

ACADEMIA REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

COMITÉ DE RÉDACTION

Rédacteur en chef:

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

Rédacteur en chef adjoint:

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

Membres:

MIHAI BĂCESCU, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; dr. doc. PETRU BĂNĂRESCU; NICOLAE BOTNARIUC, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; dr. ILIE DICULESCU; MIHAEL A. IONESCU, membre correspondant de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; PETRE JITARIU, membre de l'Académie de la République Socialiste de Roumanie; prof. dr. NICOLAE SIMIONESCU; GRIGORE STRUNGARU; dr. RADU MEŞTER — secrétaire de rédaction.

La « Revue roumaine de biologie — Série de biologie animale » paraît deux fois par an. Toute commande de l'étranger (fascieules ou abonnements) sera adressée à ROMPRESFILATELIA. Département d'exportation-importation (Presse). Boîte postale 12—201, télex 10376, prsfi r, Calea Griviței 64—66, 78104 Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. Le prix d'un abonnement est de \$ 35 par an.

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

REVUE ROUMAINE DE BIOLOGIE

Série de biologie animale

Calea Victoriei 125

R—79717 București 22, România

Tél. 50.76.80

EDITURA ACADEMIEI

REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

Calea Victoriei 125

R—79717 București 22, România

Tél. 60 76 80

REVUE
ROUMAINE
DE BIOLOGIE

SÉRIE DE BIOLOGIE ANIMALE

TOME 30, N° 1

janvier—juin 1985

SOMMAIRE

EUGEN V. NICULESCU, Le concept de l'espèce est entré dans une nouvelle voie	3
M. BĂCESCU, GEZA IULIU MÜLLER, <i>Heteromysoidea berberae</i> n. sp. et autres mysidacés dans les eaux littorales du NE de la Somalie	7
ZACHIU MATIC, Note sur les chilopodes du genre <i>Strigamia</i> Gray (<i>Chilopoda: Geophilomorpha</i>) de la réserve scientifique de Retezat	11
N. TOMESCU, GH. STAN, CODRUTĂ ROMAN, I. COROIU, VIORICA CHIŞ, A. ONIŞOR, Mating activity in <i>Plusia gamma</i> L. and <i>Amathes c-nigrum</i> L. (<i>Lepidoptera: Noctuidae</i>)	17
I. GHIZDAVU, F. P. HODOŞAN, I. OPREAN, ALEXANDRA GOCAN, HILKE CIUPE, SANDA MATIC, Attractifs sexuels pour cinq espèces de <i>Noctuidae</i> déterminés par piégeage	25
DOMNICA TĂCU, The consumption of natural food by the common vole (<i>Microtus arvalis</i> Pallas, 1778)	31
M. IONESCU-VARO, Some measurements on teleost fishes oocyte nuclei DNA	37
VIRGIL TOMA, NICOLAE FABIAN, Dynamique des groupements thioliques dans le thymus des rats surrenalectomisés	45
MARIA-SENA CRIVII, V. TOMA, Z. URAY, L'effet de la Leucotrophina sur la réactivité d'inhibition de la migration des macrophages au dérivé de protéine purifiée chez les cobayes immunisés et thymectomisés	51
P. ROTINBERG, AL. SAUCIUC, SMARANDA KELEMEN, ECATERINA DUCA, Therapeutic effectiveness of the new antibiotic preparation A 37.4 on some tumoral systems	57
OLGA CILIEVICI, EMILIA GHIDUŞ, Effects of mitoinhibitory and chromosomal aberration caused by alpha naphthyl and beta naphthoxy acetic acids in mice	63
N. MIRANCEA, DORINA MIRANCEA, Electron microscopic study of some cases of hairy cell leukemia	69
COMPTE RENDUS	75

REV. ROUM. BIOL.—BIOL. ANIM., TOME 30, N° 1, P.1—76, BUGAREST, 1985



BIOL. INV. 93

LE CONCEPT DE L'ESPÈCE EST ENTRÉ DANS
UNE NOUVELLE VOIE

EUGEN V. NICULESCU

The author reveals that his original conception on species presented in a large number of works coming out over the interval 1959—1984 has been confirmed by the three-volume collection of studies published by the French Zoological Society (1976—1980). Almost all the authors included in this collection have done justice to the morphological criterion of species, the species being defined in terms of the morphological criterion as well. The present author's criticism of the detractors of the morphological criterion turned out to be well grounded and his conception has been acknowledged by all zoologists and biologists.

Nous ne parlerons pas ici du concept typologique de l'espèce qui est du domaine du passé.

En effet le concept fixiste de Linné n'est plus d'actualité et ceux qui le considèrent comme le concept des morphologistes commettent une grave erreur ainsi que nous l'avons montré récemment [16].

Avant de parler de la nouvelle voie sur laquelle s'est engagée l'école française de biologie, il est nécessaire de présenter l'ancienne théorie qui a prévalu en biologie pendant quatre décennies. Sous l'influence de Mayr [9, 10], Cain [5] et Zavadski [20] s'est élaborée une conception qui fut adoptée par la majorité des biologistes et zoologues contemporains.

Mais ces idées erronées ont été exposées aussi avant Mayr. Ainsi en 1939 Müller et Kautz [11] ont affirmé, dans leur travail, que la notion d'espèce se base exclusivement sur un fondement biologique. Cette conception fausse a eu des conséquences taxonomiques car les auteurs tiennent *Pieris bryoniae* pour une bonne espèce, tirant cette conclusion taxonomique des seuls caractères biologiques — différents de ceux de *Pieris napi*. En 1959 nous avons critiqué la thèse des deux auteurs et avons déclaré [12] que « la notion d'espèce s'établit avant tout sur un fondement morphologico-physiologique et en second lieu sur une base écologico-biologique ».

E. Mayr a repris dès 1942 l'idée de Müller et Kautz et l'a développée dans tous ses travaux ultérieurs où il postule que la distinction morphologique n'est pas le critère décisif du rang d'espèce. « Le critère principal du rang spécifique d'une population naturelle est représenté par l'isolement reproductif » et « le degré de différenciation morphologique manifesté par une population naturelle n'est qu'un produit accessoire de la divergence génétique résultant de l'isolement reproductif ». Ces lignes montrent que selon Mayr, l'isolement reproductif aboutit à la divergence génétique et celle-ci à la différenciation morphologique. Nous avons à cet égard une tout autre conception, à savoir que les isolements génétique, morphologique et écologique se produisent simultanément et ce triple phénomène a, comme résultat final, l'isolement reproductif. A ce dernier isolement contribuent encore les stimuli chimiques — ce

que nous avons nommé isolement chimique (psychique) [16]. Les espèces ne se croisent pas entre elles puisqu'elles sont isolées génétiquement, morphologiquement, écologiquement et psychiquement, tous ces phénomènes produisant un isolement reproductif.

Nous avons critiqué les idées erronées de Cain [5] dans deux travaux et nous n'y revenons plus [13, 15]. Evoquons seulement son "argument" célèbre, relatif à la déficience du critère morphologique : comme preuve il cite l'énorme différence existant entre une chenille et son papillon ! Mais nous ne comparons pas la chenille avec le papillon de la même espèce, mais bien la chenille de l'espèce *x* avec la chenille de l'espèce *y* et l'imago de l'espèce *x* avec l'imago de l'espèce *y* et alors la valeur du critère morphologique apparaît clairement.

K. M. Zavadski [29] émet plusieurs affirmations avec lesquelles nous ne sommes pas d'accord.

1. Il est prouvé, dit l'auteur, que dans l'ensemble des caractères de l'espèce il n'en est pas un seul qui pourrait être utilisé comme caractère spécifique unique et absolu.

2. Le critère morphologique de l'espèce ne contient pas des possibilités permettant la définition de ce « degré de différence » qui doit être admis comme spécifique.

3. Il n'existe aucune sorte de degré de distinction « standard » vraiment caractéristique de l'espèce. Un même caractère peut servir de critère d'espèce pour un groupe, mais pour d'autres groupes il sera critère de genre, de famille ou même de sous-espèce.

Ces trois affirmations ont été réfutées par nous, comme non fondées [15], [16] et nous n'y revenons plus.

P. Bănărescu [1], adepte intégral de Mayr, affirmait que le seul critère de l'espèce, vraiment scientifique, est l'isolement reproductif. E. Mayr n'a jamais exprimé une opinion aussi catégorique. Voire même, il a fait dernièrement une concession au critère morphologique en admettant aussi la « distinction morphologique » parmi les critères de l'espèce : « L'isolement reproductif, les différences écologiques et la distinction morphologique sont les trois propriétés les plus caractéristiques de l'espèce » [10]. Dans un ouvrage ultérieur [2] P. Bănărescu reconnaît, lui aussi, la valeur du critère morphologique.

N. Botnariuc [4] conçoit que « chaque espèce représente une communauté reproductive, écologique et génétique »; comme on voit la « communauté » morphologique manque.

R. U. Roesler [17] pense, lui aussi, que l'espèce se définit par trois caractères : l'isolement reproductif, l'isolement écologique et l'isolement génétique.

Enfin, N. Ceapoiu [6] professe comme les autres que « le critère morphologique ne peut constituer une base scientifique pour caractériser les espèces ».

Cette conception a dominé la biologie pendant quatre décennies. Quelques voix qui ont exprimé des idées contraires (E. Racovitza, P. Brien, E. V. Niculescu) n'ont pas eu d'écho et la conception de Mayr a été accueillie par presque tout le monde.

A partir de 1959, nous avons critiqué dans plus de 20 travaux toutes ces idées « antimorphologiques » et avons montré que l'espèce doit être définie aussi morphologiquement puisque les caractères morphologiques, correctement étudiés et interprétés, mettent en évidence des différences claires et précises entre les espèces et ces caractères définissent l'espèce mieux que tous les autres — du moins chez les insectes et parmi ceux-ci chez les Lépidoptères, fait que nous avons constaté en étudiant quelques milliers d'espèces.

Nos idées ont été adoptées il y a quelques années à peine par l'école française. En 1976 a paru le premier tome de l'intéressant recueil en trois volumes « Les problèmes de l'espèce dans le règne animal » publié par la Société zoologique de France. Alors s'est produit le revirement qui marque le départ d'une nouvelle pensée dans le concept de l'espèce.

L'énoncé le plus précis et le plus clairement exprimé est de G. Bernardi [3] qui rappelle très bien notre conception : « Tous les zoologistes s'accordent à reconnaître comme 'bonnes espèces', les taxons qui sont à la fois génétiquement isolés, morphologiquement différenciés et sympathiques ». L. Tsacas et Ch. Boquet [19] accordent une haute appréciation au critère morphologique : « Les genitalia mâles ont apporté aux systématiciens des Drosophiles des informations complémentaires d'une extrême importance ». « L'importance des genitalia dans la systématique des Drosophilidae est considérable : leur étude a en effet permis la découverte de nombreuses espèces préalablement confondues en raison de la similitude de leur morphologie externe ».

L'une des phrases écrites par A. Dubois [7] ressemble totalement à la nôtre publiée quelques années auparavant (en 1973) : « Il n'existe pas d'espèces 'morphologiques', d'espèces 'écologiques', d'espèces 'génétiques' etc. ni même d'espèces 'biologiques' : toutes les espèces d'êtres vivants sont 'biologiques' »

Enfin, épingleons encore une citation de l'article de synthèse publié à la fin du III^e volume par J. Génermont et M. Lamotte [8] : « Pour le taxinomiste les 'bonnes espèces' sont celles qui sont non seulement bien isolées par une incompatibilité génétique, mais encore bien différenciées à la fois sur le plan morphologique et sur le plan écologique ».

