18** (8), 1867, 180-184.
47. F u s s, M., *Systematische Aufzählung der im Siebenbürgen angegeben Cryptogamen, III, Lichenes*, "Archiv. Ver. Siebenb.", Landeskunde, Neue-Folge, (Hermannstadt), **14** (2), 1878, 55-77.
48. G y e l n i k, V., *Adatok Magyarország zuzmó vegetációjához I*, "Folia Cryptog.", (Budapest), **I**, 1928, 237-240.
49. H a z s l i n s z k y, F., *A magyar birodalom zuzmóflórája*, "Kir. Magy. Természettud. Társ.", (Budapest), 1884, 217-223.
50. H e u f l e r, L. E., *Specimen Florae Cryptogamae Vallis Arpasch Carpatae Transsilvani*, (Wien), 1853, 32-46.
51. H r u b y, J., *Die Vegetationsverhältnisse Karpatho-Russlands und der östlichen Slovakei*, "Bot. Arch.", (Berlin), **11**, 1925, 210-212.
52. L o j k a, H., *Jelentés az 1872-ben tett társas fűvészeti kirándulásban gyűjtött zuzmókról*, "Math. Természettud. Közl.", (Budapest), **10**, 1872, 87-102.
53. L o j k a, H., *Adatok Magyarhon zuzmóvirányához I*, "Math. Természettud. Közl.", (Budapest), **11**, 1873, 39-76.
54. L o j k a, H., *Adatok Magyarhon zuzmóvirányához II*, "Math. Természettud. Közl.", (Budapest), **12**, 1874, 89-129.
55. L o j k a, H., *Adatok Magyarhon zuzmóvirányához. Délkeleti Magyarhonban 1872-1873-ban általam észlelt zuzmók összeállítása*, "Math. Természettud. Közl.", (Budapest), **14**, 1876, 41-76.
56. L o j k a, H., *Adatok Magyarország zuzmóflórájához III*, "Math. Természettud. Közl.", (Budapest), **21**, 1885, 323-378.
57. M a n t u, E., 1965, *Lichenes de la forêt Snagov*, "Trav. Mus. Hist. Nat. Gr. Antipa", (Bucureşti), **5**, 1965, 457-464.
58. M a r c o c i, C.N., *Cercetări sistematice și ecologice asupra lichenilor din Munții Nemira*, Teză dr., Univ. Al.I.Cuza, (Iași), 2002.
59. M o r u z i, C., P e t r i a, E., M a n t u, E., *Catalogul lichenilor din România*, "Acta Bot. Horti. Bucurestiensis", 1967, 85-89.
60. M o r u z i, C., T o m a, N., *Contribuții la studiul vegetației lichenologice a M-șilor Cibin*, "Acta Bot. Horti. Bucurestiensis", 1970, 165-192.
61. M o r u z i, C., T o m a, N., *Contribuții la cunoașterea florei lichenologice corticole, tericole și muscicole din zona Porșilor de Fier, I*, "Acta Bot. Horti. Bucurestiensis", 1972, 433-447.
62. N a s h, T.H., *Lichen Biology*, Cambridge Univ. Press, 2001.
63. R e d i n g e r, K., *Arthoniaceae, Graphidaceae, Chiodectonaceae, Dirinaceae, Rocellaceae, Lecanactidaceae, Thelotremaceae, Diploschistaceae, Gyalectaceae und Coenogoniaceae*. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, (Leipzig), **9**, II/I, 1937.

64. R o t ă r e s c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei și vegetației lichenologice corticole și saxicole din M-ții Rarău, Ceahlău și Cheile Bicazului*, Teză dr., Univ. Al. I. Cuza, (Iași), 1977.
65. R o t ă r e s c u, L., *Contribuții la cunoașterea florei și vegetației lichenologice din Cheile Bicazului*, "Ocrot. Nat. Nemțene", (Piatra Neamț), 1979, 150-166.
66. R o t ă r e s c u, L., *Flora lichenologică arboricolă din Masivul Ceahlău*, "Ocrot. Nat. Modova", (Iași), 1980, 106-124.
67. R o t ă r e s c u - B u r l a c u, L., *Contribuțiuni la cunoașterea florei lichenologice din M-ții Tarcăului*, "Soc. Ști. Nat. Geogr. R.P.R., Comun. Bot.", (București), **2** (2), 1963, 139-145.
68. S a v a, G., *Taxoni noi și rari pentru flora lichenologică a României*, "Stud. Com. Muz. Șt. Nat.", (Bacău), 1971, 67-74.
69. S a v a, G., *Licheni din Bazinul Uzului, regiunea M-șilor Nemira și Ciucului, II*, "Stud. Com. Muz. Șt. Nat.", (Bacău), 1971, 659-672.
70. S a v a, G., *Flora și vegetația lichenologică din bazinul Trotuș*, Teză dr., Universitatea Babeș-Bolyai, (Cluj)-Napoca, 1983.
71. S a v a, G., G â n s a c, G., *Flora lichenologică a pădurilor din împrejurimile orașului Adjud II*, "Stud. Com. Muz. Șt. Nat.", (Bacău), 1971, 647-658.
72. S e r v i t, M., *Zur Flechten Flora des Südbanats*, Wissenschaftlicher Teil, "Verh. Mitth. Siebenb. Ver. Nat." (Hermannstadt), **80**, 1930, 150-160.
73. S e r v i t, M., C r e t z o i u, P., *Zur Kenntnis der Flechtenflora von Rumänien*, "Fedde's Repertorium sp. nov.", (Berlin), **36**, 1934.
74. S e r v i t, M., C r e t z o i u, P., *Flechten aus Rumänien, I*, "Acta pro flora et fauna universalis, Ser. II", Bot., (București), **2**, 1936.
75. S e r v i t, M., H i l l m a n, J., E r i c h s e n, C.F.F., C r e t z o i u, P., *Zur Kenntnis der flechtenflora von Rumänien*, "Fedde's Repertorium sp. nov.", (Berlin), **36**, 1934, 289-299.
76. S i m o n k a i, L., *Arad vármegye és Arad szabad királyi város természetrajzi leirása*, (Arad), 1893, 365-370.
77. S t a m a t i n, M., *Contribution à la flore lichenologique de la Roumanie*, "Ann. Scient. Univ. Jassy", **4**, 1904, 3-4.
78. Ș t e f u r e a c, T., *Cercetări sinecologice și sociologice asupra Bryophytelor din Codrul secular Slătioara (Bucovina)*, "An. Acad. Rom., Mem. Secț. Ști.", (București), **16** (3), 1941, 1133-1329.
79. S z a t a l a, O., *Neue Beiträge zur Flechtenflora des Ungarns Komitates*, "Magy. Bot. Lapok", (Budapest), **21**, 1922, 33-63.
80. S z a t a l a, O., *Adatok Magyarország zuzmóflórájának ismeretéhez*, "Magy. Bot. Lapok", (Budapest), **28**, 1929, 25-81.
81. S z a t a l a, O., *Lichenes Hungariae II, Gymnocarpineae (Graphidineae, Cyclocarpineae, Lecanactidaceae, Peltigeraceae)*, "Folia Cryptog.", (Budapest), **1** (7), 1930, 834-928.
82. S z a t a l a, O., *Lojka Hugó hagyatékának zuzmói. Lichenes a divo H. Lojka relictæ*, "Magy. Bot. Lapok", (Budapest), **31**, 1932, 71-127.
83. V o l c i n s c h i, L., V o l c i n s c h i, A., *Contribuțiuni la cunoașterea florei lichenologice a masivului Rarău (reg. Suceava), II*, "An. Ști. Univ. Al. I. Cuza Iași, II, Ser. Ști. Nat.", **4** (1), 1960, 145-156.

84. V o l c i n s c h i, L., V o l c i n s c h i, A., *Contribuțiuni la cunoașterea florei lichenologice a pădurilor din colinele Tutovei*, "An. Ști. Univ. Al. I. Cuza Iași, II, Ser. Ști. Nat.", **7** (1), 1961, 113-122.
85. Z a h l b r u c k n e r, A., *Verzeichnis der gelegentlich einer Reise im Jahre 1897 von Prof. Loitlesberger in der Rumänischen Karpathen gesammelten Lichenen*, "Ann. Kais. Kon. Naturhist. Hoffmus.", (Wien), **19**, 1904, 1-8.
86. Z s c h a c k e, H., *Beiträge zur Flechtenflora Siebenbürgens*, "Magy. Bot. Lapok", (Budapest), **10**, 1911, 361-380.
87. Z s c h a c k e, H., *Zur Flechtenflora von Siebenbürgen*, "Verh. Mitth. Siebenb. Ver. Nat." (Hermannstadt), **63**, 1913, 111-166.
88. www.natureserve.org/explorer/speciesIndex/Order_Opegraphales_106662_1.htm. (NaturServe 2004)

Menționăm că la noi în țară a fost semnalată și specia *Opegrapha illecebrosa* care în prezent a fost inclusă în genul *Lecanactis*.

Pe lângă materialul de la herbariile din țară am folosit și material de la Muzeul Național Ungar, Budapesta. Prescurtări folosite în lucrare: MNH BP = Muzeul Național Ungar, Budapesta; Hb BK = Herbarul Bartók Katalin.

Mulțumiri d-lui drd. Lökös László de la Muzeul Național Ungar, Budapesta, Fundațiilor Domus Hungarica și Agora pentru sprijinul oferit la realizarea prezentei lucrări.

Fig. 1. *Opegrapha atra*

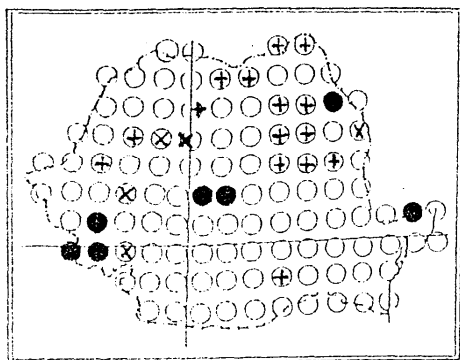


Fig. 2. *Opegrapha calcarea*

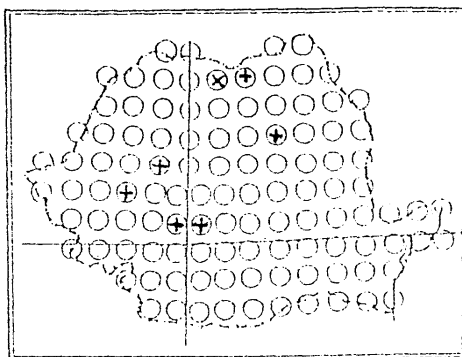


Fig. 3. *Opegrapha dolomitica*

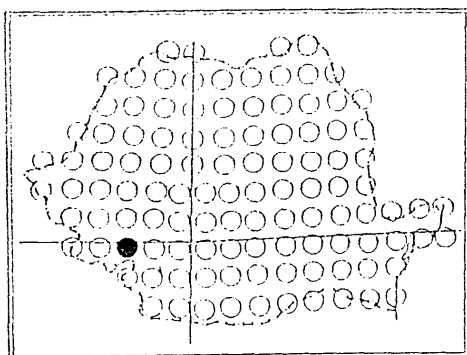


Fig. 4. *Opegrapha gyrocarpa*

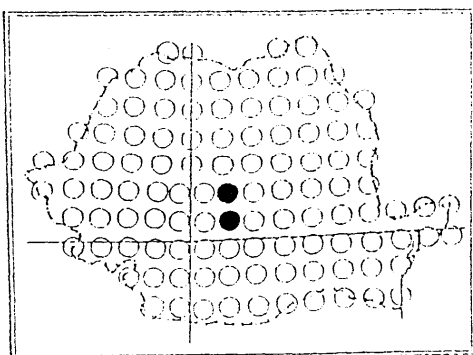


Fig. 5. *Opegrapha lyncea*

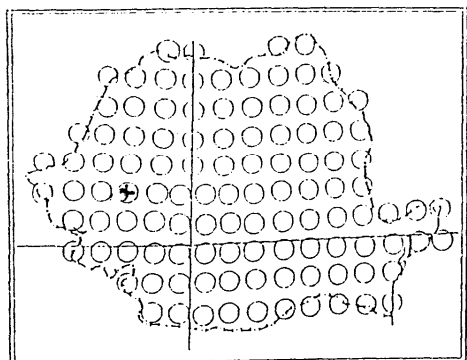


Fig. 6. *Opegrapha rufescens*

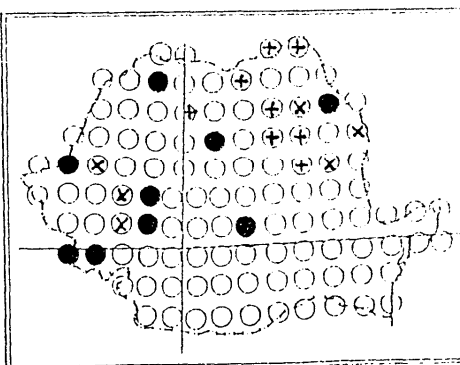


Fig. 7. *Opegrapha rupestris*

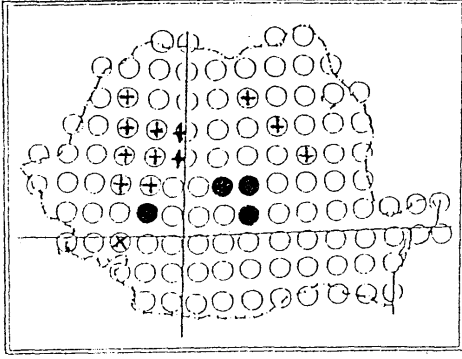


Fig. 8. *Opegrapha varia*

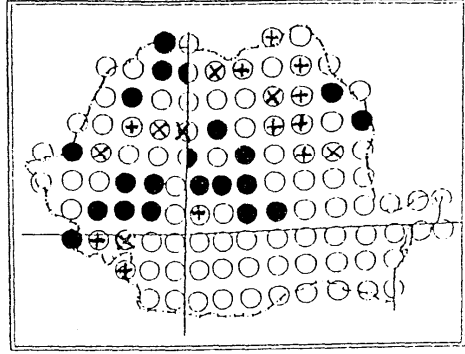


Fig. 9. *Opegrapha vermicellifera*

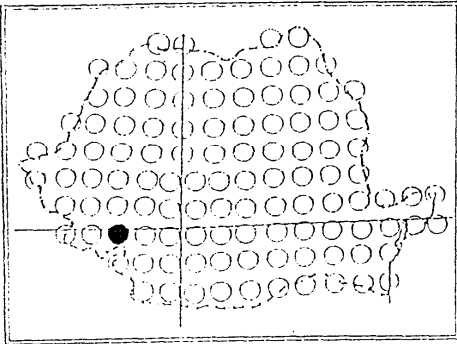


Fig. 10. *Opegrapha viridis*

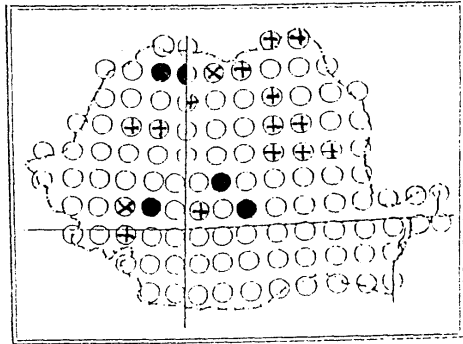
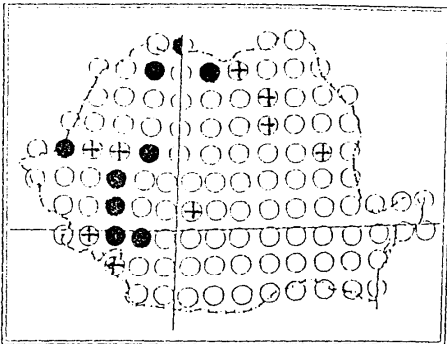


Fig. 11. *Opegrapha vulgata*



Legenda figurilor:

- semnalări făcute între anii 1853 - 1960;
- + semnalări făcute între anii 1960 - 2003;
- x semnalări făcute între anii 1853 - 2000.

Distribuția speciilor genului *Opegrapha* în România.

STUDIUL PIGMENȚILOR CICLULUI XANTOFILIC LA ALGA VERDE
SCENEDESMUS OPOLIENSIS P. RICHTER ÎN CONDIȚII DE
FOTOINHIBIȚIE INDUSĂ PRIN INTENSITĂȚI MARI ALE LUMINII

VICTOR BERCEA^{*}, ANA NICOARĂ^{*} și NICOLAE DRAGOȘ^{**}

SUMMARY. - **The Study of Xanthophyll Cycle Pigments in *Scenedesmus opoliensis* P. Richter Green Alga under Conditions of Photoinhibition Induced by Higher Light Intensities.** The paper presents the photoinhibition induction and the role of the xanthophyll cycle pigments in *Scenedesmus opoliensis* alga suspensions. The effects of 1000, 1500, 2000, 2500 and 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light intensities, for a period of exposure of 30, 60, 90 and 120 min were recorded. The levels of chlorophyll a and b and that of carotenoids were modified in the first 30 min of light exposure, proportionally to the intensity of light. Photoinhibition modifies the composition of photosystems, The redox state recorded by absorption at 320 nm and 700 nm points out that photoinhibition changes the photosystems activities. The activity of photosystems has a positive correlation with the accumulation of proteins. The deepoxidation reactions of violaxanthin were directly influenced by the intensity of light. During the reconversion stage, the epoxidation of zeaxanthin is slower and depends on the photodamage produced by high light. Indexes DEPS and EPS have pointed out the existence of the xanthophyll cycle with this species, as well as the protective role of the xanthophylls.

Organismele cu fotosinteză oxigenică și-au dezvoltat atât mecanisme care captează cu mare eficiență lumina cât și mecanisme capabile de disiparea excesului de energie, ultimele având un rol decisiv în protecția plantelor față de fotoinhibiție și fotooxidare [19]. Fotoinhibiția se manifestă *in vivo* prin scăderea producției cuantice și prin reducerea eficienței fotochimice a fotosistemului PS II [2, 13]. Fotosinteza generează, inevitabil, specii de oxigen reactiv care inactivează centrii de reacție fotosintetici, cauzează fotodistrugerea pigmentilor și peroxidarea lipidelor și a proteinelor membranelor, efecte cunoscute sub denumirea de fotooxidare [17]. Pentru evitarea vătămarilor în astfel de condiții, aparatul fotosintetic s-a adaptat prin crearea de mecanisme de disipare a excesului de energie [3, 4]. Aceste mecanisme includ xantofilele, diferențele de pH transtilacoidal [5, 12] precum și fosforilarea proteinelor [23]. În adaptarea pe termen lung crește concentrația xantofilelor prin

^{*} Institutul de Cercetări biologice 400015/Cluj-Napoca. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

^{**} Universitatea „Babeș-Bolyai”, Fac. de Biologie și Geologie Cluj-Napoca. E-mail: ndragos@biolog.ubbcluj.ro
Cercetare finanțată în Programul Național CERES nr. 3-121/2003

expunerea la lumină puternică [6] în condiții de temperatură coborâtă [22]. Violaxantina suferă o conversie dependentă de lumină în zeaxantină, prin intermediul anteraxantinei, proces inversat în condiții de întuneric. Această secvență reversibilă a celor două reacții este cunoscută sub denumirea de **ciclu xantofilic**.

Disiparea energiei de excitare în exces se produce direct în interiorul complexelor antenare clorofilă-carotenoid captatoare de lumină ale fotosistemelor [3, 11]. Excesul energetic este transferat zeaxantinei care este interconvertibilă cu alte xantofile din acest ciclu. Excitația în exces a antenei PS II este disipată neradiativ cauzând diminuarea nefotochimică a fluorescenței clorofilei din PS II [8, 18].

Experiențele efectuate au avut ca scop evidențierea ciclului xantofilic la alga verde *Scenedesmus opoliensis* în condițiile fotoinhibiției produse de lumina intensă precum și schimbările de compoziție ale aparatului fotosintetic (clorofile, carotenoide, proteine, PS II și PS I).

Materiale și metode. Alga verde *Scenedesmus opoliensis* P.Richter AICB 141 (Fig.1) provine din Colecția de culturi de alge a I.C.B. Cluj-Napoca (AICB) [7]. Tulpina AICB 141 a fost crescută în soluția nutritivă Bold (BBM), în condiții de agitare continuă cu aer (5% CO₂), iluminare continuă (600 μmol.m⁻².s⁻¹; Hansatech Quantum Sensor QSPAR), la temperatura de 28⁰C.

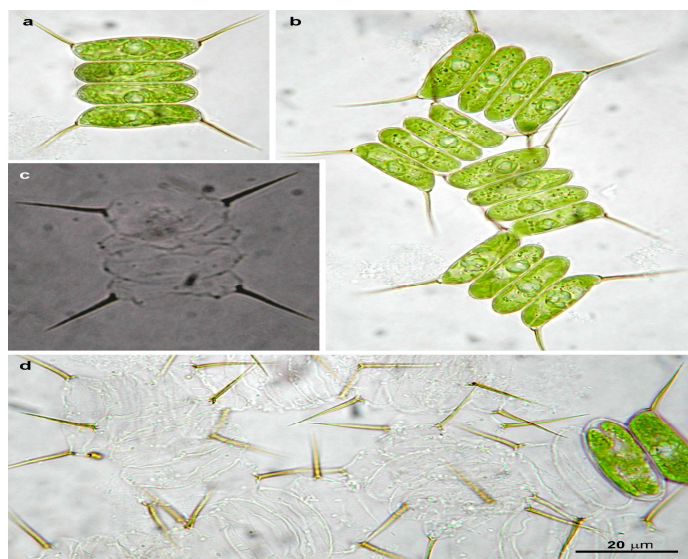


Fig. 1. Morfologia cenobiilor la *Scenedesmus opoliensis*, în microscopie optică (c = câmp întunecat). Cenobiile sunt formate din câte 4 celule, cele terminale prezentând prelungiri caracteristice, sub formă de țepi, ai pereților celulari.

După 16 zile de creștere s-a obținut o suspensie uniformă și densă (0,9 unități relative a densității optice măsurată la 750 nm). Creșterea culturilor s-a apreciat prin trasarea curbelor de creștere pe baza A_{log_2} a densității optice [24]. La finele perioadei de creștere s-a determinat biomasa (substanța uscată), concentrația pigmentilor asimilatori și a proteinelor celulare.

Suspensia algală s-a expus la lumina de diferite intensități PAR (radiația activă fotosintetic): 1000, 1500, 2000, 2500 și 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, timp de 120 minute, la temperatura camerei (perioada de iluminare). Ca sursă de lumină s-au folosit becuri halogen de 500W reglabile. Suspensia a fost agitată magnetic pe întreaga durată a expunerii la lumină pentru omogenizarea umbririi celulare, iar între suspensie și sursa de lumină s-a interpus un filtru cu apă pentru evitarea încălzirii. Probele analitice au fost prelevate la intervale de 30 minute, prin filtrare.

După expunerea la lumină, suspensia algală s-a menținut la semiîntuneric timp de 120 minute pentru epoxidarea zeaxantinei (perioada de refacere, reconversie).

Pigmenții (clorofila a și b, carotenoide), extrași cu acetonă, s-au estimat spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție [1, 14], rezultatele fiind exprimate în mg.g^{-1} substanță uscată sau în mmol / mol clorofila a. Proteinele s-au determinat după metoda Lowry [15].

Pentru analiza carotenoidelor ciclului xantofilic, extractul a fost saponificat în soluție etanolică de 1,7% KOH, iar separarea și identificarea pigmentilor s-a efectuat prin cromatografie în strat subțire [9].

Pe baza componentelor xantofilici s-a determinat indicele de de-epoxidare (DEPS): $\text{DEPS} = Z + 0,5A/V + A + Z$ (reflectă de-epoxidarea violaxantinei) și indicele de epoxidare al zeaxantinei (EPS): $\text{EPS} = V + 0,5A/V + A + Z$.

Rezultate și discuții. *Procesul de creștere.* Curba de creștere a culturilor de *Scenedesmus*, adaptate la lumina moderată de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, este redată în Fig. 2. Creșterea culturilor a fost rapidă, fără fază de latență, consemnându-se o rată de creștere exponențială (R) = 0,35, o rată medie de creștere (R_m) = 0,072 și un timp de dublare (g) = 2,88.

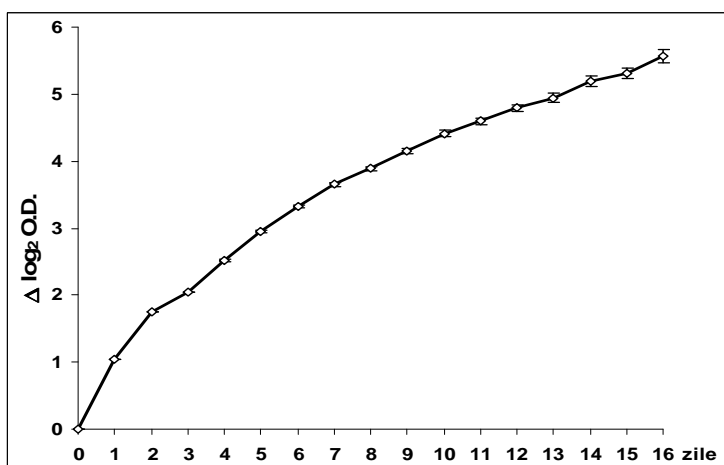


Fig. 2. Curba de creștere a culturilor algei verzi *Scenedesmus opoliensis*

Analiza biomasei algale (Tabel 1) a indicat un conținut în pigmenți fotosintetici, respectiv în clorofile și carotenoide, relativ ridicat, cu raporturi normale între componenți, confirmând că lumina a fost adecvată creșterii culturilor acestei specii.

Tabel 1

Conținutul în componenți celulari ai culturilor de *Scenedesmus opoliensis*.

Componenți biochimici	Valori cantitative
Clorofila <i>a</i> (mol)	$2,44 \times 10^{-5}$
Clorofila <i>b</i> (mol)	$0,70 \times 10^{-5}$
Caroteni (mmol/mol cl. a)	30,50
Luteina (mmol/mol cl.a)	98,76
Neoxantina (mmol/mol cl.a)	30,40
Violaxantina (mmol/mol cl.a)	47,85
Anteraxantina (mmol/mol cl.a)	3,52
Zeaxantina (mmol/mol cl.a)	6,10
Total carotenoide (mmol/mol cl. a)	217,21
Total V+A+Z	57,47
Total pigmenți (mmol/mol. cl.a)	3,49
a/b	3,48
a+b/carotenoide	9,18
Substanța uscată (g/l)	0,696
Proteine totale ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.u.)	247,10

Inducerea fotoinhibiției. Conținutul în clorofile și carotenoide s-a mărit prin expunerea suspensiei algale la diferitele intensități de lumină (Fig. 3). Pe durata iradierilor, aceste concentrații s-au menținut ridicate, iar la finele expunerii, s-a constatat o tendință de reducere, mai semnificativă, la intensitățile de peste $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Schimbările cantitative sunt reflectate de raporturile dintre componenții pigmentari.

Fotoinhibiția aparatului fotosintetic s-a produs după 30 minute de expunere la lumina de 1500 și $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ și după 60 minute la celelalte intensități luminoase experimentate.

După 30 minute de expunere la lumină, activitatea PS II a fost inhibată, exceptând lumina de $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 4). Procesele de fotoreducere ale accepteurului primar de electroni Q_A au fost reduse și au dominat fotoxidările orientate spre îndepărtarea energiei primite în exces. Dominanța proceselor de fotooxidare indică instalarea procesului de fotoinhibiție, cu consecințe negative asupra fotochimiei PS II. Cantitatea de Q_A funcțională scade prin fotoreducerea Q_A [25].

Activitatea fotosistemului PS I este prezentată în Fig. 5 pe baza potențialului redox al centrului de reacție P_{700} . După 30 minute de expunere la lumină procesele de fotooxidare ale centrului de reacție P_{700} au fost inhibitate și domină procesele de fotoreducere active în disiparea energiei în exces. Activitatea de separare a sarcinilor energetice primare ale PS I scade cu timpul. Activitatea celor două fotosisteme, PS II și PS I, s-a corelat pozitiv cu evoluția clorofilei *a*.

PIGMENTII CICLULUI XANTOFILIC LA SCENEDESMUS OPOLIENSIS

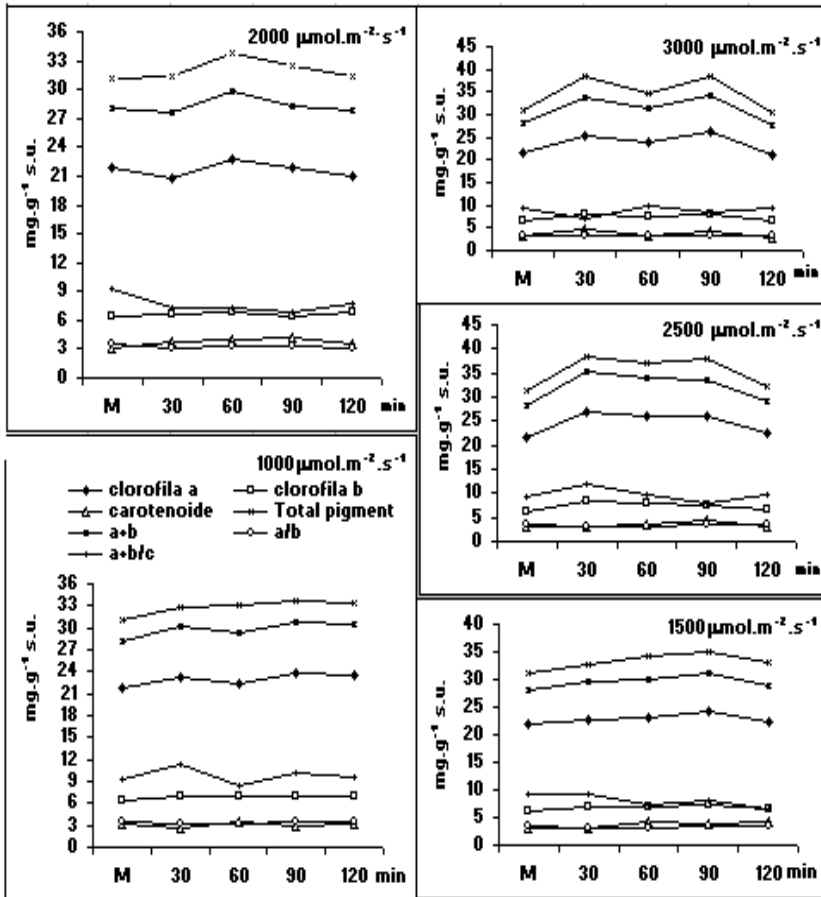


Fig. 3. Conținutul în pigmenți și raportul dintre ei la *Scenedesmus opoliensis*, în timpul expunerii la intensități diferite de lumină.

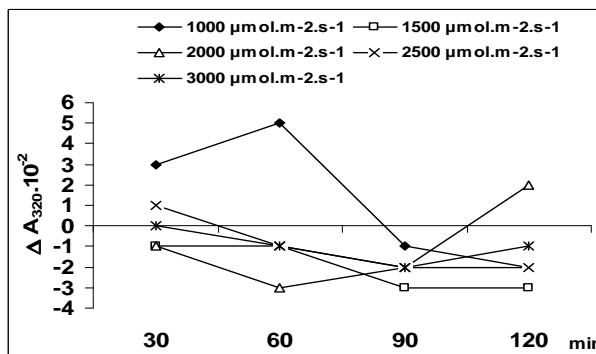


Fig. 4. Starea redox a PS II relevată prin diferențele în absorbție la 320 nm.

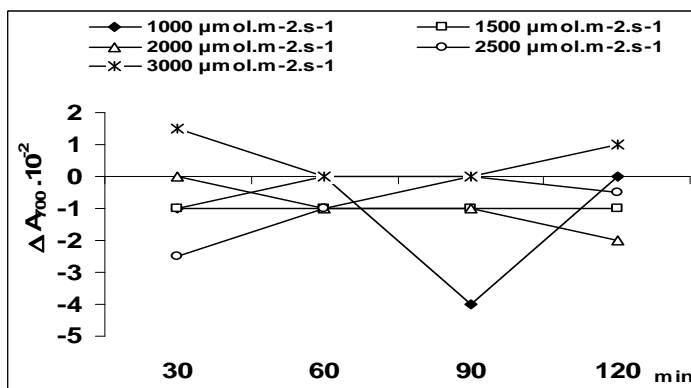


Fig. 5. Starea redox a PSI relevată prin diferențele în absorbție la 700 nm.

Evoluția conținutului în proteine totale este prezentată în Fig. 6. Comparativ cu controlul, prin expunerea suspensiei algale la diferite intensități de lumină, cu durate diferite, s-a constatat o creștere semnificativă a conținutului în proteine în primele 30 minute. Creșterea cantității proteinelor poate fi datorată satisfacerii necesarului de proteine structurale legate cu clorofilele și complexe captatoare de lumină LHC, asociat creșterii capacității fotosintetice.

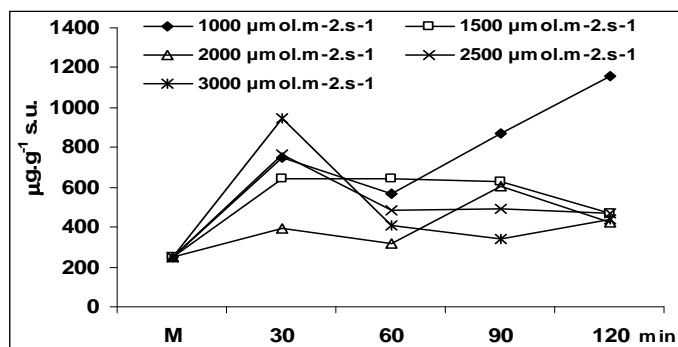


Fig. 6. Variația conținutului în proteine la *Scenedesmus opoliensis* în timpul expunerii la lumină.

Reacțiile de de-epoxidare a violaxantinei. De-epoxidarea a fost urmărită timp de 120 minute prin expunerea suspensiei algale la diferite intensități de lumină. Fig. 7 prezintă evoluția de-epoxidării violaxantinei la anteraxantină și zeaxantină, în funcție de timp. În primele 30 minute de expunere, concentrațiile violaxantinei au scăzut rapid, mai semnificativ la intensitățile de peste 2000 μmol·m⁻²·s⁻¹. De asemenea, a crescut semnificativ concentrația zeaxantinei, în timp ce concentrația anteraxantinei a fost oscilantă. Timpul de 30 minute este suficient pentru producerea de-epoxidării violaxantinei [16].

PIGMENTII CICLULUI XANTOFILIC LA SCENEDESMUS OPOLIENSIS

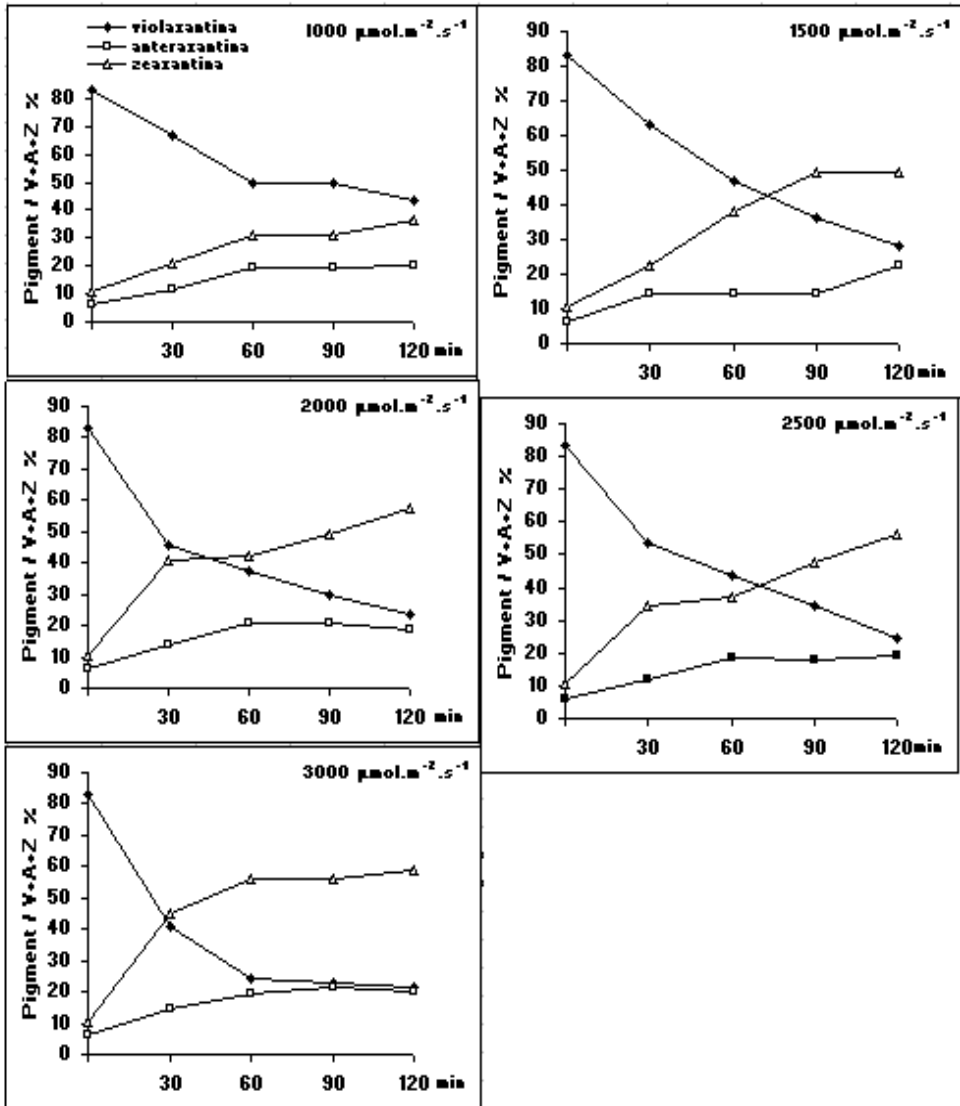


Fig. 7. De-epoxidarea violaxantinei la *Scenedesmus opoliensis* în timpul fotoinhibiției.