On ne peut plus soutenir maintenant que le seul critère de l'espèce, vraiment scientifique, est l'isolement reproductif et que le critère morphologique ne peut constituer une base scientifique pour caractériser les espèces. L'œuvre des zoologistes français est une œuvre collective et les détracteurs du critère morphologique doivent l'adopter eux aussi et reconnaître que ces auteurs sont dans le vrai. Notre satisfaction est grande puisque nous marchons depuis longtemps sur cette « nouvelle voie » et certainement quelques-uns de ces zoologistes ont été influencés par nos idées. L'homme de science ne connaît pas une satisfaction plus grande que celle de voir ses idées partagées dans le monde entier et de contribuer de manière constructive au développement et au progrès de sa science.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bănărescu P., 1973, *Principiile și metodele zoologiei sistematice*, Ed. Academiei, București.
2. Bănărescu P., 1978, in *Probleme de biologie evoluționistă*, Ed. Academiei, București, p. 23–27.
3. Bernardi C., 1980, in *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*, T. III, p. 377–425, Ed. Soc. Zool. de France, Mém. no 40, Paris.
4. Botnariuc N., 1979, *Biologie generală*, Ed. didactică și pedagogică, București.
5. Cain, A. Y., 1954, *Animal species and their evolution*, p. 5–243, London.
6. Ceapoiu N., 1980, *Evoluția speciilor*, Ed. Academiei, București.
7. Dubois A., 1977, in *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*, T. III, p. 161–285, Ed. Soc. Zool. de France, Mém. no 39, Paris.
8. Génermont Y. et Lamotte M., 1980, in *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*, T. III, p. 427–452, Ed. Soc. Zool. de France, Mém. no 40, Paris.
9. Mayr R., 1942, *Systematics and the origin of species*, Columbia Univ. Press, New York.
10. Mayr E., 1974, *Populations, espèces et évolution*, Ed. Hermann, Paris, 496.
11. Müller L. u. Kautz H., 1939, *Pteris bryoniae O. und napi L.* Vienna.
12. Niculescu E. V., 1959, St. Cerc. Biol., 11, 2, 117–134.
13. Niculescu E. V., 1974, St. Cerc. Biol., Seria biol. anim., 26, 4, 219–224.
14. Niculescu E. V., 1975, Rev. Roum. Biol., Série biol. anim., 20, 2, 73–79.
15. Niculescu E. V., 1975, St. cerc. biol., Seria biol. anim., 27, 4, 255–259.
16. Niculescu E. V., 1980, Rev. Roum. Biol., Série biol. anim., 25, 1, 9–12.
17. Niculescu E. V., 1982, *Sciences Naturelles*, 32, 3–10, Paris.
18. Racoviță E., 1929, *Evoluția și problemele ei*, Astra, Cluj.
19. Tsacacs L., Bocquet Ch., 1976, *Les problèmes de l'espèce dans le règne animal*, I, 203–238, Ed. Soc. Zool. de France, Paris.
20. Zavadski K. M., 1963, *Teoria speciei*, trad. N. Botnariuc, Ed. Științifică, București.

Reçu le 28 juin 1984

Université de Bucarest
Faculté de biologie
Bucarest, Splaiul Independenței 91–95

HETEROMYSOIDES BERBERAE N.SP. ET AUTRES MYSIDACÉS DANS LES EAUX LITTORALES DU NE DE LA SOMALIE

M. C. BĂCESCU et GEZA IULIU MÜLLER

En lavant des débris de coraux dans de l'eau faiblement formolisée ou bien en prélevant des échantillons de sable coralligène, un des auteurs (G. Müller) a récolté une appréciable quantité de bêtes coralobiontes ; parmi celles-là dominent les Crabes, les Alpheidae, Polychètes, Copépodes, etc. et — parmi les Peracarida — des Amphipoda, Isopoda, Tanaidacea, Cumacea et un nombre réduit de Mysidaceae ; c'est de ces derniers que nous nous occupons dans cette note, en signalant seulement la présence d'un *Nannastacus aff. parvulus*, de *Cumella forficuloides* et de deux autres espèces nouvelles de *Cumella*, appartenant toujours au groupe de *Cumella forficuloides*.

MATÉRIEL

Dans une douzaine de stations exécutées par le Dr. G. Müller dans les récifs coralliens du N de la Somalie, on n'a trouvé que dans deux des Mysidacés et dans quatre, de Cumacés. Les Cumacés étaient en grande quantité dans la St. 11 B (2179 exemplaires et seulement 250 Mysidacés /m²) dans un échantillon des sable grossier prélevé parmi les massifs de *Porites*, *Pocillopora* et *Stylopora*, à 1,5 m de profondeur au niveau le plus bas de la marée.

Dans la St. 9, dont le matériel a été extrait directement par le lavage des coraux (*Stylopora pistillata* et *Goniaster sp.*), on a compté 640 Mysidacés par m². Ces coraux ont été couverts, vivants, d'une toile, en scaphandre autonome, à 1,5 m de profondeur lorsque la marée était à son plus bas niveau, non loin de Berbera.

Voici ces Mysidacés :

Tribe Heteromyxini

Gen *Heteromysoides* Băcescu 1968

Heteromysoides berberae n.sp.

(Fig. 1, A–H)

Diagnose. Des yeux aplatis, ± rectangulaires — avec une minuscule partie visuelle. Telson long avec 3 paires d'épines latérales, 2 apicales et cca 10 laminae ornant son sinus superficiel.

Matériel : St. 9, 1 ♀ P de 3,2 mm et 1 juv. de 2 mm.

Description : Mysidacé de petite taille au tégument blanchâtre, faiblement transparent. Les yeux aplatis, ± rectangulaires, avec une minuscule partie visuelle, occupant l'angle antéro-extérieur du grand pédoncule (Fig. 1 A). Les éléments visuels (cca 25 ommatides) sont sphériques, formant une grappe couleur d'or. L'écailler de l'antenne,

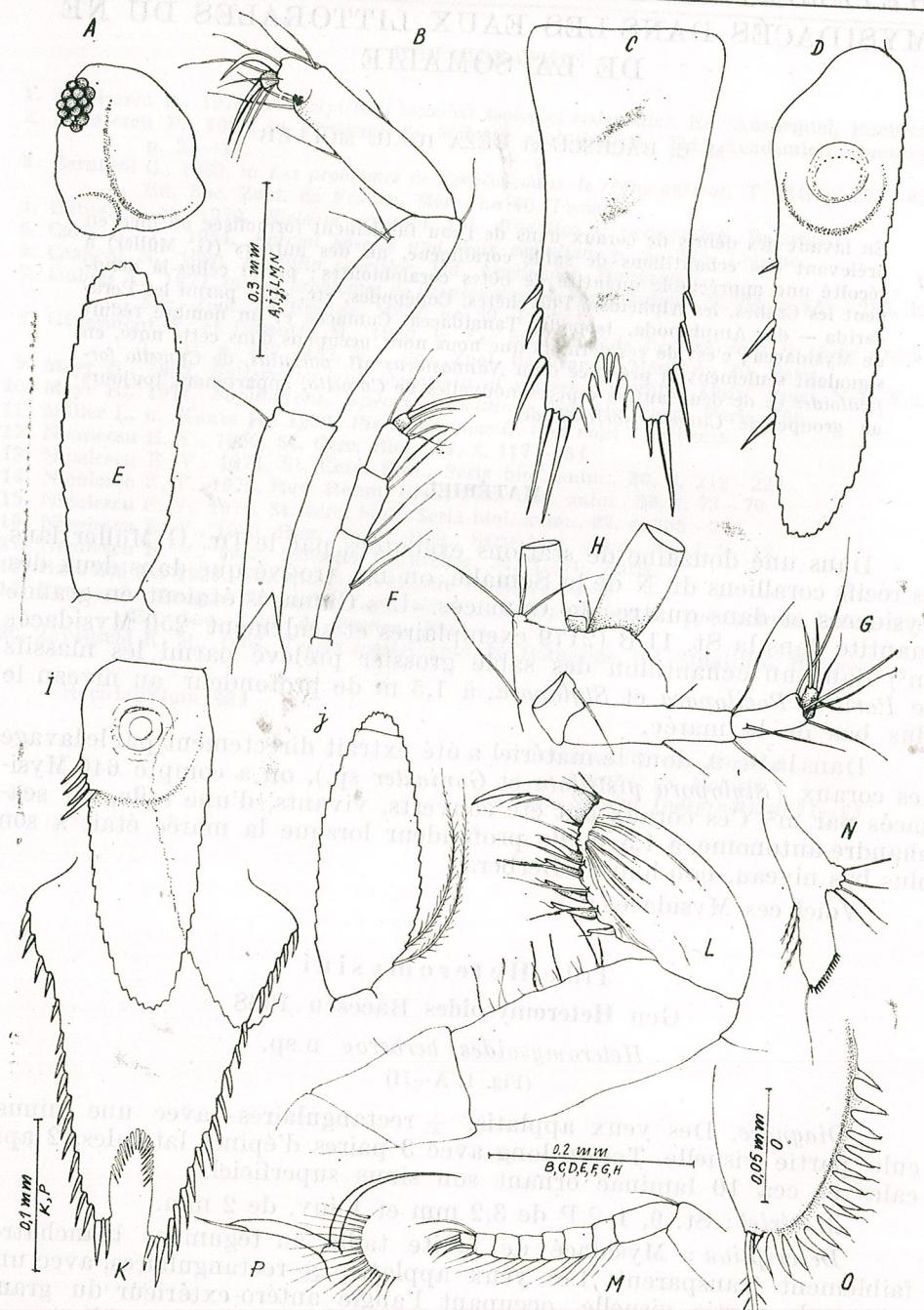


Fig. 1. — A—H, *Heteromysoides berberae* n.sp. ♀ P. A, œil, vue tergale ; B, chélipède ; C, telson ; D, endopodite de l'uropode ; E, écaille A_2 ; F, tarse du périopode 3 ; G, id., du 2^e périopode ; H, apex de l'antennule. I—P, *Heteromysis abrucei* ♂ ad. I, endopodite de l'uropode ; J, écaille de A_2 ; K, telson ; L, chélipède ♀ ; M, périopode IV ; N, pléopode IV ; O, son apex, grossi.

ovale (Fig. 1 E) ; l'antennule avec 3 soies simples à l'angle extérieur de l'article distal (Fig. 1 H) ; le chélipède comme le montre la Fig. 1 B, a une morphologie à part ; le 3^e peraeopode avec 3 articles propo-carpaux (Fig. 1 F) et le 2^e, avec seulement 2 articles au tarsus (Fig. 1 G).

Le telson ± rectangulaire avec 3 paires d'épines sur les bords dans le tiers postérieur et 2 apicales, dont l'intérieure est 3 fois plus courte. Sur la Fig. 2 C, on voit une anomalie : l'épine intérieure est aussi longue que l'extérieure. Le sinus assez superficiel et orné d'une dizaine de lames sur tout son contour. L'exemplaire jeune (Fig. 2 A) n'a que 2 paires d'épines latérales et le sinus plus superficiel encore, avec 8 lames d'une longueur égale à celle de l'épine apicale interne. Trois épines sur le bord de l'endopodite de l'uropode (Fig. 1 D).

Heteromysis (Olivaemysis) abrucei Băcescu 1979

(Fig. 1, I—P)

Matériel : St. 9 : 1 ♀ avec 6 embryons, 1 ♂ ad. et 1 ♂ juv., tous accusant une couleur rose, ayant les yeux rouge-foncé. Cette population du N de la Somalie correspond bien au type australien de l'espèce.