Schimbările în concentrația pigmentilor xantofilici, la intensitate mare de lumină, se pot explica prin creșterea disponibilului de violaxantină. La aceste intensități se instalează un dezechilibru între transportul de electroni (și cel de protoni) și fixarea carbonului, cauză ce determină defalcarea în timp a reacțiilor de de-epoxidare și epoxidare. Această defalcare determină dezechilibrul între formarea și reconversia antheraxantinei. De asemenea, acidifierea lumenului tilacoidelor este

necesară legării zeaxantinei la proteinele membranare ce conțin clorofilă conducând la formarea capcanelor de disipare a energiei în antena PS II. Capcanele de energie intră în competiție cu centrul de reacție pentru captarea energiei determinând reducerea activității PS II [10].

Starea de de-epoxidare a xantofililor s-a mărit pe durata derulării fenomenului de fotoinhibiție, ceea ce evidențiază în mod indirect cinetica de-epoxidării (Fig. 8). La intensitățile de lumină de peste $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ratele transportului de electroni și respectiv, de protoni precum și cea a fixării carbonului, deci a consumului echivalenților reducători, sunt saturate.

Valorile indicelui de de-epoxidare s-au mărit proporțional cu creșterea intensităților PAR (radiația activă fotosintetic), precum și cu durata de expunere (Fig. 8). Astfel, ciclul xantofilic pare să fie influențat direct de lumină reliefând implicarea zeaxantinei în fotoprotecția celulară față de intensitatea PAR utilizată.

Ajustările fotosintetice la diferitele intensități de lumină sunt similare și reflectă existența unui mecanism redox de sensibilizare care poate fi activat termodinamic ori fotodinamic [8, 21].

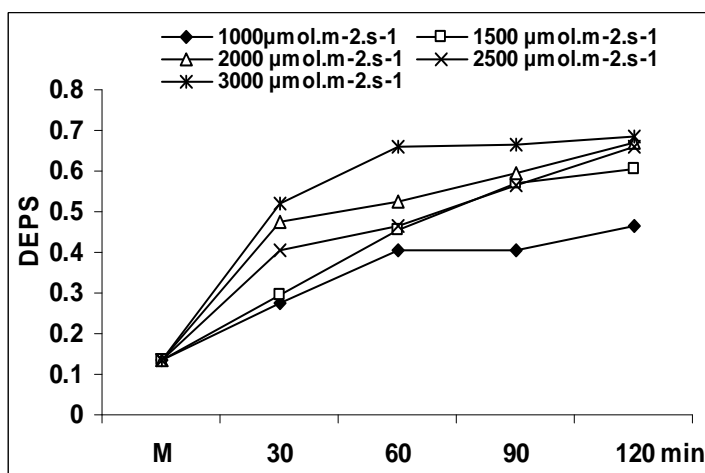


Fig. 8. Evoluția indicelui de de-epoxidare a violaxantinei (DEPS) la *Scenedesmus opoliensis* în timpul expunerii la lumină.

Reacțiile de epoxidare a zeaxantinei. Pentru analiza epoxidării zeaxantinei la violaxantină suspensiile algale supuse fotoinhibiției au fost transferate la lumină redusă, timp de 120 minute.

În perioada de reconversie violaxantina a crescut cu circa 70%, iar zeaxantina și anteraxantina s-au redus treptat (Fig. 9). În această perioadă zeaxantina este înlocuită de violaxantină în locurile de legare din membranele tilacoidale, cum sunt unitățile LHC [20].

Epoxidarea zeaxantinei la violaxantină în celulele algale pe perioada reconversiei s-a cuantificat pe baza indicelui EPS (Fig. 10). Indicele de epoxidare a zeaxantinei a crescut treptat, odată cu durata reconversiei, dar procesul este lent și depinde de disponibilul de zeaxantină precum și de capacitatea de refacere fotochimică a PS II.

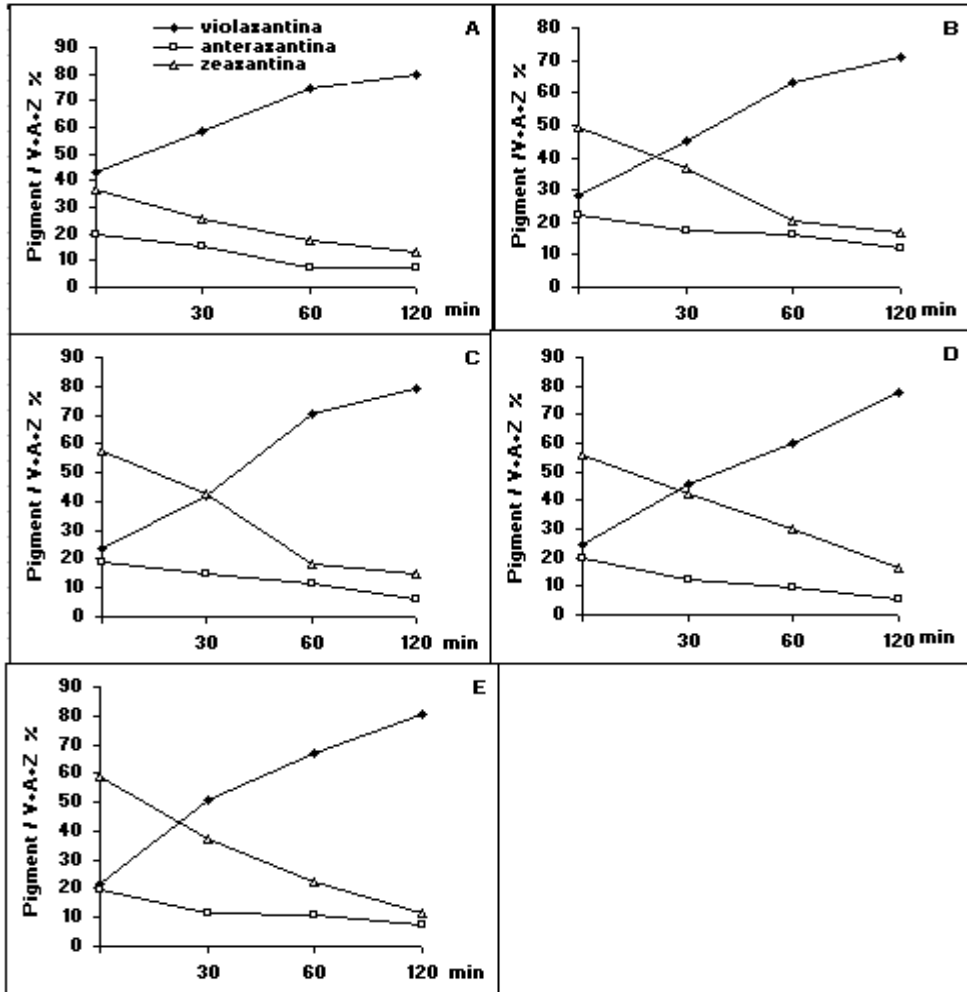
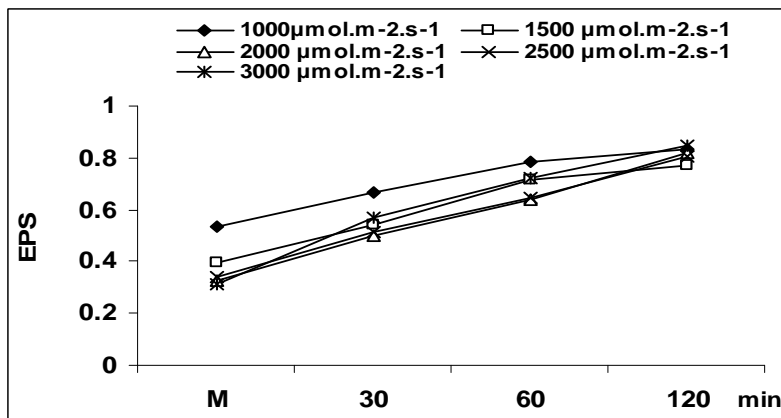


Fig. 9. Dinamica epoxidării xantofilelor în perioada reconversiei, la *Scenedesmus opoliensis*, după iluminarea la intensitățile de: A=1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; B=1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; C=2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; D=2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; E=3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Fi g. 10. Variația indicelui de epoxidare a zeaxantinei (EPS) la *Scenedesmus opoliensis* în perioada reconversiei.

Concluzii. Funcționarea fotosistemului PS II în condiții de fotoinhibiție s-a analizat prin utilizarea unor intensități variate de lumină și durate de expunere diferite.

1. Expunerea la lumină intensă a determinat schimbarea compoziției în pigmenți asimilatori a aparatului fotosintetic. Concentrația clorofilei *a* și *b*, precum și a carotenoidelor care nu intră în componența ciclului xantofilic, respectiv, caroten, luteină și neoxantină, s-a modificat în primele 30 minute, proporțional cu intensitățile de lumină studiate.

2. Fotoinhibiția indusă de lumina intensă modifică compoziția și structura celor două fotosisteme. Activitatea de separare primară a sarcinilor redox, respectiv diferențele între fotoreduceri și fotooxidări în structura antenară a fotosistemelor, amplitudinea fotodistrugerilor au fost proporționale cu intensitatea luminii și durata de expunere. Conținutul în proteine s-a corelat pozitiv cu evoluția activității fotosistemelor. Majoritatea intensităților de lumină studiate produc fenomenul de fotoinhibiție, în principal în primele 30 minute de expunere.

3. Ciclul xantofilic operează în direcția de-epoxidării violaxantinei în timpul iluminării și apoi urmează reacția epoxidării lente a zeaxantinei, la întuneric. Valorile indicelui de de-epoxidare cresc proporțional cu creșterea intensităților PAR precum și cu durata de expunere la aceste intensități. Desfășurarea de-epoxidării este influențată de disponibilul de violaxantină a cărei concentrație în celulă depinde de prezența diferitelor proteine membranare. Valorile indicelui epoxidării zeaxantinei se măresc proporțional cu timpul de refacere. În cazul suspensiilor algale expuse anterior reconversiei, la intensități mari de lumină, s-a constatat o încetinire a epoxidării zeaxantinei.

BIBLIOGRAFIE

1. Arn on, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in Beta vulgaris*, "Plant Physiol.", **24**, 1949, 1-15.
2. Aro, E. M., McCaffery, S., Anderson, J. M., *Photoinhibition and D₁ protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances*, "Plant Physiol.", **103**, 1993, 835-843.
3. Björkman, O., Demmig-Adams, B., *Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants*, in: Schulze, E. D., Caldwell, M. M. (Eds): *Ecophysiology of Photosynthesis*, pp.17-47, Springer-Verlag, Berlin, 1995.
4. Bratt, C. E., Arvidsson, P. O., Carlsson, M., Åkerlund, H. E., *Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration*, "Photosynth. Res.", **45**, 1995, 169-175.
5. Briantais, J. M., Vernet, C., Picaut, M., Krause, G. H., *A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts*, "Biochim. Biophys. Acta", **548**, 1979, 128-138.
6. Demmig-Adams, B., Adams, W. W., Logan, B. A., Verhoeven, A. S., *Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible Photosystem II efficiency in plant acclimated to light stress*, "Aust.J. Plant Physiol.", **22**, 1995, 249-260.
7. Dragoș, N., Péterfi, L. Șt., Momeu, L., Popescu, C., *An introduction to the algae and the culture collection of algae at the Institute of the Biological Research Cluj-Napoca*, Cluj Univ. Press, 1997.
8. Gilmore, A. M., Hazlett, T. L., Govindjee, *Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime*, "Proc.Natl.Acad.Sci.USA", **92**, 1995, 2273-2277.
9. Hager, A., Bartenrath, T. M., *Die isolierung und quantitative bestimmung der carotenoide und chlorophylle von blättern, algen und isolierten chloroplasten mit hilfe dünnschichtchromatographischer methoden*, "Planta", **69**, 1966, 198-216.
10. Heber, U., Bukhov, N. G., Shuvalov, V. A., Kobayashi, Y., Lange, O. L., *Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens*, "J.Exper.Biol.", **52**, 2001, 1999-2006.
11. Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G., *Regulation of light harvesting in green plants. Indication by nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence*, "Plant Physiol.", **106**, 1994, 415-420.
12. Krause, G. H., Behrend, U., *pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts*, "FEBS Lett", **200**, 1986, 298-302.
13. Krause, G. H., *Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms*, "Physiol. Plant.", **74**, 1988, 566-574.
14. Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., *Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*, "Biochem. Soc. Trans.", **603**, 1983, 591-592.

15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, „J.Biol.Chem.”, **193**, 1951, 265-275.
16. Morosinotto, T., Baronio, R., Bassi, R., *Dynamica of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle*, „J. Biol. Chem.”, **277**, 2002, 36913-36920.
17. Nayak, L., Raval, M. K., Biswal, B., Biswal, U. C., *Photoprotection of green leaves by zeaxanthin, a two-channel process*, „Current Sci.”, **81**, 9, 2001, 1165-1166.
18. Niyogi, K. K., *The roles of specific xanthophylls in photoprotection*, „Proc.Natl. Acad.Sci.USA”, **94**, 1997, 14162-14167.
19. Niyogi, K. K., *Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches*, „Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.”, **50**, 1999, 333-360.
20. Polle, J. E. W., Niyogi, K. K., Melis, A., *Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem II but not that of photosystem I in the green alga Chlamydomonas reinhardtii*, „Plant Cell Physiol.”, **42**, 2001, 482-491.
21. Savitch, L. V., Maxwell, D. P., Huner, N. P.A., *Photosystem excitation pressure and photosynthetic carbon metabolism in Chlorella vulgaris*, „Plant Physiol.”, **111**, 1996, 127-136.
22. Schöner, S., Krause, G. H., *Protectiv systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light*, “Planta”, **180**, 1990, 383-389.
23. Staehelin, L. A., Arntzen, C. J., *Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components*, „J.Cell Biol.”, **97**, 1983, 1327-1337.
24. Stein, J. R., *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1973.
25. Zhang, L., Melis, A., *Probing green algal hydrogen production*, „Phil. Trans. R. Soc. Lond. B”, **357**, 2002, 1499-1509.

EFECTELE INTENSITĂȚII LUMINII ȘI A DURATEI DE EXPUNERE ASUPRA MANIFESTĂRII FOTOINHIBIȚIEI LA ALGA VERDE *CHLORELLA FUSCA* SHIHIRA ET KRAUSS

VICTOR BERCEA*, ANA NICOARĂ* și NICOLAE DRAGOȘ**

SUMMARY. -The Effects of Light Intensity and of the Duration of Exposure on the Manifestation of Photoinhibition in *Chlorella fusca* Shihira et Krauss Green Alga. The aim of the paper is to point out the existence of the xanthophyll cycle in *Chlorella fusca*, as well as the photo-inhibition effects induced by high light on the photosynthetic apparatus. The light intensities of 1000, 1500, 2000, 2500 and 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, for a duration of 30, 60, 90 and 120 min were used. The content of chlorophylls and carotenoids increases in the first 30 min, in positive relationship with protein levels. The redox state of the two photosystems was assessed by the spectral differences at 320 nm and 700 nm. The deepoxidation reactions of violaxanthin are rapid, occurring within 30 min, and it is proportional to light intensity. The epoxidation of zeaxanthin is slower, and it is also correlated with the synthesis of proteins. Higher light intensities produce various damage. The kinetics of deepoxidation and epoxidation were highlighted by indexes DEPS and EPS, respectively.

In vivo fotoinhibiția se manifestă prin scăderea producției cuantice și, implicit, reducerea eficienței fotochimice a fotosistemului PS II [3, 16, 20, 23]. Pentru evitarea vătămarilor aparatul fotosintetic s-a adaptat prin crearea de mecanisme capabile să disipeze excesul de energie luminoasă [5, 6]. Aceste mecanisme includ xantofilele, diferențele de pH transtilacoidal [7, 15] precum și fosforilarea proteinelor [27]. Concentrația xantofilelor crește când plantele sunt expuse la lumină puternică [8] în condiții de temperatură coborâtă [26], iar violaxantina suferă o conversie dependentă de lumină în zeaxantină, prin intermediul anteraxantinei, proces inversat în condiții de întuneric (Fig.1).

Această secvență reversibilă a celor două reacții definește **ciclul xantofilic**. Carotenoidele participante în acest ciclu sunt prezente numai în membrana tilacoidelor și suferă modificări rapide de concentrație, provocate de lumina puternică. Formarea zeaxantinei și diminuarea eficienței PSII relevă funcția fotoprotectoare a acestor xantofile [1, 11].

Cercetările noastre și-au propus evidențierea ciclului xantofilic precum și analiza efectelor asupra aparatului fotosintetic ale fotoinhibiției induse de intensitățile mari de lumină.

* Institutul de Cercetări Biologice 400015, Cluj-Napoca. E-mail: icb@mail.dntcj.ro

** Univ. „Babeș-Bolyai”, Fac. de Biologie și Geologie, Cluj-Napoca. E-mail: ndragos@biolog.ubbcluj.ro
Cercetare finanțată în Programul Național CERES nr. 3-121/2003

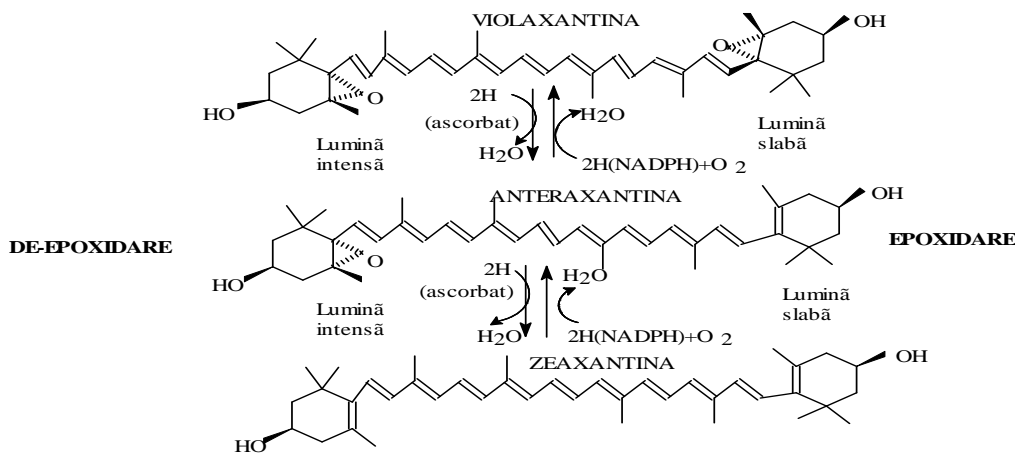


Fig. 1. Schema ciclului xantofilic și reglarea sa prin lumină [9].

Material și metode. Alga verde *Chlorella fusca* Shihira et Krauss (AICB 25), (Fig. 2) provine din Colecția de culturi de alge a I.C.B. Cluj-Napoca (AICB) [10]. Tulpina AICB 25 a fost crescută în soluția nutritivă Bold (BBM), în condiții de agitare continuă cu aer (5% CO₂), iluminare continuă (600 μmol.m⁻².s⁻¹; Hansatech Quantum Sensor QSPAR), la temperatura de 28⁰C.

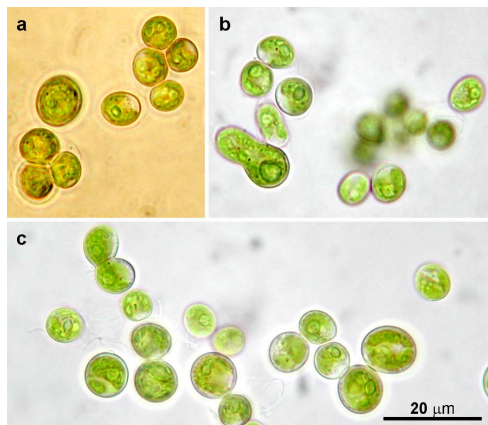


Fig. 2. Aspectul morfologic al celulelor de *Chlorella fusca*: a – contrast de fază; b, c – câmp optic iluminat

După 9 zile de creștere s-a obținut o suspensie uniformă și densă (0,9 unități relative a densității optice măsurată la 750 nm). Creșterea culturilor s-a apreciat prin trasarea curbelor de creștere pe baza $\Delta \log_2$ a densității optice [28]. La finele perioadei de creștere s-a determinat biomasa (substanța uscată), concentrația pigmentilor asimilatori și a proteinelor celulare.

Expunerea la lumina de diferite intensități PAR (radiația activă fotosintetic) a suspensiei algale s-a efectuat la 1000, 1500, 2000, 2500 și 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, timp de 120 minute, la temperatura camerei (perioada de iluminare). Ca sursă de lumină s-au folosit becuri halogen de 500W reglabile. Suspensia a fost agitată magnetic pe întreaga durată a expunerii la lumină pentru omogenizarea umbririi celulare, iar între suspensie și sursa de lumină s-a interpus un filtru cu apă pentru evitarea încălzirii. Probele analitice au fost prelevate la intervale de 30 minute, prin filtrare.

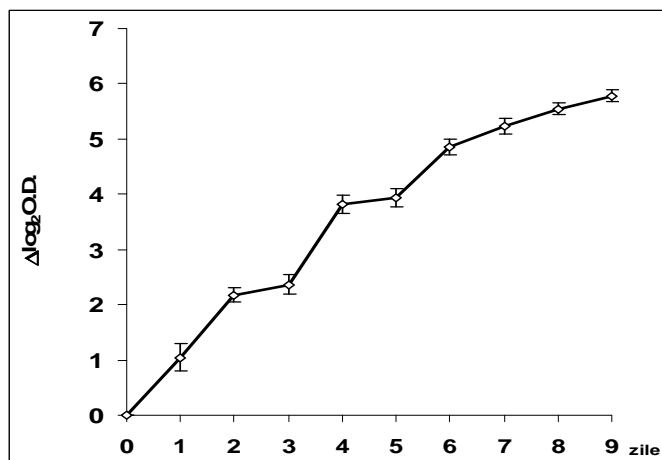
După expunerea la lumină, suspensia algală s-a menținut la semiîntuneric timp de 120 minute pentru epoxidarea zeaxantinei (perioada de refacere, reconversie).

Pigmenții (clorofila a și b, carotenoide), extrași cu acetonă, s-au estimat spectrofotometric pe baza coeficienților specifici de absorbție [2, 18], rezultatele fiind exprimate în $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ substanță uscată sau în mmol / mol clorofila a. Proteinele s-au determinat după metoda Lowry [19].

Pentru analiza carotenoidelor ciclului xantofilic, extractul a fost saponificat în soluție etanolică de 1,7% KOH, iar separarea și identificarea pigmentilor s-a efectuat prin cromatografie în strat subțire [13].

Pe baza componenților xantofilici s-a determinat indicele de de-epoxidare (DEPS): $\text{DEPS} = Z + 0,5A/V + A + Z$ (reflectă de-epoxidarea violaxantinei) și indicele de epoxidare al zeaxantinei (EPS): $\text{EPS} = V + 0,5A/V + A + Z$.

Rezultate și discuții. Procesul de creștere. Curba de creștere a culturilor de *Chlorella* la lumina moderată de $600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, este redată în Fig. 3. Culturile au prezentat o creștere rapidă, fără fază latentă, atingându-se o rată de creștere exponențială (R) = 0,64; o rată medie de creștere (R_m) = 0,136 și un timp de dublare (g) = 1,15. S-a acumulat o cantitate de biomasă de 0,466 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tabel 1), bogată în proteine în acord cu alte rezultate publicate [25].



Fi g. 3. Curba de creștere a culturilor algei verzi *Chlorella fusca*.

Conținutul în pigmenți fotosintetici, respectiv în clorofile și carotenoide, este relativ ridicat, cu raporturi normale între componenți (Tabel 1).

Tabel 1

Conținutul în componenți celulari ai culturilor de *Chlorella fusca*

Componenți biochimici	Valori cantitative
Clorofila <i>a</i> (mol)	4,39 x 10 ⁻⁵
Clorofila <i>b</i> (mol)	1,66 x 10 ⁻⁵
Caroteni (mmol/mol cl. a)	28,86
Luteina (mmol/mol cl.a)	86,72
Neoxantina (mmol/mol cl.a)	21,27
Violaxantina (mmol/mol cl.a)	36,96
Anteraxantina (mmol/mol cl.a)	1,80
Zeaxantina (mmol/mol cl.a)	4,69
Total carotenoide (mmol/mol cl. a)	180,30
Total V+A+Z	43,45
Total pigmenți (mmol/mol. cl.a)	6,60
a/b	2,64
a+b/carotenoide	11,93
Substanța uscată (g/l)	0,466
Proteine totale (μg.g ⁻¹ s.u.)	995,61

Inducerea fotoinhibiției. Inactivarea funcționării PS II prin lumină s-a urmărit prin aplicarea de intensități diferite de lumină și prin schimbarea duratei de expunere. *P a r k* și colab. [21] au arătat că există o relație strânsă între intensitate și durata iluminării pentru funcționarea normală a PS II, important fiind numărul total de fotoni absorbiți și nu rata absorbției fotonilor.

În general, conținutul în pigmenți asimilatori a crescut în primele 30 minute după care a fost observată o evoluție oscilantă, la diferitele intensități de lumină (Fig. 4). Fotoinhibiția s-a produs după 90 minute la intensitățile de 1000, 1500 μmol.m⁻².s⁻¹; în intervalul de 30 minute pentru lumina de 2000 și 3000 μmol.m⁻². s⁻¹ și după 30 minute la lumina de 2500 μmol.m⁻². s⁻¹. S-au constatat modificări în structura fotosistemelor prin schimbarea concentrației clorofilei *a* și *b* precum și a carotenoidelor, fapt care a cauzat modificarea raporturilor între pigmenți, respectiv, a capacității fotosintetice.

Lumina de 2500 și 3000 μmol.m⁻². s⁻¹ a cauzat fotodistrugerii importante în structura PS II. Starea redox a componentilor PS II a fost măsurată spectrofotometric prin înregistrarea schimbărilor în absorbție Δ A₃₂₀ (Fig. 5).

Fotoreducerea acceptorilor primari de electroni ai PS II s-a corelat pozitiv cu cantitatea de clorofilă *a*. După 30 minute de iluminare s-au produs importante ajustări fotochimice sub acțiunea luminii de 1000, 2000 și 2500 μmol.m⁻².s⁻¹, producându-se fotooxidarea acceptorilor de electroni de la PS II și menținerea activă a centrilor de reacție. La finele celor 120 minute de iradiere s-a consemnat un echilibru între fotoreducerea și fotooxidarea acceptorilor primari de electroni.

FOTOINHIBIȚIA INDUSĂ DE LUMINĂ LA CHLORELLA FUSCA

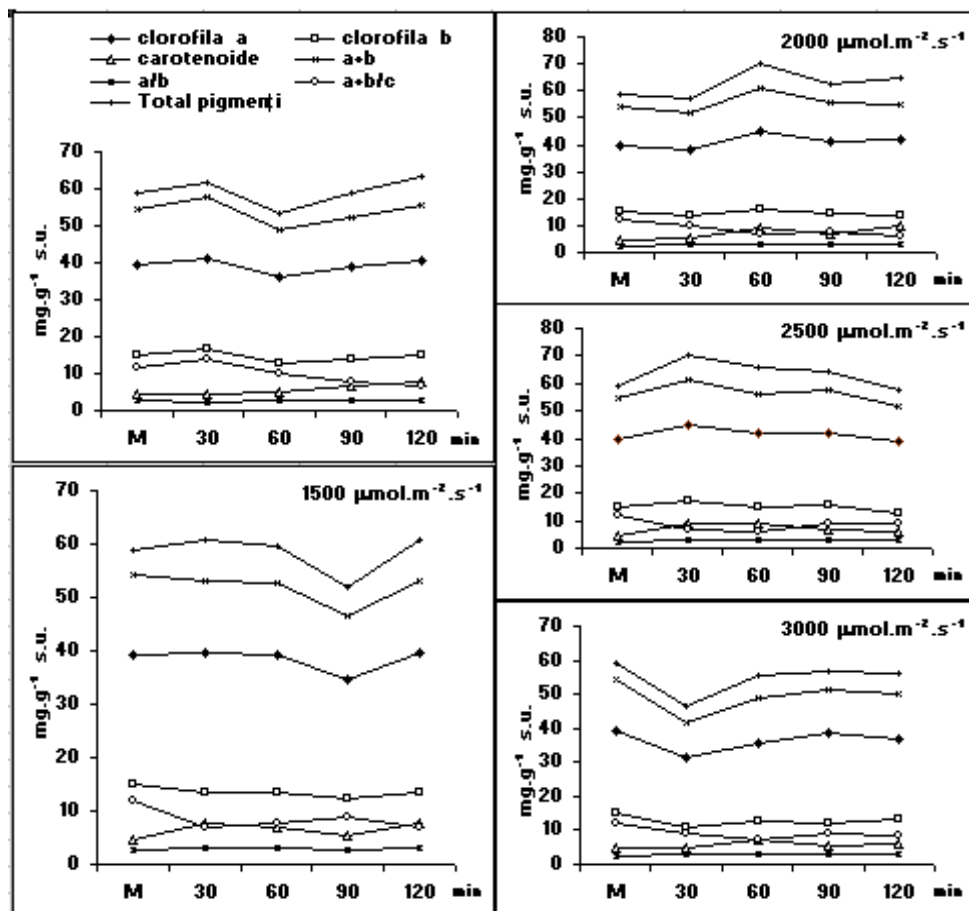


Fig. 4. Conținutul în pigmenți și raportul dintre ei la *Chlorella fusca* în timpul expunerii la lumină.

Starea redox a PS I s-a analizat prin schimbările spectrale în absorbție ΔA_{700} (Fig. 6). Exceptând lumina de 1500 și 3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la nivelul PS I s-a menținut un echilibru între fotooxidări și fotoreduceri în primele 30 minute cu o ușoară dominanță a fotoreducerilor, ca la finele timpului de iradiere să se instaleze un oarecare echilibru.

Evoluția conținutului în proteine este prezentată în Fig. 7. Comparativ cu controlul, s-a constatat o creștere a conținutului în proteine, mai semnificativă la lumina de 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Intensitatea mare a luminii (3000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) are un efect inhibitor. Acumularea proteinelor s-a corelat pozitiv cu cea a clorofilei a răspunzând necesarului de proteine în componența complexelor LHC pentru legarea clorofilei captatoare de lumină.

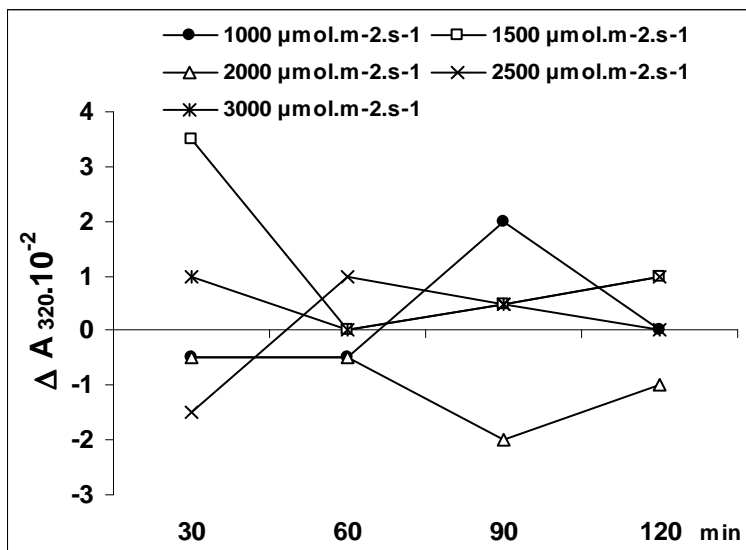


Fig. 5. Evaluarea stării redox a PS II prin înregistrarea diferențelor de absorbție la 320 nm.

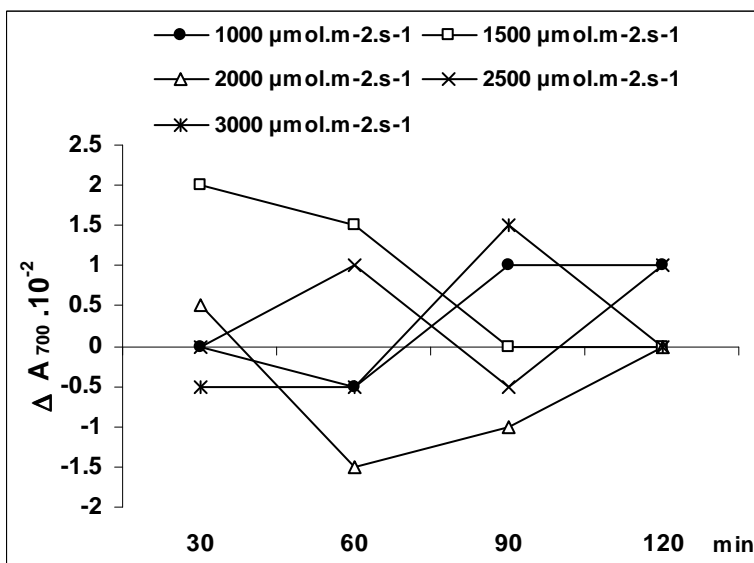
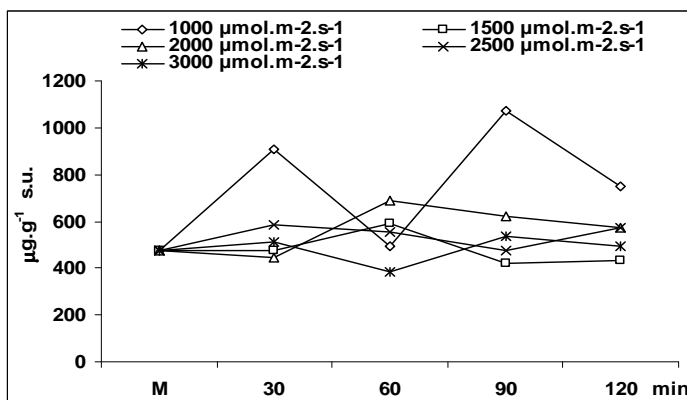


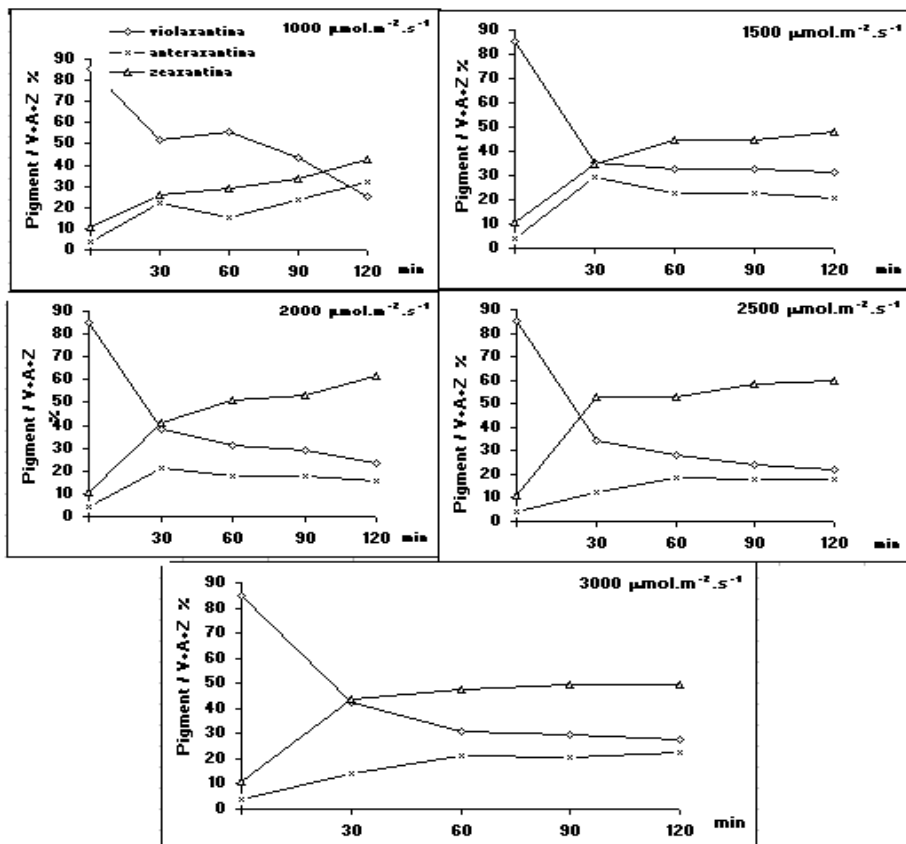
Fig. 6. Evaluarea stării redox a PS I prin înregistrarea diferențelor în absorbție la 700 nm.