Le pédoncule oculaire finit par une fine apophyse aiguë antérieure ; les bords du telson armés de 17—18 épines insérées sur toute leur longueur ; l'exemplaire de 3 mm n'a que 15 épines, et 17—19 lames au fond de son sinus (Fig. 1 K) et 4 épines sur l'endopodite de l'uropode (Fig. 1 I). Le mâle a 15 lames flagellées sur l'apex du IV^e pléopode (Fig. 1 N, O). Le tarsus à 8 articles (Fig. 1 M), la morphologie du chélipède ♀ et l'écaille de l' A_2 peuvent être vues sur les figures 1 J et 1 L. Le chélipède du ♂ est plus massif.

On n'a pas surpris le biotope de cette espèce, vu qu'on les a capturés par une sonde enfoncée dans le sable parmi les coraux.

Incertae sedes

Heteromysis sp. (Fig. 2 B—C), St 11yB. L'œil a une minuscule partie cornéale rappelant le *Heteromysis bectoni* Modlin 1984 (Fig. 2 C). Le telson avec 4 paires d'épines latérales dans la moitié distale des bords, 2 épines apicales dont l'intérieure plus petite, cca 10 lames occupant 2/3 du sinus (Fig. 2 B) et une seule épine sur l'endopodite de l'uropode fixée sur le statocyste.

Mysini—g.s. p. n.?

(Fig. 2 D—I)

Toujours dans la St. 9 on a trouvé un autre Mysidacé ♂ dans un tel état qu'on ne peut l'identifier. Un seul exemplaire ♂ de 2,5 mm, abîmé, mais assez différent par la morphologie du telson (Fig. 2 D) et du pléopode IV (Fig. 2 G). L'œil sphérique a une très grande partie cornéale, dépassant la taille de son pédoncule (Fig. 2 H). Le premier peraeopode semble avoir 3 articles tarsiens ; les autres peraeopodes font défaut. L'écaille A_2 (Fig. 2 I) très large, finissant par une forte épine ; L'endopodite de l'uropode à une seule épine (?) médiane (Fig. 2 E) et son exopodite

armé d'une forte épine apicale (Fig. 2 F). Le IV^e pléopode ♂ accuse l'aspect de la Fig. 2 G.

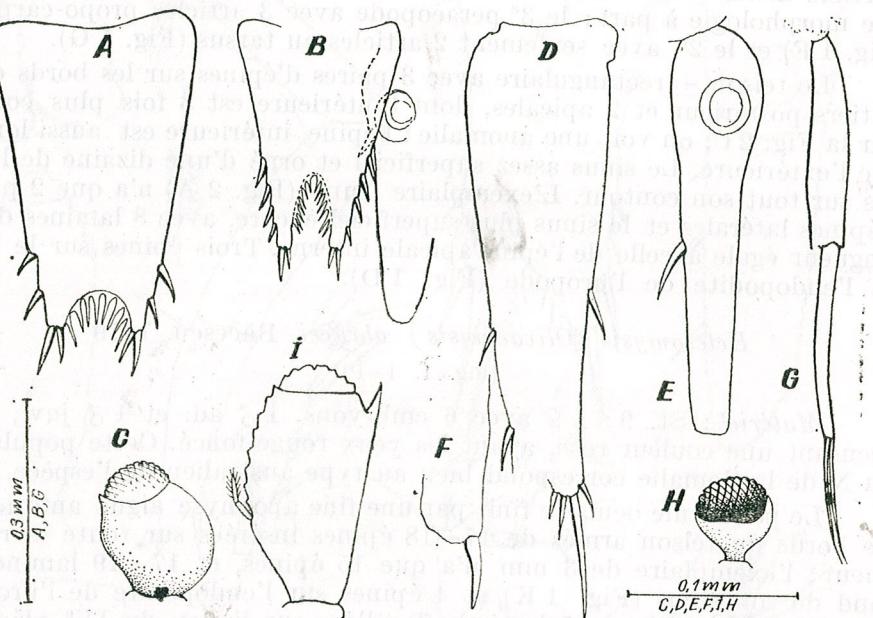


Fig. 2. — A, *Heteromysoides berberae*, juv.=2 mm ; B-C, *Heteromysis* sp. : B, telson et l'endopodite de l'uropode ; C, l'œil ; D-I, Mysidacé gen. sp. n. ♂ ad. = 2,8 mm ; D, telson ; E, endopodite de l'uropode ; F, apex de l'exopodite ; G, pléopode IV ; H, œil ; I, écaille antennaire.

REMARQUES

Tous les péracaridés mentionnés ici sont cités pour la première fois dans les eaux du N de la Somalie et tous ont une origine Indo-Ouest-Pacifique. *Heteromysis abrucei* est connue de l'Australie de l'E. En ce qui concerne la présence de *Heteromysoides berberae* — la 4^e espèce du genre — dans les eaux somalaises, elle ajoute un anneau intermédiaire à l'areal étendue, téthysien, de ce genre : Cuba (*H. spongicola*), Lanzarote (*H. cotti* Calman), Aden (*H. berberae* n.sp.) et O. Australie (*H. longiseta* Băc. 1983).

On peut supposer que les mysidacés et les cumacés cités sont soit spongioles soit coralicoles, soit liés d'une autre manière aux récifs de coraux.

BIBLIOGRAPHIE

1. Băcescu M., 1968, Rev. roum. Biol., Sér. Zool., 13, 4, 221–237.
2. Băcescu M., 1983, Rev. roum. Biol., Biol. anim., 28, 1, 3–11.
3. Modlin R., 1984, J. Crust. Biol., 4, 2, 278–297.

Reçu le 3 décembre 1984

Musée d'histoire naturelle « Grigore Antipa »
Bucarest, Șoseaua Kiseleff 1

NOTE SUR LES CHILOPODES DU GENRE *STRIGAMIA* GRAY (CHILOPODA : GEOPHIOMORPHA) DE LA RÉSERVE SCIENTIFIQUE DE « RETEZAT »

ZACHIU MATIC

Two new species of the Centiped genus *Strigamia* (*S. lutea* n.sp. and *S. paucipora* n.sp.) are described from the natural sanctuary in the Retezat mountains, and other 5 species of this genus are determined from the same samples. This is the European habitat with the highest known number of *Strigamia* species — 7 from 9 species of this genus.

Les chilopodes des Monts de Retezat n'ont été étudiés que sporadiquement, de sorte que seulement deux espèces ont été signalées jusqu'à présent dans la réserve du parc national : *Pachymerium ferrugineum* C.L. Koch et *Strigamia crinita* (Att.).

Les recherches effectuées en collaboration avec le collectif d'écoologie du Centre de Recherches Biologiques de Cluj-Napoca ont mené à l'identification de nouveaux taxons, dont seulement ceux du genre *Strigamia* seront présentés dans ce travail. On a trouvé sept espèces, dont deux nouvelles pour la science (*S. lutea* n.sp. et *S. paucipora* n.sp.) et quatre citées pour la première fois de cette réserve.

1. *Strigamia crassipes* (C. L. Koch) *

Espèce largement répandue en Europe, dont l'aréal est assez difficile à préciser, car elle est souvent confondue avec *S. acuminata* (Leach). Fréquente dans les biocénoses des forêts d'arbres feuillus et surtout de hêtres, dans les zones de collines et de montagnes, mais rare dans les forêts de conifères. Présente dans le sol et ses annexes de mars jusqu'en novembre.

2. *Strigamia acuminata* (Leach)

Espèce dont la répartition est la même que pour la précédente. Elle occupe un large aréal dans notre pays, étant typique pour les biocénoses des forêts d'arbres feuillus de la zone de collines et de montagnes. Elle préfère la litière, mais apparaît aussi dans le sol et les annexes de celui-ci.

3. *Strigamia engadina* (Verh.)

Espèce alpino-carapatique, répandue le long de tout l'arc carpatique. Monticole, elle est fréquente à des altitudes moyennes. Se trouve sous les pierres, dans la litière, les annexes du sol, les lithoclases etc. Apparaît en grand nombre au début de l'automne.

* Les espèces 1–4 ont été collectées par tamisage de la litière de la forêt de hêtres du périmètre de la réserve scientifique.

4. *Strigamia transsylvania (Verh.)?*

Espèce monticole, alpino-carpatische, avec les mêmes valences écologiques que les précédentes.

5. *Strigamia crinita* (Att.)

Espèce monticole, endémique, connue seulement des Monts de Retezat et de Rarău. Se trouve dans la litière mais elle est fréquente également sous les pierres dans les prairies sousalpines.

Elle a été collectée sous pierres aux environs de Tăul Negru.

6. *Strigamia lutea* n.sp.

Matériel : 2 ♂♂; 2 ♀♀ litière de la forêt de hêtres, leg. Z. Matic 1 ♂, collectif d'écologie du C.R.B.—16.VIII.83.

Description : Longueur du corps 25—29 mm.

Segments pédifères: ♂ 35; ♀ 37.

Coloration rougeâtre, avec le ventre pâle.

Corps robuste, atténué en avant et en arrière. Téguments unis, avec ou sans vestiges de sillons longitudinaux.

Tête (fig. 1 A) aussi longue que large. Sillon frontal visible sous forme de ligne claire, la tête ne dissimulant pas complètement le coxosternum forcipulaire.

Antennes non claviformes (fig. 1 A). Lame prébasale pas distincte.

Pièce médiane du labre large (fig. 1 B), à bord rostral garni de fines dentelures très nombreuses. Pièces latérales très grèles.

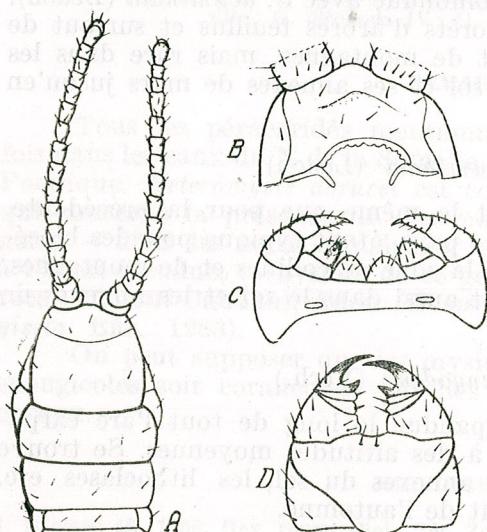


Fig. 1. — *Strigamia lutea* n.sp.
A = Extrémité antérieure du corps ; B = Zone prélabiale et labre ; C = Mâchoires (I, II) ; D = Forcipules — face ventrale.

Coxosternum des premières mâchoires non divisé (fig. 1 C). Coxosternum des deuxièmes mâchoires large (fig. 1 C), à pores métamériques rapprochés.

Coxosternum forcipulaire (fig. 1 D) plus large que long. Pas de lignes chitineuses. Griffes apicales (fig. 2 B) courtes et assez grèles, élargies à la base avec une dent robuste très saillante.

Tergite forcipulaire (fig. 1 A) plus large que la tête et arrondi latéralement.

Sternites déprimés dans leur moitié antérieure, divisés par un sillon longitudinal superficiel. Il y a des champs poreux en série interrompue (fig. 2 C).

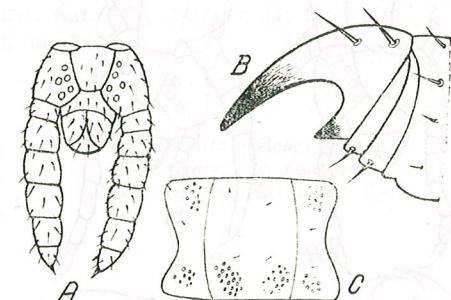


Fig. 2. — *Strigamia lutea* n.sp.

A = Extrémité postérieure du corps — face ventrale (♂) ; B = Griffes forcipulaires ; C = Sternite.

Prétergite du dernier segment pédifère plus large que le métatergite. Les pléurites latéraux manquent.

Présternite divisé en deux sclérites elliptiques. Métasternite allongé pas plus large que le métatergite du segment précédent, à bords faiblement convergents.

Pattes terminales composées de 7 articles (fig. 2 A) ; hanches bombées, avec 5—9 pores isolés dispersés sur la face ventrale (5 pores chez le mâle; 6—9 pores chez la femelle). Télopodite pas plus long que les pattes précédentes, grêle chez la femelle, très épais chez le mâle, armé d'une griffe apicale fonctionnelle chez les deux sexes.

Deux pores anaux (fig. 2 A).

Ecologie : espèce monticole.

Discussion : la nouvelle espèce se distingue de toutes les autres surtout par le nombre réduit de pattes, se rapprochant à ce point de vue de *S. perkeo* Verh. décrite de Tatra, la seule du genre qui ait un nombre plus faible de pattes (33 paires).

7. *Strigamia paucipora* n.sp.

Matériel : 1 ♀, litière de la forêt de hêtres leg. collectif d'écologie du C.R.B., V. 1983.

Déscription : Longueur du corps 22 mm.

Segments pédifères: ♀ 39.

Coloration jaune pâle. Corps robuste, atténué en avant. Téguments unis.

Tête ne dissimulant pas complètement les forcipules.

Antennes courtes, non claviformes.
Lames prébasales pas distinctes.
Pièce médiane du labre large, avec des dentelures fines très nombreuses.

Coxosternum des premières mâchoires non divisé ; celui des deuxièmes mâchoires large, avec des pores métamériques rapprochés.

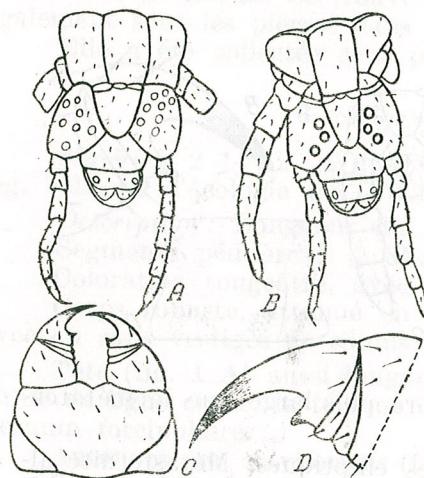


Fig. 3. — A = *Strigamia lutea* n.sp. Extrémité postérieure du corps face ventrale (♀); B,C,D = *Strigamia paucipora* n.sp.; B = Extrémité postérieure du corps — face ventrale (♀); C = Forcipules — face ventrale; D = Griffes forcipulaires.

Coxosternum forcipulaire (fig. 3 C) plus large que long. Pas de lignes chitineuses. Griffe apicale avec une dent robuste à la base (fig. 3 D).

Sternites avec des pores.

Prétergite et présternite avec la même structure que chez les autres espèces du genre.

Pattes terminales composées de 7 articles, armées d'une griffe apicale (fig. 3 B). Hanches avec 3 pores isolés sur la face ventrale (fig. 3 B).

Deux pores anaux (fig. 3 B).

Ecologie : espèce monticole.

Discussion : la nouvelle espèce se distingue de toutes les autres surtout par le nombre le plus faible de pores coxaux, ainsi que par le nombre réduit de pattes.

Conclusions : Avant nos recherches on connaissait dans la faune de Roumanie cinq espèces du genre *Strigamia*, genre représenté en Europe par neuf espèces. Les deux nouvelles espèces décrites ci-dessus mènent à une meilleure connaissance de ce genre si caractéristique pour la faune de montagne, surtout alpino-carpatique.

Dans la réserve scientifique de Retezat on a identifié toutes les cinq espèces connues dans la faune de notre pays, auxquelles s'ajoutent

les deux espèces nouvelles pour la science, ce qui fait que cette réserve soit en Europe la zone la plus riche en espèces appartenant au genre *Strigamia*.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaczmarec J., 1979, Pareczniki polski Univ. im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Ser. Zool., 9.
2. Matic Z., 1972, Fauna R. S România, Chilopoda, Epimorpha, 6, 2, Ed. Academiei, Bucureşti.
3. Prunescu C., Căpuşă I., 1971, Trav. Mus. Hist. Nat. "Gr. Antipa", 11, 111—119.
4. Verhoeff K. W., 1935, Zool. Anz., 111, 1/2, 10—23.

Reçu le 20 novembre 1984

Université « Babeş Bolyai »
Chaire de biologie
Cluj-Napoca, Clinicii 5—7

MATING ACTIVITY IN *PLUSIA GAMMA* L.

AND *AMATHES C-NIGRUM* L.

(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)*

N. TOMESCU¹, GH. STAN², CODRUȚA ROMAN³, I. COROIU²,
VIORICA CHIȘ³ and A. ONIŞOR³

During 24 hours 15% adult males of *P. gamma* mated twice in the presence of several virgin females. In the same period, the *A. c-nigrum* males coupled once. The females of both species mated also once in the presence of several virgin adult males. During their lifetime multiple matings occurred in males and females the maximum number being 5 in *P. gamma* and 6 in *A. c-nigrum*. The average length of mating was 39 minutes in *P. gamma* and 144 minutes in *A. c-nigrum*. The *P. gamma* females "calling" occurred 30 minutes from the beginning of the scotophase, reached a maximum after 3 hours and ceased at the end of the scotophase. The mating occurred 1 hour from the beginning of the scotophase, the highest value being reached 4 1/2 hours later and ceasing at the end of the scotophase. In *A. c-nigrum* females the "calling" occurred 3 1/2 hours after the beginning of the scotophase, 2 1/2 hours later attaining a maximum value and ceasing suddenly at the end of the scotophase. The mating attained a maximum value 6 1/2 hours from the beginning of the scotophase and stopped at its end. Food is an indispensable factor for the sexual maturity of the adults. The adults of both species fed with 10% honey solution and sugar solution mated normally and the females laid fertile eggs. The optimum temperature for "calling" and mating is 15°–25°C in *P. gamma* and 15°–20°C in *A. c-nigrum*.

Laboratory researches concerning the biology of reproduction in the *P. gamma* and *A. c-nigrum* species are relatively few. Vojnitz [11] has studied the influence of food on the maturation of *P. gamma* females and Szöcs and Toth [10] the "calling" and mating behaviour in the same species. In *A. c-nigrum*, Poitout [7] has studied the action of food and consanguinity on the vigour of the populations grown in laboratory conditions. In the same species, Stan et al. [9] have studied the "calling" behaviour of the females.

Most of the investigations have been carried out in field conditions and they refer to the damage degree, the dynamics and the migration of the two species [2-6], as well as to the capturing of the males in traps with synthetic sexual pheromones [8].

This paper presents the results of laboratory researches on mating frequency and duration, the circadian rhythm of coupling and sexual pheromone release ("calling"), the effect of food and temperature on the mating.

MATERIALS AND METHODS

The adult insects used in all experiments derived from larvae grown on artificial medium under laboratory conditions, at $+23^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, relative humidity over 70%, 17 : 7 hours light : dark. The pupae were sexed and

* This work was presented at the XVIIth International Congress of Entomology, Hamburg, August 20–26, 1984.

kept in cages at 23°C until emergence. The adults were kept in 6 l. glass jars at 20°C, under the same photoperiod conditions as the larvae, and years we have grown several generations of the two species under the above mentioned conditions and we have studied the effect of growth in the laboratory on the population vigour, expressed by the number of matings and the females' fecundity and fertility. We found that these biological properties change: in *P. gamma* beginning with the IVth generation grown in the laboratory and in *A. c-nigrum* from the IIIrd generation. The results reported in this paper were obtained in experiments with adults derived only from generations I and II, grown in the laboratory.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Mating frequency and duration. In order to know the coupling capacity of the two species, we studied the mating capacity over a period of 24 and 72 hours and during the whole adults' lifetime. For the 24-hour period, the mating frequency was studied in three variants. In the first one, 30 adult pairs of each species (1 male + 1 female) were put under experimental conditions. After 24 hours the females were dissected and the spermatophores counted, recording in this way the number of matings per pair. In the second variant, the females were placed in numerical excess (1 male + 3 females), also 30 groups for each species, and in the third variant the same number of groups was used, the males being in numerical excess (3 males + 1 female). We worked only with virgin and sexually mature adults.

In the first variant (1 male + 1 female), during a period of 24 hours only one mating was observed in both species (the females who mated had a single spermatophore in the bursa copulatrix). In the variant with females in excess, out of the total couplings (70%), 15% of the males mated with two females but none twice with the same female (Fig. 1, A). These results suggest that the *P. gamma* females lose their attractivity and receptivity for the males of the scotophase where the first coupling took place. In *A. c-nigrum*, during the same period of time, the matings occurred in proportion of about 60% and all the males and females coupled only once (Fig. 1, B).

The mating frequency during a period of 72 hours was studied in a single variant, that with virgin females in numerical excess. Thirty groups, each having one male and 3 females, were formed. In *P. gamma* the total couplings were 80% (Fig. 2), out of which 67% of the males mated only once, 23% twice and 10% thrice, which proves a high coupling capacity in the males of this species. Half of the males coupling twice or thrice, coupled twice with the same female, although there were virgin females in numerical excess. We may conclude that during the second or the third scotophase from the first coupling the females regained their attractivity and receptivity for the males. This conclusion is reinforced also by the results obtained in the group where the pairs (1 male + 1 female) were kept together during their whole life and where

more numerous multiple couplings occurred (Fig. 3). In *A. c-nigrum*, during 72 hours, the males mating proportion was also of 80%, but in this period the maximum number of matings per males was two (about 40%) (Fig. 2).

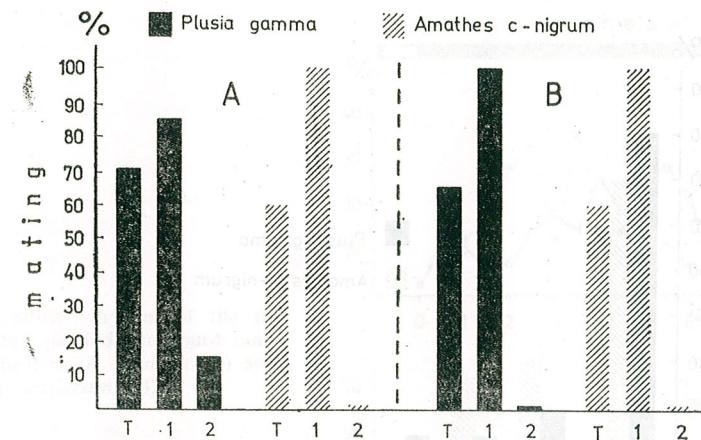


Fig. 1. — Mating frequency in the mature males and females of *P. gamma* and *A. c-nigrum* over 24 h (A = 1 male + 3 females; B = 1 female + 3 males; T = total number of matings; 1 = one mating; 2 = two matings).