Reacțiile de de-epoxidare a violaxantinei. De-epoxidarea a fost urmărită timp de 120 minute (perioada de iluminare), la diferite intensități de lumină, utilizându-se suspensii algale adaptate la lumina de intensitate mică (Fig. 8).

FOTOINHIBIȚIA INDUSĂ DE LUMINĂ LA CHLORELLA FUSCA



Fi g. 7. Conținutul în proteine la Chlorella fusca în timpul expunerii la lumină.



Fi g. 8. De-epoxidarea violaxantinei la Chlorella fusca în timpul expunerii la lumină.

Pe durata a 30 minute de iluminare, de-epoxidarea violaxantinei a fost rapidă și semnificativă, fiind însoțită de creșterea cantității de zeaxantină și anteraxantină. După 60 minute de expunere, concentrația pigmentilor ciclului xantofilic devine constantă. Concentrația violaxantinei și zeaxantinei depinde de disponibilitatea violaxantinei la de-epoxidază și de raportul dintre reacțiile de de-epoxidare și epoxidare în dependență de intensitatea luminii [14]. Activitatea de-epoxidazei și rezultatul acesteia depinde de pH-ul lumenului tilacoidal și de disponibilul echivalenților de reducere [22].

Concentrațiile relativ constante ale xantofilelor fotoconvertibile, după 60 minute de expunere, se pot interpreta prin saturarea de-epoxidării datorită disponibilului limitat de violaxantină.

Activitatea de de-epoxidare a xantofilelor (DEPS) a crescut pe durata derulării fenomenului de fotoinhibiție, ceea ce evidențiază în mod indirect cinetica de-epoxidării violaxantinei (Fig. 9). Evoluția ciclului xantofilic este influențată, în iluminarea de durată, de cele două trepte ale de-epoxidării, de la violaxantină la anteraxantină și apoi de la anteraxantină la zeaxantină. Recent *Gruszcki* și *Krupa* [12] au evidențiat o activitate epoxidazică a proteinelor CAB, responsabile de variația nivelurilor de bază ale xantofilelor. *Bassi* și colab. [4] au arătat că violaxantina este asociată cu proteinele interne (CP₂₄, CP₂₆, CP₂₉), iar *Ruban* și colab. [24] au constatat asocierea violaxantinei cu proteinele principale LHC II [17].

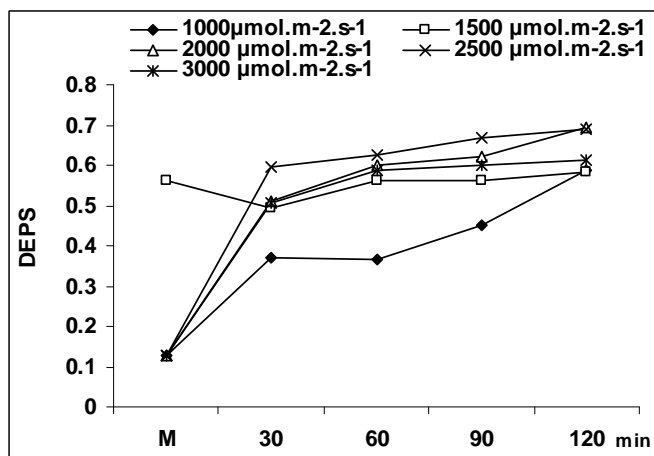


Fig. 9. Evoluția indicelui de de-epoxidare (DEPS) a violaxantinei la *Chlorella fusca* în timpul expunerii la lumină.

Reacțiile de epoxidare a zeaxantinei. Suspensiile de alge supuse fotoinhibiției au fost transferate la lumină redusă timp de 120 minute pentru analiza epoxidării zeaxantinei la violaxantină (perioada de reconversie). În aceste condiții se refac structurile afectate, cu precădere unitățile fotosintetice inițiale ale PS II.

Refacerea structurilor fotosistemelor afectate de lumina intensă se bazează pe o creștere semnificativă a cantității proteinelor necesare pentru legarea pigmentilor resintetizați (Fig. 10). Deoarece lumina de $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a cauzat fotodistrugereri puternice, acestea se refac mai lent în perioada reconversiei.

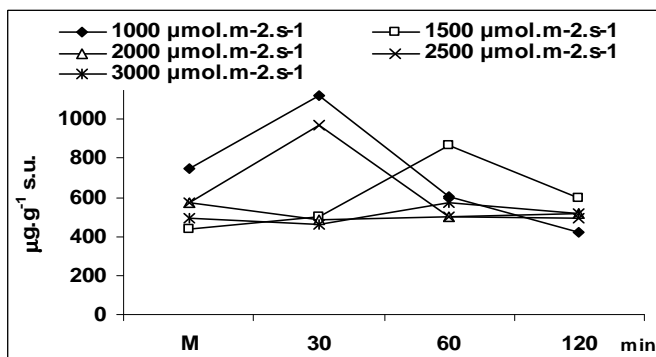


Fig. 10. Conținutul în proteine la Chlorella fusca în perioada reconversiei.

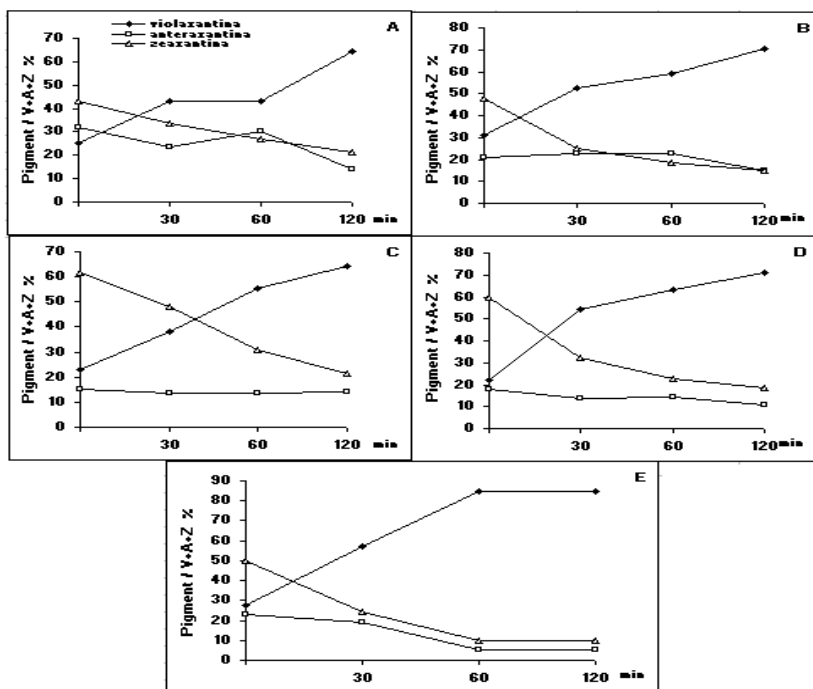


Fig. 11. Dinamica epoxidării carotenoidelor xantofilice în perioada reconversiei, după tratamentul luminos cu: A= $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; B= $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; C= $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; D= $2500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; E= $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Evoluția componentelor ciclului xantofilic în perioada de reconversie este prezentată în Fig. 11. Refacerea concentrației violaxantinei a fost rapidă în primele 30 minute, datorită intensificării epoxidării zeaxantinei la anteraxantină. La finele perioade de reconversie de 120 minute, concentrația violaxantinei a fost mare, iar zeaxantina și anteraxantina au rămas la valori reduse și constante.

Valorile indicelui epoxidării zeaxantinei au fost scăzute în timpul iluminării, iar în timpul reconversiei acestea cresc, constituind măsura indirectă a epoxidării zeaxantinei (Fig. 12). Concentrația de bază a violaxantinei, produsul final al epoxidării zeaxantinei, a crescut treptat în funcție de timp.

Iluminarea prelungită a avut ca efect diminuarea indicelui epoxidării fără a avea însă vreă influență asupra nivelului de bază al zeaxantinei. Este cunoscut faptul că efectul este mai pronunțat când iluminarea se efectuează la temperatura scăzută [14].

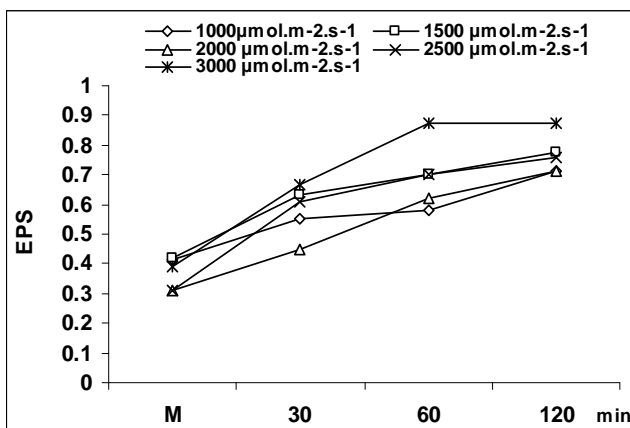


Fig. 12. Evoluția indicelui de epoxidare (EPS) a zeaxantinei la *Chlorella fusca* în perioada reconversiei.

Concluzii. Experiențele s-au derulat pe parcursul a două etape.

1. În etapa de acclimatizare alga s-a adaptat rapid la lumina moderată de $600 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ având o rată de creștere exponențială care a dus la densitatea optică de 0,900 în 9 zile de creștere.

2. În etapa de fotoinhibiție efectul luminii s-a manifestat prin schimbarea compoziției în pigmenți asimilatori a aparatului fotosintetic. Concentrația clorofilei a și b , precum și a carotenoidelor care nu intră în componența ciclului xantofilic, respectiv, caroten, luteină și neoxantină s-a modificat în primele 30 minute de expunere, proporțional cu intensitatea luminii.

3. Diferențele de fotoreducere și fotooxidare ale fotosistemelor, sunt proporționale cu intensitatea luminii și durata de expunere. Conținutul în proteine se corelează pozitiv cu evoluția activității fotosistemelor.

4. În condițiile fotoinhibiției, operează ciclul xantofilic în direcția de-epoxidării violaxantinei în timpul iluminării și apoi urmează reacția epoxidării lente la întuneric a zeaxantinei. Valorile indicelui de de-epoxidare au crescut proporțional cu creșterea intensităților PAR (radiația activă fotosintetic), precum și cu durata de expunere la aceste intensități. De asemenea, valorile indicelui de epoxidare a zeaxantinei au crescut proporțional cu durata perioadei de reconversie. Aceste rezultate indică un rol important al ciclului xantofilic în protecția aparatului fotosintetic al algelor verzi expuse la intensități mari de lumină.

BIBLIOGRAFIE

1. Adams, W. W., Demmig-Adams, B., Verhoeven, A. S., Barker, D. H., *Photoinhibition during winter stress: Involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation*, „Aust. J. Plant Physiol.”, **22**, 1994, 261-276.
2. Arnott, D. I., *Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenyloxidase in Beta vulgaris*, „Plant Physiol.”, **24**, 1949, 1-15.
3. Aro, E. M., McCaffery, S., Anderson, J. M., *Photoinhibition and D₁ protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances*, „Plant Physiol.”, **103**, 1993, 835-843.
4. Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P., Marquardt, J., *Carotenoid-binding proteins of photosystem II*, „Eur. J. Biochem.”, **212**, 1993, 297-303.
5. Björkman, O., Demmig-Adams, B., *Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants*, in: Schulze, E. D., Caldwell, M. M., Eds., *Ecophysiology of Photosynthesis*, pp.17-47, Springer-Verlag, Berlin, 1995.
6. Bratt, C. E., Arvidsson, P. O., Carlsson, M., Åkerlund, H. E., *Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration*, „Photosynth. Res.”, **45**, 1995, 169-175.
7. Briantais, J. M., Vernet, C., Picaut, M., Krause, G. H., *A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts*, „Biochim. Biophys. Acta”, **548**, 1979, 128-138.
8. Demmig-Adams, B., Adams, W. W., Logan, B. A., Verhoeven, A. S., *Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible Photosystem II efficiency in plant acclimated to light stress*, „Aust. J. Plant Physiol.”, **22**, 1995, 249-260.
9. Demmig-Adams, B., Adams, W. W. III., *The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis*, „Elsevier Trends J.”, **1**, 1996, 21-26.
10. Dragoș, N., Péterfi, L. Șt., Momeu, L., Popescu, C., *An introduction to the algae and the culture collection of algae at the Institute of the Biological Research Cluj-Napoca*, Cluj Univ. Press, 1997.
11. Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D., Wasielewski, M. R., *Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis*, „Photosynth. Res.”, **41**, 1994, 389-395.
12. Gruszecki, W. I., Krupa, Z., *LHC II, the major light-harvesting pigment-protein complex is a zeaxanthin epoxidase*, „Biochim. Biophys. Acta”, **1144**, 1993, 97-101.

13. Hager, A., Bertenrath, T. M., *Die isolierung und quantitative bestimmung der carotenoide und chlorophylle von blättern, algen und isolierten chloroplasten mit hilfe dünn-schichtchromatographischer methoden*, „Planta”, **69**, 1966, 198-216.
14. Jahn, P., *The xanthophyll cycle in intermittent light-grown pea plants. Possible functions of chlorophyll a/b-binding proteins*, „Plant Physiol”, **108**, 1995, 149-156.
15. Krause, G. H., Behrend, U., *Δ pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts*, „FEBS Lett”, **200**, 1986, 298-302.
16. Krause, G. H. *Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms*, „Physiol.Plant”, **74**, 1988, 566-574.
17. Król, M., Spangfort, M. D., Huner, N. P. A., Öquist, G., Gustafsson, P, Jansson, S., *Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions and early light-induced proteins in a chlorophyll b-less barley mutant*, „Plant Physiol.”, **107**, 1995, 873-883.
18. Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R., *Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*, „Biochem. Soc. Trans.”, **603**, 1983, 591-592.
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, „J. Biol. Chem.”, **193**, 1951, 265-275.
20. Öquist, G., Anderson, J. M., McCaffery, S., Chow, W. S., *Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants*, „Planta”, **188**, 1992, 422-431.
21. Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., *Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in medium light depends on photon exposure*, „Planta”, **196**, 1995, 401-411.
22. Pfündel, E., Bilger, W., *Regulation and possible function of the violaxanthin cycle*, „Photosynth. Res.”, **42**, 1994, 89-109.
23. Powles, S. B., *Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light*, „Annu.Rev.Plant Physiol.”, **35**, 1984, 15-34.
24. Ruban, A. V., Young, A. J., Pascal, A. A., Horton, P., *The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light harvesting complex of spinach thylacoid membranes*, „Plant Physiol.”, **104**, 1994, 227-234.
25. Schärer, C., *Controlling the effects of excessive light energy fluxes: dissipative mechanisms, repair processes and long-term acclimation*, in Schulze, E. D., ed., *Flux Control in Biological Systems From Enzymes to Populations and Ecosystems*, pp.37-54, Academic Press, Inc., San Diego, 1994.
26. Schöner, S., Krause, G. H., *Protectiv systems against active oxygen species in spinach: Response to cold acclimation in excess light*, „Planta”, **180**, 1990, 383-389.
27. Staehelin, L. A., Arntzen, C. J., *Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components*, „J.Cell Biol”, **97**, 1983, 1327-1337.
28. Stein, J. R., *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1973.

ORGANIZAREA MEMBRANELOR TILACOIDALE ȘI FUNCȚIONAREA LOR SUB INFLUENȚA STRESULUI FOTIC

ANCA BUTIUC-KEUL*, LASZLO FODORPATAKI* și CONSTANTIN DELIU**

SUMMARY. - Thylakoid Membrane Organization and Functioning under High Light Stress. Several experiments regarding the organization of thylakoid membranes and their functioning under high light stress were carried out. As shown by circular dichroism spectra (CD) the light-harvesting pigment-protein complexes of 3 weeks old pea plantlets are better organized than the ones of 6 weeks old pea plantlets, fact that could confer high capacity to young plantlets to undergo reversible changes of thylakoid membrane organization under high light intensity. Under 120' exposure to high light the amplitude of CD spectrum is decreased by 50% compared to CD spectrum of control chloroplasts. The fluorescence parameters give important informations about thylakoid membrane organization and functioning under stress conditions. The initial fluorescence (F_0) shows that light-harvesting complexes have lower extension under high light intensity. The values of temporary, maximal fluorescence (F_m) are more reduced than F_0 values under 600 and 1200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ light intensity. The F_v/F_m ratio as an indicator of potential quantum efficiency of photosynthesis, shows the highest value at low light intensity while under a light intensity of 600-1200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, the values of F_v/F_m ratio are strongly decreased.

Studii recente, referitoare la procesele de acomodare ale aparatului fotosintetic la variațiile regimului fotic, au scos în evidență faptul că acestea se realizează pe multiple planuri care includ atât modificările de scurtă durată (de milisecunde până la câteva minute), ce rezultă din reorganizarea componentelor structurale existente, precum și schimbările reglatoare pe termen lung (de ore și zile), datorate ciclurilor de sinteză și degradare ale moleculelor proteice implicate în reacțiile fotochimice și variației conținutului membranelor tilacoidale în ATP-sintetază și în complexe de pigmenți antenari [4, 10].

Stresul fotic nu se datorează luminii intense în sine, ci excesului de energie absorbită față de cea care poate fi utilizată în reacțiile fotochimice, ceea ce se poate datora nu numai unei densități crescute a fluxului fonic ci și scăderii capacității

* Babeș-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400084 Cluj, Romania;

E-mail: alkeul@yahoo.com

** Biological Research Institute, 400015 Cluj, Romania; E-mail: deliu_konstantin@yahoo.com

funcționale a aparatului fotosintetic în prezența altor factori stresanți [3, 5]. Eficiența traserii energiei luminoase spre centrul de reacție este, în mare măsură, determinată de arhitectura complexelor proteine-pigmenți asimilatori din membranele tilacoidale. Componentele fotosistemului II (PSII) din membranele tilacoidelor granale formează macroagregate cu organizare chirală [6, 7]. Formarea macrodomeniilor este în mare măsură facilitată de complexe captatoare de lumină de la nivelul PSII (LHCII = Light harvesting complex of PSII). În forma sa izolată, LHCII formează, de asemenea, agregate lamelare cu organizare chirală [6, 7]. S-a demonstrat că aceste macrodomenii, care conțin LHCII, joacă diferite roluri structurale și funcționale în complexul antenar al plantelor superioare. Lumina determină modificări reversibile detectate la nivelul macroorganizării cromoforilor [1, 6, 7]. Aceste restructurări au fost inițial atribuite gradientilor transmembranari și/sau protonilor (sau ionilor) apăruiți ca urmare a transportului de electroni și protoni prin membrana tilacoidală. Cu toate acestea, se pare că aceste restructurări, sunt în mare măsură, independente de activitatea fotochimică a membranelor în exces de lumină (intensități luminoase excedentare optimului), rata modificărilor structurale crescând aproximativ liniar cu intensitatea luminii [2, 8, 11]. Deci, în membranele tilacoidale, modificările structurale reversibile sunt în mare măsură independente de activitatea fotochimică și sunt amplificate în lumină excesivă [11]. În condiții de fotoinhibiție, macrodomeniile chirale ale membranelor tilacoidale sunt dezamblate, fără a fi afectată organizarea complexelor antenare în ansamblu. Aceste modificări ireversibile sunt în corelație cu gradul de fotoinhibiție [9]. Modificările structurale au fost acompaniate de modificări în cinetica fluorescenței clorofilei, ceea ce sugerează implicarea lor în procesele reglatoare în condiții de iluminare excesivă [1].

În această lucrare s-a realizat un studiu referitor la modificarea organizării membranelor tilacoidale sub influența stresului cauzat de lumina de intensitate crescută.

Materiale și metode. Cloroplastele izolate constituie un sistem experimental foarte bun pentru studiul mecanismelor moleculare ale fotoinhibiției. În acest experiment, cloroplastele au fost izolate de la plantule de mazăre (*Pisum sativum* L.), provenite din același lot de semințe [6], plantule care au fost crescute, până la vârsta de 3 săptămâni, respectiv 6 săptămâni de la germinație, în germinatoare aflate în camera de vegetație termostată la temperatura de 25 °C, cu umiditatea atmosferică relativă de 80 %. Pe o perioadă continuă de 16 ore pe zi, plantulele au fost iluminate cu ajutorul unor tuburi fluorescente care au asigurat o densitate a fluxului fonic fixată la 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, măsurată la nivelul suprafeței foliare cu ajutorul unui radiometru de cuante „Hansatech” pentru radiațiile fotosintetic active. Aceste condiții sunt necesare pentru că structurile fotosintetice dezvoltate în lumină slabă sunt mult mai susceptibile la fotoinhibiție decât cele care funcționează în condițiile unor fluxuri fonice ridicate nesaturante (în condiții de heliofilie).

La atingerea vârstei de 3 săptămâni de la germinație, de pe plantulele aflate în germinatoare au fost colectate stipelele și foliolele netransformate în cârcei de la cele 3 frunze aflate la baza tulpinii. Din acest material vegetal s-au izolat cloroplastele pentru studiile ulterioare. Pentru experimentul de expunere la flux fonic inhibitor, iluminarea a fost realizată cu un bec care furnizează lumină de intensitate mare. Efectul caloric a fost îndepărtat prin interpunerea unui vas de sticlă cu apă, între plante și bec. Iluminarea a fost realizată timp de 30', 60', 120', după care au fost recoltate frunzele și stipelele și au fost izolate cloroplastele, respectiv membranele tilacoidale și s-au realizat primele măsurători de dicroism circular. Aceste măsurători au fost realizate la plantule în vârstă de 3, respectiv 6 săptămâni expuse fluxului fonic de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pentru studiul organizării membranelor tilacoidale în funcție de vârsta plantulelor.

Spectrele de dicroism circular au fost înregistrate utilizându-se un dicrograf Jobin-Yvon CD 6, iar concentrația clorofilei a fost $20 \mu\text{g/ml}$.

Toate rezultatele privind spectrele de dicroism circular, fluorescență sunt înregistrate de aparate cuplate la calculator. Preluarea spectrelor și procesarea acestora s-a realizat cu programul Excel/Windows. Pentru fiecare măsurătoare au fost efectuate trei repetiții, iar rezultatele au fost prelucrate statistic.

Un alt set de experimente a constat în determinarea parametrilor fluorescenței clorofilene induse în suspensii de cloroplaste, acestea fiind obținute după metoda descrisă anterior. Cloroplastele izolate au fost suspendate într-o cantitate corespunzătoare cu $10 \mu\text{g}$ clorofilă în 1 ml soluție tampon și au fost expuse direct la următoarele intensități luminoase: a) varianta 1 - la $100 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (flux fonic identic cu cel din perioada de creștere a plantelor în camera de vegetație), b) varianta 2 - la $300 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$, c) varianta 3 - la $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$, d) varianta 4 - la $900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ și e) varianta 5 - la $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cinetica inducerii fluorescenței clorofilene în frunze preadaptate la întuneric și supuse ulterior unei iradierii bruște este cunoscută sub numele de efect Kautsky. Metoda este nedistructivă, foarte sensibilă și aplicabilă și în condiții de teren, astfel că inducerea fluorescenței are astăzi o aplicabilitate foarte largă în domeniul fiziologiei stresului la plante [13].

Fluorescența clorofiliană indusă în urma iluminării cu lumină actinică (cu $150 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$) roșie (de 660 nm) a materialului vegetal (suspensie de cloroplaste cu $10 \mu\text{g}$ clorofilă în 1 ml) s-a determinat pe o durată de 1,5 secunde, cu ajutorul unui fluorimetru Hansatech. S-au măsurat următorii parametri ai fotosintezei clorofilene induse [14]:

a) fluorescența de bază (F_0), apărută în primele milisecunde de la acțiunea luminii actinice asupra aparatului fotosintetic aflat în întuneric, intensitatea acesteia fiind direct proporțională cu gradul de organizare a complexelor antenare care realizează captarea energiei fotonilor incidenti pe suprafața respectivă; oferă indicii despre integritatea membranelor tilacoidale și despre capacitatea de a transmite energia

captată între moleculele învecinate de pigmenți, dar nu are legătură cu transformările energiei fotonice absorbite;

b) fluorescența maximă temporară (F_m), datorată reducerii acceptorilor chinonici ai sistemului fotochimic II de către electronii energizați expulzați din centrul de reacție P_{680} în cursul reacției fotochimice primare de separare a sarcinilor electrice în urma absorbției unei cuante fotonice; valoarea acestui parametru oferă informații despre starea funcțională a regiunii acceptoare a sistemului fotochimic II și despre capacitatea de transport al electronilor spre complexul citocromilor b_6/f ;

c) fluorescența variabilă (F_v) reprezintă diferența dintre cea maximă temporară și cea inițială sau de bază, reflectând relația cantitativă dintre captarea și conversia fotochimică primară a energiei fotonice;

d) raportul F_v/F_m , cunoscut și sub numele de randament cuantic potențial al fotosintezei, este un parametru esențial al eficienței energetice a fazei de lumină în ansamblu, reflectând măsura în care energia fonică absorbită poate fi transformată în energie chimică utilizabilă în asimilația bioxidului de carbon, respectiv în generarea ATP prin fosforilare și în reducerea $NADP^+$.

Măsurătorile de fluorescență clorofiliană indusă au fost executate în 5 repetiții pentru fiecare variantă experimentală, iar valorile au fost prelucrate statistic cu ajutorul testului t .

Rezultate și discuții. Așa cum am menționat, primele experimente realizate au vizat studiul organizării membranelor tilacoidale în macrodomenii formate din complexe de pigmenți asimilatori-proteine la plantule de 3 respectiv 6 săptămâni. Aceasta s-a realizat prin înregistrarea spectrelor de dicroism circular (CD) la cloroplastele izolate din frunzele plantulelor care au fost crescute la o intensitate luminoasă de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 1). În urma observațiilor efectuate, s-a constatat că nu există modificări de alură ale spectrelor în cazul plantulelor de vârste diferite, însă amplitudinea spectrului la plantulele tinere este cu mult mai mare decât la plantulele senescente. Aceasta dovedește faptul că la plantulele tinere sinteza de clorofilă este mai intensă, comparativ cu aceea a plantulelor senescente, deoarece se știe că mărimea acestor macrodomenii este dependentă de concentrația clorofilei. Benzile CD, + 500 nm și - 682 nm sunt caracteristice unei înalte organizări în macrodomenii, ceea ce se poate observa că apare indiferent de vârsta plantelor, diferențe apărând doar în amplitudinea spectrului.

Deoarece s-a observat că plantulele în vârstă de 3 săptămâni prezintă o organizare a membranelor tilacoidale mult mai bună decât plantulele în vârstă de 6 săptămâni, în experimentele ulterioare de iluminare cu lumină inhibitoare s-au utilizat doar plantule de 3 săptămâni. Iluminarea acestora s-a realizat timp de 30', 60', 120' cu lumină de intensitate $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

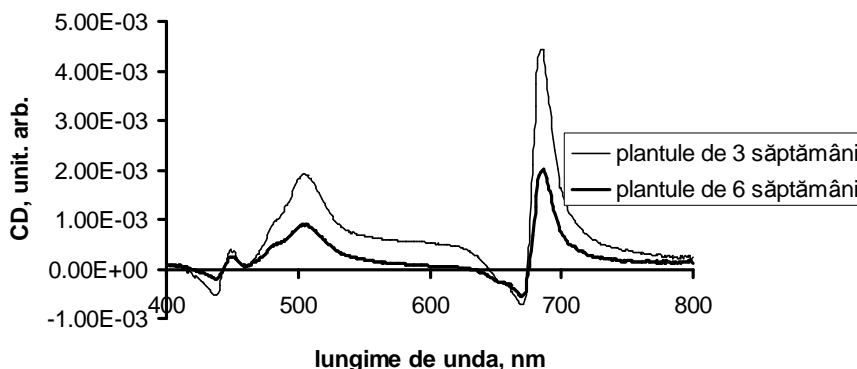


Fig. 1. Spectrul CD al cloroplastelor izolate din frunzele și stipelele plantulelor de mazăre de 3, și respectiv de 6 săptămâni, crescute la o intensitate luminoasă de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ și o fotoperioadă de 16 ore lumină/ 8 ore întuneric.

Influența luminii inhibitoare asupra organizării membranelor tilacoidale în complexe formate din pigmenți asimilatori și proteine este ilustrată prin spectrul CD al cloroplastelor izolate din frunzele plantulelor expuse fluxului fonic diferite intervale de timp (Fig. 2). Din grafic se poate observa că iluminarea cu flux fonic inhibitor nu modifică alura spectrului CD, ceea ce înseamnă că organizarea membranelor tilacoidale este menținută chiar la o iluminare mai îndelungată. Diferențele apar doar în ce privește amplitudinea spectrelor care este în concordanță cu timpul de expunere a plantelor la fluxul fonic inhibitor. Astfel, după o iluminare timp de 30' se observă o reducere ușoară a amplitudinii spectrului CD în regiunea + 500 nm și - 682 nm, ceea ce denotă doar un proces redus de degradare a pigmentilor clorofilieni. Surprinzător este faptul că degradarea pigmentilor clorofilieni nu este foarte intensă nici după o iluminare de 60'. Diferențe minore se observă între amplitudinea spectrului la + 682 nm la cloroplastele izolate din frunzele plantulelor expuse 30' și 60'. Față de martor se observă însă o reducere a conținutului în clorofilă la plantulele iluminate timp de 60', ceea ce indică o organizare mai slabă în macrodomenii a membranelor tilacoidale. Spre deosebire de acestea, la plantulele expuse timp de 120' la acțiunea fluxului fonic inhibitor se produce o perturbare majoră a organizării membranelor tilacoidale. Degradarea pigmentilor clorofilieni este mult prea intensă ca procesele de biosinteză să poată înlocui moleculele de clorofilă degradate, iar complexele de pigmenți-proteine se dezorganizează. Amplitudinea spectrului CD în regiunea + 500 nm, - 682 nm și + 682 nm este redusă la jumătate față de martor.

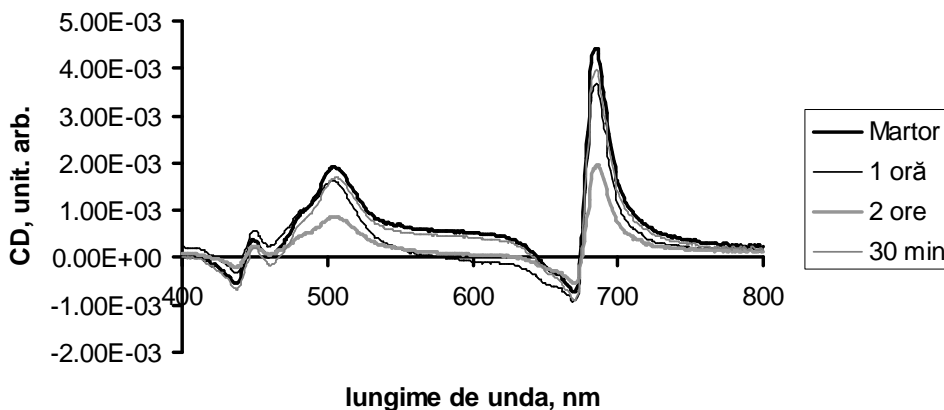


Fig. 2. Spectrul CD al cloroplastelor izolate din frunzele și stipelele plantulelor de mazăre expuse fluxului fonic inhibitor de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ timp de 30', 60', 120'. Martorul este reprezentat de plantule crescute la $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

În cazul suspensiilor de cloroplaste expuse la diferite densități ale fluxului fonic, s-au determinat parametri ai fluorescenței clorofiliene induse. În absența oricărui factor perturbator, curba inducției fluorescenței, măsurată în prima secundă după iluminare în suspensia de cloroplaste, prezintă câteva zone distincte. Începe cu o valoare inițială a fluorescenței de bază, notată cu F_0 , se continuă cu o creștere moderată până la un nivel de platou intermediar (F_{pl}), de unde crește încet, dar cu amploare până la atingerea nivelului maxim temporar, F_m . F_0 își are originea în complexul antenar de captare a luminii, care este asociat centrului de reacție al sistemului fotochimic II. Creșterea de la F_0 la F_{pl} reflectă fotoreducerea rapidă a unor molecule de Q_A care acceptă electronul transferat de la P680 fotoexcitat al unor centri de reacție, indicând activitatea intervalului Q_A-Q_B . Etapa creșterii fluorescenței de la F_{pl} la F_m se atribuie fotoreducerii majorității moleculelor de plastochinonă în urma acceptării electronilor energizați de la numeroase SF II ajunse în stare activă. Deoarece transportul de electroni se desfășoară mai încet pe fața acceptoare a SF I decât la nivelul SF II, electronii se acumulează temporar între cele două sisteme fotochimice [12].

În funcție de natura acțiunii diferiților factori perturbatori asupra reacțiilor fotochimice, cinetica emiterii fluorescenței prezintă modificări specifice. Atunci când electronii nu pot fi transferați de pe Q_A pe Q_B , valorile F_0 și F_m nu se modifică, dar are loc o creștere inițială bruscă și pronunțată a fluorescenței de la F_0 la F_{pl} care atinge valori foarte apropiate de F_m , deoarece Q_A^- nu poate fi oxidat. În schimb, dacă se accelerează transportul de electroni de la centrul Fe-S ai SF I, deci nu se împiedică acumularea temporară a electronilor între cele două sisteme fotochimice, atunci scade mult valoarea F_m , fără a afecta F_0 și F_{pl} , care sunt valori de fluorescență

datorate complexului antenar și respectiv sistemului fotochimic. În cazul în care este afectată funcționarea complexului de scindare a apei, crește semnificativ emiterea rapidă de fluorescență de la F_0 la F_{p1} , însă valoarea finală a F_m nu este afectată, deoarece transportul de electroni este perturbat înăuntrul centrului de reacție al SF II din cauza suplinirii întârziate a electronilor proveniți din fotoliza apei. Orice reducere a fluorescenței variabile ($F_{var} = \text{diferența dintre } F_m \text{ și } F_0$) are la bază împiedicarea formării și acumulării temporare normale a Q_A^- . Fluorescența clorofiliană indusă în suspensiile de cloroplaste izolate din stipelele și foliolele de mază dezvoltate la diferite fluxuri fotonice și preadaptate la întuneric timp de câteva minute înaintea efectuării măsurătorilor furnizează informații despre starea funcțională a aparatului fotosintetic tilacoidal care realizează conversia unei părți a energiei luminoase absorbite în energie chimică utilizabilă în procesele biosintetice.

Valorile fluorescenței inițiale de bază (F_0) scot în evidență faptul că sistemul de pigmenți antenari, responsabili de captarea energiei fotonice, are o extindere tot mai redusă pe măsura creșterii fluxului fonic (Fig. 3). În lumina cu intensitate redusă, complexul antenar este foarte extins, și este format din numeroase molecule de pigmenți clorofilieni și carotenoidici asociați sistemului fotochimic II, asigurând captarea unei proporții însemnate a energiei fotonice deficitare. Iluminarea cu $300 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ și cu $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ are ca rezultat reducerea treptată a complexului de pigmenți antenari, acesta fiind foarte slab reprezentat în cazul celor două intensități luminoase suprasaturante ($900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ și $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Aceste rezultate arată că lumina tot mai intensă este utilizată, din punct de vedere energetic, într-o măsură tot mai mică în etapa incipientă a fazei de lumină a fotosintezei, înainte de a fi convertită parțial în energie chimică.

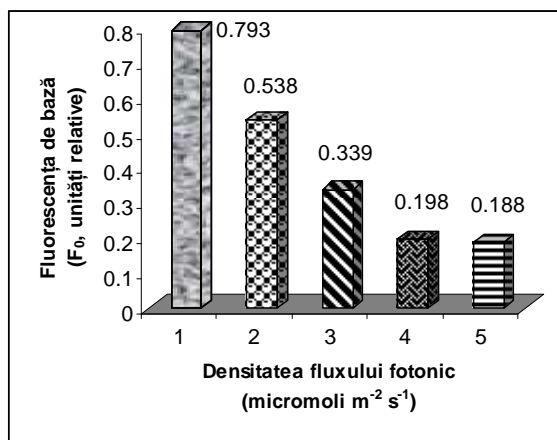


Fig. 3. Influența diferitelor intensități de fluxuri fotonice asupra fluorescenței clorofiliene de bază din cloroplastele izolate din frunzele de mază. Valorile reprezintă media a 5 repetiții pentru fiecare variantă experimentală ($n = 5$). (1 – $100 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 – $300 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 – $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 4 – $900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 5 – $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

În cazul fluorescenței maxime temporare (F_m), rezultată din acumularea plastochinonelor reduse în zona acceptoare a sistemului fotochimic II, se constată o scădere mult mai pronunțată față de F_0 , descreștere care se manifestă deja la intensități medii ale luminii incidente, iar între cele două valori mari ale fluxului fonic nu se mai sesizează diferențe semnificative, fluorescența maximă stabilizându-se la un nivel de planșeu (Fig. 4).

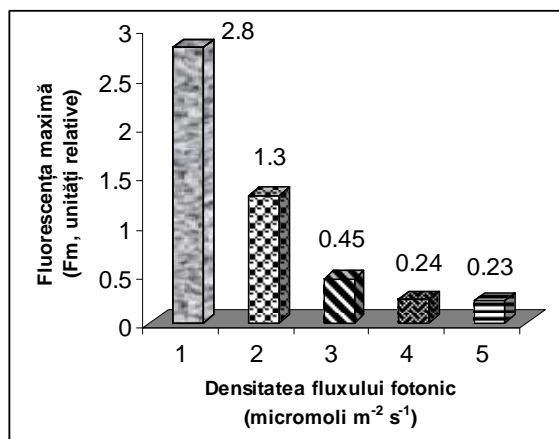


Fig. 4. Influența diferitelor intensități de fluxuri fotonice asupra fluorescenței clorofilene maxime din cloroplastele izolate din frunzele de mazăre. Valorile reprezintă media a 5 repetiții pentru fiecare variantă experimentală ($n = 5$). (1 – $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 – $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 – $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 4 – $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 5 – $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Datorită faptului că diferitele intensități ale luminii influențează în măsură diferită fluorescența inițială și maximă a clorofilelor (respectiv procesele de captare și de conversie a energiei fotonice, cu care cei doi parametri menționați sunt legați), fluorescența variabilă (F_v) înregistrează variații semnificative (Fig. 5). Față de valoarea înregistrată în lumină cu intensitate scăzută ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), scade cu aproximativ 60% în lumină cu intensitate medie ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) și la $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ atinge un nivel scăzut, la cele două fluxuri fotonice excesive (900 și $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fluorescența clorofiliană maximă fiind doar cu puțin mai mare decât fluorescența de bază, cu toate că și aceasta din urmă scade semnificativ față de valoarea înregistrată în condițiile unei iluminări slabe a cloroplastelor.

Raportul F_v/F_m , ca indicator al randamentului potențial al utilizării energiei fotonice în producerea energiei chimice stocate în legături covalente, prezintă cea mai mare valoare în cazul fluxului fonic scăzut, cu care probabil că s-a acomodat aparatul fotosintetic în cursul dezvoltării frunzelor în camera de vegetație. Lumina cu o intensitate de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ duce la o scădere ușoară, dar semnificativă a acestui raport de la 0,79 la 0,54, însă randamentul conversiei energetice rămâne suficient

de ridicat. În schimb, fluxul fonic de $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reduce randamentul cuantic al fazei de lumină la o valoare care nu reprezintă nici jumătate din cea înregistrată la flux fonic scăzut. În consecință, în suspensiile de cloroplaste efectele fotoinhibitorii se manifestă deja la $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$, și apar într-o măsură foarte pronunțată atât la $900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cât și la $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 6).

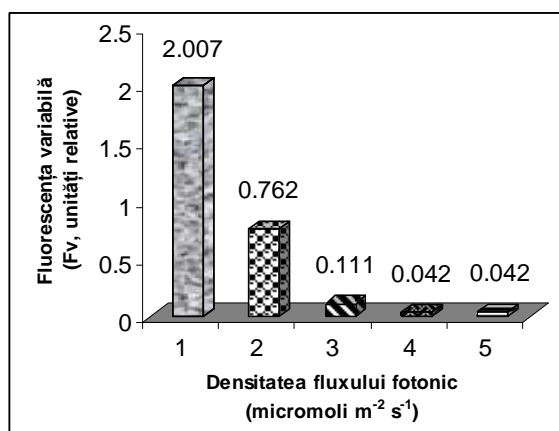


Fig. 5. Influența diferitelor intensități de fluxuri fonice asupra fluorescenței clorofiliene maxime din cloroplastele izolate din frunzele de mazăre. Valorile reprezintă media a 5 repetiții pentru fiecare variantă experimentală ($n = 5$). (1 – $100 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 – $300 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 – $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 4 – $900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 5 – $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

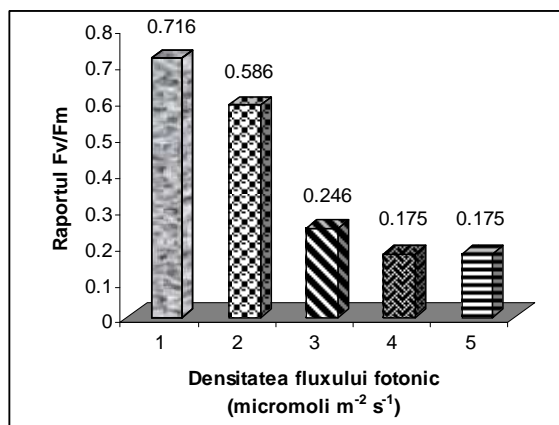


Fig. 6. Influența diferitelor intensități de fluxuri fonice asupra randamentului cuantic potențial (F_v/F_m) în cloroplastele izolate din frunzele de mazăre. Valorile reprezintă media a 5 repetiții pentru fiecare variantă experimentală ($n = 5$). (1 – $100 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 2 – $300 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 3 – $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 4 – $900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 5 – $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

În urma rezultatelor obținute, s-a constatat faptul că cloroplastele izolate reacționează sensibil la variațiile intensității fluxului fonic incident până la un plafon al acestuia, peste care diferite intensități excesive ale luminii provoacă același grad de perturbare a captării și a conversiei energiei fonice. Raportul dintre fluorescența clorofiliană variabilă și cea maximă reflectă în mod sensibil măsura în care reacțiile fotochimice din cloroplaste pot utiliza energia luminii cu diferite intensități. Rezultatele subliniază importanța decisivă a intensității luminii ca factor de mediu care determină randamentul proceselor fiziologice primare care stau la baza producției de biomasă vegetală.

Concluzii.

1. Studiul organizării membranelor tilacoidale în macrodomenii formate din complexe de pigmenți asimilatori-proteine, la plantule de 3, respectiv 6 săptămâni a evidențiat o organizare mai bună în frunzele plantulelor de 3 săptămâni decât în frunzele celor de 6 săptămâni, ceea ce s-a evidențiat prin amplitudinea spectrului de dicroism circular.

2. La plantulele expuse fluxului fonic inhibitor timp de 30' nu există diferențe majore în ceea ce privește amplitudinea spectrului CD față de martor. Diferențe notabile apar doar la o expunere de 60', iar la o expunere de 120' se observă o reducere a amplitudinii spectrului CD la jumătate din amplitudinea spectrului cloroplastelor izolate din plantulele martor.

3. Valorile fluorescenței inițiale de bază (F_0) arată că sistemul de pigmenți antenari responsabili de captarea energiei fonice are o extindere tot mai redusă pe măsura creșterii fluxului fonic. Lumina tot mai intensă este utilizată din punct de vedere energetic într-o măsură tot mai mică în etapa incipientă a fazei de lumină a fotosintezei, înainte de a fi convertită parțial în energie chimică.

4. În cazul fluorescenței maxime temporare (F_m), rezultată din acumularea plastochinonelor reduse în zona acceptoare a sistemului fotochimic II, se constată o scădere mult mai pronunțată față de F_0 , descreștere care se manifestă deja la intensități medii ale luminii incidente, iar între cele două valori mari ale fluxului fonic (600 respectiv $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nu se mai sesizează diferențe semnificative.

5. Raportul F_v/F_m , ca indicator al randamentului potențial al utilizării energiei fonice în producerea energiei chimice stocate în legături covalente, prezintă cea mai mare valoare în cazul fluxului fonic scăzut, iar fluxul fonic de $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reduce randamentul cuantic al fazei de lumină la o valoare care nu reprezintă nici jumătate din cea înregistrată la flux fonic scăzut.

6. În suspensiile de cloroplaste efectele fotoinhibitorii se manifestă la $600 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$ și apar într-o măsură foarte pronunțată atât la $900 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cât și la $1200 \mu\text{moli m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

BIBLIOGRAFIE

1. Barzda, V., Istokovics, A., Simidjiev, I., Garab, G., *Structural flexibility of chiral macroagregates of light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complexes. Light-induced reversible structural changes associated with energy dissipation*, "Biochemistry", **35**, 1996, 8981-8985.
2. Barzda, V., Peterman, E. J. G., van Grondelle, R., van Amerongen, H., *The influence of aggregation on triplet formation in light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complex II of green plants*, "Biochemistry", **37**, 1998, 546-551.
3. Fodorpataki, L., Trifu, M., *Inhibition of light reactions of photosynthesis by some chemical agents in isolated chloroplasts*, "Studia Univ. Babeş-Bolyai, Biologia", **38**, 1993, 93-100.
4. Fodorpataki, L., Trifu, M., *Evolutionary aspects of photosynthetic structures*, "Evol. Adapt.", **5**, 1995, 67-79.
5. Fodorpataki, L., Papp, J., *Ecophysiological studies based on chlorophyll fluorescence in algal cell cultures*, "Contrib. Bot.", **37**, 2002, 221-230.
6. Garab, G., Faludi-Daniel, D., Sutherland, J. C., Hind, G., *Macroorganization of chlorophyll a/b light-harvesting complex in thylakoids and aggregates: Information from circular differential scattering*, "Biochemistry", **27**, 1988 a, 2425-2430.
7. Garab, G., Leeghood, R. C., Walker, D. A., Sutherland, J. C., Hind, G., *Reversible changes in macroorganization of the light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complexes detected by circular dichroism*, "Biochemistry", **27**, 1988 b, 2430-2434.
8. Garab, G., Istokovics, A., Butiuc, A., Simidjiev, I., Déer, A., *Light-induced ion movements in thylakoid membranes and isolated LHCII*, in Garab, G., (Ed.), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Vol. I., pp. 341-34, Kluwer Academic Publishers, 1998.
9. Gussakovsky, E. Barzda, V., Shahak, Y., Garab, G., *Irreversible disassembly of chiral macrodomains in thylakoids due to photoinhibition*, "Photosynth. Res.", **51**, 1997, 119-126.
10. Heldt, H.-W., *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 39-84, Oxford Univ. Press, Oxford, 1997.
11. Istokovics, A., Simidjiev, I., Lajko, F., Garab, G., *Characterization of the light induced reversible changes in the chiral macroorganization of the chromophores in chloroplast thylakoid membranes. Temperature dependence and effect of inhibitors*, "Photosynth. Res.", **54**, 1997, 45-53.
12. Koblizek, M., Kaftan, D., Nedbal, L., *On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and the photosystem II light-harvesting efficiency. A repetitive flash fluorescence induction study*, Photosynth. Res., **68**, 2001, 141-152.
13. Schreiber, U., Bilger, W., Hormann, H., Neubauer, C., *Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance*, in: Raghavendra, A. S. (Ed.), *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*, pp. 320-351, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2000.
14. Strasser, R. J., Srivastava, A., Govindjee, F., *Short term parameters of the induced chlorophyll fluorescence in dark-adapted leaves*, "Photochem. Photobiol.", **61**, 1995, 32-42.

SALT STRESS TOLERANCE OF A FRESHWATER GREEN ALGA UNDER DIFFERENT PHOTON FLUX DENSITIES

LASZLO FODORPATAKI* and CSABA BARTHA*

SUMMARY. - Salinity stress and unfavorable light conditions are main limiting factors of plant productivity both in aquatic and terrestrial, natural and anthropically modified environments. This is the reason why the identification of physiological responses to the interactive effects of high salt concentration and different photon flux densities is an important requirement for the selection of tolerant and highly productive plant ecotypes under stressful environmental conditions. The aim of this study is to identify physiological parameters which enable the evaluation of the degree of salt stress tolerance and the energetic requirements of protective mechanisms based on the photochemical conversion of light energy. The axenic monoalgal cultures of *Scenedesmus opoliensis* were grown under controlled conditions in the presence of 0, 0.1 and 0.5 M NaCl at photon flux densities of 5, 50 and 100 $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The dynamics of growth and biomass production, as well as the photosynthetic pigment content was determined for all the experimental variants, the significance of the results was evaluated with the one-way ANOVA and with the Tukey test. The investigated freshwater microalga can easily acclimate to high salt concentrations, under these conditions the rate of cell divisions increases, the cells develop very small light-harvesting antennae and they excrete high amounts of mucilage in which the individuals form extended aggregates.

Plant cells are generally able to live within a certain range of enhanced salt concentrations or changing salinities, since most probably all life originated in the oceans, i. e. a highly saline environment. However, during evolution, the degree of salt resistance and salt tolerance became very divergent among the present-day aquatic organisms. Algae (and cyanobacteria) have attracted considerable attention in this respect, since they are inhabitants of biotopes characterized by changing salinities and can serve as model organisms for a better understanding of salt acclimation in the more complex physiological processes of higher plants [3, 4, 11]. Enhanced salt concentrations change the growth conditions in a manner unfavourable for most organisms. The increase in external concentrations of inorganic ions impairs the osmotic balance between the cells and their surrounding medium and forces water efflux (exosmosis) from the cells, leading to the loss of turgor pressure. In parallel, the increased exogenous ion concentration tightens the influx of these ions into the cells according to their electrochemical gradients [7, 13, 16, 20, 22, 23].

* Babeş-Bolyai University, Department of Experimental Biology, 400084 Cluj-Napoca, Romania.
E-mail: lfodorp@bioge.ubbcluj.ro

The loss of water and the invading ions activate a concerted acclimation process that leads to salt-tolerant cells with a new steady state of growth. This acclimation process includes three basal processes: restoration of turgor, regulation of the uptake and export of ions through the cell membranes, and induction of the accumulation of osmoprotecting compatible solutes and stress proteins. The acclimation initiated by water loss due to salt stress involves water fluxes which are controlled by water channels and the concentrations of those cellular solutes that predominantly contribute to the osmotic potential [5, 14, 17]. Because the influx of sodium and chloride disturbs the cellular ion homeostasis, acclimation also involves the regulated uptake and export of potassium and sodium cations [2, 15, 16]. Elevated ion concentrations impair the function of biopolymers and induce protective measures that involve mainly the accumulation of osmoprotective compatible solutes and specific proteins. These molecules ensure the protection and renaturation of damaged functional and structural proteins, nucleic acids and membrane lipids [12, 18, 24]. Besides these main processes, several secondary responses are needed to ensure a successful salt tolerance, e. g. the scavenging of liberated free radicals, increase in energy-supplying reactions and, finally, the adjustment of the whole metabolism to the new situation [1, 21]. All these efforts are realized with an increased energy consumption and require an adequate photon flux density and photochemical conversion to cope with the stressful conditions.

Salt acclimation has generated great interest for two main reasons: 1. sodium chloride represents one of the environmental major factors of aquatic habitats, and 2. salt resistance constitutes a real biotechnological challenge in the field of renewable biomass production [8, 25, 27]. This is why we have chosen a freshwater green microalga with high bioproduktive capacity to achieve a study of its salt tolerance. The aim of this study is to investigate the relationship between the salt concentration and the photosynthetically active light intensity during the development of salt stress tolerance in cell cultures of a typically freshwater species of green microalga.

Material and methods. Axenic monoalgal cultures of *Scenedesmus opoliensis* P. Richter, strain AICB 141, obtained from the culture collection of the Biological Research Institute in Cluj [6], were grown in Kuhl-Lorenzen (KL) nutrient media supplemented, according to the different experimental variants, with 0.1 M and 0.5 M sodium chloride. The control cultures were kept in the KL medium without sodium chloride. The initial pH of all the culture media was adjusted to 6.5 and the cell suspensions were illuminated continuously with fluorescent lamps at photon flux densities of 5, 50 and 100 micromoles $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ on the surface of the cultures [10]. The dynamics of cell divisions was evaluated cytometrically with a light microscope. The initial cell density of all the cultures was set to 540 cells per microliter. The photosynthetic pigment content was determined spectrophotometrically after extraction with methanol at high temperature [9, 19]. The dry algal biomass of the cultures was determined after 2 weeks of development in the presence of different concentrations

of sodium chloride at the three different photon flux densities mentioned above. Every measurement was repeated 5 times. The experimental data were evaluated statistically, using ANOVA ($P < 0.05$) and the Tukey test ($P < 0.05$) [26].

Results and discussion. *Scenedesmus opoliensis* is a freshwater algal species, being present in the phytoplankton of various rivers and lakes, known for its pronounced metabolic plasticity that confers tolerance to different environmental changes in the aquatic habitats. One strain of this species was grown for years in laboratory cultures in a liquid medium with low osmotic potential and with no sodium ions. Such a culture that was in the exponential growth phase of the algal population was used to initiate the experimental setups designed to study the capacity of this alga to cope with two different concentrations of sodium chloride (0.1 M and 0.5 M, respectively) under three different photon flux densities.

In the absence of sodium chloride (control cultures) the rate of cell divisions in the algal populations is influenced by the amount of light energy available from the environment. High photon flux densities ($100 \mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, that in aquatic habitats represents a higher light intensity but does not cause photoinhibition) ensure a much higher cell density in the algal cultures than low and medium light intensities (5 and $50 \mu\text{mole photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), underlining the fact that the incident light energy is an important external factor for algal growth (Fig. 1).

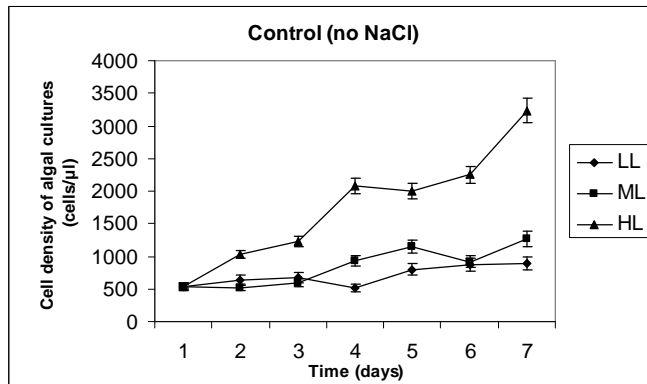


Fig. 1. Variation of cell number in the cultures of *Scenedesmus opoliensis* grown under different photon flux densities. HL - high light; LL - low light; ML - medium light. The error bars indicate standard deviation ($n = 5$).

In the presence of a smaller amount of sodium chloride (0.1 M) there were no significant differences from the control cultures with respect to the dynamics of cell density. The light intensity remained the determinant factor for the rate of cell divisions, the high photon flux density leading to an increased algal cell density in comparison with the cultures grown under low and medium light. Multiplication of this alga under the above mentioned conditions does not show sensitivity to a relatively low concentration of sodium chloride.

In the presence of 0.5 M sodium chloride the variation of cell density of the algal cultures differs significantly from the values recorded in the control populations if the cell cultures are illuminated with high photon flux densities. In low and medium light the cell density remains on a lower level along the days, while in the intensely illuminated cultures the cell number increases more quickly than in the control, even though the maximal algal density reaches its steady state at a lower level (Fig. 2). This reflects that the salt stress caused by 0.5 M sodium chloride induces a prompt response of the algal culture reflected by the enhancement of the reproductive capacity immediately after the initiation of the stress reaction. Because this process of hardening requires extra amounts of metabolic energy, it can be sustained only by a sufficient amount of photosynthetically active light energy.

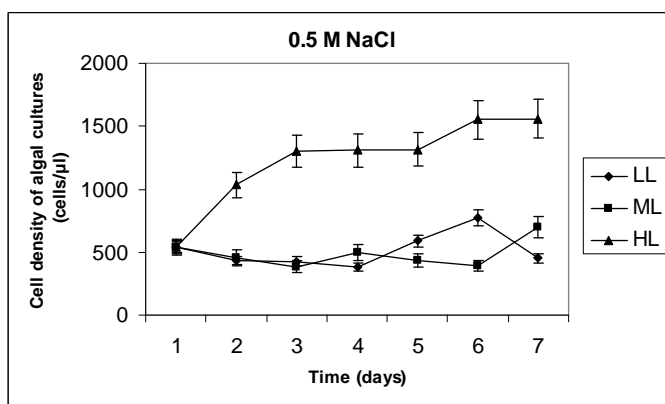


Fig. 2. The influence of 0.5 M NaCl on the variation of cell number in the cultures of *Scenedesmus opoliensis* grown under different photon flux densities. HL - high light; LL - low light; ML - medium light. The error bars indicate standard deviation ($n = 5$).

The dry algal biomass of two weeks old cultures initiated with the same cell density was the lowest in the presence of 0.5 M sodium chloride under all the three light intensities. The lower concentration of NaCl caused a less pronounced decrease of the net biomass production in comparison with the control cultures. As expected, the highest algal biomass was recorded in the presence of $100 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and in the absence of sodium chloride (Fig. 3). The results are similar to those obtained with marine algae, where the control cultures were grown in seawater [17], and they reflect that the acclimation to salt stress has high energy demands and leads to a decreased biomass production. This may be the reason why the dry weight is much less affected by salt stress in the presence of a higher photon flux density, which provides more energy to sustain the physiological processes involved in the development of tolerance.

Microscopic investigations revealed that in the presence of higher concentrations of sodium chloride the algal cultures become almost colorless, the cells lose their obvious green colour, the pyrenoid of the chloroplasts is smaller and the chloroplast

itself is shrunken. This indicates a partial desiccation and a loss of turgor. As a reaction to the unfavorable growth condition created by salinity, the cells excrete a high amount of mucilage in which they form extended aggregates.

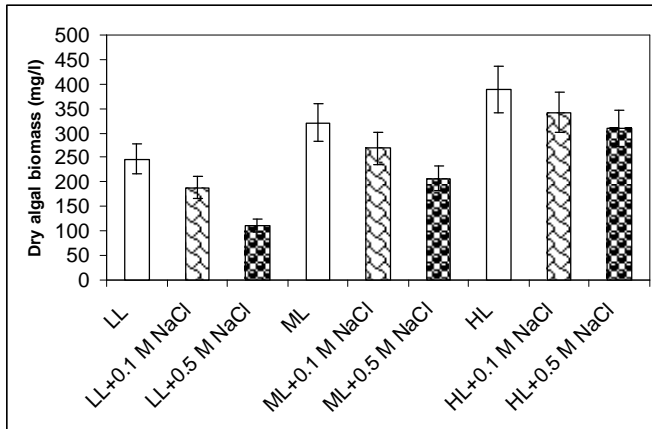


Fig. 3. The dry weight of the 2 weeks old axenic cultures of *Scenedesmus opoliensis* grown in 3 light intensities in the presence of different amounts of sodium chloride. HL - high light; LL - low light; ML - medium light. The error bars indicate standard deviation ($n = 5$). The mean values are significantly different according to the Tukey test (in all cases $P < 0.05$).

The embedded cells become protected by this mucous sheath, they survive successfully and they exhibit a relatively high rate of multiplication, even though in the presence of high photon flux densities they reduce severely the amount of photosynthetic pigments. The rate of net oxygen production of the algal culture depends strongly on the light intensity, but does not show significant differences in relation to the salt concentration if the oxygen evolution is expressed per dry biomass unit (data not shown).

In the cultures grown under low light the presence of 0.1 M and 0.5 M NaCl causes a slightly significant ($P < 0.05$) but not very pronounced decrease in the overall chlorophyll content of the algal cells. The amount of chlorophylls is kept high because the main limiting factor is the reduced energy input that induces the development of an extended light-harvesting complex in order to absorb a higher percentage of the incident low photon flux (Fig. 4).

Under the conditions of a moderate light intensity ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) the algal cells develop smaller photosynthetic pigment antennae in the thylakoid membranes of their chloroplasts and the presence of sodium chloride causes different quantitative changes depending on salt concentration: the chlorophyll content increases significantly in the presence of 0.1 M NaCl and it obviously decreases in the cultures provided with 0.5 M NaCl (Fig. 5). These results can be explained by the fact that small amount of sodium chloride create a slight stress condition compensated by the development of a more extended light-harvesting complex, while under the situation of a more

severe salt stress the defense mechanisms do not allow to spend too much energy for the synthesis of many new chlorophyll molecules and binding proteins.

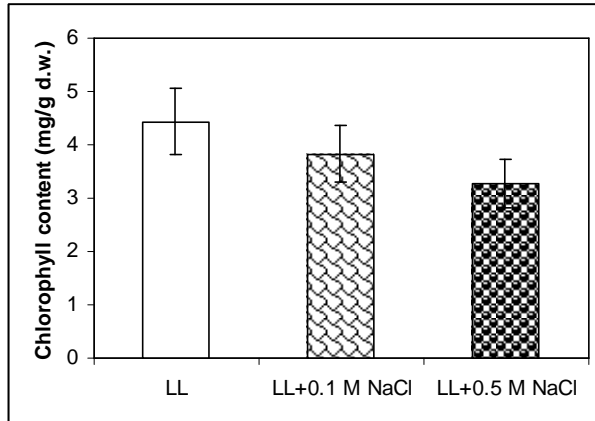


Fig. 4. Chlorophyll content of the cells of *Scenedesmus opoliensis* grown under low photon flux density (LL) in media with different concentrations of sodium chloride. The error bars indicate standard deviation (n = 5). The mean values are significantly different according to the Tukey test ($P < 0.05$).

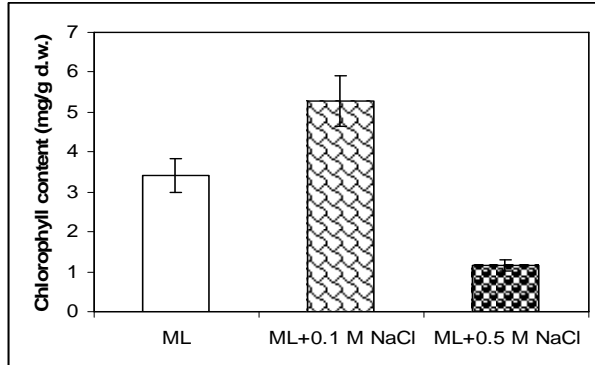


Fig. 5. Chlorophyll content of the cells of *Scenedesmus opoliensis* grown under medium photon flux density (ML) in media with different concentrations of sodium chloride. The error bars indicate standard deviation (n = 5). The mean values are significantly different according to the Tukey test ($P < 0.01$).

The changes observed in medium light intensity occur even more obviously in the algal cultures grown under higher photon flux densities (increased chlorophyll content in the presence of 0.1 M NaCl and significantly decreased amounts of these pigments under the influence of 0.5 M NaCl), the reaction to mild salt stress leading to different results than the processes that develop under a more severe salt stress (Fig. 6).

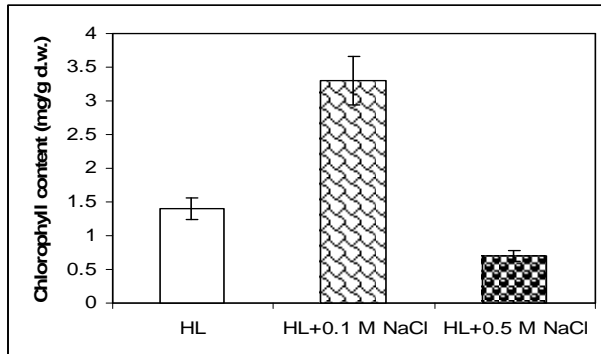


Fig. 6. Chlorophyll content of the cells of *Scenedesmus opoliensis* grown under high photon flux density (HL) in media with different concentrations of sodium chloride. The error bars indicate standard deviation (n = 5). The mean values are significantly different according to the Tukey test (P < 0.01).

Conclusions. The monoalgal cultures of the freshwater species *Scenedesmus opoliensis* can acclimate to high salt concentrations, under these conditions the rate of cell divisions shows only a moderate decrease, the cells develop very small light-harvesting antennae and they excrete high amounts of mucilage in which the individuals form huge aggregates. A higher tolerance is expressed mainly if there is a relatively increased photon flux density, suggesting the role of light in supporting the energy demands of an efficient protective mechanism against physiological drought caused by the hypertonic environment and against the toxicity induced by excessive amounts of the sodium ion.

Acknowledgements. The research activities were supported by the Research Programme Institute of the Sapientia Foundation.

REFERENCES

1. Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Murata, N., *Inactivation of photosystem I and II in response to osmotic stress in Synechococcus. Contribution of water channels*, "Plant Physiol.", **122**, 2000, 1201-1208.
2. Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E., *Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in Arabidopsis*, "Science", **285**, 1999, 1256-1258.
3. Bohner, H.J., Jensen, R.G., *Metabolic engineering for increased salt tolerance – the next step*, "Aust. J. Plant Physiol.", **23**, 1996, 661-667.
4. Bohner, H.J., Sheveleva, E., *Plant stress adaptations – making metabolism move*, "Curr. Opin. Plant Biol.", **1**, 1998, 267-274.
5. Delauney, A.J., Verma, D.P.S., *Proline biosynthesis and osmoregulation in plants*, "Plant J.", **4**, 1993, 215-223.

6. Dragoş, N., Péterfi, L.Ş., Momeu, L., Popescu, C., *An introduction to the algae and the culture collecton of algae*, Cluj Univ. Press, Cluj-Napoca, 1997, 197.
7. Fisher, M., Gokhman, I., Pick, U., Zamir, A., *A structurally novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga Dunaliella salina grown in high salinities*, "J. Biol. Chem.", **272**, 1997, 1565-1570.
8. Fitter, A.H., Hay, R.K.M., *Environmental physiology of plants*, Academic Press, London, 2002.
9. Fodorpataki L., Márton A., Csorba T., *Stress-physiological investigation of algal cell cultures in polluted media*, "Contrib. Bot.", **36**, 2001, 101-108.
10. Fodorpataki L., Bartha Cs., Demeter Sz. J., Turóczy Z., *Interactive effects of hypoxia, low light stress and different carbon sources on photosynthetic parameters of the green alga Scenedesmus intermedius Chod.*, "Contrib. Bot.", **38** (1), 2003, 105-111.
11. Fogg, G.E. (2001): *Algal adaptation to stress – some general remarks*, in Rai, L.C., Gaur, J.P. (Eds.), *Algal adaptation to environmental stresses*, Springer, Berlin, 2001, 1-19.
12. Garcia, A.B., Engler, J.D., Iyer, S., Gerats, T., VanMontagu, M., Caplan, A., *Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice*, "Plant Physiol.", **115**, 1997, 159-169.
13. Hatfield, J.L., *Plant-water interactions*, in Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for environmental studies*, CRC Press, New York, 1997, 81-103.
14. Helliot, B., Mortain Bertrand, A., *Accumulation of proline in Dunaliella salina (Chlorophyceae) in response to light transition and cold adaptation. Effect on cryopreservation*, "Cryo Lett.", **20**, 1999, 287-296.
15. Howard, R.J., Mendelsohn, I.A., *Salinity as a constraint on growth of oligohaline marsh macrophytes. II. Salt pulses and recovery potential*, "Am. J. Bot.", **86**, 1999, 795-806.
16. Kinraide, T.B., *Interactions among Ca²⁺, Na⁺ and K⁺ in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects*, "J. Exp. Bot.", **50**, 1999, 1495-1505.
17. Kirst, G.O., *Salinity tolerance of eukaryotic marine algae*, "Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.", **41**, 1990, 21-53.
18. McNeil, S.D., Nuccio, M.L., Hanson, A.D., *Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance*, "Plant Physiol.", **120**, 1999, 945-949.
19. Nyholm, N., Peterson, H.G., *Laboratory bioassays with microalgae*, in Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for environmental studies*, CRC Press, New York, 1997, 225-276.
20. Oren, A., *Bioenergetic aspects of halophilism*, "Microbiol. Mol. Biol. Rev.", **63**, 1999, 334-337.
21. Papageorgiou, G.C., Govindjee, Govindjee, R., Mimuro, M., Stamatakis, K., Alygizaki Zorba, A., Marata, N., *Light-induced and osmotically induced changes in chlorophyll a fluorescence in two Synechocystis sp. PCC 6803 strains that differ in membrane lipid unsaturation*, "Photosynth. Res.", **59**, 1999, 125-136.
22. Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J.A., deLarrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., PascualAhuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C., *A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress*, "J. Exp. Bot.", **50**, 1999, 1023-1036.

23. W e g m a n n, K., *Osmoregulation in eucaryotic algae*, "FEMS Microbiol. Rev.", **39**, 1986, 37-43.
24. W i n z o r, C.L., W i n z o r, D.J., P a l e g, L.G., J o n e s, G.P., N a i d u, B.P., *Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality*, "Arch. Biochem. Biophys.", **296**, 1992, 102-107.
25. Y e o, A., *Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology*, „J. Exp. Bot.”, **49**, 1998, 915-929.
26. Z a r, J.H., *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, New Jersey, 2000, 178-214.
27. Z h a n g, J.X., N g u y e n, H.T., B l u m, A., *Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants*, „J. Exp. Bot.”, **50**, 1999, 291-302.

CHEMICAL HEPATECTOMY AND THE “HEPATIC FRACTURE LINES”

MIRCEA ANTONIU RUSU*

SUMMARY. - We studied the action of some xenobiotics, that exist in the environment (dimethylnitrosamine, CCl₄, ethyl alcohol and acetaminophen), on rat liver. Using histological and histochemical-histoenzymological methods, we ascertained the severe structural alterations produced in liver, a real chemical hepatectomy being evidenced. We established and substantiated the characteristics of chemical hepatectomy, in comparison with the surgical (classic) hepatectomy, and also the presence of some “fracture zones” with minimum tissue resistance.

Traditionally, any study concerning hepatic regeneration is a reminder of the myth of P r o m e t h e u s [32].

Regeneration, recovery, repair is the capacity of an organ to replace dead cells, dead or partially lost tissue. The liver is an organ with unique abilities from this point of view.

Hepatic regeneration represents a vital phenomenon for the healing of acute necrosing liver diseases, as well as for the repair of the hepatic mass after partial hepatectomy. Necroses can be the consequence of viral, parasitic diseases as well as of the action of experimental [28] or environmental toxic substances (hepatotoxicants) [6].

The liver is an organ consisting of at least 6 distinct resident cellular populations [10], arranged as acini (R a p a p o r t) [22].

There is a metabolic zoning of the hepatic parenchyma [2, 12, 13, 31]. Practically, a mosaic of cells is observed, which are metabolically stimulated or inhibited depending on the needs of the liver at the time.

The liver is an organ with active proliferation until the process of growth is completed in both humans and animals. In the normal adult liver there is one mitosis to approximately 20.000 hepatocytes.

Following injuries (lesions-aggressions) accompanied by important hepatic cellular losses, a very active proliferation process is initiated. Cellular losses are due to necrosis and apoptosis, which are usually more or less simultaneous [9, 14]. Hepatic cell proliferation is a process opposed to the effects of hepatotoxicants [24], and represents the premise of tissue recovery, which is an adaptive strategy [4] against injuries caused by xenobiotics [27].

* *Biological Research Institute, Republicii str., no. 48, Cluj-Napoca, Romania. Email: icb@mail.dntcj.ro*

Higgins and Anderson initiated the oldest study model of hepatic regeneration, in 1931 [32]. They performed the ablation of 2/3 of the liver in white rats. Growth in liver after this operation is remarkably fast and the initial liver mass is recovered in 7-10 days in the rat.

The residual lobes grow until they reach the size and volume of the original liver, then growth stops suddenly. In humans, transplanted liver grows until the optimum mass is reached. If the graft is too small, it will grow until it reaches the necessary dimension. In contrast, if the graft is too big for the receptor, its dimensions will be probably diminished through apoptosis.