In the course of adult life, in *P. gamma*, we recorded a maximum number of 5 matings per pair (1 male + 1 female), frequently one, two

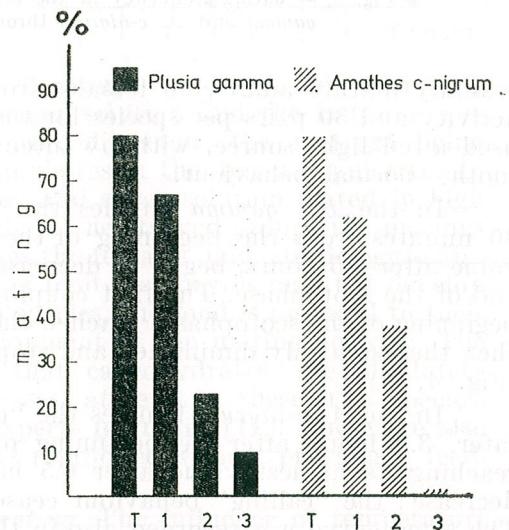


Fig. 2. — Mating frequency in the mature males and females of *P. gamma* and *A. c-nigrum* over 72 h (T = total number of matings; 1, 2, 3 = number of matings/male).

and three matings. In *A. c-nigrum* we recorded a maximum of 6 matings, frequently one and two (Fig. 3).

The length of mating was studied by direct observations on 30 pairs from each species. In *P. gamma* the average duration was of 39

minutes (maximum 60 minutes), minimum 15 minutes) and in *A. c-nigrum* 144 minutes (maximum 290 minutes, minimum 20 minutes).

The circadian rhythm of "calling" and mating. The circadian rhythm of "calling" and mating was studied by direct observations on pairs of

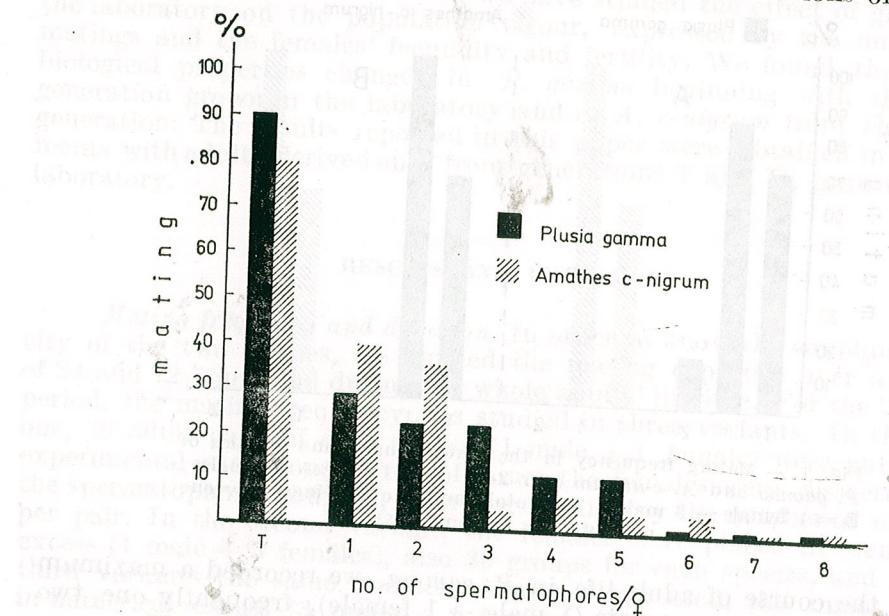


Fig. 3. — Mating frequency in the mature males and females of *P. gamma* and *A. c-nigrum* throughout their lifetime.

sexually mature adults, 20 females from each species for the "calling" activity and 30 pairs per species for the mating one. For the survey we used a red light source, with low intensity, which did not disturb the moths' normal behaviour.

In the *P. gamma* females the "calling" activity occurred after 30 minutes from the beginning of the scotophase, reached its highest value after 3.5 hours, began to decrease after 4 hours and ceased at the end of the scotophase. The first couplings began after an hour from the beginning of the scotophase, reached the maximum value after 5.5 hours, then they suddenly diminished and stopped at the end of the scotophase (Fig. 4, A).

In the *A. c-nigrum* females the "calling" behaviour occurred much later, 3.5 hours after the beginning of the scotophase, and increased reaching its highest value after 6.5 hours; it followed a very sudden decrease; the "calling" behaviour ceased at the end of the scotophase. The same curve was recorded also in the case of matings, with the difference that they began later than the "calling" (Fig. 4, B).

In *P. gamma* the "calling" and mating activity develop during a longer period of time in comparison with *A. c-nigrum*: in the first species during almost the whole duration of the scotophase, while in the second

species during its second half. In both species the "calling" activity precedes the mating one.

The effect of food on mating. We carried out researches on 20 pairs from each species concerning the influence of food on mating. Immedia-

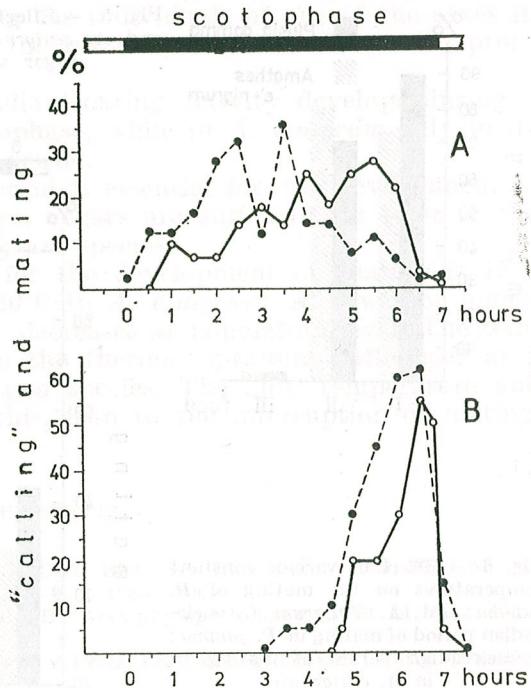


Fig. 4. — Circadian rhythm of the females' "calling" (dotted lines) and mating (solid lines) in *P. gamma* (A) and *A. c-nigrum* (B).

tely after the emergence we formed 3 groups: one was fed with 10% honey solution, another with 10% sugar solution and the last one was starved. After death, the females were dissected, the matings being revealed by the presence of spermatophores in the bursa copulatrix. In both species, the adults fed on honey and sugar solution mated in high proportion and laid fertile eggs, while in the starved groups the matings were extremely few, and in these cases the females laid sterile eggs (Fig. 5). It is possible that in the absence of food the oocytes may not develop completely. In the adults of the two species, the food is essential to their sexual maturation and to the development of the mating activity. The results of our investigations show that carbohydrates are absolutely necessary for these biological processes, at least in these two species, and no other substances, as some experts maintain [11]. There are also lepidoptera species where the adults reproduce without previously feeding themselves [1].

The effect of temperature on mating. The influence of temperature on mating was studied in groups of 30 pairs kept at 6 constant temperatures (Fig. 6). The adults used were sexually mature and were fed with 10% honey solution. The mating was recorded by counting the spermatophores in the females' bursa copulatrix.

The low temperatures, but particularly the high ones, negatively influenced the mating activity in both species. In *P. gamma* the thermic optimum ranged between 15–25°C and in *A. c-nigrum* between 15–20°C. In *P. gamma*, at 30°C an extremely low number of matings occurred,

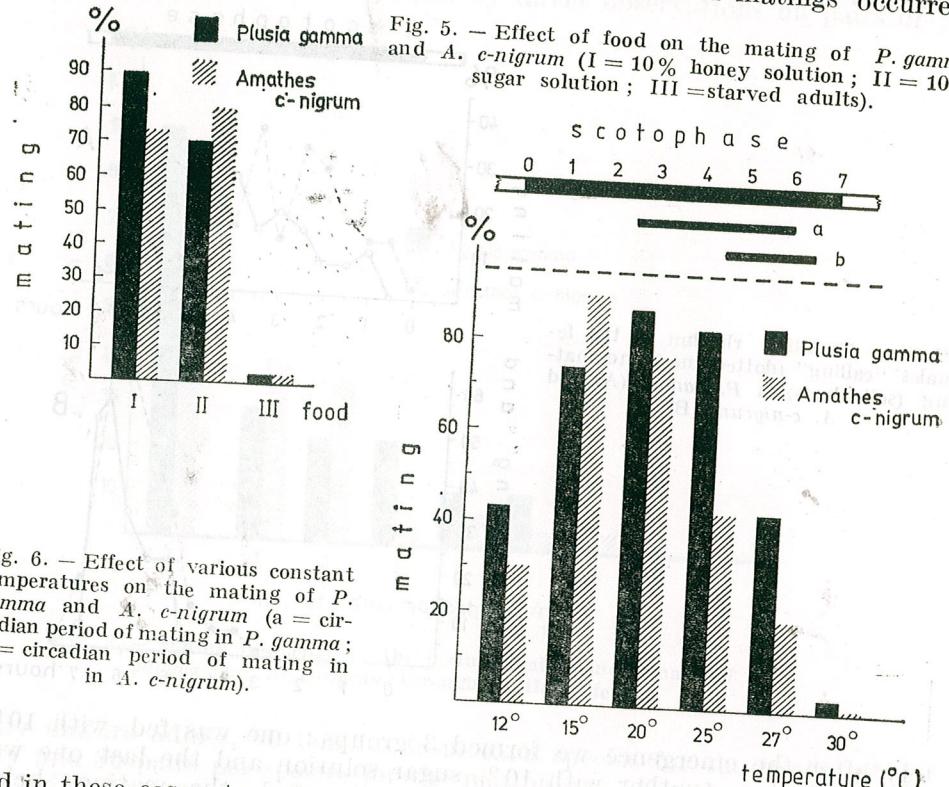


Fig. 6. — Effect of various constant temperatures on the mating of *P. gamma* and *A. c-nigrum* (a = circadian period of mating in *P. gamma*; b = circadian period of mating in *A. c-nigrum*).

and in these cases, too, the females laid sterile eggs. We have correlated the values of the thermic optimum with the characteristic temperatures for the circadian period of the scotophase when the two species develop their reproduction activity.

The *P. gamma* adults develop their reproduction activity during much of the scotophase period, when greater temperature variations take place and consequently the limits of the thermic optimum are also wider. The *A. c-nigrum* adults develop this activity in the second half of the scotophase when in nature the temperature is lower and the oscillations smaller. These conditions are reflected in the thermic optimum of this species, the values of which lie between narrower limits, having a

CONCLUSIONS

In *P. gamma* and *A. c-nigrum* the mating capacity is relatively high, multiple matings in males and females occurring in both species. In the first species frequently one, two and three matings occurred, the

maximum number recorded being five. In the second species one and two matings frequently occurred and in a lower proportion three and four, maximum number recorded being six.

The capacity of the males and females of both species to perform multiple matings suggests that for controlling it one should not resort to methods aimed at diminishing the individuals of one of the sexes in the natural populations, such as the autocid method or the mass capture of males with feromone traps.

In *P. gamma* the circadian mating activity develops during a long period of time in the scotophase, while in *A. c-nigrum* only in its second half, during a shorter period.

The adults' feeding period is essential for the development of mating. As energising substances, sugars are sufficient, at least in the case of *P. gamma* and *A. c-nigrum* species.

The thermic optimum for the development of mating is 15–25°C in *P. gamma* and 15–20°C in *A. c-nigrum*. At lower or higher temperatures the mating activity decreases at population level. The temperatures which are lower than the thermic optimum influence, at a greater extent, mating in the two species. The 30°C temperature and the temperatures higher than this, lead to the interruption of mating.