The factors of aggression on the liver can be classified into: biological (viral, microbial, parasitic), physical (including experimental surgical ablation), and chemical (mostly xenobiotics). The leaving of the proliferative rest and the initiating of an active division process is based on the existence of oval hepatic stem cells having fetal markers such as alpha-fetoprotein [1, 33].

Hepatic regeneration depends on the combined action of several stimulating and inhibiting endocrine, paracrine and autocrine factors. Hepatic growth regulators include a series of mitogens, comitogens and inhibitors [32].

The amount of xenobiotics is constantly increasing in the environment. Humans, animals and plants are chemically aggressed. The impact of xenobiotics affects in the first place the liver – as the main organ that metabolizes them. Among xenobiotics with hepatic tropism, some are frequently used experimentally, such as: CCl₄, galactosamine, phalloidin, nitrosamines, ethyl alcohol, acetaminophen etc. At first, the researches investigated the induction of hepatic injury, then hepatic regeneration was studied. The correlation between various xenobiotics administered together was also studied, as well as the phenomena of autoprotection and heteroprotection [15, 16, 17].

I consider that lesions induced in the liver by xenobiotics could be compared (assimilated) with a real “*chemical hepatectomy*”. I found this term in a study by Chanda and Mehendale, 1996. Other authors might have used it, as well. I believe that this term deserves to be studied and supported by arguments.

In Romania, our research team has a great experience in the study of hepatic toxicoses. We used for the induction of hepatic injury especially CCl₄, ethyl alcohol, nitrosamines (dimethyl nitrosamine), acetaminophen [25, 29].

We generally used histochemical, histoenzymological methods for the characterization of hepatic injury, these methods being efficient and practical [20].

Materials and methods. In the course of the numerous experiments done over several years, we used adult Wistar white rats, males, weighing 150-200g, kept under standard conditions. We organized control groups and groups intoxicated with the following xenobiotics:

1. DMNA (dimethylnitrosamine) administered by gavage, in the form of its precursors: sodium nitrate + aminopyrine (which contains a dimethylamino group), 20mg of each / kg body weight, for 14 days.

2. CCl₄, that was administered by gavage, 0.1ml / kg body weight, for 7 days.
3. 50% ethyl alcohol, that was administered by gavage, 6ml / kg body weight, for 30 days.
4. Acetaminophen (paracetamol), that was administered by gavage, 200mg / kg body weight, for 7 days.

After finishing the treatment, the rats were sacrificed and the liver was collected, which was processed for histology (haematoxyline-eosine staining) and histochemistry-histoenzymology (lactate-dehydrogenase – LDH, succinate-dehydrogenase – SDH, glutamate-dehydrogenase – GTDH, cytochrome-oxidase – CyOx, glucosyl-6-phosphatase – G6P-ase, and total lipids by Sudan Black staining).

Results and discussions. In all the cases, the liver is more or less affected by the toxic action of the utilized xenobiotics. We observed general lesions, evident in all cases, such as: necrosis, especially centrolobular, clear and granular dystrophy, lipid accumulation (steatosis), leucocytic infiltration, reduced activity of the studied enzymes. The destruction of liver tissue is important in the case of dimethylnitrosamine and CCl₄, the hepatic tissue being completely sectioned, largely damaged, presenting true images of "chemical hepatectomy". In the case of CCl₄ intoxication, the zones with swollen cells are characteristic, and in both cases infiltration with collagen fibers appear (more numerous after dimethylnitrosamine action). Tissue necrosis is characteristic for acetaminophen toxicosis, and steatosis and necrosis are characteristic for ethanol toxicosis. The hepatic enzymatic activity is reduced in all intoxicated groups.

CCl₄ is present in human environment, having various uses in industry and agriculture. It has a high retention in the environment, its half-time being of approximately 50 years; it pollutes especially the atmosphere [6]. It is frequently used for the experimental induction of hepatic toxicosis [30, 34].

Cytochrome P-450 2E1 is the major catalyser of reductive and oxidative bioactivation of CCl₄ to -CCl₃, a free radical [3a, 3b] which attacks the double bonds of enoic fatty acids from the phospholipids of the endoplasmic reticulum, mitochondria, and the cell membrane. It produces, depending on the dose: necroses, steatosis, cirrhosis, cancer [7, 18, 28, 34]. Ethyl alcohol causes a mitochondrial overproduction of free radicals inducing the peroxidation of cell membranes [21]. Ethyl alcohol modifies the fluidity of cell membranes and produces megamitochondria, steatosis and hepatic cirrhosis. Nitrosamines are metabolized into microsomes under the action of mixed function oxidoreductases. In the case of dimethylnitrosamine (DMNA) used by us, a highly reactive radical results, diazomethane, that can methylate hepatic DNA. Acetaminophene (paracetamol) is bioactivated by cytochrome P-450 1A2, the metabolite N-acetyl-p benzoquinone imine (NAPQI) being produced, which is blocked under normal conditions by glutathione [8]. At high doses, glutathione is inactivated and NAPQI attacks hepatic proteins, especially mitochondrial ones; it peroxidates lipids, splits the DNA etc., producing centrolobular necroses [8].

The type of hepatic injury depends upon the nature of the xenobiotics and the rate of the lesion of cell organelles. We notice that free radicals, with different chemical structures but highly reactive and aggressive in relation to the cell material, underlie these injuries [3a, 11, 19].

The information obtained by using surgical hepatectomy and “*chemical hepatectomy*” proves that both models are suitable in experimental hepatology.

However, chemical hepatectomy has some peculiarities in terms of its induction and evolution, which individualizes it. I found no material concerning the definition and characterization of “*chemical hepatectomy*”. This is only mentioned [5]. Based on my experience, I will give an original, synthetic, and comparative characterization of “*chemical hepatectomy*” versus surgical hepatectomy.

- Chemical hepatectomy is not achieved through a surgical intervention, it is a white, non-invasive approach, while surgical hepatectomy is an invasive red approach.

- Chemical hepatectomy is based on the noxious effects produced by certain xenobiotics, selectively chosen in order to induce lesions similar to those occurring in certain hepatic diseases.

- The biochemical reactions of bioactivation or metabolization are the source of appearance of some highly aggressive free radicals producing the lesions of chemical hepatectomy.

- Xenobiotics or free radicals inducing hepatic toxicosis have the role of a real “*chemical scalpel*”.

- There is an administration limit of the xenobiotic inducing “*chemical hepatectomy*”, related to the dose, duration, etc. If the limit is exceeded, chemical hepatectomy turns into an irreversible process towards exitus, not towards recovery.

- Some xenobiotics attacking primarily the nuclear material (e.g. nitrosamines) should be avoided, as they involve a risk for cancer.

- Chemical hepatectomy is intrinsic to the liver. The chemical substance (the xenobiotic) enters the organ and penetrates it wherever blood carries it. Surgical hepatectomy is somewhat extrinsic to the organ because, since ablation of one or more lobes “exterior” to the remaining part of the liver is performed.

- Although the xenobiotic penetrates all through the liver, it usually causes specific zonal lesions (frequently centrolobular lesions), affecting certain cell organelles.

- Chemical hepatectomy is more difficult to quantify, because it generally has a diffuse character, the dead zones being more difficult to evaluate. An adequate software computer may solve the situation. In surgical hepatectomy, the volume of the lost tissue can be assessed rather accurately.

- A major chemical hepatectomy and a minor chemical hepatectomy can be considered in relation to the lost hepatic tissue mass. Depending on this parameter,

a major chemical hepatectomy could involve more than 25% of lost tissue, and a minor one, less than 25% of lost tissue.

- For example, a major chemical hepatectomy could be produced by CCl₄, and a minor chemical hepatectomy, by acetaminophen.

- Chemical hepatectomy is being produced especially on fracture lines or minimum tissue resistance lines.

- We consider that histochemical (histoenzymological) methods demonstrate chemical hepatectomy the best, allowing a clear distinction between dead and unaffected areas.

- In the case of chemical hepatectomy induced by CCl₄, LDH and G-6P-ase can be considered "marker" enzymes.

- Surgical hepatectomy has a sudden action, while chemical hepatectomy is more gradual in its action, requiring a shorter or longer onset and latency period.

- Chemical hepatectomy is based on the aberrant architecture of the lesions induced by xenobiotics in the liver mass.

- In the case of chemical hepatectomy dead areas of hepatic tissue coexist with unaffected or little affected proximal parenchymal and non-parenchymal areas.

- CCl₄ is very useful for the induction of chemical hepatectomy because, through the phenomena of cellular ballooning and necrosis, it produces splitting or "dissecting areas" of dead tissue surrounded by unaffected tissue.

- Chemical hepatectomy triggers a proliferative process of hepatic recovery that regenerates the normal structure in 7-14 days.

- The time period necessary for hepatic regeneration after chemical hepatectomy does not differ or does not significantly differ from that following surgical hepatectomy.

- Hepatic recovery after chemical hepatectomy is achieved by the replacement of dead or damaged cells from the affected areas by new cells as a result of cellular proliferation through which a normal architecture will substitute for the aberrant architecture of the lesions.

- The induction of chemical hepatectomy (which is possible by a single xenobiotic administration and dose) is easier to achieve than the surgical intervention, and is sometimes less expensive.

- Animal care seems to be simpler in the case of chemical hepatectomy.

- recovery process. Chemical hepatectomy should be considered only when it allows a

- Chemical hepatectomy is influenced by species, sex, age, dose and duration of xenobiotic administration, energy substrate, etc.

These considerations are presented in **Fig. 1**.

In our researches, we obtained the best results with CCl₄ intoxication. LDH and G-6-P-ase proved to be two marker enzymes for chemical hepatectomy.

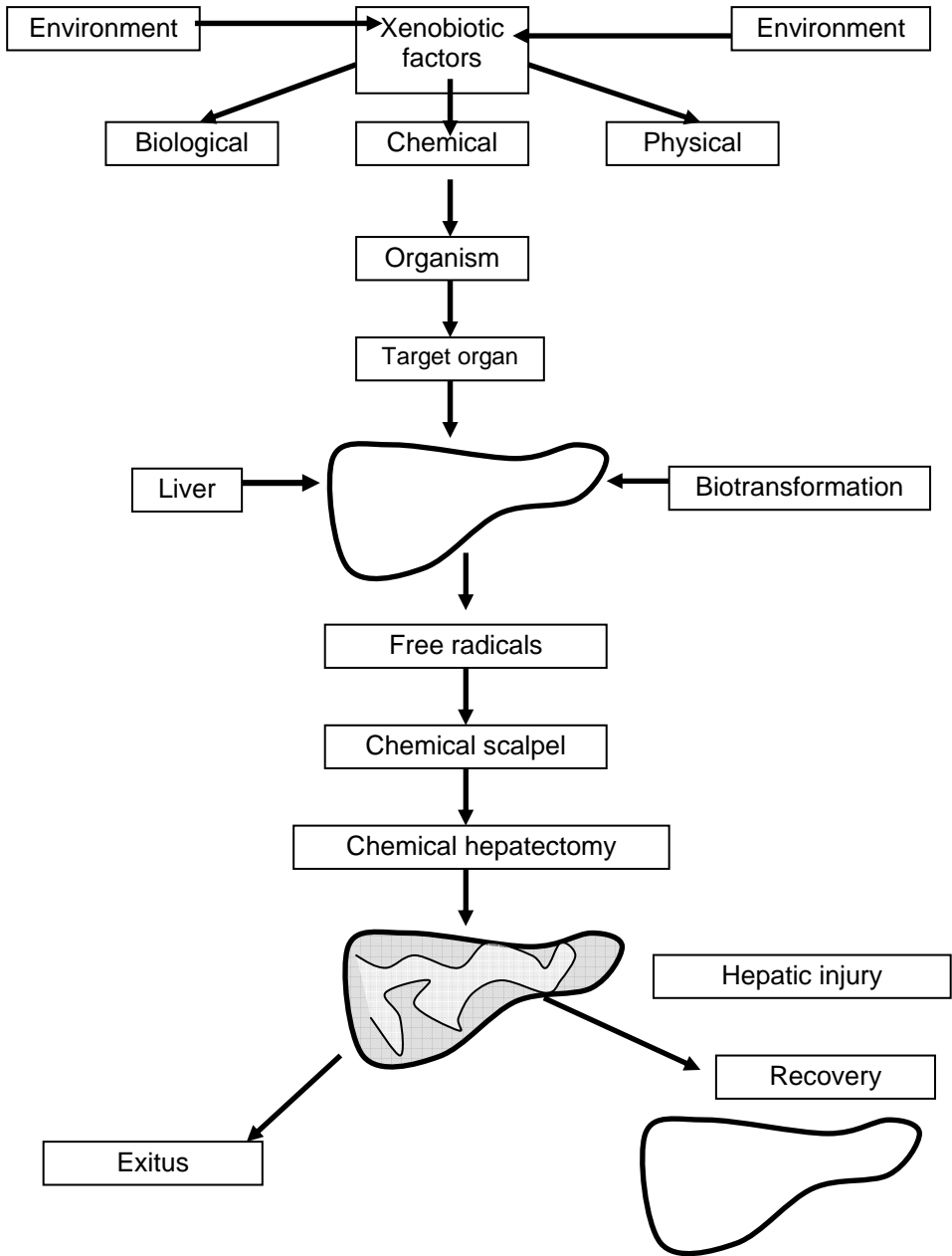


Fig. 1. The development of chemical hepatectomy.
Scheme inspired by Chanda and Mehendale, 1996.

I consider that the producing of hepatic lesions only in certain zones is due to the existence of some "zones with minimum resistance", named by me "fracture lines" or "fracture zones", that overlap, in my opinion, the zones II and III of the acinary hepatic structure in R a p p a p o r t ' s theory. These zones with more reduced resistance at chemical aggressions, would correspond with the classic centrolobular zones. In these portions of the hepatic acinus, which are true "lines of minimum resistance" or "of fracture", lesions that induce chemical hepatectomy are produced. My theory starts from the experimental results observed, and is based, principally, on the acinary theory of hepatic structure, considering that this "zone of minimum resistance or of fracture" is "predestined" to be so, because of several factors. I think that one of the most important conditions refers to the insufficient irrigation with O₂ and nutrients of the acinary zones II and III, and also the existence in these zones of an enzymatic apparatus specialized in xenobiotic metabolism. Thus, the very reactive metabolites resulted operate firstly superficial, and then systemic, affecting especially these zones. Of course, there are other factors, as well, that are involved in the generation or existence of the "lines of minimum resistance" or "of fracture", among which is the rate of cellular divisions.

Therefore, in my opinion, the most important factors that create the "fracture lines" are: insufficient blood irrigation, that creates a greater sensitivity for the cells in these zones; the direct action of reactive metabolites produced by the enzymes that metabolize the xenobiotics; and, also, the decreased level of cellular divisions, that are, in fact, a protective factor.

Conclusions. 1. We consider that the term of "chemical hepatectomy" is supported by scientific arguments.

2. Chemical hepatectomy can be used as an alternative for surgical hepatectomy in studies on hepatic regeneration.

3. Chemical hepatectomy is produced in the minimum tissue resistance zones of the hepatic acinus (hepatic fracture lines).

REFERENCES

1. B e r n u a u D., *Le regeneration hepatique*, "Gastroent. Clin. Biol.", **17**, 1993, 361-363.
2. B o u v e n s L., D e B l e s s e r P., V a n d e r k e r k e n K a r I m, G e e r t s B e r t, W i s s e E., *Liver cell heterogeneity: function of non-parenchymal cells*, "Enzyme", **46**, 1992, 155-168.
- 3.a. B r e n t J. A., R u m a c k B. H., *Role of free radicals in toxic hepatic injury, I, Free radical biochemistry*, "Clin. Toxic.", **31**, (1), 1993, 139-171.
- 3.b. B r e n t J. A., R u m a c k B. H., *Role of free radicals in toxic hepatic injury. II, Are free radicals the cause of toxin induced liver injury?* "Clin. Toxic.", **31**, (1), 1993, 173-196.

4. Calabrese E. J., Mehendale H. M., *A review of the role of tissue repair as an adaptative strategy why low doses are often non-toxic, and why high doses can be fatal*, "Fd. Chem. Toxic.", **34**, (3), 1996, 301-311.
5. Chanda S., Mehendale H. M., *Hepatic cell division and tissue repair: a key to survival after liver injury*, "Molec. Med. Today", Feb., 1996, 82-89.
6. Faroon O., De Rosa C. T., Smith L., *Carbon tetrachloride: health effects, toxicokinetics, human exposure and environmental fate*, "Toxic. Ind. Health", **10**, 1994, 4-20.
7. Fouad F. M., Maner O. A., Shahidi F., *Acute phase in rat to carbon tetrachloride-azothioprine induced cirrhosis and partial hepatectomy of cirrhotic liver*, "J. Toxic. Environ. Health", **47**, 1996, 601-615.
8. Gibson J., Punford R. N., Samokyzyn V. and Hinson J., *Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress*, "Chem. Res. Toxic.", **9**, 1996, 580-585.
9. Guettier C., Zioli M., *L'apoptose dans le foie normal et pathologique*, "Gastroent. Clin. Biol.", **22**, 1998, 381-393.
10. Hanoune J., *Cooperation et compartimentation des cellules hepatiques*, "Med. Scie.", **7**, 1991, 108-109.
11. Hinson J. A., Punford M. R., Nelson S. D., *The role of metabolic activation in drug toxicity*, "Drug Metab. Rev.", **26**, (1,2), 1994, 395-412.
12. Jungermann K., Katz N., *Functional specialization of different hepatocyte populations*, "Physiological Rev.", **69**, (3), 1989, 708-763.
13. Jungermann K., *Zonal liver cell heterogeneity*, "Enzyme", 1992, 46, 5-7.
14. Mangipudy R. S., Rao P. S., Andrews Annette, Bucci T. J., Witmann F., Mehendale H. M., *Dose dependent modulation of cell death: apoptosis versus necrosis in the thioacetamide hepatotoxicity*, "Int. J. of Toxic.", **17**, 1998, 193-211.
15. Mehendale H. M., Thacore K. N., Rao C. V., *Autoprotection: stimulated tissue repair permits recovery from injury*, "Biochem. Toxicol.", **9**, (3), 1994, 131-139.
16. Mehendale H. M., Roth R. A., Gandolfi J. A., Klaunig J. E., Lemasters J. J., Curtis L. R., *Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity*, "FASEB J.", **8**, 1994, 1285-1295.
17. Mehendale H. M., Harihara, *Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications to chemical health*, "Environ. Health Perspect.", **102**, (9), 1994, 139-149.
18. Mion F., Geloën A., Agosto E., Minaire Y., *Carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats: influence of the acute effects of the toxin on glucose metabolism*, "Hepatology", **23**, 1996, 582-588.
19. Nelson S. D., *Mechanism of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury*, "Drug Metab. Rev.", **27**, (1,2), 1995, 147-177.
20. Noorden C. J., and Jonges G. N., *Analysis of enzyme reactions "in situ"*, "Histochem. Journ.", **27**, 1995, 101-118.
21. Nordmann R., Ribiere C., Rouach H., *Alcool et radicaux libres: donnees actualles*, "Med. Sci.", **6**, 1988, 336-345.
22. Rappaport A. M., *The structural and functional unit of the human liver (liver acinus)*, "Anat. Rec." **130**, 1958, 637-686.
23. Rosenbaum J., Mavier T. H., Dhumeaux D., *Interactions cellulaires dans le foie*, "Med. Sci." **7**, 1991, 110-117.

24. Rao P. S., Mangipudy R. S., Mehendale H. M., *Tissue injury and repair as parallel and opposing responses CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response*, "Toxicol.", **118**, 1997, 181-193.
25. Rusu M. A., Preda N., Crăciun C., Gădăleanu V., Bucur N., *Histoenzymological and ultrastructural changes in rats following the administration of aminopyrine and nitrite (nitroaminopyrine)*, in vol. "IARC Scie. Pub. Lyon", Geneve, **31**, 1980, 803-812.
26. Rusu M. A., Bucur N., Tămaș M., Puică C., *Effects of the Chrysanthemum balsamita hydroalcoholic extract upon the intoxicated liver*, "Fitoterapia" (Italy), **3**, (LXV), 1994, 211-214.
27. Rusu M. A., *Mecanisme și factori de bioactivare ale unor xenobiotice toxice*, "Ann. Univ. Oradea", **1**, 1994, 99-104.
28. Rusu M. A., Bucur N., Tămaș M., Puică C., *Unele aspecte histochimice și biochimice ale acțiunii unui extract vegetal în toxicoze cu tetraclorura de carbon*, "Studia Univ. Babeș-Bolyai", **1**, (XXXIX), 1994, 89-93.
29. Rusu M. A., Bucur N., Puică C., *Aspecte ale afectării și refacerii hepatice în toxicoza cu CCl₄ la șobolanii tineri și bătrâni*, "Ann. Univ. Oradea", **3**, 1996, 19-25.
30. Sanchez C. V., Munoz R. H., Yanez L., Vidrio S., and Munoz N. D., *Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by products and glutathione peroxidase*, "J. of Biochem. Toxic.", **10**, (1), 1995, 41-50.
31. Sasse D., Spornitz U. M., Maly P., *Liver architecture*, "Enzyme", **46**, 1992, 8-32.
32. Steer H. J., *Liver regeneration*, "FASEB J.", **9**, 1995, 1396-1399.
33. Thorgeirsson S. S., *Hepatic stem cells in liver regeneration*, "FASEB J.", **10**, 1996, 1249-1256.
34. Ugazio G., Bosia S., Cornaglia E., *Experimental model of cirrhosis in rabbits exposed to carbon tetrachloride by inhalation*, "Mol. Path. Pharm.", **88**, (1), 1995, 63-77.

MELITINA, COMPONENTA MAJORĂ A VENINULUI DE ALBINE ȘI PRINCIPALUL COMPUS ACTIV AL ACESTUIA

ADRIAN FLOREA* ȘI CONSTANTIN CRĂCIUN**

SUMMARY. – **Melittin, the Major Component of the Honey Bee Venom and its Main Active Compound.** The bee venom is a complex secretion product of honey bees, which contains a large number of different inorganic and organic substances responsible for a wide range of effects. Among all these substances, melittin prevails both in terms of concentration and effects. Melittin is a small cationic peptide, present in the crystallized venom in a ratio of about 50-55%. In certain physico-chemical circumstances melittin could appear in a monomer or a tetramer shape. It is involved in the pain producing mechanism, it has an anti-inflammatory activity (is the smallest allergen known), and interacts with different enzymes, thus modulating their activity. But the principal action of melittin is exerted on cell membranes, where it alters the normal structure and consequently the selectivity of these barriers. Because of its properties, melittin is used as a tool in the basic research, but it is also studied for the design of some new drugs.

Albinele au dezvoltat o farmacologie biochimică de nivel înalt, producând o gamă largă de molecule cu activitate biologică, a căror interacțiuni multiple cu diversele structuri celulare sau moleculare din alte organisme sunt urmate de un spectru vast de efecte. Dintre produșii de secreție ai albinelor, veninul se distinge prin marea sa complexitate, manifestată atât în ce privește numărul și proprietățile moleculelor sale, dar și efectele diferite produse de acestea. Deși în veninul de albine se regăsesc numeroase substanțe organice (peptide, proteine, aminoacizi, acizi organici, amine, glucide și fosfolipide) și anorganice (acizi și săruri), melitina (MLT) este componenta majoritară a veninului, reprezentând o proporție de 50-55% din masa veninului cristalizat, fiind totodată răspunzătoare pentru o mare parte din efectele veninului.

Etape în studiul MLT

Melitina a fost evidențiată de către Habermann în 1952; acest cercetător de referință pentru acest domeniu a definit MLT ca pe o “hemolizină” directă, care este prezentă în venin împreună cu cea indirectă, fosfolipaza A₂ (FLA₂). Greutatea

* *Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Facultatea de Medicină, Catedra de Biologie Celulară și Moleculară, 400349 Cluj-Napoca, România. E-mail: aflorea@personal.ro*

***Universitatea “Babeș-Bolyai”, Facultatea de Biologie și Geologie, Centrul de Microscopie Electronică, 400006 Cluj-Napoca, România*

moleculii de MLT a fost stabilită inițial de Habermann în jurul valorii de 12000 Da [24]. După purificarea MLT, s-a constatat că este de fapt un tetramer format din subunități peptidice identice, cu greutatea moleculară de 2846,53 Da. Catena monomerului este liniară, conținând 26 de aminoacizi [23, 59, 63, 64]. MLT este un peptid amfifil, fiind comparată cu un săpun inversat [24]. Capătul N-terminal începând cu restul 20 este hidrofob iar resturile de aminoacizi C-terminali (până la restul 6 inclusiv) sunt puternic bazice, având caracter hidrofil [57]. Are 6 sarcini pozitive [29]. Este sintetizată în glandele veninifere ale albinei sub forma unui precursor (promelitină), evidențiat numai în extractele glandulare și care nu se regăsește în veninul excretat. Acest precursor diferă de MLT prin lungimea mai mare a catenei și o încărcare electronegativă la capătul N-terminal [24].

Formula chimică brută a monomerului MLT este: $C_{131}H_{229}N_{39}O_{31}$ [71], iar structura primară a acestuia este următoarea [23, 71]:

G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q N H₂

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂

MLT se dizolvă bine în apă și soluții saline; în apă distilată MLT se prezintă ca monomer cu conformație spațială de *random-coil* [14, 15, 19, 43, 54]. Conformația randomică a melitinei în soluție poate fi modificată prin legarea de unele molecule proteice (de exemplu α -lactalbumina, un peptid de 123 aminoacizi, component al lactat sintetizei mamiferelor). Complexele formate vor avea o structură helicală [52]. De asemenea, în soluții alcoolice, structura sa devine α -helix [19, 27, 56], alcoolii halogenați (mono-, dar mai ales polihalogenați – în special cei cu F) inducând cel mai rapid formarea α -helixului [18, 54]. Regiunile hidrofobe ale alcoolilor din soluție, prin interacțiunea cu grupările hidrofobe ale melitinei expuse solventului, au tendința de a scădea polaritatea în jurul lanțului polipeptidic. Prin urmare sunt stabilizate legăturile locale de hidrogen și implicit conformația helicală amfipatică.

Melitina poate adopta și o conformație tetramerică – în tampon fosfat [19] sau în alte soluții saline concentrate [37], dar și la inserarea în membrane. Tetramerul MLT prezintă în stare cristalină două axe de pliere, ceea ce face ca unitatea asimetrică în cristal să fie reprezentată de o jumătate a tetramerului (două lanțuri peptidice). Tetramerul prezintă, de asemenea, și două axe de pliere necristalografică, aproximativ perpendiculare pe axele cristalografice [45].

Componentele cu importanță practică din veninul de albine au fost sintetizate în laborator, fiind astfel obținută pe cale sintetică și melitina, precum și un număr de 3 analogi, dintre care unul având proprietăți farmacologice foarte apropiate celor ale melitinei [24]. Prin utilizarea biotehnologiilor s-a reușit sinteza, în culturi de celule de grâu, a unui peptid foarte asemănător melitinei (are un aminoacid în plus – glicina – la capătul C-terminal) [61]. Același colectiv a reușit apoi obținerea *in vitro* a unui precursor de 70 aminoacizi al melitinei (prepromelitina), pornind de la ARNm extras

din celule ale glandelor venifere de la albină [62]. După izolare, Lane *et al.* [44] au utilizat ARNm din celulele glandulare, pentru a obține în oocite de *Xenopus* un peptid aproape identic cu promelitina (un singur aminoacid înlocuit la capătul C-terminal), iar doi ani mai târziu, aceiași cercetători au copiat, prin transcriere inversă, ARNm din celulele glandelor venifere și l-au introdus într-o plasmidă (pBR322), pe această cale reușind și ei sinteza prepromelitinei (peptidul de 70 aminoacizi) [66].

Perfecționarea acestor tehnici a facilitat studiul MLT, iar pe de altă parte, a servit unui scop practic și anume obținerea unui analog al MLT cu o antigenicitate mult redusă și cu acțiune hemolitică diminuată [36]. Totodată, MLT purificată din venin sau de sinteză poate fi utilizată ca instrument de lucru în studiul altor molecule cu activitate biologică. Astfel, un alt analog de sinteză al MLT, constituit din D-aminoacizi, a fost utilizat în vederea elucidării unor aspecte ale activității calmodulinei [19].

Efecte ale MLT și modalități de interacțiune

Producerea durerii

MLT, cel mai important și totodată cel mai toxic constituent al veninului de albine, este responsabilă, în primul rând, pentru inducerea durerii la locul înțepăturii. Mecanismul declanșării durerii implică acțiunea directă asupra fibrelor nervoase, respectiv eliberarea ionilor K^+ în urma distrugerii membranelor celulare; eliberarea kallikreinei din membrane, accelerarea sintezei de interleukină-1 (IL-1) și a factorului de necroză tumorală, în dependență de doză și timp pot contribui, de asemenea, la declanșarea durerii [38].

Efectul antiinflamator

Studiile efectuate pe animale de laborator, au arătat că MLT ajunsă în organism determină stimularea indirectă a suprarenalelor determinând creșterea nivelului catecolaminelor și cortizolului plasmatic prin stimularea secreției de ACTH din hipofiză [32]. Aceste date sugerează că multe din efectele curative ale veninului de albine se realizează datorită stimulării unor enzime, dar mai ales declanșării răspunsului sistemului imun al organismului (efect antiinflamator). Rezultate asemănătoare sunt obținute și în cazul administrării medicamentelor pe bază de cortizon, care este însă recunoscut pentru efectele secundare nedorite [39]. În prezent MLT este unul dintre cei mai puternici agenți antiinflamatori cunoscuți, aceasta fiind baza teoretică a utilizării veninului de albine în tratamentul artritelor sau reumatismului.

MLT este totodată și cea mai mică moleculă cunoscută ca și alergen [45, 35, 36]. Răspunsul imunologic al organismului este determinat, mai exact, de două secvențe specifice de aminoacizi din structura MLT. Secvența de aminoacizi 7-10 de la capătul C-terminal induce reacții inflamatorii imediate (care ating un maxim de intensitate la 15-30 de minute după care descresc rapid). Secvența hidrofobă N-terminală nu este implicată direct în inflamație, dar intensifică reacția imediată, cauzând leziuni severe, evidente după două ore de la administrare și caracterizate de o infiltrație masivă de neutrofile polimorfonucleare [47].

Interacțiuni cu proteine și enzime

În celule, MLT are capacitatea de a lega calmodulina într-un raport de 2:1 [19, 60], formând un complex globular [8], împiedicând deci competitiv atașarea calmodulinei de alte molecule [51, 70], ceea ce determină în final o inhibare a activității calmodulinei. Prin aceasta MLT devine un inhibitor al unor protein-kinaze [8]. MLT inhibă și unele ATP-aze din clasa P: Ca^{2+} -ATPaza din reticulul sarcoplasmic, Na^+/K^+ -ATPaza și H^+/K^+ -ATPazei din celulele mucoasei gastrice prin legarea competitivă la domeniul lor catalitic intracelular [46]. Dozele mari de MLT purificată au capacitatea de a inhiba respirația mitocondrială, în principal datorită perturbării structurii membranelor. Ea diminuează transportul de electroni în membrana mitocondrială internă și funcționează ca decuplant al oxidării de fosforilare [9, 24].

Pe de altă parte MLT stimulează activitatea unei game largi de enzime, începând chiar cu FLA_2 din veninul de albine, fosfolipazele C [22] și D, adenilat ciclaza, proteina G [4] etc.

Interacțiunea cu membranele

Principala proprietate care îi conferă toxicitatea este capacitatea MLT de a se insera în membranele lipidice unde va provoca alterarea selectivității prin diferite mecanisme, inclusiv formare de pori (pentru apă, ioni sau chiar glucoză la concentrații foarte mici – 10^{-6} M) [23, 24], astfel explicându-se acțiunea citolitică a MLT.

MLT are o puternică afinitate pentru membranele lipidice [12], afinitate urmărită prin măsurarea efectului de liză indus în acestea. Analiza măsurătorilor de mobilitate electroforetică arată că MLT se adsorbe de câteva ori mai rapid la membranele (artificiale) de fosfatidilserină decât la cele de fosfatidilcolină. În același timp s-a observat că membranele de fosfatidilcolină sunt mai susceptibile la perforare, veziculare și micelizare în prezența unui nivel mai scăzut de MLT comparativ cu membranele de fosfatidilserină [50]. MLT are tendința de a se adsorbi la suprafața membranelor de fosfatidilserină – încărcate cu sarcini electrice negative – în primul rând datorită unor interacțiuni electrostatice. Ca urmare, moleculele de MLT sunt reținute un interval mai mare de timp în afara bistratului, în timp ce în cazul membranelor de fosfatidilcolină, neutre din punct de vedere electric, inserția MLT în bistratul hidrofob se realizează la o rată mai mare și implicit efectele sunt mai pronunțate. În liposomii din fosfatidilglicerol, inserția MLT se face la o rată scăzută, aceasta rămânând fixată stabil la nivelul monostratului extern, fără a mai forma pori [68]. Și în membranele celulare, prezența lipidelor și proteinelor cu sarcină electrică negativă reduce proporția de lezare a acestora; faptul a fost de asemenea confirmat și pentru membranele artificiale electroneutre în care s-au încorporat diferite cantități de lipide electronegative [48]. În schimb, interacțiunile cu molecule electropozitive din membrană favorizează redistribuirea MLT în bistrat, având ca rezultat accelerarea efectului litic. S-a mai dovedit, în același context, că rata de legare la suprafața bistratului și respectiv rata de inserție a MLT în membrane sunt influențate și de prezența în compoziția acestora a colesterolului și a derivaților săi: dihidrocolesterolul, stigmasterolul și ergosterolul [16]. Aceste

tipuri de molecule lipidice au proprietatea de a diminua sensibilitatea membranelor față de MLT. Întrucât se pare că acesta reprezintă o barieră pentru acțiunea veninului, albinele au găsit soluția pentru a o înlătura. Astfel, în unul din studiile noastre anterioare, am constatat că sub acțiunea veninului de albine se înregistrează o scădere accentuată a colesterolului seric [20].

Pe de altă parte, studii efectuate atât pe liposomi cât și pe celule Lettre și pe eritrocite au arătat că sarcinile pozitive conferite de prezența în mediu a ionilor Ca^{2+} , Mg^{2+} și H^+ au un rol important în alterarea stadiilor inițiale ale interacțiunii dintre MLT și membrane [1, 55]. Consecința o constituie scăderea ratei de inserție a MLT în bistratul fosfolipidic – direct proporțional cu creșterea concentrației cationilor –, reducerea semnificativă a transportului apei prin membrane și implicit diminuarea hemolizei în cazul eritrocitelor [55].

Alte studii au arătat că nu există o relație directă între capacitatea de adsorbție și efectul litic: adăugarea unui rest succinat la capătul N-terminal duce la abolirea potențialului hemolitic, dar nu afectează activitatea de suprafață. În același context se poate menționa și faptul că unele fragmente sintetice de melitină pot avea o activitate de suprafață cu până la 50% mai mare decât a melitinei native, fără a manifesta proprietăți litice [24]. Pe de altă parte, modificări structurale minime produse în structura MLT (substituirea sau deleția unui aminoacid) pot determina modificări radicale în activitatea ei biologică, concretizate prin scăderea, sau accentuarea acțiunii hemolitice. Astfel, triptofanul din poziția 19 – având o puternică afinitate pentru membrane – este implicat în interacțiunea acestui peptid cu bistratele fosfolipidice [33], deci și în inducerea hemolizei, ca de altfel și în alte acțiuni biologice ale MLT. Acest fapt a fost confirmat prin adăugarea unui rest de triptofan, când s-a constatat o creștere a activității hemolitice, iar în urma înlocuirii triptofanului cu leucina, activitatea litică a scăzut în mod considerabil [6].

În momentul de față, în literatura de specialitate sunt descrise două mecanisme distincte prin care se realizează interacțiunea MLT cu membranele fosfolipidice, rezultatele lor fiind și ele total diferite.

A. Mecanismul “în covor” de interacțiune a MLT cu membranele. Din soluția în care are o conformație nespecifică (în apă, conformația extinsă sau înfășurată randomic, iar în metanol, un helix amfifil), MLT se adsoarbe și apoi se inseră parțial în membrane [13, 15], cu capătul N-terminal (primii 19 aminoacizi), hidrofob – principalul responsabil pentru activitatea hemolitică a peptidului [3, 57]. În prima etapă se produce aderarea la membrană, moment în care are loc și amplificarea împachetării helicoidale a MLT [58, 67]. Când concentrația MLT este mică și în funcție de unele condiții fizice (temperatură, pH) și chimice (tipul fosfolipidelor), inserția în bistratul lipidic se produce sub formă de monomeri, cu axa helicală orientată paralel cu planul bistratului, după modelul numit “în covor” [14, 15, 67]. În membranele în care fosfolipidele se găsesc, datorită condițiilor fizico-chimice menționate, în starea de gel, MLT va păstra în mod constant, indiferent de concentrație, doar orientarea paralelă [69]. Nivelul de localizare corespunde zonei de localizare a glicerolului [26, 28].