REFERENCES

1. Coroiu, I., Tomescu, N., Stan, Gh., St. Cerc. Biol., Ser. Biol. Anim., 1984, **36**, 1, 57–62.
2. Howell, J. F., Environ. Entomol., 1979, **8**, 6, 1065–1069.
3. Mészáros, Z., Madaras, K. M., Herczeg, B., Acta phytopath. hung., 1979, **14**, 3–4, 493–501.
4. Novák, I., Sborník vys. školy zemědělské v Praze. Provozně ekonomické fakulty v Českých Budějovicích, 1970, **397**, 339–346.
5. Novák, I., Sbor. UVTI-Ochr. rostl., 1975, **11**, 48, 295–299.
6. Novák, I., Appl. Zool.-Écol. anim., 1976, **8**, 3, 389–391.
7. Poitout, S., Ann. Zool. Écol. anim., 1969, **1**, 3, 245–264.
8. Stan, Gh., Coroiu, I., Tomescu, N., Chiș, V., Roman, M.-C., Oprean, I., Ciupe, H., St. Cerc. Biol., Ser. Biol. Anim., 1983, **35**, 2, 95–101.
9. Stan, Gh., Tomescu, N., Coroiu, I., St. Cerc. Biol., Ser. Biol. Anim., 1984, **36**, 1, 63–69.
10. Szocs, G., Tóth, M., Acta phytopath. hung., 1979, **14**, 3–4, 453–459.
11. Vojnits, A., Acta phytopath. hung., 1969, **4**, 2–3, 163–179.

Received November 21, 1984

¹The "Babeș-Bolyai" University
Faculty of Biology
Cluj-Napoca, Cliniciilor 5–7

²Biological Research Center
Cluj-Napoca, Republicii 48

³Institute of Chemistry
Cluj-Napoca, Fărăinele 30



ATTRACTIFS SEXUELS POUR CINQ ESPÈCES DE NOCTUIDAE DÉTERMINÉS PAR PIÉGEAGE

I. GHIZDAVU¹, F. P. HODOŞAN², I. OPREAN², ALEXANDRA GOCAN²,
HILKE CIUPE² et SANDA MATIC¹

Mixtures of tetradecenyl-acetates (Z9-, E9-, Z11- and E11-14 : Ac) exhibited remarkable attractivity and selectivity for the males of five Noctuid moths. The best attractivity for the males of *Noctua fimbriata* Schr. was displayed by the lures containing Z9- and Z11-14 : Ac in a ratio of 1 : 9, for the males of *Polymixis polymita* L. those containing Z9- and Z11-14 : Ac in a ratio of 1 : 1, and for the males of *Noctua janthina* Den. et Schiff., *Caradrina morphaeus* Hfn. and *Panemera tenebrata* Scop. those containing the same compounds in a ratio of 9 : 1. The other ratios of these compounds and mixtures with their geometric isomers evinced little or no attractivity. The selectivity of the lures for the last three species is discussed.

Au cours des essais déroulés en 1980 et 1981 dans un verger abandonné, essais ayant comme but le piégeage des espèces de Tortricidae, les pièges appâtés avec des mélanges d'acétoxy-1-tétra-décènes ont capturé des papillons appartenant à cinq espèces de Noctuidae : *Noctua fimbriata* Schr., *N. janthina* Den. et Schiff., *Polymixis polymita* L., *Caradrina morphaeus* Hfn. et *Panemera tenebrata* Scop. L'examen des genitalia des papillons capturés a révélé que ceux-ci étaient des mâles, prouvant que les substances testées ont agi comme attractifs sexuels pour les espèces capturées.

Les acétates de 9- ou 11-tétradécene-1-yl (Z9-, E9-, Z11- et E11-14 : Ac) sont connus comme constituants des attractifs sexuels de plusieurs espèces de Noctuidae : *Agrotis exclamans*, *A. ypsilon*, *Ochropleura plecta*, *O. triangularis*, *Rhyacia putris*, *Peridroma saucia*, *Diarsia deparca*, *Eurois occulta*, *Polia grandis*, *Mamestra configurata*, *M. suassa*, *Ceramica picta*, *Panolis flamea*, *Leucania commoides*, *L. phragmidicola*, *Cucullia chamomillae*, *C. intermedia*, *C. umbratica*, *Ammoconia caecimacula*, *Teratoglaea pacifica*, *Oligia strigilis*, *Spodoptera cilium*, *S. eridania*, *S. exempta*, *S. frugiperda*, *S. littoralis*, *S. litura*, *S. triturata*, et *Plusia chalcites* [1-11], mais n'ont pas été signalés comme attractifs sexuels pour les cinq espèces que nous avons capturées.

L'importance des captures et la relative spécificité de quelques appâts nous ont déterminé à suivre et développer les recherches dans le but d'établir plus exactement la composition des attractifs sexuels spécifiques pour les cinq espèces capturées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les essais de piégeage ont été effectués dans le même verger (environ 10 hectares) entouré de jardins, diverses cultures agricoles et terrains incultes, dont le sol a été couvert par un tapis végétal comprenant plus de 50 espèces herbacées et, par conséquent, abritant une riche faune d'insectes.

On a testé l'attractivité et la sélectivité de 34 variantes d'appâts en caoutchouc contenant 1 mg de matière active, représentée par les acétates de Z9-, E9-, Z11- et E11-tétradécène-1-yl, seuls ou des mélanges contenant deux de ces substances en proportion de 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7 et 1 : 9. Les substances ont été soigneusement purifiées (pureté isomérique minimale = 99%).

Les pièges adhésifs ont été placés dans la couronne des arbres à la hauteur de 1,5—1,6 m. Les parties engluées des pièges ont été échan-gées à un intervalle de 14 jours et les captures ont été analysées en labo-ratoire. A l'occasion des observations effectuées trois fois par semaine, on a enlevé de la glu les insectes appartenant à d'autres ordres (*Diptera*, *Hymenoptera*) et autres objets (fragments de bourgeons, de feuilles etc.) qui sont entrés accidentellement dans les pièges. L'expérience a été effec-tuée en quatre répétitions et pour offrir aux pièges des possibilités égales de capture, ceux-ci ont été permutés dans le cadre de chaque répétition à l'occasion des observations. La signification des différences entre les captures moyennes de chaque variante a été déterminée selon l'analyse de la variance.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Il faut mentionner avant tout que l'examen des *genitalia* a établi que tous les papillons capturés ont été des mâles et, par conséquent, il est sûr que les substances testées sont attractifs pour les mâles des espèces de *Noctuidae* capturées.

Les principaux résultats des piégeages de 1982 et 1983 sont synthétisés dans le tableau 1. L'analyse de ces résultats nous permet de constater que :

— Les mâles de *Noctua fimbriata* Schr. n'ont pas été capturés par les appâts contenant une seule substance, mais seulement par les appâts contenant le Z11-14 : Ac en mélange avec de faibles proportions de Z9 ou E9-14 : Ac. La présence du Z9-14 : Ac en proportion de 10% est essentielle, conférant aux appâts le maximum d'attractivité, mais l'accroissement de la proportion de ce composant au-dessus de cette valeur diminue l'attractivité. Les mélanges de Z11-14 : Ac avec de faibles doses de E9-14 : Ac ont capturé un nombre très réduit de papillons, d'où il résulte que cette dernière substance agit comme inhibiteur de l'attractivité. Ainsi donc, pour la capture des mâles de *Noctua fimbriata* Schr. les appâts doivent contenir un mélange de Z9-14 : Ac et Z11-14 : Ac en proportion de 1 : 9. Ces appâts ont démontré une remarquable sélectivité.

— Les mâles de *Noctua janthina* Den. et Schiff. n'ont pas été capturés par les appâts contenant une seule substance. On a enregistré des captures seulement avec des mélanges contenant du Z9-14 : Ac avec de faibles proportions de Z11-14 : Ac ou de E9-14 : Ac. La présence dans le mélange du Z11-14 : Ac en proportion de 10% est essentielle pour la capture, mais l'augmentation de la proportion de ce composant au delà de 10% cause la baisse, puis l'inhibition totale de l'attractivité. Les mélanges contenant du Z9- et du E9-14 : Ac en faibles proportions ont réalisée un nombre insignifiant de captures, ce qui démontre que le E9-14 : Ac

L'attractivité des appâts testés envers les cinq espèces de *Noctuidae* capturées (Cluj-Napoca, 1982–1983)
Tableau 1

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

se manifeste comme inhibiteur. Il s'ensuit que, pour la capture des mâles de *Noctua janthina* Den. et Schiff., les appâts doivent contenir un mélange de Z9-14 : Ac et Z11-14 : Ac en proportion de 9 : 1.

— Les mâles de *Polymixis polymita* L. ont été capturés par les appâts contenant soit le Z9-14 : Ac ou le Z11-14 : Ac seuls, soit des mélanges entre ces substances. Le maximum de captures a été réalisé par les appâts contenant ces composants en proportion de 1 : 1. Les autres proportions ainsi que les mélanges de ces deux substances avec leurs isomères géométriques ont réalisé un nombre très réduit de captures. Il résulte que les appâts pour la capture des mâles de *Polymixis polymita* L. doivent contenir un mélange de Z9-14 : Ac et Z11-14 : Ac en proportion de 1 : 1. Les appâts de ce type ont montré pendant les essais de piégeage une remarquable spécificité.

— Les mâles de *Panemeria tenebrata* Scop. ont été capturés par les appâts contenant le Z9-14 : Ac seul ou en mélange avec le Z11- ou le E11-14 : Ac. Comme dans le cas de *Noctua janthina* et de *Caradrina morpheus*, mais dans une mesure plus accentuée, la présence du Z11-14 : Ac en proportion de 10% dans le mélange accroît l'attractivité des appâts d'environ 40 fois. L'accroissement de la proportion de ce composant au delà de 10% ainsi que la présence dans le mélange du E11 : Ac inhibent fortement l'attractivité. Par suite, pour la capture des mâles de *Panemeria tenebrata* Scop. les appâts doivent contenir du Z9-14 : Ac et du Z11-14 : Ac en proportion de 9 : 1.

— Les mâles de *Caradrina morpheus* Hfn. ont été capturés par les appâts contenant du Z9-14 : Ac, seul ou en mélange avec le E9-, le Z11- et le E11-14 : Ac. La présence dans le mélange du Z11-14 : Ac en proportion de 10% détermine un accroissement du nombre des captures dix fois plus grand que celui de Z9-14 : Ac seul, pendant que sa présence en autres proportions et la présence du E9- et E11-14 : Ac inhibent l'attractivité. Par suite, pour la capture des mâles de *Caradrina morpheus* Hfn. les appâts doivent contenir un mélange de Z9-14 : Ac et Z11-14 : Ac en proportion de 9 : 1. Cette constatation diffère essentiellement des résultats de piégeage obtenus par autres auteurs, qui ont capturé des mâles de *Caradrina morpheus* avec des appâts contenant du E9-12 : Ac [2] ou des mélanges de Z9-12 : Ac avec le E9-12 : Ac, ou avec le Z9-12 : OH [4], mais n'ont pas capturé cette espèce avec des appâts contenant le Z9-, E9-, Z11- et le E11-14 : Ac seuls [2] ou le Z9-14 : Ac seul, ou en mélange avec le Z9-14 : OH, le Z11-16 : Ac ou le Z11-16 : Ald. En observant que la composition optimale de l'attractif synthétique pour *Caradrina morpheus* est identique avec celle pour *Noctua janthina* et pour *Panemeria tenebrata* et en considérant les résultats de Arn et collab. [2] et de Capizzi et collab. [4], il paraît possible que la vraie composition optimale de l'attractif sexuel pour les mâles de *Caradrina morpheus* doit comprendre aussi du Z9-, E9-12 : Ac et du Z9-12 : OH, ces substances ayant peut-être un rôle décisif pour la spécificité de l'attraction envers cette espèce, ainsi que pour *Noctua janthina* et *Panemeria tenebrata*.

Quant à la spécificité des appâts pour la capture des trois espèces qui ont montré un maximum de sensibilité envers les mélanges de Z9- et Z11-14 : Ac en proportion de 9 : 1, il faut remarquer que :

— *Panemeria tenebrata*, selon nos observations et les observations de Capizzi et collab. [4], ainsi que les données de la littérature, est monovoltine, présentant la seule période de vol au printemps (fin d'avril jusqu'à la mi-mai), période qui ne se superpose pas sur les périodes de vol de *Noctua janthina* (espèce monovoltine dont les adultes volent en août) et de *Caradrina morpheus* (espèce bivoltine dont les adultes volent en juin et en juillet-août). Même si on constate un chevauchement (toutefois peu probable) des vols de *Panemeria tenebrata* et de *Caradrina morpheus* au printemps, les différences morphologiques entre les adultes de ces deux espèces évite toute confusion.

— Le chevauchement de l'unique période de vol des adultes de *Noctua janthina* et du deuxième vol des adultes de *Caradrina morpheus* peut causer quelques confusions. Toutefois ces confusions sont peu probables à cause des différences morphologiques (taille, coloration), aisément décelables pour un observateur qualifié.

De futurs essais basés sur nos observations et sur les observations des auteurs cités, concernant l'attractivité et la spécificité des mélanges contenant du Z9- et du Z11-14 : Ac, ainsi que du Z9, E9-12 : Ac et du Z9-12 : OH, peuvent résoudre définitivement le problème de la spécificité des appâts pour *Caradrina morpheus*, *Noctua janthina* et *Panemeria tenebrata*.

Les auteurs remercient vivement le Dr. Doc. Aurelian Popescu Gorj, Chef du Département d'Entomologie du Musée d'Histoire Naturelle de Bucarest, qui a identifié ou a confirmé l'identité des espèces capturées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ando, T., Yoshida, S., Tatsuki, S., Takahashi, N., 1977, Agric. Biol. Chem., **41**, 1485–1492.
2. Arn, H., Schwarz, C., Limacher, H., Mani, E., 1974, Experientia, **30**, 1142–1144.
3. Bestmann, H. J., Vostrowsky, O., 1981, in *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel* (Réd. R. Wegler), 29–164, Springer–Verlag, Berlin–Heidelberg–New York.
4. Capizzi, A., Arsura, E., Spinelli, P., Piccardi, P. (communication personnelle).
5. Dunkelblum, E., Gothilf, S., Kehat, M., 1980, Phytoparasitica, **9**, 77.
6. Inscoe, M. N., Beroza, M., 1976, in *Pest management with insect sex attractants* (Réd. M. Beroza), ACS Symposium Series, No. 23, American Chem. Soc., 145–181.
7. Jacobson, M., Redfern, R. E., Jones, W. A., Aldridge, M. H., 1970, Science, **170**, 542–544.
8. Nesbitt, B., Beevor, P. S., Lester, R., Poppi, R. G., 1973, Nature New Biol., **244**, 208–209.
9. Struble, D. L., Swailes, G. E., Steck, W. F., Underhill, E. W., Chisholm, M. D., 1976, Environ. Entomol., **5**, 988–990.
10. Struble, D. L., Swailes, G. E., Steck, W. F., Underhill, E. W., Chisholm, M. D., 1977, Canad. Entomol., **109**, 1393–1398.
11. Tóth, M., Szöcs, G., Novák, L., Szantay, Cs., 1979, Acta Phytopath. Hung., **14**, 195–199.

Reçu le 28 mai 1984

¹ Institut agronomique «Dr. Petru Groza»
Chaire d'entomologie
Cluj-Napoca, Mănăstur 3
² Institut de chimie
Cluj-Napoca, Fântânele 30

THE CONSUMPTION OF NATURAL FOOD BY THE COMMON VOLE (*MICROTUS ARVALIS* PALLAS, 1778)

DOMNICA TÂCU

Food consumption, digestibility and food assimilation were studied in *Microtus arvalis* (Pallas, 1778). It resulted that the daily consumption of *Medicago sativa* L. and *Trifolium repens* L. is 35 g fresh matter/animal/day and that of *Lolium perenne* L. 22 g/animal/day. The consumption of dry matter from the same plants is 5–6 g/animal/day. Expressed as energy units, the consumption averaged 23 Kcal/animal/day and feces elimination 6–10 Kcal/animal/day when succulent food was provided. With concentrated diets (in subadults), food consumption averaged 8–9 Kcal/animal/day and feces elimination 1–2 Kcal/animal/day. A digestibility of 56–74% of the succulent plants and 74–84% of the concentrated diets was recorded. Assimilation averaged 60% when the animals were fed with succulent food.

The knowledge about the quality and quantity of food consumed by the common vole is correlated with the studies carried out for the determination of the energy flow in this species. These studies also contribute to determining the preferred food of *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) and to finding out how much of the food is assimilated by the organism or dispersed in the ecosystem [1], [2], [3], [7].

The common vole is a frequent pest of plant crops in Europe and for this reason most of the studies are related to its ecology and control. In Romania, the field vole was studied by several authors : [4], [5], [6], [9], [10], [11].

MATERIALS AND METHODS

The specimens of *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) were captured in a lucerne crop of the Amzacea-Constanța State Farm and consisted of two adults and seven subadults. The experiments were conducted at $19 \pm 2^\circ\text{C}$. The diets consisted of *Medicago sativa* L., *Trifolium repens* L. and *Lolium perenne* L. plants supplied as succulent food, and wheat and maize grains as concentrated food.

The animals were kept in the laboratory for 3 days with a view to their accommodation and were fed on the tested diet. The animals together with the diet needed for 24 hours were introduced in special metal cages, adequately sized for this species. Further, the animals were weighed daily, both at the beginning of the experiment and on the following day when samples were collected.

The fresh food introduced in the cages was weighed and estimated so as to allow the animals to feed at discretion. On collecting the samples, the remaining food and the eliminated feces were separated and weighed.

The experiments were run in June and July, the animals being captured in the same year in late spring. Each diet was tested for 6 days.

After sampling, the offered diet as well as the remaining food and the feces were dried in a thermostat oven at 60°C and weighed again for dry matter estimation; the urine was lyophilised. The humidity of the samples for analysis (W_a^a) was estimated as percentages.

The calorimetric burning was carried out in a Berthelot calorimeter, using about one gram of the sampled food, feces and urine, and the gross calorific value (Q_s^a) related to the sample for analysis was estimated. The results are expressed as cal/g. The ash of the sample for analysis obtained in the calorimetric bomb (A^a) was weighed (expressed as percentages). The gross calorific value was determined according to the standard STAS 5269-50. Further, the daily food consumption of the common vole was estimated as Kcal/animal/day.

The percentages of digested and assimilated energy were estimated from the energy intake. The studies were run on adult and subadult animals of both sexes.

RESULTS

Table 1 shows the weight of the animals, the weight of the ingested fresh and dry food, as well as the quantity of eliminated feces and urine. Adult common voles consumed on the average 35 g/animal/day of fresh matter of lucerne and clover, 22 g of ryegrass and subadults on the average 2 g of wheat and maize grains, preferring the core. As to the succulent food, the consumed food amounted to 5–6 g dry matter/animal/day. The quantity of excreted feces ranged between 1–2 g and 0.3–0.5 g dry matter/animal/day when the diet consisted of lucerne, clover and ryegrass, and wheat and maize grains respectively. In the animals fed on succulent food the quantity of excreted urine ranged between 0.18 and 0.63 g dry matter/animal/day.

The gross calorific (Q_s^a) value of the plants used in the diet amounted to 4,255–4,386 cal/g of dry matter. The ash (A^a) of these plants represented 0.98–7.81% (Table 2). The gross calorific value in the feces ranged from 4,235 to 4,972 cal/g and A^a from 10 to 14% after feeding on lucerne, clover and ryegrass, and 5% in the feces of subadult animals fed on wheat and maize (Table 3). In the urine, Q_s^a amounted to 2,057 cal/g dry matter with $A^a = 39\%$ (Table 4).

The daily consumption of succulent food in the common vole (Table 5), expressed as energy units, averaged 23 Kcal/animal/day while feces elimination averaged 6–10 Kcal/animal day. When concentrated diets in subadults were used, food consumption averaged 8–9 Kcal/animal/day and feces eliminations was 1–2 Kcal/animal/day. The daily elimination of urine ranged from 0.31 to 1.30 Kcal/animal/day when the diet consisted of succulent plants.

The percentage of digested energy from the total energy intake (Table 6) ranged between 56–74% in the animals fed on succulent plants and the feces averaged 31%.

Table 1
Food consumption in *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), in grams

Diet	Age	Sex	Body weight (g)	Food consumption g/animal/day		Feces g/animal/day	Urine g/animal/day	
				fresh	dry		fresh	dry
<i>Medicago sativa</i> L.	subadult	♂	18.96 ± 0.91	31.07 ± 3.10	4.82 ± 0.51	3.26 ± 0.94	1.17 ± 0.35	6.08 ± 3.39
	adult	♂	19.31 ± 0.14	29.02 ± 0.85	4.49 ± 0.17	2.43 ± 0.37	1.37 ± 0.20	6.64
<i>Trifolium repens</i> L.	subadult	♂	29.57 ± 0.49	35.69 ± 7.29	5.53 ± 1.13	3.30 ± 1.46	1.46 ± 0.65	9.96 ± 3.46
	adult	♂	33.16 ± 0.78	36.70 ± 6.41	6.69 ± 0.99	2.79 ± 0.39	1.47 ± 0.20	10.37 ± 3.49
<i>Lolium perenne</i> L.	subadult	♂	18.66 ± 1.79	37.55 ± 1.13	5.27 ± 0.17	3.58 ± 1.90	1.44 ± 0.76	7.47 ± 1.17
	adult	♂	19.21	38.17	5.36	4.73	2.05	9.13
<i>Wheat-grains</i>	subadult	♂	25.33 ± 3.24	37.62 ± 5.20	5.28 ± 0.73	3.88 ± 0.17	1.55	10.35 ± 2.93
	adult	♂	31.98	39.97	5.61	2.87	1.24	9.96
<i>Maize-grains</i>	subadult	♀	19.77	22.52	5.97	3.55	2.20	2.49
	adult	♀	17.65 ± 0.10	23.29 ± 1.00	6.17 ± 0.26	3.77 ± 0.39	2.22 ± 0.20	1.24 ± 0.59
	subadult	♂	27.01	20.77	5.50	2.88	1.79	3.32
	adult	♂	26.18 ± 7.23	26.39 ± 1.40	6.99 ± 0.37	4.49 ± 2.16	2.64 ± 1.26	2.91 ± 1.76
	subadult	♀	10.37 ± 0.42	2.24 ± 0.32	2.06 ± 0.28	0.90 ± 0.43	0.54 ± 0.13	—
	adult	♀	10.68 ± 0.36	1.97 ± 0.32	1.77 ± 0.29	0.05 ± 0.19	0.27 ± 0.10	—

Table 2
Gross calorific value (Q_s^a) of some plants used as food for *Microtus arvalis* (Pallas, 1778)

Diet	Wa ^a (%)	A ^a (%)	Q_s^a (cal/g dry matter)
<i>Trifolium repens</i> L.	85.95	6.93±0.31	4,296±37.00
<i>Medicago sativa</i> L.	84.50	7.81±0.23	4,386±40.00
<i>Lolium perenne</i> L.	73.50	3.97±0.66	4,295±33.00
Wheat grains	8.00	1.41±0.08	4,255±19.86
Maize grains	10.31	0.98±0.27	4,337±1.15

Table 3
Gross calorific value (Q_s^a) of the feces in *Microtus arvalis* (Pallas, 1778)

Diet	Age	Sex	Wa ^a (%)	A ^a (%)	Q_s^a (cal/g dry matter)
<i>Medicago sativa</i> L.	subadult	♀	65.40	10.87±3.64	4,826±27.51
		♂	43.60	12.13	4,856
<i>Trifolium repens</i> L.	adult	♀	55.60	13.06±0.11	4,778±24.50
		♂	47.30	13.79±0.25	4,972±58.64
<i>Lolium perenne</i> L.	adult	♀	59.90	10.35±0.22	4,716±19.60
		♂	56.70	11.08	4,744
Wheat grains	subadult	♀	37.90	10.16±0.07	4,374±42.43
		♂	41.10	10.70±0.23	4,235±39.21
Maize grains	subadult	♀	40.02	4.99±0.24	4,251±35.22
		♂	45.27	5.39±0.10	4,376±7.07

Table 4

Gross calorific value (Q_s^a) of urine in *Microtus arvalis* (Pallas, 1778)

Wa ^a (%)	A ^a (%)	Q_s^a (cal/g dry matter)
93.92	38.57±1.08	2,057±19.09

In the diets consisting of wheat and maize grains, digestibility ranged between 74 and 84 %. Assimilated energy represented 51–70 % of the energy intake, with 4–5 % in the urine when the diet consisted of lucerne and clover. In the common voles fed on ryegrass, 1–2 % of the total energy consumption was lost in the urine. No differences could be established between the digestion of food in adults and subadults, as the digestibility and assimilation coefficients presented close values.