Structura tridimensională a formei cristaline a MLT nu se păstrează la inserarea în membrane. Formarea structurii terțiare este considerată a se datora unei reduceri, prin intermediul legăturilor de hidrogen, a costului energetic al distribuirii atomilor în legăturile peptidice. Astfel s-a observat, prin comparație, că analogul MLT, în care aminoacizii Val⁵, Val⁸, Ile¹⁷ și Lys²¹ au fost înlocuiți cu D-aminoacizii corespunzători (care realizează mai puține legături de hidrogen), a prezentat un conținut helicoidal mai redus decât al MLT naturale [41]. Cunoașterea acestui proces de pliere este importantă pentru înțelegerea, respectiv îmbunătățirea activității unor peptide antimicrobiene, dar și pentru înțelegerea plierii și stabilității proteinelor de membrană.

Monomerul de MLT produce perturbarea orientării moleculelor lipidice într-un interval de timp de 500 picosecunde, magnitudinea modificării fiind diferită în cele două monostraturi [17]. La inserarea în membrane, MLT afectează în mod direct și mobilitatea lipidelor, scăzând semnificativ rata difuziei laterale a acestora [53]. Uneori MLT se poate insera în monostratul extern și sub formă oligomerică – dimeri sau tetrameri [28], situație în care și perturbarea aranjării lipidelor din membrană este mult mai pronunțată. Rezultatul inserării unui număr relativ mare de molecule ale MLT în membrane și respectiv autoasocierea helixurilor MLT înainte de a se intercala în bistraturile lipidice este reprezentat în final de distrugerea acestora după un mecanism asemănător cu cel de acțiune a detergentilor.

B. Formarea de pori. Când MLT este prezentă în cantitate mare, în bistratul lipidic aflat în starea de cristal lichid și când sarcina electrică a fosfolipidelor o permite, are loc inserarea MLT în membrane, urmând apoi dimerizarea/tetramerizarea. MLT adoptă în final o conformație tetramerică helicoidală, cu orientare perpendiculară pe planul membranei, ce tinde să străbată acest bistrat [28, 59] sub forma unor α -helixuri multiple, amfipatice. Se pare însă că MLT nu adoptă o configurație transmembranară deplină, probabil și datorită faptului că are doar o singură regiune polară [3]. Aceste helixuri amfipatice ale MLT vor produce modificări în organizarea fosfolipidelor membranare și ca urmare a asocierii mai multor molecule, vor determina apariția de pori cu permeabilitate relativ selectivă, prin care vor trece în primul rând moleculele apei. La formarea porilor, α -helixurile MLT apar separate prin zonele hidrofile ale fosfolipidelor (așa-numitul model *toroidal*), porii rezultați nefiind deci organizați sub forma unui canal clasic, cu partea centrală hidrofilă [69]. Prin calcule indirecte, bazate pe măsurarea eliberării unor markeri fluorescenți din vezicule fosfolipidice (formate din palmitoiloleil-fosfatidilcolină – POFC) sub acțiunea unei concentrații relativ mici de melitină, Ladokhin *et al.* [40] au estimat că diametrul mediu al porilor produși de melitină se situează în jurul valorii de 2,5-3 nm. Tot ei au formulat o ipoteză conform căreia diametrul porului multimolecular poate depinde, direct proporțional, de concentrația melitinei în mediu – respectiv în membrane.

Predominarea unuia sau a celuilalt dintre mecanismele de interacțiune a MLT cu membranele este determinată de mai mulți factori ce includ: concentrația melitinei în mediu, compoziția fosfolipidică a membranelor și sarcinile electrice ale

acestora, iar nu în ultimul rând temperatura și pH-ul mediului. După ambele mecanisme descrise, care în multe situații se desfășoară simultan și sinergic, MLT va determina liza membranelor, dar acest fenomen nu se produce concomitent cu inserția MLT în bistrat, ci numai după ce o cantitate semnificativă de MLT va fi inclusă în bistrat. Ladokhin și Waite au arătat că un factor decisiv în definirea mecanismului de acțiune al melitinei asupra membranelor îl reprezintă compoziția acestora [42]. Astfel, în liposomii formați din POFC (încărcate cu sarcini pozitive), melitina produce pori după mecanismul prezentat anterior, cu eliberarea selectivă a markerilor conținuți, în vreme ce în veziculele formate din fosfolipide anionice (cu conținut ridicat de palmitoiloleoilfosfatidilglicerol – POFG), MLT nu formează pori propriu-zisi, inserându-se paralel cu planul membranei și acționând ca detergent – eliberarea markerilor fiind neselectivă – totodată putând determina solubilizarea integrală a veziculelor. În concentrații mari – de peste 1 μM , melitina determină distrugerea completă a bistratului lipidic (dipalmitoil fosfatidilcolină – DPFC), cu formare în câteva secunde de vezicule și micle, într-o manieră direct proporțională cu temperatura [29].

Aplicații practice ale MLT

MLT este în prezent utilizată ca instrument de lucru în cercetarea fundamentală, în studiul activității unor enzime, dar mai ales în studiul interacțiunii proteine-lipide în membrane.

Pe de altă parte, pe baza mecanismelor de acțiune descrise anterior, s-a constatat că MLT prezintă și acțiune antibacteriană împotriva unui număr mare de microorganisme, în special a bacteriilor gram negative [5, 7, 10, 24], respectiv antifungică [2] și antiparazitară [65]. O ipoteză prin care se încearcă explicarea acțiunii antibacteriene a MLT sugerează permeabilizarea membranei externe bacteriene ca urmare a afinității pentru lipopolizaharidele sau alte componente ale peretelui celular și neutralizării sarcinilor negative prin prezența peptidului cationic pe anumite arii ale acestuia. În zonele respective MLT se va insera și își va stimula autopropagarea spre plasmalemă. De importanță majoră este și afinitatea sa pentru suprafața peretelui extern, cu trei ordine de mărime mai mare decât a ionilor bivalenți Ca^{2+} și Mg^{2+} , care vor fi excluși din anumite regiuni, acest perete pierzându-și proprietățile de barieră. Ajunse în plasmalemă, moleculele de MLT vor determina permeabilizarea acesteia pentru apă și apoi liza celulei.

Creșterea rapidă a rezistenței microorganismelor la antibioticele existente în prezent, a sporit interesul în descoperirea unor noi clase de antibiotice. Una din aceste clase o reprezintă cea a peptidelor cationice naturale cu citotoxicitate direcționată asupra plasmalemei și la care fungii și bacteriile nu dezvoltă rezistență [21, 31]. În acest context a fost luată în considerare și MLT. Deși acțiunea antimicrobiană a veninului de albine este cunoscută de mai multe decenii, activitatea hemolitică pronunțată, împiedică totuși utilizarea sa ca agent antimicrobian, în combaterea diverselor afecțiuni umane sau animale. Dar, pe baza cunoașterii structurii MLT, au fost sintetizate *in vitro* [30] sau izolate numeroase peptide naturale cationice cu acțiune

antibacteriană similară, dar cu efecte hemolitice limitate, sau fără proprietăți hemolitice. Utilizarea MLT ca antibiotic este testată și sub formă de hibrizi – în combinație cu alte peptide – de exemplu MLT-cecropina A. Cecropina A este un peptid natural, izolat din hemolimfa fluturului de mătase *Hyalophora cecropia*, care prezintă o puternică activitate antibacteriană cu spectru larg asupra bacteriilor Gram-pozitive cât și Gram-negative. Utilizarea hibrizilor MLT-cecropina A conduce la potențarea efectului asupra membranelor artificiale și a celor bacteriene [26], odată cu reducerea semnificativă a efectului hemolitic. Hibridul are și proprietăți antifungice și antitumorale, datorate în special secvențelor *Gln-Gly-Ile*, respectiv *Gly-Gln-Gly-Ile-Gly* (prin deleția cărora aceste proprietăți se reduc considerabil) [57].

O altă potențială aplicație practică a efectului antibacterian și antifungic al MLT, avută în vedere de către Cleveland *et al.* [11], este în alimentație, mai precis în împiedicarea alterării alimentelor.

Nu în ultimul rând, MLT este studiată ca agent antitumoral. Sharom *et al.* (1995 – citați de Johnstone *et al.*, [31]) au arătat că o linie de celule tumorale, rezistente la un spectru larg de medicamente (*multi-drug resistant*) nu au prezentat *in vitro* rezistență la MLT purificată din veninul de albine. Acest peptid natural se preconizează a fi utilizat ca potențial agent de eliminare a celulelor canceroase reziduale în urma intervențiilor chirurgicale de extirpare. Ca și mecanism de acțiune, MLT se va lega pe anticorpi monoclonali care recunosc antigene specifice pe celulele tumorale. Deoarece complexe MLT-anticorp vor viza celulele canceroase, cercetătorii arată că vor fi evitate efectele secundare care apar curent asociate cu chimioterapia [3, 49]. Alt mecanism pe baza căruia MLT poate fi folosită ca agent antiproliferativ și antitumoral este cel de inhibare a activității calmodulinei – proteină omniprezentă, recunoscută a avea rol important în proliferarea celulară. Rezultatele obținute pe această direcție arată că MLT inhibă creșterea și capacitatea de multiplicare a celulelor leucemice de om și șoarece [25]. Este important de amintit și faptul că celulele leucemice de cultură s-au dovedit mai sensibile – chiar de 2-4 ori – la acțiunea citolică a MLT decât celule normale din splina de șoarece sau măduva hematogenă [34]. Și hibridul cecropina A-MLT a dat rezultate promițătoare în ce privește activitatea antitumorală [57].

Ținând deci cont de diversitatea țintelor asupra cărora acționează MLT, poate fi explicată multitudinea de efecte asupra funcțiilor celulare. Pe de altă parte, înțelegerea interacțiunii peptidelor active mici, de tipul melitinei, cu membranele biologice are o semnificație particulară pentru descifrarea unor procese moleculare importante cum este transferul materialului genetic din virus în celula atacată sau pentru modelarea acțiunii antimicrobiene a peptidelor sintetizate de multe vertebrate pentru a lupta cu infecțiile. Nu în ultimul rând, înțelegerea relației structură-funcție în cazul melitinei (și derivaților) poate conduce spre noi sisteme vectoriale de transport ale genelor în terapia genică, respectiv pentru direcționarea medicamentelor, deoarece translocarea cu succes a moleculelor mari în celule va depinde în primul rând de mecanisme eficiente care să permită traversarea membranelor, dar și să prevină leziunile ireversibile.

BIBLIOGRAFIE

1. Alder, G. M., Arnold, W. M., Bashford, C. L., Drake, A. F., Pasternak, C. A. and Zimmermann, U., *Divalent cation-sensitive pores formed by natural and synthetic melittin and by Triton X-100*, "Biochim. Biophys. Acta", **1061**, 1991, 111-120.
2. Andrä, J., Berninghausen, O., Leippe, M., *Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals are potently fungicidal against Candida albicans*, "Med. Microbiol. Immunol.", **189**, 2001, 169-173.
3. Bailly, Y., *La mellitine*, <http://www.ucmb.ulb.ac.be/.../mellitin.html>, 2001
4. Bavaec, A., Soomets, U., Langel, Ü., Zorko M., *Structural features of amphipathic peptides required for the activation of G-proteins*, "Acta Chim. Slov.", **45**, 1998, 27-34.
5. Blondelle, S. E., Houghten, R. A., *Hemolytic and antimicrobial activities of twenty-four individual omission analogues of melittin*, "Biochemistry", **30**, 1991, 4671-4678.
6. Blondelle, S. E., *Influence of tryptophan residues on melittin's hemolytic activity*, "Biochim. Biophys. Acta", **1202**, 1993, 331-336.
7. Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wahlin, B., Merrifield, R. B., *Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin A-melittin hybrids*, "FEBS Letters", **259**, 1989, 103-106.
8. Brokx, R. D., Lopez, M. M., Vogel, H. J., Makhatazde, G. I., *Energetics of target peptide binding by calmodulin reveals different modes of binding*, "J. Biol. Chem.", **276**, 2001, 14083-14091.
9. Chauvin, R., *Action du venin sur l'homme*, in: R., Chauvin (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.160-161, Masson ETC, Paris 1968.
10. Choi, S. H., Kang, S. S., *Therapeutic effect of bee venom in sows with hypogalactia syndrome postpartum*, "J. Vet. Sci.", **G2**, 2001, 121-124.
11. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L., *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*, "Int. J. Food Microbiol.", **71**, 2001, 1-20.
12. David, H., Krause, W., Behrisch, D., *Interaction of melittin with endotoxic lipid A*, "Biomed. Biochim. Acta", **49**, 1990, 563-571.
13. Dawson, C. R., *The interaction of bee melittin with lipid bilayer membranes*, "Biochim. Biophys. Acta", **510**, 1978, 75-86.
14. Dempsey, C. E., *The action of melittin on membranes*, "Biochim. Biophys. Acta", **1031**, 1996, 143-161.
15. Dempsey, C. E., *Membrane and protein dynamics*, <http://www.bch.bris.ac.uk/staff/pfdg/dempsey.htm>, 2002.
16. Feigin, A. M., Teeter, J. H., Brand, J. G., *The influence of sterols on the sensitivity of lipid bilayers to melittin*. "Biomed. Biophys. Res. Comm", **211**, 1995, 312-317.
17. Feller, S. E., *Molecular dynamics simulations of lipid bilayers*, "Curr. Opin. Col. Interf. Sci.", **00**, 2000, 1-7.
18. Fioroni, M., Burger, K., Mark, A. E., Roccatano, D., *Model of 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-propan-2-ol for molecular dynamics simulations*, "J. Phys. Chem.", **105**, 2001, 10967-10975.
19. Fischer, P. J., Prendergast, F. G., Ehrhardt, M. R., Urbauer, J. L., Wand, A. J., Sedarous, S. S., McCormick, D. J., Buckley, P. J., *Calmodulin interacts with amphiphilic peptides composed of all D-amino acids*, "Nature", **368**, 1994, 651-653.

20. Florea, A., Pure, D., Oprea, M. C., Gherghel, P., Crăciun, C., *Blood changes in experimental subchronic rat envenomation with honey bee (Apis mellifera L.) venom*, "Bull. Mol. Med.", **15-17**, 2003, 19-26.
21. Ganz, T., *Defensins and host defense*, "Science", **286**, 1999, 420-421.
22. Haber, M. T., Fukui, T., Lebowitz, M. T., Lowenstein, J. M., *Activation of phosphoinositide-specific phospholipase C γ from rat liver by polyamines and basic proteins*, "Arch. Biochem. Biophys.", **288**, 1991, 243-249.
23. Habermann, E., *Chimie, pharmacologie et toxicologie du venin*, in Chauvin, R. (Ed.), *Traité de biologie de l'abeille*, p.363-387, Masson, Paris, 1968.
24. Habermann, E., *Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed*, "Science", **177**, 1972, 314-322.
25. Hait, W. N., Grais, L., Benz, C., Cadman, E. C., *Inhibition of growth of leukemic cells by inhibitors of calmodulin: phenothiazines and melittin*, "Cancer, Chemother. Pharmacol.", **14**, 1985, 202-205.
26. Hancock, R. E. W., Chappelpe, D. S., *Peptide antibiotics*, "Antimicrob. Ag. Chemother.", **43**, 1999, 1317-1323.
27. Hong, D. P., Hoshino, M., Kuboi, R., Goto, Y., *Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides*, "J. Am. Chem. Soc.", **121**, 1999, 8427-8433.
28. Hristova, K., Dempsey, C. E., White, S. H., *Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface*. "Biophys. J.", **80**, 2001, 801-811.
29. Janshoff, A., *Interaction of peptides and proteins with artificial bilayers*, <http://www.uni-mainz.de/~janshoff/research/bilayer.html>, 2000.
30. Jelinek, R., Kolusheva, S., *Polymerized lipid vesicles as colorimetric biosensors for biotechnological applications*, "Biotechnol. Adv.", **19**, 2001, 109-118.
31. Johnstone, S. A., Gelmon, K., Mayer, L. D., Hancock, R. E., Bally, M.B., *In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides. I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines*, "Anti-Cancer Drug Des.", **15**, 2000, 151-160.
32. Kang, S. S., Pak, S. C., Choi, S. H., *The effect of whole bee venom on arthritis*, "Am. J. Chin. Med.", **30**, 2002, 73-81.
33. Killian, J. A., vanMeer, G., *The 'double lives' of membrane lipids. Workshop: Anno 2000. A lipid milestone*, "Eur. Mol. Biol. Org. Rep.", **2**, 2001, 91-95.
34. Killian, J. J., Dunn, J. D., *Differential cytolysis of murine spleen, bone-marrow, and leukemia cells by melittin reveals differences in membrane topography*, "Biochem. Biophys. Res. Com.", **139**, 1986, 222-227.
35. King, T. P., *Insect venom allergens*, in Baldo, B. A. (Ed.), *Molecular approaches to the study of allergens*. Monogr. Allergy, **28**, p. 84-100, Karger, Basel, 1990.
36. King, T. P., Wade, D., Coscia, M. R., Mitchell, S., Kochoumian, L., Merrifield, B., *Structure-immunogenicity relationship of melittin, its transposed analogues, and D-melittin*. "J. Immunol.", **153**, 1994, 124-1128.
37. Klyushnichenko, V. E., Syagailo, Y. V., *Chromatographic and membrane purification of polypeptide compounds from honey bee venom*, "J. Nat. Tox.", **6**, 1997, 111-119.
38. Koyama, N., Hirata, K., Hori, K., Dan, K., Yokota, T., *Computer-assisted infrared thermographic study of axon reflex induced by intradermal melittin*, "Pain", **84**, 2000, 133-139.

39. Krell, R., *Value-added products from beekeeping*, "FAO Agr. Serv. Bull.", **124**, Food Agr. Org. U. N., Rome, 1996.
40. Ladokhin, A. S., Selsted, M. E., White, S. H., *Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin*, "Biophys. J.", **72**, 1997, 1762-1766.
41. Ladokhin, A. S., White, S. H., *Folding of amphipathic α -helices on membranes: energetics of helix formation by melittin*, "J. Mol. Biol.", **285**, 1999, 1363-1369.
42. Ladokhin, A. S., White, S. H., *'Detergent-like' permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin*, "Biochim. Biophys. Acta", **1514**, 2001, 253-260.
43. Ladokhin, A. S., White, S. H., *Interfacial folding and membrane insertion of a designed helical peptide*, "Biochemistry", **43**, 2004, 5782-5791.
44. Lane, C. D., Champion, J., Haiml, L., Kreil, G., *The sequestration, processing and retention of honey-bee promelittin made in amphibian oocytes*, "Eur. J. Biochem.", **113**, 1981, 273-281.
45. Liu, P., *Protein Gallery*, http://www.Molvis.chem.indiana.edu/.../protein_pro.html, 2001.
46. Lopina, O. D., *Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators*, "Biochimia", **66**, 2001, 1122-1131.
47. Mackler, B. F., Kreil, G., *Honey bee venom melittin: correlation of nonspecific inflammatory activities with amino acid sequences*, "Inflammation", **2**, 1977, 55-65.
48. Monette, M., Lafleur, M., *Modulation of melittin-induced lysis by surface charge density of membranes*, "Biophys. J.", **68**, 1995, 187-195.
49. O'Neill, G., *A sting in the tail for cancerous cells*, "Ecos", **n90**, 1996, 5.
50. Ohki, S., *Interaction of melittin with lipid membranes*, "Biochim. Biophys. Acta", **1194**, 1994, 223-232.
51. Paudel, H. K., Xu, Y. H., Jarret, H. W., Carlson, G. M., *The model calmodulin-binding peptide inhibits phosphorylase kinase by interacting with its catalytic center*, "Biochemistry", **32**, 1993, 11865-11872.
52. Permyakov, E. A., Berliner, L. J., *α -Lactalbumin: structure and function*, "FEBS Letters" (V. Skulachev, Ed.), **473**, 2000, 269-274.
53. Picard, F., Paquet, M. J., Dufourc, E. J., Auger, M., *Measurement of the lateral diffusion of dipalmitoylphosphatidylcholine adsorbed on silica beads in the absence and presence of melittin: a ^{31}P two-dimensional exchange solid-state NMR study*, "Biophys. J.", **74**, 1998, 857-868.
54. Roccatano, D., Colombo, G., Fioroni, M., Mark, A. E., *Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study*, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA". Early Ed., 2002, 1-6.
55. Rudenko, S. V., Pavliuk, O. M., *The effect of Zn ions on erythrocyte hemolysis induced by melittin*, "Biochimia", **60**, 1995, 723-733.
56. Sessions, R. B., Gibbs, N., Dempsey, C. E., *Hydrogen bonding in helical polypeptides from molecular dynamics. Simulations and amide hydrogen exchange analysis: alamethicin and melittin in methanol*, "Biophys. J.", **74**, 1998, 138-152.
57. Shin, S. Y., Kang, J. H., Lee, D. G., Jang, S. Y., Seo, M. Y., Kim, K. L., Kyung-Soo Hahm, K. S., *Influences of hinge region of a synthetic antimicrobial peptide, cecropin A(1-13)-melittin(1-13) hybrid on antibiotic activity*, "Bul. Kor. Chem. Soc.", **20**, 1999, 1078-1084.

58. Silvestro, L., Axelsen, P. H., *Membrane-induced folding of cecropin A*, "Biophys. J.", **79**, 2000, 1465-1477.
59. Smith, R., *Structure and orientation of the pore-forming peptide, melittin in lipid bilayers*, "J. Mol. Biol.", **241**, 1994, 456-466.
60. Steiner, R. F., Albaugh, S., Fenselau, C., Murphy, C., Vestling, M., *A mass spectrometry method for mapping the interface topography of interacting proteins, illustrated by the melittin-calmodulin system*, "Anal. Biochem.", **196**, 1991, 120-125.
61. Suchanek, K. G., Kreil, G., *Translation of melittin messenger RNA in vitro yields a product terminating with glutaminyglycine rather than with glutaminamide*, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", **74**, 1977, 975-978.
62. Suchanek, G., Kreil, G., Hermodson, M. A., *Amino acid sequence of honeybee prepromelittin synthesized in vitro*, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", **75**, 1978, 701-704.
63. Terwilliger, T. C., Eisenberg, D., *The structure of melittin. I. Structure determination and partial refinement*, "J. Biol. Chem.", **257**, 1982, 6010-6016.
64. Terwilliger, T. C., Eisenberg, D., *The structure of melittin. II. Interpretation of the structure*, "J. Biol. Chem.", **257**, 1982, 6016-6020.
65. Vizioli, J., Salzet, M., *Antimicrobial peptides versus parasitic infections?*, "TRENDS Parasitol.", **18**, 2002, 475-476.
66. Vlasak, R., Unger-Ullmann, C., Kreil, G., Frischauf, A. M., *Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin*, "Eur. J. Biochem.", **135**, 1983, 123-126.
67. White, S., *Partitioning-folding coupling*, <http://www.blanco.biomol.uci.edu/IMAGES/part.fold.coupling.html>, 1999
68. Wimley, C. W., White, S. H., *Determining the membrane topology of peptides by fluorescence quenching*, "Biochemistry", 2000, **39**, 161-170.
69. Yang, Y., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., Huang, H. W., *Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores*, "Biophys. J.", **81**, 2001, 1475-1485.
70. Zühlke, R. D., Pitt, G. S., Deisseroth, K., Tsien, R. W., Reuter, H., *Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels*, "Nature", **399**, 1999, 159-162.
71. ***BACHEM AG product catalog, 2004, p.808.

ASPECTE ULTRASTRUCTURALE ADENOHIPOFIZARE PRIVIND
EFECTUL PROTECTOR AL UNOR COMPUȘI ANTIOXIDANȚI ÎN
NEUROTOXICOZA INDUSĂ DE L-GLUTAMATUL MONOSODIC
LA ȘOBOLANII ALBI JUVENILI

CONSTANTIN PUICĂ*, AHMAD MOUSA BASHA**,
CONSTANTIN CRĂCIUN**

SUMMARY. - Ultrastructural Pituitary Aspects Regarding the Protective Effect of Some Antioxidants Compounds Against L-Monosodium Glutamate Induced Neurotoxicosis in White Juvenile Rats. L-monosodium glutamate (MSG) is the most abundant of a group of endogenous amino acids in the mammalian central nervous system (CNS), and in the past decade, MSG has become widely accepted as a major neurotransmitter in the vertebrate CNS. Under certain abnormal conditions as: chronic neurodegenerative disorders or following oral intake, when the concentration of this neurotransmitter rises above this level, this amino acid can be neurotoxic. At higher concentrations in the brain, the neurons are excited to death. In these conditions MSG are called excitotoxin. The administration of MSG at prepubertal stage on rodents induces alteration of hypothalamus and pituitary morphology and functionality, and severe structural and functional alterations in hypothalamic-pituitary axis. In the last decade, an considerable interest has been generated concerning the use of natural compounds, anti-oxidants in particular, in neuroprotection, against MSG excitotoxicity. Our results show that 30 day-administered of 0,17 mg/g b.w. of MSG during the juvenile, prepubertal phase of development, caused ultrastructural alterations in the pituitary structure (cytoplasmic ballooning, intense modification of the form and size of the nuclei, mitochondrial vacuolisation, enlargement of endoplasmic reticulum). Some certain protective effects of the antioxidant micronutrients treatment, against MSG administration, upon pituitary ultrastructure, were registered.

L-Glutamatul monosodic (MSG) este cel mai abundent aminoacid din grupul aminoacizilor endogeni în sistemul nervos central (SNC) la vertebrate, iar în ultimele decenii MSG a fost considerat neurotransmițătorul major în SNC la mamifere [20, 22, 33, 39]. În anumite condiții specifice, în care nivelul acestui aminoacid din creier crește peste limitele normale, devine neurotoxic, inducând modificări morfologice și metabolice neuronale. Acestea se manifestă mult mai evident în creierul în dezvoltare, precum și în fazele de îmbătrânire ale organismului, condiții în care MSG a fost denumit *excitotoxină*.

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

** Universitatea Babeș - Bolyai, Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Fiziologie Animală, 3400 Cluj-Napoca, Romania

Excitotoxinele sunt substanțe, uzual aminoacizi, care reacționează cu receptorii specializați din creier determinând distrugere neuronală, [11, 33]. Astfel, *excitotoxicitatea* se referă la proprietatea paradoxală prin care MSG și alți aminoacizi excitotoxici (AAE) analogi, cauzează degenerare neuronală acută prin stimularea postsinaptică excesivă a receptorilor ionotropici pentru AAE, prin intermediul cărora glutamatul funcționează fiziologic ca neurotransmițător, [12]. Forma acută de neurotoxicitate este caracterizată prin balonizarea neuronilor în prezența agoniștilor, în particular a glutamatului, care duce la liza osmotică a neuronilor.

Cercetările ultimelor decenii au relevat că administrarea subcutană a unor doze diferite de MSG la șobolanii tineri a indus perturbări acute la nivelul axelor neuroendocrine, având drept rezultat alterarea sintezei și eliberării hormonilor adenohipofizari ce reglează creșterea și dezvoltarea. Efecte similare s-au obținut în administrarea subtoxică a MSG și a omologilor săi la maimuțele Rhesus tinere, unde s-a observat o scădere a eliberării de FSH și LH, asociate cu o creștere a prolactinei în ser, [11, 24, 33, 39].

Descoperirile cu privire la efectele negative induse de administrarea L-glutamatului monosodic asupra hipotalamusului, au fost și sunt de o importanță extremă, având în vedere că hipotalamusul controlează activitatea glandelor endocrine și, prin intermediul acestora, reglarea creșterii și a pubertății. Întrucât glutamatul nu poate penetra în mod obișnuit barierele hematoencefalică și cefalorahidiană, efectul excitotoxic se manifestă numai asupra structurilor din creier unde capacitatea de protecție a acestor bariere este deficitară, cum ar fi hipotalamusul neuroendocrin. La acest nivel glutamatul acționează în special la nivelul regiunilor circumventriculare ce alcătuiesc așa numită "*arie hipofizotropă*", precum și a structurilor retrochiasmatică, unde are loc sinteza și eliberarea factorilor neurohormonali ce reglează activitatea adenohipofizei. Din cauză că nucleul arcuat hipotalamic - centrul regulator neuroendocrin, reprezintă una din regiunile circumventriculare cerebrale cele mai afectate, animalele tratate în tinerețe cu glutamat manifestă multiple dezechilibre neuroendocrine, însoțite de un habitus anormal în faza de adult.

Cercetările efectuate în ultimele decenii au demonstrat astfel, că administrarea glutamatului la animalele de laborator tinere, în doze și în perioade de timp deferite, a provocat tot la adulți, hipoplazia unor organe interne: hipofiza, tiroida, glandele suprarenale, gonadele, aceste modificări fiind asociate cu disfuncții ale capacității reproductive, ce pot evolua până la stadiul de sterilitate, atât la femele, cât și la și masculi. La animalele injectate cu MSG s-au observat leziuni neuronale la nivelul hipotalamusului și dereglări, respectiv, diminuări ale secreției de hormoni adenohipofizari (TSH, GH, LH, FSH și ACTH), precum și prin creșterea nivelului seric a prolactinei [3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 17, 19, 24, 28, 29, 31, 32, 35, 38, 39, 40, 41, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 53, 54, 55].

Creșterea concentrației glutamatului în creier poate fi și urmarea unui aport exogen provenit din surse alimentare, îndeosebi din concentratele alimentare ce utilizează acest aminoacid ca aditiv alimentar.

În ambele situații, glutamatul provenit atât din surse endogene cât și exogene, din factor neurotropic, devine factor distructiv, neurotoxic.

Cu toate că MSG este o neurotoxină care poate distruge neuronii centrali ca urmare a consumului oral, (studii elaborate pe mai multe specii de mamifere de laborator), acest aminoacid continuă (intenționat sau neintenționat), a fi cel mai utilizat aditiv alimentar în toată lumea, în preparatele alimentare destinate consumului uman.

Datorită incidenței tot mai crescute a maladiilor neurodegenerative, în patogeneza cărora aminoacizii excitotoxici joacă un rol major, actualmente s-a stabilit un concept unitar privind implicarea coordinativă a cercetărilor în direcția dezvoltării strategiilor neuroprotective, domeniu în care contracararea sau atenuarea efectelor neurotoxice ale aminoacizilor excitatori, intens utilizați ca aditivi alimentari sau factori farmacologici, prezintă un interes uriaș.

Strategiile preventive și curative actuale sunt orientate atât pe administrarea unor antagoniști ai receptorilor N-metil-D-aspartat, unde are loc medierea mecanismului excitotoxic, cât și prin prevenirea, atenuarea și blocarea mecanismelor stresului oxidativ, activat ca urmare a excitotoxicității glutamatului. Un rol important în contracararea efectelor neurotoxinelor îl joacă micronutrienții cu potențial antioxidant: vitaminele A, C, E, acidul lipoic, coenzima Q, precum și unele săruri minerale pe bază de magneziu, zinc etc., [1, 2, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 23, 25, 26, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 48, 49, 50, 51].

În consens cu aceste perspective, am considerat inițial, iar ulterior, am demonstrat experimental, că o strategie foarte eficace în atenuarea sau blocarea variatelor exprimări ale mecanismelor excitotoxice ale glutamatului la nivelul SNC, precum și al axei neuroendocrine hipotalamo-hipofizare, se poate realiza prin asigurarea unui sinergism al acțiunii mai multor factori protectori cu potențial protector și antioxidant. Aceasta ar permite pe de o parte, blocarea canalelor calcice de la nivelul receptorilor NMDA cu ajutorul unor antagoniști ai ionilor de Ca^{2+} , respectiv, prin intermediul ionilor de Mg^{2+} cuplați cu vitamina B6, iar pe de altă parte, atenuarea sau blocarea mecanismelor stresului oxidativ cu ajutorul unor factori antioxidanți biologic activi (vitaminele C, E etc.). Sugestiile noastre sunt în consens cu datele din literatură care descriu utilizarea agenților antioxidanți în atenuarea efectelor adverse care se manifestă în diferite afecțiuni neurologice acute și cronice, [4, 11, 14, 15, 16, 18, 23, 25, 28, 29, 33, 34, 35, 40, 41, 42, 47, 51, 54].

Astfel, scopul cercetărilor noastre de microscopie electronică s-a axat pe elucidarea acțiunii protectoare a unor compuși antioxidanți: lactat de magneziu asociat cu vitamina B6, precum și a unui complex format din vitaminele C și E, în condițiile tratamentului subcronic cu o excitotoxină - L-glutamat monosodic, la nivelul ultrastructurii adenohipofizei șobolanilor albi juvenili.

În cadrul studiului nostru s-au efectuat investigații ultrastructurale la nivelul a două tipuri de celule adenohipofizare: celulele somatotrope (SH) și gonadotrope (GH).

Materiale și metode

Loturile experimentale. Cercetările experimentale au fost efectuate pe sobolani albi juvenili, în vârstă de 30 de zile. Animalele au fost întreținute în condiții zoo-igienice standardizate: interval de lumină-întuneric de 12 ore, regim alimentar standardizat administrat sub formă de concentrate cu un conținut echilibrat de proteine, lipide, glucide și vitamine, fiind tratate „a jeun” prin gavaj intragastric timp de 30 de zile, zilnic, cu o cantitate de 4 ml. soluție de analizat. Apa de băut a fost „ad libitum”.

Loturile experimentale având un număr de câte 8 animale au fost următoarele: **lotul M** (martor), animalele având greutatea medie de $57 \pm 0,9$ g; **lotul MG**, animalele având greutatea medie de $56 \pm 0,5$ g., au fost tratate cu MSG în doză de 0,17 mg/g greutate corporală (8,4 mg/animal); **lotul MGB**, animalele având greutatea de $56 \pm 0,8$ g., au fost tratate simultan cu MSG în doză de 0,17 mg/g greutate corporală (8.4 mg/animal) + lactat de magneziu (0,04 mg/g – 2,2 mg/animal) + vitamina B6 (piridoxină clorhidrat) în doză de 0,0001 mg/g. greutate corporală (0,01 mg/animal); **lotul MGC**, animalele având greutatea medie de $57 \pm 0,7$ g., au fost tratate simultan cu MSG în doză de 0,17 mg/g. (8,5 mg/animal) + vitamina C în doză de 0.009 mg/g (0,5 mg/animal) + vitamina E în doză de 0,002 mg/g. (0,1 mg/animal).

Microscopia electronică de transmisie. De la un număr de 4 animale din fiecare lot experimental, s-a recoltat câte un fragment din adenohipofiză, piesele recoltate fiind imediat introduse, în vederea prefixării, într-o soluție de glutaraldehidă 3% în tampon fosfat 0,1 M, la un pH = 7,4 și la temperatura de + 4⁰C. Timpul de prefixare a fost de 2 ore. A urmat o spălare în 4-5 băi de tampon fosfat 0,15 M la un pH = 7,4 timp de 4 ore, după care fragmentele de țesut au fost postfixate timp de o oră la temperatura de 44⁰ C, într-o soluție de acid osmic 1% în tampon fosfat 0,15 M, la pH = 7,4. Infiltrarea și includerea s-au efectuat în rășină poliestică – Vestopal W, piesele biologice fiind în final înglobate în capsule de gelatină. Secțiunile ultrafine au fost realizate la un ultramicrotom de tip CEB-III. Contrastarea secțiunilor s-a realizat cu acetat de uranil și cu citrat de Pb. Secțiunile ultrafine au fost examinate la un microscop electronic JEOL-JAPAN, la o tensiune de accelerare a electronilor de 80.000 V. Tehnica și modul de lucru expuse mai sus au fost adaptate după lucrări consacrate în domeniul microscopiei electronice (Ploaie și Petra, 1979 și Weakley, 1981).

Rezultate și Discuții

Studiul ultrastructural al adenohipofizei a relevat la **lotul M**, faptul că *celulele somatotrope* prezintă nuclee sferice sau ovalari, eucromatici, cu un contur regulat. În citoplasmă se găsesc numeroase granule de secreție de mărimi uniforme, răspândite în toată citoplasma. Organitele celulare sunt discret reprezentate, datorită abundenței granulelor de secreție. Mitocondriile sunt ușor vacuolizate, (Fig. 1).

Celulele gonadotrope prezintă nuclee sferice, eucromatici, cu un contur regulat. Organitele celulare implicate în procesul de secreție hormonală: aparatul Golgi, ribozomii și reticulul endoplasmic, sunt bine exprimate, sugerând o activitate de sinteză intensă. Mitocondriile sunt numeroase, ușor vacuolizate. În citoplasmă se remarcă abundența granulelor de secreție imature (care predomină, având în vedere vârsta prepubertală, imatură, a animalelor), (Fig. 2).

Lotul MG – *celulele somatotrope* prezintă un polimorfism accentuat de formă și structură, atât a nucleilor, cât și a organitelor celulare. Astfel, nucleele sunt de forme neregulate, mulți dintre aceștia fiind hiperchromi, cu cromatina condensată, cu spații intermembranare dilatate. În citoplasmă se remarcă numeroase vacuolizări, atât ale reticulului endoplasmic, cât și a mitocondriilor. Granulele de secreție sunt reduse cantitativ (Fig. 3).

Examinarea *celulelor gonadotrope* a evidențiat un polimorfism accentuat a formei și mărimii nucleilor, care prezintă contururi neregulate și spații intermembranare dilatate. În citoplasmă, la majoritatea celulelor se remarcă o scădere puternică a numărului granulelor de secreție hormonală, precum și dilatări ale reticulului endoplasmic rugos, precum și ale mitocondriilor (Fig. 4).

Lotul MGB – *celulele somatotrope* nu prezintă, în general, modificări majore față de lotul M, majoritatea acestui tip de celule fiind normal constituite. Există însă, celule cu modificări de formă și mărime a nucleilor, remarcându-se condensarea cromatinei nucleare, cu spații intermembranare dilatate, precum și vacuolizări ale citoplasmei și organitelor celulare. În general, numărul granulelor de secreție hormonale este mai redus, comparativ cu lotul M, (Fig. 5).

Studierea *celulelor gonadotrope* a relevat, la majoritatea acestora, modificări minore ale componentelor celulare, comparativ cu lotul M. Nucleele prezintă un contur ușor neregulat, remarcându-se un număr redus al granulelor de secreție, precum și a ribozomilor, care sunt grupați în centre de sinteză, (Fig. 6).

Lotul MGC – s-au constatat atât *celulele somatotrope* de aspect normal, cât și celule cu nuclee de aspect neregulat, având membrana intermembranară dilatată, precum și vacuolizări în unele zone ale citoplasmei. Granulele de secreție sunt în număr variabil, remarcându-se atât celule cu un număr redus de granule de secreție, cât și celule cu activitate secretorie hormonală, normală, (Fig. 7).

Celulele gonadotrope prezintă nucleele normal structurați, de forme și mărimi diferite. Organitele celulare: reticulul endoplasmic, aparatul Golgi sunt normal distribuite, remarcându-se vacuolizări ale mitocondriilor. S-a evidențiat o reducere generalizată și marcată a ribozomilor și a granulelor de secreție (Fig. 8).

Examinând imaginea de ansamblu a adenohipofizei la acest lot experimental, s-a remarcat și prezența unor insule celulare gonadotrope inactive, ce prezintă deformări și condensări ale cromatinei nucleilor, vacuolizări intracitoplasmice, precum și o cantitate redusă de granule de secreție hormonală.

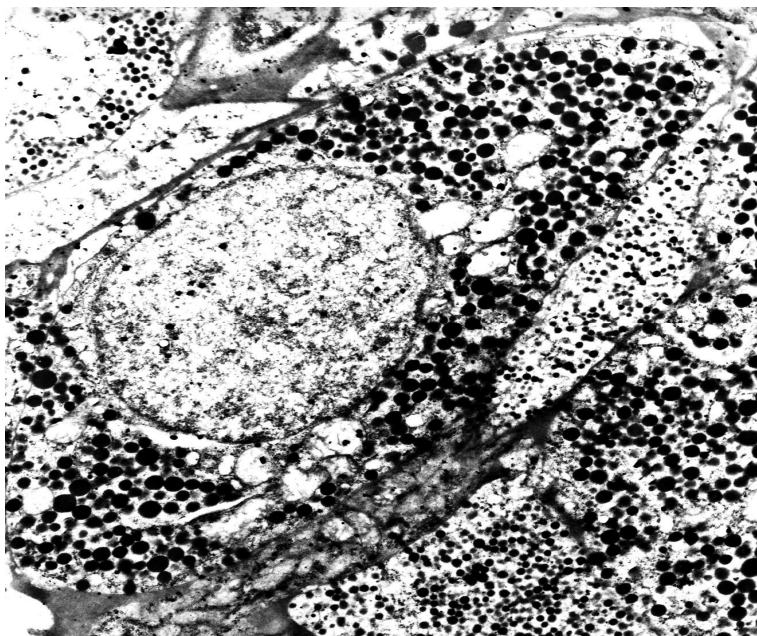


Fig. 1. Lotul M. Aspect normal al celulelor somatotrope SH cu granule electrodense, uniforme ca mărime, (12.600 x).

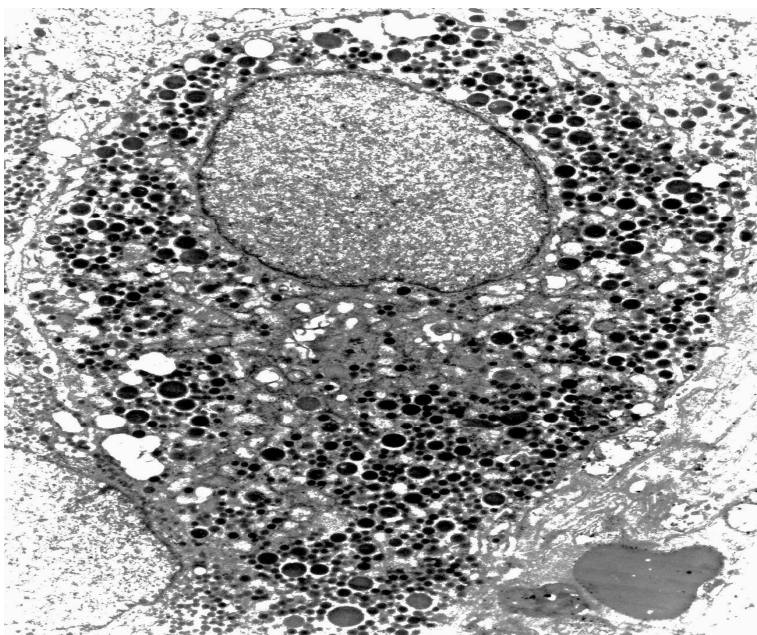


Fig. 2. Lotul M Celulă gonadotropă GH cu granule de diferite mărimi dispuse la periferia celulei, (x 12600).

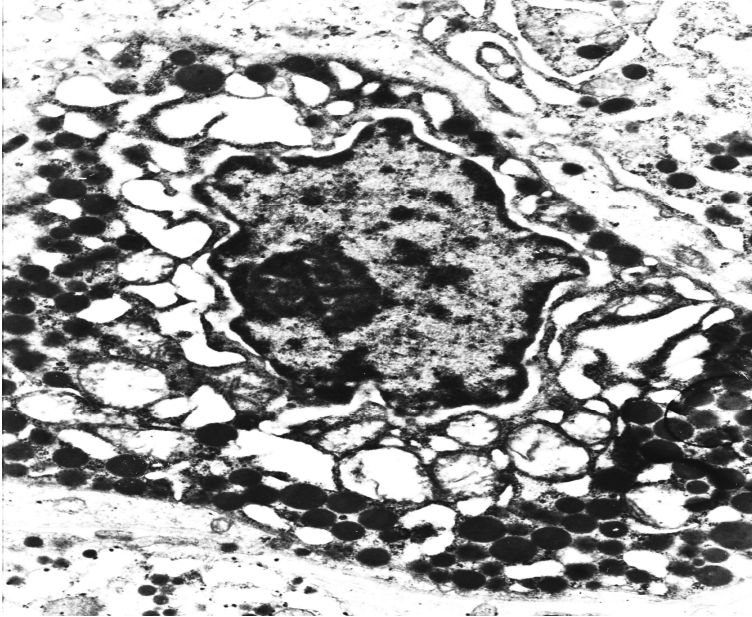


Fig. 3. Lotul MG. Celulă somatotropă SH cu vacuolizări intense ale citoplasmei și scăderea accentuată a numărului de granule de secreție, (x 8400)

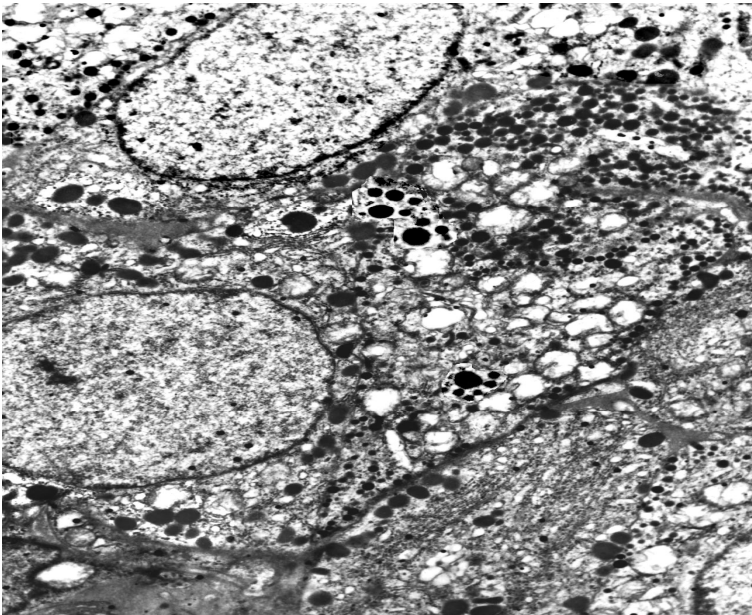


Fig. 4. Lotul MG. Celulă gonadotropă cu vacuolizări intense a citoplasmei și a mitocondriilor, scăderea numărului granulelor de secreție, (x 8400)

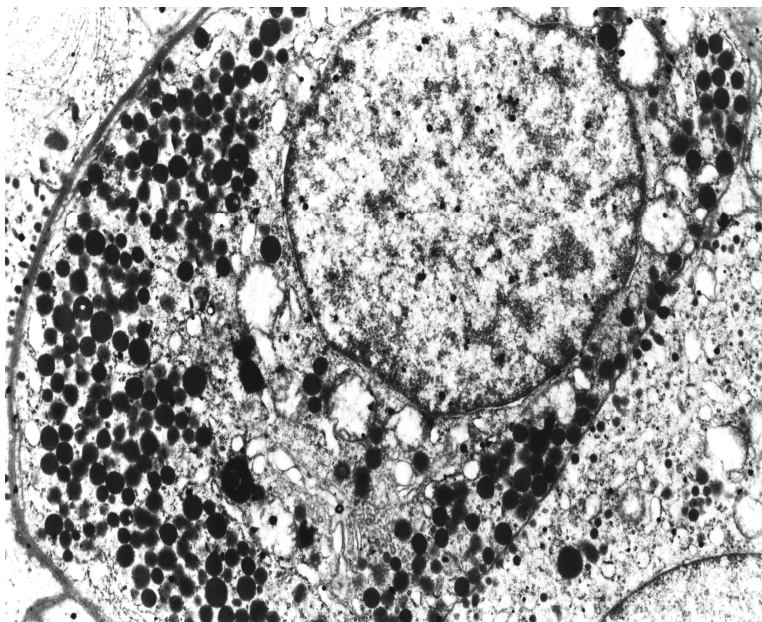


Fig. 5. Lotul MGB. Celulă SH cu modificări minore ale nucleului, ultrastructurii organelor celulare și a numărului granulelor de secreție, (x 8400)

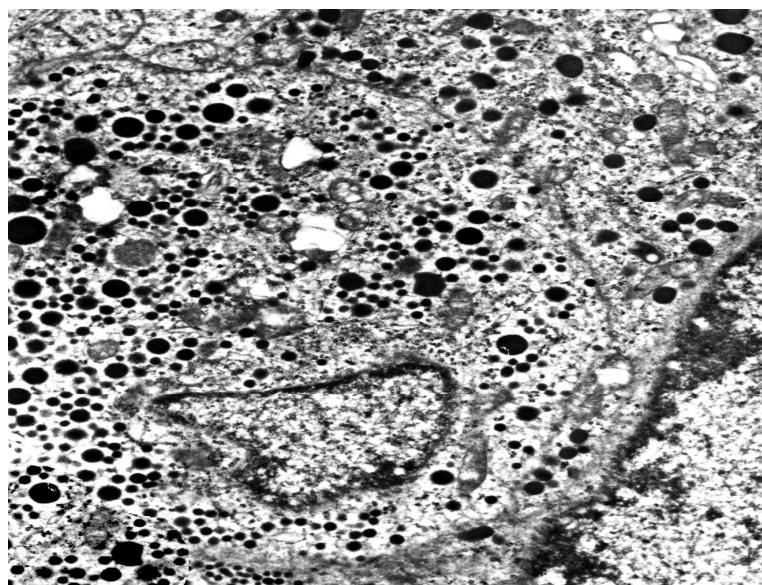


Fig. 6. Lotul MGB. Celulă gonadotropă cu centre de sinteză ribozomale, vacuolizări reduse ale mitocondriilor, reducere moderată a numărului granulelor de secreție hormonală, (x 12600).

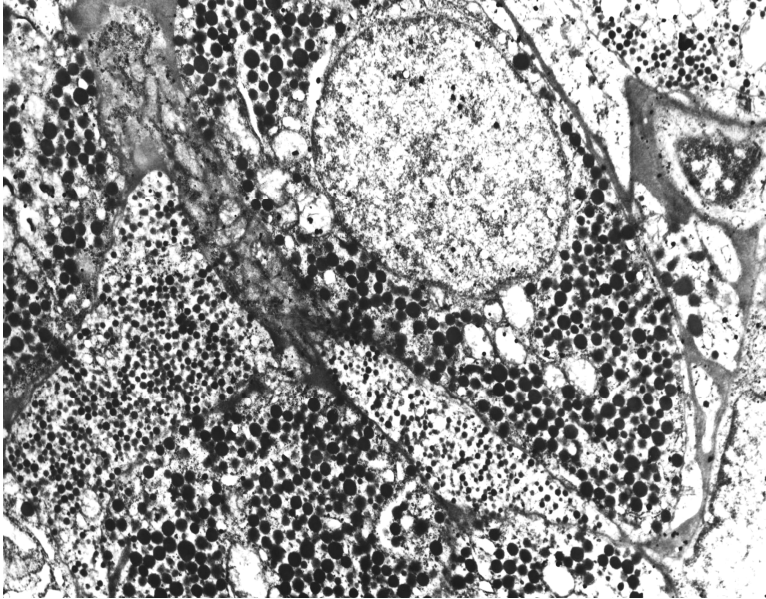


Fig. 7. Lotul MGC. Celulă SH cu nucleu normal constituit, dilatări; reducere moderată a numărului granulelor de secreție, (14200 x).

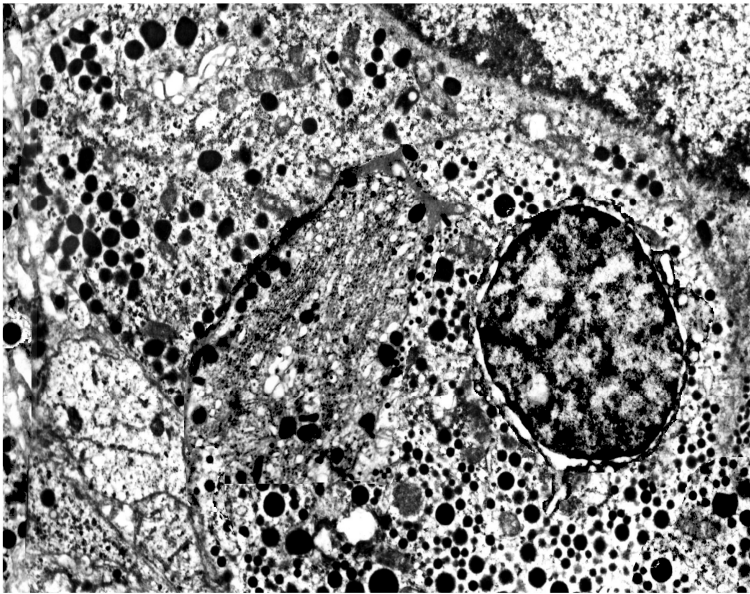


Fig. 8. Lotul MGC. Modificări moderate ale ultrastructurii celulelor GH. Scădere moderată a granulelor de secreție hormonală imature și mature (x 12600)

Obiectivul cercetărilor noastre l-a constituit studierea acțiunii L-glutamatului monosodic, precum și a efectelor protectoare a unor agenți protectori și antioxidanți biologic-activi (lactatul de magneziu, vitaminele B6, C, E), asupra ultrastructurii adenohipofizei, în perioada juvenilă, prepubertală a animalelor.

Rezultatelor cercetărilor de microscopie electronică au evidențiat că administrarea L-glutamatului monosodic la șobolanii prepuberi a indus unele aspecte degenerative morfologice și ultrastructurale ale celulelor acidofile - somatotrop formatoare (SH) și bazofile, gonadotrop formatoare (GH).

Am considerat necesar studiul acestui moment al dezvoltării ontogenetice, întrucât datele din literatură cu privire la acțiunea glutamatului asupra organismului mamiferelor aflate în perioada imaturității sexuale sunt sporadice și prezintă rezultatele administrării unor aminoacizi excitotoxici (AAE), în speță ale glutamatului, de scurtă durată, [1, 5, 6, 8, 11, 17, 19, 22, 24, 27, 28, 34, 37, 53, 55].

Modificările morfologice și ultrastructurale sunt caracterizate printr-o diminuare a volumului glandei, generată de hipoplazia atât a celulelor acidofile, cât și a celor bazofile, diseminate în zone specifice ale parenchimului glandular. La unele dintre aceste celule adenohipofizare se remarcă aspecte distrofice accentuate, caracterizate prin balonizarea intensă a corpului celular. Citoplasmele sunt intens vacuolizate, lipsite de conținut granular, iar nucleii sunt hiper cromatici, situați excentric. Se mai remarcă existența unor zone ale adenohipofizei cu aspecte de hipertrofiere și hiperplazie a celulelor bazofile din porțiunea anteromedială a glandei, ceea ce duce la modificarea raportului normal dintre celule, în favoarea celor bazofile, aceste aspecte semnificând o creștere a bazofilismului glandular, caracteristică a stărilor de stres. Majoritatea celurilor β și γ (gonadotrop formatoare) prezintă citoplasmele intens vacuolizate, iar unele dintre celulele Σ - corticotrop formatoare, prezintă un aspect spumos, caracteristic, aceste celule fiind denumite celule Crooke, care sunt prezente în condițiile expunerii organismelor la diferite situații de stres, [20, 28, 51].

În parenchimul glandular se mai remarcă ușoare dilatări ale capilarelor sanguine sinusoide. Toate aceste modificări sugerează la prima vedere un nivel scăzut al hormonilor adenohipofizari, care determină un răspuns adecvat, al etajului inferior al axei hipotalamo-hipofizo-gonadice testiculul – organ hormono-dependent, unde se remarcă o involuție marcată atât a organului în totalitate, cât și a structurilor tubilor seminiferi, respectiv, un aspect de hipogonadism accentuat, (rezultate neprezentate). În același timp, leziunile celulelor acidofile somatotrop formatoare, determină o încetinire a procesului general de creștere al organismului, manifestat printr-o involuție a greutateii corporale a animalelor tratate cu glutamat, (rezultate de asemenea, neprezentate).

Considerăm că leziunile celulare nu reprezintă consecința unei acțiuni directe a glutamatului asupra morfologiei glandei, din mai multe considerente. Literatura de specialitate nu a semnalat până în prezent, existența receptorilor pentru glutamat la nivelul membranelor celulelor adenohipofizare. Probabil că aspectele lezionale adenohipofizare semnalate, reprezintă consecința persistenței în timp a hipofuncției

hipotalamice determinată de degenerescența neuronală ireversibilă care apare în structurile periventriculare hipotalamice, ce cuprind printre alte structuri, nucleii ventromedian, dorsomedian, precum și nucleul arcuat hipotalamic - centrul neurohormonal reglator al funcțiilor gonadotrope și somatotrope ale adenohipofizei. Activitatea hipofizei fiind dependentă esențial de comenzile primite prin SNC de la hipotalamus, nivelul redus al neuropeptidelor secretate, sugerat de o scădere a activității neurosecretoare, a determinat modificări de structură și funcție ale acestei glande.

Actualmente este bine cunoscut faptul că neurohormonii (corticoliberina, vasopresina și oxitocina), eliberați la nivelul structurilor magnoceleulare și parvoceleulare hipotalamice, (nucleul paraventricular și nucleul supraoptic), participă la reglarea funcțională a adenohipofizei. Coexistența vasopresinei cu factorul neurohormonal de eliberare a corticoliberinei (CRH), în pericarionul neuronilor parvoceleulari hipotalamici, eliberarea în sângele portal a vasopresinei la nivelul eminenței mediane, rolul ei fiziologic în reglarea eliberării de ACTH și punerea în evidență a acestui neurohormon în celulele adenohipofizare, precum și elucidarea rolului oxitocinei în reglarea secreției gonadotropilor, demonstrează participarea acestor neurohormoni în reglarea funcțiilor adenohipofizei [12, 20 51].

În concluzie, întregul proces de secreție gonadotropă și somatotropă este dirijat de o porțiune a ariei hipofizotrope situată în hipotalamusul mediobazal (îndeosebi în nucleul arcuat), în care are loc secreția și eliberarea de LH-RH, precum și de o zonă a hipotalamusului anterior (aria preoptică), care reglează ritmul de sinteză și eliberare al gonadoliberinei. Pe de altă parte, secreția și eliberarea de hormon somatotrop este reglată de acțiunea celor doi factori hipotalamici, GH-RH și somatostatina, eliberați tot la nivelul ariei hipofizotrope hipotalamice ce cuprinde nucleul arcuat și ventromedian. Astfel, leziunile ireversibile ale neuronilor hipotalamici, asociate cu inhibarea eliberării factorilor neurohormonali reglatori din aceste zone hipotalamice, ca urmare a acțiunii excitotoxice a glutamatului, pot determina aspectele ultrastructurale lezionale descrise la nivelul adenohipofizei în cadrul experimentului nostru.

Rezultatelor cercetărilor noastre de microscopie electronică au reliefat și concordanța acestora cu datele din literatură, care descriu că administrarea pe diferite căi (parentală sau injecții intrahipotalamice directe), a unor aminoacizi excitotoxici și omologi ai acestora (acid ibotenic, acid kainic, L-cisteină, L-glutamat monosodic, acid D,L- α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol propionic, N-metil-D-aspartat), a determinat aspecte de degenerescență neuronală, asociate cu leziuni axondendritice, precum și ale celulelor adenohipofizare, [3, 28].

Administrarea în perioada neonatală a L-Glutamatului monosodic la șobolani a indus la adulți aspecte degenerative ultrastructurale ale celulelor gonadotrope adenohipofizare, rezultatele noastre fiind în consens cu datele din literatură, care au descris alterarea secreției de gonadotropine la animalele adulte, consecutiv administrării neonatale de glutamat, [5, 8, 11, 12, 23, 25, 28, 34, 38, 39, 40, 43, 44].

Repercusiunile, în cazul administrării L-glutamatului monosodic în perioadele precoce ale dezvoltării ontogenerice nu sunt evidente, în momentele imediat următoare ale tratamentului sau consumului acestui aminoacid. **Efectul glutamatului este ocult, acțiunea excitoneurotoxică la nivelul hipotalamusului și complexului neuroendocrin hipotalamo-hipofizar manifestându-se la distanță, în timp, respectiv în faza de adult a animalelor**, prin tot evantaiul de aspecte negative care au fost descrise în lucrarea de față. Urmările negative ale administrării glutamatului la animale, putem să le considerăm ca semnale deosebite, de alarmă, privind consumul acestui aminoacid – aditiv alimentar – în perioadele precoce ale dezvoltării la om! În același timp, administrarea lactatului de Mg asociat cu vitamina B6, precum și a vitaminelor C și E, a determinat un efect pozitiv asupra ultrastructurii celulelor adenohipofizare analizate. Rezultatele obținute în cadrul experimentelor noastre sugerează că utilizarea sinergică, în două variante experimentale, a componentelor antioxidante analizate, pot fi eficiente în prevenirea daunelor provocate de administrarea subcronică a MSG. Datele noastre au relevat efectul protector, pozitiv, al ionilor de magneziu asociați cu vitamina B6, precum și al vitaminelor C și E – compuși antioxidanți, asupra ultrastructurii celulelor acidofile și bazofile adenohipofizare, demonstrând că antioxidanții reprezintă substanțe care pot preveni sau contracara alterările morfostructurale induse de excitotoxine la nivelul axelor neuroendocrine.

Concluzii

- Rezultatele experimentale obținute demonstrează existența unei sensibilități crescute a celulelor adenohipofizare în timpul stadiului prepubertal al dezvoltării ontogenetice, ca urmare a tratamentului subcronic cu L-glutamat monosodic
- Expunerea subcronică timp de 30 de zile a șobolanilor la MSG în timpul acestui stadiu critic prepubertal al dezvoltării, prin dereglarea bioritmului hormonal, presupune efecte adverse asupra creșterii și dezvoltării ulterioare.
- Datele experimentale obținute reprezintă argumente ce atestă faptul că stadiile prepubertale, timpurii, ale dezvoltării ontogenetice în condițiile unui organism incomplet maturat, sunt extrem de vulnerabile la acțiunea neuroexcitotoxică a glutamatului.
- Administrarea componentelor biologice active, cu un potențial protector și antioxidant asociate în cele 2 variante experimentale (lactat de magneziu + vitamina B6, precum și vitaminele C și E), a demonstrat efectul protector al acestor micronutrienți, în contrast cu acțiunea excitotoxică a glutamatului, asupra întregului ansamblu de celule adenohipofizare studiate.

BIBLIOGRAFIE

1. Ahmad, K. and Jahan, K., *Studies on the preventive and curative action of ascorbic acid on the neurological toxicity of monosodium glutamate*, "Hunger, Technology, and Society" **1**, 2001, 5-9.
2. Abraham, A., Kiss, I., Borșa, Maria, Sandu, Victoria Doina, Puică, C., *Neurotoxicological investigations of some drugs in animal experiments*, „Int. Neurotoxicol. Assoc.” **6**, 1997, 28-32.
3. Ahmad, M.B., Crăciun, C., Puică, C., *Aspecte ultrastructurale adenohipofizare induse de administrarea L-glutamatului monosodic la iepurii juvenili*, "Probleme Actuale în Biologia Celulară și Moleculară", **VII**, 1, 2002a, 308-315
4. Ahmad, M.B., Crăciun, C., Puică, C., Cristescu, M., *Cercetări morfofuncționale cerebrale privind rolul protector al unor micronutrienți-factori antioxidanți, în atenuarea efectelor stresului oxidativ indus de administrarea L-glutamatului monosodic la iepurii juvenili*, Probleme Actuale în Biologia Celulară și Moleculară, **VII**, 1, 2002b, 270-277.
5. Albala, B.J., Moshe, S.L., Okada, R., *Kainic acid induced seizures: a developmental study*, "Developmental Brain Research.", **13**, 1984,139-148.
6. Barnes, G.N. and Slevin, J.T., *Ionotropic Glutamate Receptor Biology: Effect on Synaptic Connectivity and Function in Neurological Disease*, "Current Medicinal Chemistry", **10**, 2003, 20-23.
7. Bartanusz, D., Muller, R.C., Gaillard, P., *Local α -aminobutyric acid and glutamate circuit control of hypophyseotrophic corticotropin-releasing factor neuron activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus*, "Eur. J. of Neurosci"., **19**, 2004, 777-781.
8. Basu, A., Kaur, G., Kaur, A.P., *Glutamate Excitotoxicity: Its Correlation with Neuronal Plasticity in Young Adult and Neonate Rats*, "Journal of Neurological Sciences", NOROL BILD **20**, 4, 2003, <http://www.med. ege.edu.tr/norolbil /2003/NBD25403.htm>
9. Behne, D., and Kyriakopoulos, A., *Mammalian selenium - containing proteins*, "Annual Review of Nutrition", **21**, 2001, 453-473.
10. Berkoff, F., *Joys of vitamins C, E and selenium*, "Food and Nutrition Board of the National Academy of Sciences", Washington D.C., USA. 2000.
11. Blaylock, R.L., *Neurodegeneration and aging of the central nervous system: Prevention and treatment by phytochemicals and metabolic nutrients*, "Integrative Med.",**1**, 1998,117-133.
12. Blaylock, R.L., *Excitotoxins, Neurodegeneration and Neurodevelopment*, "The Medical Sentinel Journal.", 2002, S175-S188.
13. Bronzetti, G., Cini, M., Elisabeta Andreoli Caltavuturo, L., Panunzio, M., Clara Della Croce, *Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast*, "Mutation Research", **496**, 2001, 105-115.
14. Chandan, K.S., Savita Khanna, Sashwati, R., and Packer, L., *Molecular Basis of Vitamin E Action Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60^{c-Src} kinase activation and death of HT4 neuronal cells*, "J. Biol. Chem.", **275**, 17, 2000, 13049-13055.
15. Coan, E.J., and Collingridge, G.L., *Magnesium ions block an NMDA receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus*, „Neurosci. Lett.”, **53**, 1985, 21-26.
16. Coyle, J.T. and Puttfarcken, P., *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*, "Science", **262**, 1993, 689-695.

17. Crăciun, C., and Puică, C., *The protective role of Magnesium-glutamogluconate associated with vitamin B6, on the ultrastructure and nucleic acids (DNA and RNA) concentration, of pituitary gland, in L-glutamate juvenile treated rats*, „Current Problems and Techniques in Cellular and Molecular Biology”, **3**, 1998, 214-217.
18. Danbolt, N.C., *Glutamate uptake*, „Prog. Neurobiol.”, **65**, 2001, 1-105.
19. Dancășiu, Minerva, *Citologia Comparată a Adenohipofizei*, “Editura Academiei Republicii Socialiste România”, București., 1974.
20. *Encyclopædia Britannica*. "Monosodium Glutamate", Encyclopædia Britannica Premium Service.15 <<http://www.britannica.com/eb/article?eu=54755>>, 2004.
21. Frei, B., Traber, M., *The new US dietary reference intakes for vitamins C and E*, „Redox Report”, **1**, 2001, 5-9.
22. Goldsmith, P.C., *Neuroglial Responses to Elevated Glutamate in the Medial Basal Hypothalamus of the Infant Mouse*, Journal of Nutrition, **130**, 2000, 1032S-1038S.
23. Grunewald, R.A., *Ascorbic acid in the brain*, “Brain Res. Rev.”, **18**, 1993, 123-133.
24. Ho, I, Daniela, Ortiz, Rogers, E., Sheal, T.B., *Multiple Aspects of Homocysteine Neurotoxicity: Glutamate Excitotoxicity, Kinase Hyperactivation and DNA Damage*, “Journal of Neuroscience Research”, **70**, 2002, 694-702.
25. Iacono, R., Schoonenberg, T., Advocate, P., Crystal, Whitten, Loma Linda, *Preventive and Therapeutic Nutritional Approaches to Neurological Disease*, „Neuroscience & Movement Disorder Clinic”, **40**, 2002, 355-366.
26. Krinsky, N.I., *Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids*, “J. Am. Diet. Assoc.”, **96**, 2001, 693-702.
27. Kubo, T., Kohira, R., *Neonatal glutamate can destroy the hippocampal CA1 structure and impair discrimination learning in rats*, “Brain Res.”, **616**, 1993, 311-314.
28. Kwiatkowska-Patzer, B, Baranowska, B, Walski, M, *Influence of spinal cord protein hydrolysate upon the blood brain barrier changes due to experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. Ultrastructural study*, “Folia Neuropath.”, **41**, 2003, 29-34.
29. Lombard J., *Antioxidants and neurodegenerative diseases*, “Brain Behav. Res.”, **2**, 2002, 1-19.
30. Mc Intosh, T.K., Vink, R., Yamakami, I., Faden, A.I., *Magnesium protects against neurological deficit after brain injury*, „Brain Res”., 482, 1989, 252-260.
31. McIntyre, J. L., *MSG is Back in Baby Food – Sprayed Right on Crops as They Grow*, “CEO Emerald BioAgriculture (Auxein Corporation)”, Washington D.C., USA, 2002.
32. Meldrum, B.S., *Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology*, “Journal of Nutrition”, **130**, 2001, 1007S-1015S.
33. Miyamoto, M., Murphy, T.H., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T., *Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line*, “J. Pharmacol. Exp. Ther.”, **250**, 1989, 1132-1140.
34. Nair, P.G., *N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonists as potential therapeutic agents in neurodegenerative diseases*, “Indian J. Pharmacol.”, **36**, 2004, 50-51.
35. Niki, E., *Interactions of ascorbate and alpha-tocopherol*, “Third Conference of Vitamin C, “Burns ET (Ed), NY Acad. Sci.”, **498**, 1987, 186-199.
36. Olney, J.W., *Excitotoxins in alimentation*, “J. Child. Neurol.”, **4**, 1995a, 218-226.
37. Olney J.W., *Excitotoxin in foods (II)*, “Neurotoxicology”, **19**, 1995b, 445-449.

38. Olney J.W., *Drug-induced Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain*, „Brain Pathol.”, **12**, 2002, 488-498.
39. C. Puică, M. Cristescu, C. Crăciun, Doina Sandu, *Efectul protector al ionilor de magneziu și a vitaminei B6 asupra unor parametri morfologici din hipotalamus și hipofiză la șobolanii albi Wistar juvenili*, “volumul Primului Congres Național de Biologie Celulară”, 8-10 iunie, Iași, **1**, 2000, 33-37.
40. C. Puică, C. Crăciun, D. Sandu, C. Cristescu, *The protective action of magnesium ions and vitamin B6 upon some morpho-functional parameters in hypothalamus and anterior pituitary in white juvenile rats treated with L-monosodium glutamate*, “Current Problems and Techniques in Cellular and Molecular Biology”, **V**, 2001, 285-291.
41. C. Puică, M.A.Rusu, Maria Borșa, Ioana Roman, Mihaela Sabadăș, M. Cristescu, M.B. Ahmad, *Aspecte ultrastructurale cerebrale privind rolul protector al unor factori antioxidanți în neurodegenerescența indusă de L-glutamatul monosodic la șobolanii albi juvenili*, “Probleme Actuale în Biologia Celulară și Moleculară”, **VII**, 2003, 300-307.
42. C. Puică, C. Crăciun, M. Rusu, Ioana Roman, M.B. Ahmad, C. Cristescu, *Histological and ultrastructural studies concerning the protective effects of some micronutrients-antioxidants factors, following L-monosodium glutamate administration, on hypothalamic-pituitary neuroendocrine axis, in prepubertal white rats*, “Nat. Cong. with Int. Com “Biotechnology, Present and Outlook in the Third Millenium”, Bucharest, **sect. 2**, 2003, 35-36.
43. C. Puică, C. Crăciun, M. Cristescu, M.B. Ahmad, *Ultrastructural studies concerning the reactivity of the hypothalamic-pituitary axis following L-monosodium glutamate administration in juvenile rats*, “The International Syposium “Actualities in the Pathology and Development of the Domestic Animals”, Cluj-Napoca, **59-60**, 2003, 432-437.
44. Rao, S.D., Yin, H.Z., Weiss, J.H. *Disruption of Glial Glutamate Transport by Reactive Oxygen Species Produced in Motor Neurons.*, “J. Neurosci.”, **23**, 2003, 2627-2633.
45. Reinhard, Tonia, *Nutrition in the News - New Dietary Reference Intakes for Antioxidant Nutrients*, “Nutrition and Food Science Department Wayne State University”, USA. 2000.
46. Rothstein, J.D., Martin, L.J, and Kuncl, R.W, *Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*, “The New England Journal of Medicine”, **22**, 2003, 1464-1468, Massachusetts Medical Society.
47. Singh, P., Mann, K.A., Mangat, H.K., Kaur, G., *Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes*, “Mol. Cell Biochem.”, **243**, (1-2), 2003, 139-145.
48. Smith, J.D , Terpening, C.M , Schmidt, S.O., *Relief of Fibromyalgia Symptoms Following Discontinuation of Dietary Excitotoxins*, “The Annals of Pharmacotherapy”, **35**, 2003, 702-706.
49. Schmidt, R., Hayn, M., Roob, B., Reinhard, G., Schmidt, H., Schumacher, M., Watzinger, N., and Launer, L.J. *Plasma antioxidants and cognitive performance in middle-aged and older adults: Results of the Austrian Stroke Prevention Study*, “J. Am. Geriat. Soc.”, **46**, 2003, 1407-1410.
50. Stevens, A., and Lowe, J., *Histology*, “MOSBY-Year Book Europe Ltd., Toronto”, Canada., 1993.
51. Sunde, R.A., *Selenium, Present Knowledge in Nutrition* “The Nutrition Foundation”, Washington, D.C. 2002.

52. Traber, M., Serbinova, Elena, Lester, P., *Biological activities of tocotrienols and tocopherols*, In: "Antioxidant Food Suppl. in Human Health", New York: Academic Press, **7**, 1999, 55-71.
53. Van Westerlaak, M.G., Joosten, E.A., Gribnau, A.A., Cools, A.R., Bar, P.R., *Chronic Mitochondrial Inhibition Induces Glutamate-Mediated Corticomotoneuron Death in an Organotypic Culture Model*, "Exp. Neurol., Academic Press", **167**, 2001, 393-400.
54. Zeron, Melinda, M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Raymond, L.A., *Increased sensitivity to N-Methyl-D-Aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease*, "Neuron", **33**, 2002, 849-860.
55. Young, V.R., and Ajami, A.M., *Glutamate: An Amino Acid of Particular Distinction*, International Symposium on Glutamate: Keynote Presentation, "The Journal of Nutrition", **130**, 2000, 892S-900S.

MICROBIOTA NĂMOLULUI ACTIV ȘI A CELUI FERMENTAT DE LA STAȚIA DE TRATARE A APEI UZATE DIN ORAȘUL BISTRIȚA

ANDREEA MÎNDRUȚ* și MIHAIL DRĂGAN-BULARDA**

SUMMARY. – Microbiota of Activated and Digested Sludge from the Bistrița Town Wastewater Treatment Plant. Activated sludge, a common biological treatment method for municipal and industrial wastewater represents a complex microbial community. Population shifts within the microbial community may result from changes in the plant operating conditions. Our research is the first complex analysis of the activated and digested sludge in the Bistrița wastewater treatment plant. The bacteriological studies focused on the broader effects of the treatment on sludge microbiota. In activated and digested sludge, we determined the number of following bacteria: heterotrophic aerobic, ammonifying, nitrifying, denitrifying, proteolytic, amylolytic and lipolytic. We also determined five bacteriological indicators: the mesophilic heterotrophic bacteria, the total coliform bacteria, the fecal coliform bacteria, the fecal enterococcus and the clostridia. Our data show that all the bacteria in the seven physiological groups were present in a low number in the sludge, probable because of sludge age, high BOD₅ value (Biochemical Oxygen Demand) and bulking problems. The numbers recorded for the bacteriological indicators were high in both type of sludge. The anaerobic mesophilic digestion had a better efficiency on total coliforms and fecal coliforms, but the fecal enterococcus and the clostridia were more resistant to this treatment. This data confirm that the mesophilic digestion isn't a good treatment for sludge disinfecting.

Succesul procesului de epurare a apelor municipale prin metoda nămolului activ depinde de constituirea comunității mixte de microorganisme, având trei scopuri principale: îndepărtarea materiei organice din apa uzată, formarea nămolului recirculat și generarea unui efluent secundar, acceptabil din punct de vedere calitativ[5].

Bacteriile constituie majoritatea microorganismelor prezente în nămolurile activ și fermentat, predominarea uneia sau mai multor grupe fiziologice la un moment dat fiind determinată de natura substanțelor organice din apa uzată, de modul de operare al stației și de condițiile de mediu[7].

La stația de tratare a apei uzate Bistrița procesul de epurare este bifazic, fiind absentă faza terțiară de nitrificare/denitrificare și îndepărtare a fosforului. Nămolul format în treapta a doua de epurare este supus fermentării anaerobe mezofile (15 zile la 35°C) și deshidratării.

* Administrația Națională "Apele Române", Sistemul de Gospodărire a Apelor Bistrița, Str. A. Iancu nr.9, 4400 Bistrița, România. E-mail: andimi75@yahoo.com

** Universitatea "Babeș-Bolyai", Facultatea de Biologie și Geologie, Catedra de Biologie Experimentală, Str. M. Kogălniceanu nr.1, 400084 Cluj-Napoca, România. E-mail: draganb@bioge.ubbcluj.ro

În cercetările noastre asupra nămolurilor activ și fermentat am urmărit evidențierea și determinarea numărului de bacterii din 7 grupe fiziologice (heterotrofe aerobe mezofile, amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, proteolitice, amilolitice, lipolitice), precum și a parametrilor igienico-bacteriologici (bacterii mezofile aerobe, coliformi totali, coliformi fecali, enterococi fecali, clostridii sulfito-reducătoare).

Materiale și metode. Probele de nămol activ au fost recoltate din decantorul secundar, iar cele de nămol fermentat din metantanc în două perioade: august 2003 pentru indicatorii igienico-bacteriologici și mai 2004 pentru grupele fiziologice.

Au fost utilizate următoarele medii de cultură:

Mediul pentru bacterii heterotrofe aerobe: geloză nutritivă [2].

Mediul pentru bacterii amonificatoare: apă peptonată (pH 7,9) [11].

Mediul pentru bacterii nitrificatoare: bulion cu adaos de cazeină și KNO_2 [11].

Mediul pentru bacterii denitrificatoare: bulion de soia cu triptoză, cu adaos de KNO_3 [12].

Mediul pentru bacterii proteolitice: mediu cu gelatină [8].

Mediul pentru bacterii amilolitice: agar nutritiv cu amidon [8].

Mediul pentru bacterii lipolitice: agar nutritiv cu Tween 80 [8].

Mediul pentru coliformi totali: bulion cu laurylsulfat de Na, simplu concentrat și GEAM-Levine[2].

Mediul pentru coliformi fecali: bulion cu laurylsulfat de Na simplu concentrat [2].

Mediul pentru enterococi fecali: bulion cu azidă de sodiu simplu concentrat și azidă de sodiu și bromcrezol purpur [2].

Medii pentru clostridii sulfito-reducătoare: bulion pentru clostridii, mediu cu ficat, mediu cu albuș de ou, lapte simplu steril [2].

S-au preparat diluții de nămol în soluție salină izotonică 0,85%, cuprinse între 10^{-1} și 10^{-12} . Din diluțiile preparate s-au inoculat câte 2 cutii Petri în cazul mediilor solide și câte 5 eprubete în cazul mediilor lichide. Temperatura și timpul de incubare a fost cel indicat de metodologiile menționate. Culturile au fost examinate macroscopic sau/și chimic.

S-au utilizat următorii reactivi pentru analiza culturilor bacteriene: reactivul Nessler pentru bacteriile amonificatoare, reactivul cu difenilamină pentru bacteriile nitrificatoare și denitrificatoare, soluția Lugol pentru bacteriile amilolitice.

Numărul bacteriilor heterotrofe aerobe, al bacteriilor amilolitice și al celor lipolitice s-a stabilit pe baza valorii medii a numărului de colonii care s-au dezvoltat în urma inoculării mediului, înmulțindu-se numărul de colonii cu valoarea inversă a diluției. Numărul cel mai probabil de bacterii aparținând celorlalte grupe fiziologice s-a calculat pe baza tabelului statistic publicat de Alexander, luându-se în considerare trei diluții succesive [1]. Pentru indicatorii igienico-bacteriologici s-au utilizat tabelele prevăzute de metoda STAS[10].

Datorită umidității ridicate a nămolurilor activ și fermentat, care poate influența exprimarea încărcăturii bacteriene raportată la greutatea nămolului, s-au determinat procente de umiditate pentru fiecare tip de nămol [6].

Rezultate și discuții. Datele referitoare la prezența și numărul bacteriilor din grupele fiziologice studiate sunt redată în Tabelele 1 și 2. În ambele tipuri de nămol (activ și fermentat), bacteriile heterotrofe au fost prezente la densități numerice crescute. În urma fermentării anaerobe mezofile, numărul bacteriilor heterotrofe s-a redus, gradul de îndepărtare al acestora fiind de 30,5%.

În condiții tehnologice normale, conținutul relativ mare de materie organică a nămolului constituie substratul dezvoltării bacteriilor amonifitoare, prezența acestor bacterii în număr mare indicând o încărcare mare a influentului.

Atât în nămolul activ, cât și în cel fermentat, bacteriile amonifitoare s-au încadrat în domeniul valoric 10^4 bacterii/g nămol. În urma fermentării anaerobe s-a realizat o reducere considerabilă a bacteriilor amonifitoare, aproximativ 76% dintre bacterii fiind îndepărtate din nămol.

Privită prin prisma importanței pe care o are îndepărtarea biologică a azotului în sistemele lipsite de treapta terțiară, prezența bacteriilor nitrificatoare și denitrificatoare în nămolul activ a fost redusă. În condiții normale randamentul nitrificării este direct corelat cu cantitatea de NH_4^+ existentă în nămolul activ, iar denitrificarea se produce doar în condițiile formării zonelor anoxice [14].

Deși apa uzată prezintă în general încărcări mari cu N, corelarea densității bacteriilor nitrificatoare și denitrificatoare cu conținutul de NH_4^+ , NO_2^- și NO_3^- al nămolului activ a indicat un randament redus al proceselor implicate în îndepărtarea azotului din efluent. În cazul influentului s-au înregistrat următoarele valori pentru parametri menționați: 21 mg NH_4^+ /l, 0,7mg NO_2^- /l și 1,1 mg NO_3^- /l. În efluent concentrația NH_4^+ a rămas neschimbată, iar concentrațiile NO_2^- și NO_3^- au scăzut puțin, până la valoarea 0,6 mg/l.

Din punct de vedere biochimic, densitățile scăzute ale nitrificatorilor și denitrificatorilor se pot explica prin vârsta mică a nămolului (2 zile), prin valoarea mare a CBO_5 solubil (consum biochimic de oxigen) de 139 mg O_2 /l precum și prin șocurile suferite de sistemul de tratare în condițiile instalării fenomenului de umflare a nămolului [5, 7].

În condițiile în care procesele de nitrificare și denitrificare nu se realizează corespunzător, eutrofizarea bazinului acvatic în care se deversează apa epurată rămâne o problemă nesoluționată. Cunoscut fiind faptul că tratarea primară și cea secundară a apei uzate nu sunt suficiente pentru a asigura îndepărtarea nutrienților (N și P), o soluție ar fi aplicarea în plus a tratamentelor terțiare (nitrificarea și denitrificarea biologică, îndepărtarea biologică a fosforului) [7].

Comarate cu datele existente în literatura de specialitate densitățile bacteriilor proteolitice, amilolitice și lipolitice în nămolul activ și fermentat au fost mici. Astfel, bacteriile proteolitice s-au încadrat în domeniul 10^3 bacterii/g, atât la nămolul

activ, cât și la cel fermentat. Datele din literatură indică densități de ordinul a 10^8 bacterii proteolitice/g nămol activ și 10^6 bacterii proteolitice/g nămol fermentat. Pentru bacteriile amilolitice apar menționate valori de ordinul 10^7 bacterii/g nămol activ și fermentat, iar pentru bacteriile lipolitice densitățile sunt mai mici în nămolul activ (50-500 bacterii/g) și mai mari în nămolul fermentat (10^6 bacterii/g)[13].

Tabel 1

Densitatea numerică bacteriană heterotrofă totală și pe grupe fiziologice în nămol activ

Tipul nămolului	Bacterii heterotrofe aerobe (UFC/g)	Bacterii amonificatoare (nr./g)	Bacterii nitrificatoare (nr./g)	Bacterii denitrificatoare (nr./g)	Bacterii proteolitice (nr./g)	Bacterii amilolitice (UFC/g)	Bacterii lipolitice (UFC/g)
Nămol activ	$88,5 \times 10^6$	17×10^4	26×10^4	21×10^3	17×10^3	58×10^2	93×10^2

UFC=unități formatoare de colonii

Tabel 2

Numărul bacteriilor din diferite grupe fiziologice în nămolul fermentat anaerob mezofil

Tipul nămolului	Bacterii heterotrofe aerobe (UFC/g)	Bacterii amonificatoare (nr./g)	Bacterii proteolitice (nr./g)	Bacterii amilolitice (UFC/g)	Bacterii lipolitice (UFC/g)
Nămol fermentat	$61,5 \times 10^6$	4×10^4	14×10^3	19×10^2	76×10^2

Tabel 3

Parametrii igienico-bacteriologici din nămolurile activ și fermentat

Tipul nămolului	Bacterii aerobe mezofile (UFC/g)	Bacterii coliforme totale (nr./g)	Bacterii coliforme fecale (nr./g)	Enterococi fecali (nr./g)	Clostridii sulfito-reducătoare (nr./g)
Nămol activ	148×10^6	23×10^7	49×10^6	2000	2200
Nămol fermentat	105×10^6	63×10^5	26×10^5	400	1400

În Tabelul 3 sunt prezentate rezultatele noastre privind parametrii igienico-bacteriologici ai nămolurilor activ și fermentat.

Influentul oricărei stații de epurare conține, de obicei, concentrații mari ale bacteriilor, dar procesul de epurare biologică tinde să îndeparteze microorganismele patogene din apa epurată și să le concentreze în nămol. De aceea, prezența lor în nămolul activ este așteptată la valori ridicate, în corelație cu încărcătura apei uzate.

Pe baza datelor obținute de noi se constată prezența tuturor indicatorilor bacteriologici la densități mari în nămolul activ și mai mici în nămolul tratat prin fermentare.

Compararea distribuției coliformilor totali în nămolul activ, nămolul fermentat, în influentul și efluentul stației Bistrița, a arătat o îmbogățire a nămolului activ în bacterii coliforme pe măsură ce apa era epurată. Astfel, de la o încărcare a influentului

de $5,4 \times 10^7$ coliformi totali/100 ml s-a ajuns la un efluent netratat cu densitatea de $2,8 \times 10^7$ coliformi totali/100 ml, ceea ce a însemnat o reținere importantă a coliformilor de către nămol.

Gradul de îndepărtare a coliformilor totali din nămol prin fermentare anaerobă mezofilă a fost de 97,26%.

Raportate la densitatea mare a coliformilor fecali în nămolul activ, reducerile numerice ale bacteriilor coliforme termotolerante prin fermentarea anaerobă mezofilă au fost considerabile (94,69%), similare valoric cu cele indicate de literatura de specialitate [3, 4, 9]. Comparativ cu coliformii totali, rezistența coliformilor fecali la fermentarea anaerobă mezofilă a fost mai mare.

Pe baza caracterelor manifestate de enterobacterii pe mediile selective și specifice, s-au izolat și identificat în nămolurile activ și fermentat specii aparținând genurilor *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* și *Shigella*. Prezența genului *Salmonella* în nămol nu a fost pusă în evidență.

Îndepărtarea enterococilor fecali și a clostridiilor sulfito-reducătoare din nămol, prin fermentare anaerobă mezofilă, a fost redusă: 80% pentru enterococi și 36,36% pentru clostridii. Aceste date demonstrează eficiența redusă a fermentării mezofile în îndepărtarea microorganismelor patogene din nămol. Mai mult, identificarea speciei *Clostridium perfringens* în nămolul activ și fermentat ridică problema asocierii fermentării anaerobe mezofile cu alte metode mai eficiente, pentru a asigura dezinfectarea nămolului (mai ales în cazul utilizării acestuia ca fertilizant).

Concluzii. 1. Nămolurile activ și fermentat, formate în cadrul stației de epurare Bistrița prezintă o microbiotă variată, fiind evidențiate bacterii din 7 grupe fiziologice (heterotrofe aerobe, amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, proteolitice, amilolitice și lipolitice), prezente la valori mai mici în nămolul supus fermentării mezofile.

2. Nitrificarea și denitrificarea, procese esențiale în cadrul fluxului tehnologic, s-au desfășurat cu randamente reduse, fapt indicat de numărul mic al bacteriilor nitrificatoare și denitrificatoare din nămol, precum și de parametrii fizico-chimici (NH_4^+ , NO_2^- și NO_3^-) determinați.

3. Densitățile reduse ale bacteriilor din cele 7 grupe fiziologice au fost puse pe seama șocurilor induse de debitul variabil al oxigenului în bazinele de aerare, pe vârsta redusă a nămolului, care nu permite formarea unei microbiote consistente și active, precum și a fenomenului de umflare a nămolului.

4. Indicatorii bacteriologici au fost prezenți în număr mare în ambele tipuri de nămol. Au fost identificate bacterii din genurile *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* și *Shigella*. Prezența genului *Salmonella* în nămol nu a fost semnalată. În schimb, a fost evidențiată în nămol prezența bacteriei *Clostridium perfringens*.

5. Gradul de îndepărtare, prin fermentarea anaerobă mezofilă, a fost substanțial în cazul coliformilor totali și fecali și insuficient în cazul enterococilor fecali și a clostridiilor sulfito-reducătoare. Acest fapt indică obligativitatea asocierii fermentării mezofile cu alte metode mai avansate de îndepărtare a microorganismelor patogene din nămol.

BIBLIOGRAFIE

1. Alexander, M., *Most-probable-number method for microbial populations*, în Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E., Clark, F.E.(Eds.), *Methods of Soil Analysis*, p. 1467-1472, Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, 1965.
2. Brobst, B., Cicmanec, J., Shay Font, G., McKinnon, H., *Control of pathogen and vector attraction in sewage sludge*, Cincinnati, 1999.
3. Franczy, D.S, Hart, T.L., Virostek, C. M., *Effects of Receiving-Water Quality and Wastewater Treatment on Injury, Survival and Regrowth of fecal-Indicator Bacteria and Implications for Assesment of Recreational Water Quality*, Columbus, Ohio, 1996.
4. Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G.T., *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*, Pretoria, 1984.
5. Mănescu, S., *Microbiologie sanitară*, Ed. Medicală, București, 1989.
6. Pescod, M.B., *Wastewater treatment and use in agriculture*, Rome, 1992.
7. Rodina, A.G., *Methods in aquatic microbiology*, University Park Press. Baltimore, Butterworths-London, 1980, 128-149.
8. Scott, T.M., McLaughlin, M.R., Harwood, V.J., Chivukula, V., Levine, A., Gennacaro, A., Lukasik, J., Rose, J.B., *Reduction of pathogens, indicator bacteria and alternative indicators by wastewater treatment and reclamation processes*, "Water Sci. Technol.", 3, 2003, 247-252.
9. Tiedje, J.M., *Denitrification*, în Page, A.L.(Ed.), *Methods of soil analysis Part 2: Chemical and microbiological properties*, p. 1011-1026, "Agron.", 9, 1982.
10. Voznyay, N.F., *Chemistry of Water and Microbiology*, Mir Pub. Moscow, 1981, 308-333.
11. Zarnea, G., *Tratat de microbiologie generală*, V, Ed. Academiei, București, 1994.
12. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, *Standard methods for the analysis of water and wastewater*, 18th ed., Washington, D.C., 1992.
13. *** STAS, *Apa-analiza bacteriologică*, 1991.
14. *** STAS, *Sedimente-analiza bacteriologică*, 2002.

IN MEMORIAM

Prof. dr. *BÉLA KIS*
(15 februarie 1924 - 29 noiembrie 2003)

Cerneala tipografică nu a apucat să se usuce pe "Laudatio" scrisă cu ocazia decernării medaliei pentru merite deosebite în entomologie, înmănată cu ocazia simpozionului de Entomofaunistică pentru Europa centrală la 22.09. 2003 în Linz/Austria, profesorului Béla Kis, când vestea trecerii sale în neant a ajuns la noi din Budapesta. A fost înmormântat pe 16 decembrie în cimitirul Fiume din Budapesta.

Tăcut, modest, foarte pasionat și dotat cu o deosebită putere de muncă, Béla Kis s-a născut la 15 februarie 1924 la Aiud. În localitatea natală a urmat scoala generală, apoi liceul „Bethlen“, fiind un eminent elev. Stâncăriile din Cheile Aiudului, pădurile de amestec sau vegetația cu caracter stepic au stimulat pasiunea pentru natură, astfel încât în 1946 Béla Kis se înscrie la Facultatea de Științe Naturale a Universității „Bolyai“ din Cluj. Absolvent al Facultății în 1950, cu un excelent examen de stat, naturalistul B. Kis este încadrat ca asistent la Catedra de Zoologie a Universității. Fidel Universității „Bolyai“ și mai târziu „Babeș-Bolyai“, Béla Kis se pensionează ca șef de lucrări în 1984. Catedra de Zoologie nu se poate dispensa de experiența didactică și cunoștințele sale practice, menținându-l în activitate până în 1995. Recunoscându-i meritele didactice și prestigioasa activitate științifică, Universitatea „Babeș-Bolyai“ îi conferă titlul de profesor universitar onorific.

Pentru studenți, colegi și toți cei care l-au cunoscut și admirat, a fost și va rămâne „Profesor Kis“, iar pentru cei mai apropiați „Béla bácsi“ (unchiul Béla).

Cunoscut ca unul dintre cei mai reprezentativi entomologi din România, prof. B. Kis a început cercetările în 1951, cu studiul ordinului *Orthoptera*. În anii următori, în paralel cu studiul ortopterelor, abordează ordinele *Neuroptera*, *Plecoptera* și *Heteroptera*. Rezultatele cercetărilor referitoare la ortoptere au fost sintetizate într-o remarcabilă lucrare de doctorat "Studiul ortopterelor din România".

Pe lângă cursuri și îndrumătoare pentru lucrări practice de Zoologia nevertebratelor, prof. Kis a îndrumat și numeroși studenți la elaborarea lucrărilor de diplomă, unii dintre ei continuând și azi școala entomologică clujeană.

Activitatea științifică, clădită în liniște și fără valuri, însumează peste 80 lucrări științifice publicate în țară și străinătate. În aceste lucrări au fost descrise 28 specii noi pentru știință (8 ortoptere, 5 neuroptere, 15 plecoptere), precum și multe specii noi pentru țară, contribuind din plin la afirmarea entomologiei românești și la cunoașterea biodiversității entomofaunei naționale.

Lucrări de sinteză (cărți) au fost publicate în prestigioasa serie monografică "Fauna României": *Neuroptera (Planipennina)* în colaborare cu C. Nagler și C. Mândru (1970), lucrare care a obținut premiul "E. Racoviță" al Academiei. În 1974, în aceeași serie, apare volumul dedicat ord. *Plecoptera*, în 1984, excelenta sinteză *Heteroptera* (partea generală și suprafamilia *Pentatomioidea*), iar în 2001 volumul consacrat suprafamiliei *Coreoidea* și *Pyrrhocorioidea*.

IN MEMORIAM

Prof. dr. Béla Kis a participat în ultimii 30 de ani la cele mai importante proiecte de cercetare la care au fost angrenați și zoologi. A studiat și publicat ortopterele, neuropterele și plecopterele de la Porțile de Fier, a lucrat și a studiat mult în Dobrogea, sudul Banatului, Oltenia, dar în special în Transilvania.

Lucrările științifice ale dr. Kis nu sunt simple note, ele concentrează importante date morfologice, biologice, ecologice și zoogeografice, fiind ilustrate cu unele dintre cele mai corecte și mai atractive desene publicate în România. În ultimii ani a studiat și dermapterele din România, publicând și o lucrare de revizuire a acestui grup, foarte puțin cunoscut.

În cei 45 de ani de activitate didactică, prof. Kis a organizat și condus zeci de excursii de studiu cu studenți, numeroase lucrări de licență, lăsându-și astfel o evidentă amprentă asupra școlii entomologice din Cluj.

Ca în cele mai multe cazuri, recunoașterea activității și meritelor prof. dr. Kis s-au lăsat în mod oficial mult așteptate în țară. În ciuda acestui fapt neesențial - având în vedere modestia care-l caracterizează - mulți specialiști și renumiți oameni de știință din străinătate i-au dedicat, în semn de prețuire, numeroase specii noi pentru știință. Din anul 1991 este ales membru de onoare al Societății Maghiare de Entomologie, a fost membru fondator (1990) al Societății Române de Lepidopterologie, în cadrul căreia a desfășurat o foarte bogată și intensă activitate, fiind distins cu medalia "Aristide Caradja". Prin trecerea în neființă a dr. Béla Kis, Facultatea de Biologie, dar în special entomologia românească pierde polii unui magnet care a atras mulți entomologi tineri și vârstnici.

Colegii, prietenii și toți cei care l-au cunoscut îl vor păstra în memorie așa cum a fost, modest, tăcut, dar excelent entomolog, un om cu suflet ales, deschis naturii și celor care l-au solicitat. Odihnească-se în pace, iar sufletul să-i fie înălțat de roiuri de fluturi și alte insecte atât de dragi lui.

LÁSZLÓ RÁKOSY

IN MEMORIAM

Prof. Univ. Dr. *KISS STEFAN*
(15 august 1926 – 2 decembrie 2004)



Profesorul Ștefan KISS, reprezentant de seamă al școlii de Microbiologie din țara noastră, eminent om de știință, autor al unor studii de enzimologie ambientală de referință, s-a stins din viață la vârsta de 78 ani.

S-a născut în orașul Satu Mare la 15 august 1926. Școala primară și cei 8 ani de liceu i-a urmat la *Liceul Reformat* din orașul natal, pe care l-a absolvit în 1946, situându-se pe primul loc din cei 131 de absolvenți. Se înscrie apoi la Facultatea de Chimie, secția Biochimie, de la Universitatea Bolyai Janos din Cluj, pe care o absolvă cu diplomă de merit în 1950. Între 1950 și 1952 lucrează ca biochimist la Fabrica de Medicamente din Cluj.

În 1952 a fost numit asistent la disciplinele de Fiziologie animală și Microbiologie din cadrul facultății de Biologie de la Universitatea Bolyai. În 1959, după unificarea celor două universități din Cluj (Universitatea Victor Babeș și Universitatea Janos Bolyai), ocupă postul de șef de lucrări la facultatea de Biologie-Geografie a Universității Babeș-Bolyai din Cluj. În 1968 a ocupat prin concurs postul de conferențiar la disciplina de Microbiologie, iar în 1990 postul de profesor la aceeași disciplină. În 1991, prin pensionarea sa, a fost numit profesor consultant, activând cu multă energie până în ultimele zile de viață. În anul 1990 a fost numit conducător de doctoranzi la disciplina de Microbiologie, 10 doctoranzi obținând titlul de doctor în *Biologie, specialitatea Microbiologie*, sub îndrumarea sa. Între 1976 și 1984 a fost decanul facultății de Biologie-Geografie, dovedindu-se un foarte bun organizator, contribuind substanțial la prestigiul acestei facultăți atât în țară cât și peste hotare.

Pe plan didactic a fost unul dintre profesorii cei mai iubiți și stimați de studenții biologi, remarcându-se prin pregătirea sa profesională de excepție, prin cultura sa generală de invidiat, prin stăpânirea principalelor limbi de circulație (între care și limba rusă), precum și a limbii latine. A predat mai multe cursuri universitare de-a lungul anilor și anume *Microbiologie generală*, *Microbiologia solului*, *Microbiologie industrială*. A publicat cursul de *Microbiologie generală*, în două volume, precum și cursul de *Microbiologia solului*, în colaborare.

A fost un erudit dascăl care a format peste 40 generații de biologi, în fiecare an îndrumând, cu multă competență și dăruire, în medie 8-10 lucrări de licență. Mulți absolvenți lucrează astăzi ca microbiologi în laboratoare de prestigiu din Europa sau SUA, respectiv Canada.

Ca cercetător, a fost unul din cei mai entuziaști, consacându-și mai mult de jumătate din viața muncii științifice experimentale, de laborator. A condus cu prestanță un colectiv de cercetare în domeniul Microbiologiei aplicate, din 1968 până în 1990, în cadrul Institutului de Cercetări Biologice din Cluj-Napoca. Pe plan științific a abordat domeniul *enzimologiei și microbiologiei solului, a turbei, a sedimentelor acvaticice*, inclusiv *nămolurile terapeutice*. De asemenea, a abordat și probleme de *geomicrobiologie și de biodeteriorare*. În 1964 și-a susținut teza de doctorat intitulată *Studierea enzimelor din sol*, la Universitatea Babeș-Bolyai, sub conducerea Acad. Péterfi Stefan. Ca autor sau coautor a publicat peste 200 lucrări științifice în limbile română, maghiară, germană, rusă sau engleză, mai ales în următoarele țări: România, Germania, Ungaria, Rusia, Statele Unite ale Americii, Anglia și Olanda. Este autorul primei monografii din literatura universală asupra enzimelor din sol, apărută în limba maghiară – *Talajenzimék (Enzimele din sol)*, în 1958, la București (Edit. Agro-Silvică). De asemenea, este unul din coautorii primului tratat de enzimologia solului apărut în Anglia (*Soil Enzymes, Academic Press, London, 1978*). A publicat împreună cu colaboratorii săi lucrări de sinteză în reviste de mare prestigiu, cum este *Advances in Agronomy, Ed. Academic Press, New York*, în 1975, respectiv în 1989. Este autorul principal al celor două tratate publicate în Olanda *Enzymology of Disturbed Soils* la Ed. Elsevier, Amsterdam, 1998, respectiv *Improving Efficiency of Urea Fertilizer by Inhibition of Soil Urease Activity*, 2002, la Ed. Kluwer, Dordrecht.

În 1986, a definit pentru prima oară în literatura de specialitate, conținutul unei noi discipline științifice de sinteză – *Enzimologia mediului înconjurător (Environmental Enzymology)*, care cuprinde 8 domenii: 1. Enzimologia solului, 2. Enzimologia turbei, 3. Enzimologia apelor naturale și a sedimentelor acvaticice, inclusiv nămolurile terapeutice, 5. Enzimologia compostului și a gunoiului de grajd, 6. Enzimologia humusului, 7. Enzimologia argilei, 8. Miscellanea (de ex. Enzimologia depunerilor din peșteri, Elaborare de metode pedoenzimologice pentru detectarea vieții existente sau extinse pe alte planete, de notat pe planeta Marte).

A participat la două mari congrese internaționale (Congresul Internațional de Știința Solului, București, 1964; Congresul Internațional de Microbiologie, Moscova, 1964), la alte congrese fiind invitat, dar neputând participa din cauza condițiilor politice. Colaboratorii săi mai tineri, în schimb, au participat la mai multe manifestări științifice internaționale din Vestul Europei, după 1990, la care figura ca participant și profesorul Kiss, în calitate de colaborator.

A fost autorul principal sau coautor la 3 brevete de invenție, legate de *epurarea apelor uzate de nitroderivați, de înobilarea bacteriană a caolinului*, respectiv de *înhibarea activității ureazei din sol*.

Ca recunoaștere a meritelor sale științifice, a făcut parte din mai multe comisii de specialitate (de ex. Comisia de Biologia Solului, din cadrul Societății Naționale Române pentru Știința Solului). A fost membru al *International Society for Soil Science, Birmendorf, Elveția*. În 1993 a devenit membru extern al Academiei Maghiare de Științe. A fost redactor șef al revistei *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*, timp de 22 ani. De asemenea, a făcut parte din comitetele de redacție pentru volumele *Symposium on Soil Biology* (Cluj, 1966, 1977; București, 1972; Iași, 1971) și *Evolution and Adaptation* (Cluj, 1983, 1985, 1988, 1991).

IN MEMORIAM

Ca recunoaștere a meritelor sale științifice pe plan internațional este de subliniat că, la lucrările sale publicate în țară sau străinătate, singur sau în colaborare, se găsesc referiri în 94 tratate și cărți de specialitate, în 42 volume de congrese și simpozioane și alte colecții de articole, precum și în 193 reviste științifice diferite apărute în 35 de țări de pe aproape toate meridianele globului. Toate acestea vin să susțină că profesorul Kiss Stefan poate fi considerat una din personalitățile de seamă ale Enzimologiei solului, respectiv Enzimologiei mediului înconjurător pe plan mondial, contribuind substanțial la apariția și evoluția acestora în ultimii 50 de ani.

MIHAIL DRĂGAN-BULARDA

RECENZII – BOOK REVIEWS

Methoden zur quantitativen Bestimmung und Charakterisierung der mikrobiellen Biomasse im Boden (*Methods for Quantitative Determination and Characterisation of the Microbial Biomass in Soil*), Zusammengestellt von (Assembled by) R. Martens, Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, FAL, Braunschweig (Institute for Soil Biology, Federal Research Station for Agriculture, Braunschweig), s.a., II + 114 pages, including 11 figures and 3 tables.

This book of methods was written by 11 soil biologists and biochemists, collaborators of the following institutions: Institut für Bodenbiologie, FAL, Braunschweig (T.-H. Anderson, O. Heinemeyer, H. Insam, R. Martens) and Institut für Ökotoxikologie, FAL, Braunschweig (S. Schlecht); Abteilung Bodenkunde, Universität Trier (P. Gehlen, Th. Kowalczyk, E. Schuster); Institut für Bodenökologie, GSF-München, Neuherberg (F. Beese, M. Raubuch); Sachgebiet Bodenmikrobiologie, Bayerische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, München (Th. Beck).

The book consists of six Parts. Their authors and headings are specified below.

Part 1. Th. Beck, F. Beese, R. Martens: *Indications for the Collection, the Preparation for Analysis and the Storage of Soil Samples* (pp. 1-4).

Part 2. T.-H. Anderson, O. Reinemeyer, H. Insam, R. Martens, M. Raubuch, P. Gehlen, E. Schuster, Th. Kowalczyk: *Determination of the Soil Respiration* (pp. 5-23).

Part 3. T.-H. Anderson, O. Heinemeyer, H. Insam, R. Martens, S. Schlecht, P. Gehlen, E. Schuster, Th. Kowalczyk: *Determination of the Microbial Biomass* (pp. 24-39).

Part 4. T.-H. Anderson, H. Insam, R. Martens: *Characterisation of the Microbial Biomass* (pp. 40-57).

Part 5. P. Gehlen, E. Schuster, Th. Kowalczyk, Th. Beck, R. Martens: *Transformation Capacities of Groups of Microorganisms for Determined Substrates* (pp. 58-106). As this Part is the most extensive, the headings of its 12 Chapters are also presented: Nitrification, Ammonification, Arginine ammonification, Protease activity, Urease activity, Saccharase (sucrase, invertase) activity, β -Glucosidase activity, Cellulose decomposition, Dehydrogenase activity, Catalase activity, Alkaline phosphatase activity, Reduction of dimethylsulphoxide (DMSO).

Part 6. Authors of Parts 1-5: *References*, with 45 citations. More than 50% of the papers cited were elaborated, entirely or partly, in Germany and the other papers cited – in the following countries (in alphabetical order): Australia, Austria, Czech Republic, New Zealand, Romania, United Kingdom, United States of America.

This valuable book is addressed to students and experts, interested in understanding and studying the role played by microbial communities and accumulated enzymes in the fertility and productivity of soils and, consequently, in rehabilitation of disturbed, polluted and eroded degraded soils, in sustainability of agri- and silviculture.

STEFAN KISS

Katalin Bartók, **A növénykórtan alapjai** (*Fundamentals of Plant Pathology*), Ábel Kiadó, Kolozsvár – Ábel Publishing House, Cluj-Napoca, 2004, 260 pages, including 96 black-white and 68 colour figures, and 5 tables.

Associate Professor Dr. K. Bartók (Babes-Bolyai University, Faculty of Biology-Geology) has structured her book into Introduction, three Parts (each consisting of many chapters and also many subchapters of different orders), Subject index, References (with 91 citations), Index of the colour figures, and Table of contents.

First of all, I specify the headings of Parts and chapters.

Part 1. General Plant Pathology, with 13 chapters: History of plant pathology; Outstanding phytopathologists; Concept of disease and classification of plant diseases; Causes of disease (pathogenic agents); Symptoms of plant diseases; Pathogenesis; Relations between the host and parasite; Infection chains, epidemics; Prognosis of plant diseases; Methods of the sanitary control; Methods of the defence against plant diseases; Plant – protecting chemicals; Conservation and determination of plant materials attacked by pathogens.

Part 2. Detailed Plant Pathology, with 11 chapters: Physiological disease of plants; Phytopathogenic Viruses; Mycoplasmas (phytoplasmas), Viroids, Rickettias, Bacteria, Actinomycetes and Fungi; Diseases caused by holo- and hemiparasitic flowering plants (Anthophytoses); Damages caused by lichens; Damages caused by wood-destroying fungi.

Part 3. Grouping of Pathogens for Some Host Plants, with 6 chapters: Diseases of Plants cultivated under ploughed field conditions, Vegetables, Fruit trees, Vine, Ornamental plants, Forest trees.

Associate Professor Bartók's book is excellent from both scientific-aesthetical viewpoints. As a textbook, it is addressed to students in biology, ecology, agri-, horti-, and sylviculture. At the same time, due to the richness of this book in up-to-date and comprehensive information, it may serve as a handbook for practisers professionally dealing with plant (biomass) production in different domains of agri-, horti- and sylviculture.

In conclusion, I consider that appearance of Associate Professor Bartók's books has been a significant event in the history of publishing biological text- and handbooks by the pedagogical and research staff of our University.

STEFAN KISS