Table 5

Food consumption in *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) in kilocalories

Diet	Age	Sex	Body weight (g)	Food consumption Kcal/animal/day	Feces Kcal/animal/day	Urine Kcal/animal/day
<i>Medicago sativa</i> L.	subadult	♀	18.96±0.91	21.60±2.29	5.66±1.65	0.76±0.43
		♂	19.31±0.14	20.16±0.81	6.65±1.06	0.82
	adult	♀	29.57±0.49	24.80±5.04	6.95±3.08	1.24±0.44
		♂	33.16±0.78	25.52±4.45	7.30±1.03	1.30±0.44
<i>Trifolium repens</i> L.	subadult	♀	18.66±1.79	22.66±0.71	6.79±3.61	0.93±0.14
		♂	19.21	23.04	10.19	1.13
	adult	♀	25.33±3.24	22.70±3.13	7.31±0.33	1.30±0.38
		♂	31.98	24.10	6.16	1.25
<i>Lolium perenne</i> L.	subadult	♀	19.77	25.15	9.62	0.31
		♂	17.65±0.10	25.99±1.13	9.40±1.14	0.15±0.07
	adult	♀	27.01	23.17	7.83	0.41
		♂	26.18±7.23	29.47±1.58	11.20±5.36	0.36±0.22
Wheat grains	subadult	♀	10.37±0.42	8.86±1.25	2.31±0.94	
Maize grains	subadult	♀	10.86±0.36	7.61±1.23	1.19±0.45	

Table 6

Digestibility and assimilation of natural food in *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), in percentages

Diet	Age	Sex	Feces	Digested energy	Urine	Assimilated energy
<i>Medicago sativa</i> L.	subadult	♀	26.20	73.80	3.52	70.28
		♂	32.99	67.01	4.07	62.94
<i>Trifolium repens</i> L.	adult	♀	28.02	71.98	5.00	66.98
		♂	28.60	71.40	5.09	66.31
<i>Lolium perenne</i> L.	subadult	♀	29.96	70.04	4.10	65.94
		♂	44.23	55.77	4.90	50.87
Wheat grains	adult	♀	32.20	67.80	5.73	62.07
		♂	25.56	74.44	5.19	69.25
Maize grains	subadult	♀	38.25	61.75	1.23	60.52
		♂	36.17	63.83	0.58	63.25
	adult	♀	33.79	66.21	1.77	64.44
		♂	38.00	62.00	1.22	60.78
Maize grains	subadult	♀	26.07	73.93		
Maize grains	subadult	♂	15.64	84.36		

DISCUSSIONS

The results presented above are comparable to those obtained by several authors [1], [2], [3], on the utilisation of natural food. The assimilation coefficient averaged 60 %. The daily food consumption, expressed both as grams and calories, is high and exceeds the values obtained by the authors mentioned above.

In Romania, considerable damages are caused in lucerne and clover crops by the common vole which is a typically herbivorous rodent. Its digestibility level is rather low. Food consumption is high; thus, an important proportion of it is not used efficiently by the organism, but is wasted in the ecosystem as feces and urine. The nutritional experiments carried out on rodents are of interest since they greatly contribute to the elucidation of the role played by these animals in the ecosystem.

REFERENCES

1. Drozdz A., 1968, Acta theriol. Bialowieza, **13**, 21, 367–389.
2. Drozdz A., Gorecki A., Sawicka-Kapusta K., 1972, Acta theriol. Bialowieza, **17**, 18, 245–257.
3. Grodzinski W., Makomaska M., Tertil R., Weiner J., 1977, Oikos, Copenhagen, **29**, 494–510.
4. Hamar M., Tuță A., 1969, In *Energy flow through small mammal populations*, Warszawa, 81–87.
5. Hamar M., Sutova M., Tuță A., 1972, Bulletin de l'Académie des Sciences Agricoles et Forestières, **1**, 85–96.
6. Hamar M., 1978, In *Probleme de ecologie terestră*, Ed. Academiei, București, 222–231.
7. Ryszkowski L., Goszczynski J., Truszkowski J., 1973, Acta theriol. Bialowieza, **18**, 7, 125–165.
8. Standard de Stat STAS 5269-69, *Determinarea puterii calorifice. Combustibili solizi*.
9. Tăcu D., 1974, Analele ICPP, **10**, 353–357.
10. Tăcu D., 1977, Rev. roum. Biol., Série de Biol. anim., **22**, 2, 165–167.
11. Tăcu D., 1978, In *Probleme de ecologie terestră*, Edit. Academiei, București, 232–234.

Received July 27, 1984

Research Institute for Plant Protection
Bucharest, Bd. Ion Ionescu de la Brad 8

SOME MEASUREMENTS ON TELEOST FISHES
OOCYTE NUCLEI DNA

The quantity of DNA in the oocytes of 23 species of marine and dulcicol fishes on paraffine sections have been cytospectrophotometrically measured. For all species, DNA increases quantitatively simultaneously with the beginning of meiotic prephase and is measurable until the beginning of diplotene stage. Referring to the DNA quantity of complement C, the smallest values have been found in *Solea nasuta*, where DNA amplification is of $2.85 \times$ and the largest in *Esox lucius* which is $134 \times$. There is a big variety of amplified DNA final quantity, taking into account the species.

Gene amplification is a widespread phenomenon for living beings. In fishes it was studied from the biochemical point of view by Vincent [14], who found in *Roccus saxatilis* ovaries ten times more ribosomal cistrons than in erythrocytes. From a cytological point of view, Steopoe [8] found the presence of an extrachromosomal escape, and Vlad [13] studied gene amplification in *Salmo irideus* cytophotometrically, biochemically and with radioisotopes. Varo [4] studying the process of amplification in *Carassius auratus gibelio* with tritiated thymidine established the time of amplification.

MATERIALS AND METHODS

23 species of fishes have been studied in very young phases, where ovaries have the internal cavity [3] in cytoplasmatic growth and incipient trofoplasmatic growth phase.

Gonads were fixed in Zenker liquid and 10 % buffered formol. After dehydration in alcohols of graded concentrations, clarification in toluol and inclusion in paraffin, the slides were cut at 10 μm thickness. After deparaffination, Feulgen reaction was made by hydrolysis at 20°C in 5 N HCl for 35 min, followed by staining with pararosaniline Schiff for 90 min, after a method described by Tomasi [11].

Feulgen dye contents (FDC) of individual nuclei were measured by the two wavelength method of Ellen M. Rasch and Robert Rasch [5], using a C. Zeiss microspectrophotometer. The two wavelengths chosen were such that for an apparently homogeneous nucleus filling and overlapping the boundary of the photometric measuring area (122.65 μm), the extinction at the lower wavelength was half that of the higher wavelength. Two such wavelengths, 498 nm and 560 nm, were accurately determined and used for all subsequent measurements of Feulgen dye contents, which was expressed in arbitrary units as AE₂. Another method used was that of Swift [9] recommended for this type of cytospectrophotometer.

RESULTS

To determine most correctly the quantity of DNA in fish oocytes it is preferred that the Feulgen reaction be made on thick sections of 10–12 μm , where whole nuclei would be contained. This method proves necessary because amplified ribosomal DNA is located on nuclear envelope as free ribosomal gene, amplified in "cascade". Squash type methods, by which the nuclear envelope is eliminated, consequently produce a big loss of amplified rDNA. A great incidence of oocytes in genes amplification is encountered in seedling ovaries of various teleostenes species. In these fishes, ovaries are ovisacks, being formed in various ways [2–3]. For these 23 species studied by us genital crests suffer an invagination of the ventral wall, so that in cross section they appear with two sections which are linked along free edges. This introflexion creates an internal cavity, whose wall includes the peritoneal one, hence part of the peritoneal cavity. Oogonies are located along internal surface and begin to differentiate in oocytes (*Aristihtys*). In other cases (*Cyprinus*), after inflection of the two sections, the ovary is represented by a vascularized conjunctive stroma belt, while oogonies and oocytes, and the rest are formed of a thin wall of peritoneal origin. Then the belt side facing the lumen which contains gonocytes begins to fold and form ovarian infolds. They also contain oogonies and oocytes, and in this phase there begins a small increase of the latter. In such young ovaries, female sexual cells are found in the first three phases of oogenesis. The first phase is represented by oogonies, with only one nucleolus in the nucleus and low cytoplasmatic acidophilia. In the second phase, oocytes increase their volume at the beginning of meiotic prophase (leptotene, zygotene and pachytene). In phase three (diplotene), the more abundant cytoplasm becomes basophil due to the ribonucleoprotein quantitative increase. The nuclei contain a series of nucleoli under the nuclear envelope.

Oogenesis begins in clusters of a few oogonies, which immediately after mitosis enter the meiotic prophase. From its first phase of leptotene in teleosteans gene amplification begins (Fig. 6). In *Cyprinus carpio*, where the 2C value is of 3.49 pg, this can be observed after reducing the quantity of 4C of meiotic chromosomal DNA, an increase of enhanced DNA as follows: in leptotene it increases by 0.53 pg, in zygotene it reaches 5.18 pg, in the pachytene 27 pg and in the long diplotene phase it passes from 29 pg to 51.42 pg.

Considering in each of the 23 species analyzed how many times C quantity is represented in meiotic prophase nuclei in leptotene, zygotene, pachytene and diplotene phase, we obtain the smallest value in *Solea nasuta* 2.85 a.u. and the largest in *Esox lucius* 134.18 a.u. We render below the minimum and maximum limits of amplification in arbitrary units: *Acipenser ruthenus* 9–34, *Alosa caspia nordmanni* 14.26–33.3, *Sprattus sprattus phalericus* 9.11–81, *Esox lucius* 41.6–134.18, *Perca fluviatilis* 29–53, *Cyprinus carpio carpio* 9.12–34.5, *Carassius auratus gibelio* 8.25–22.5, *Abramis brama danubii* 18.6–47, *Rutilus rutilus carpathorossicus* 36–38, *Ctenopharyngodon idella* 25.5–75.6, *Hypophthalmichthys molitrix* 6.6–18.2, *Aristihtys nobilis* 26.3–80, *Lucioperca lucio-*

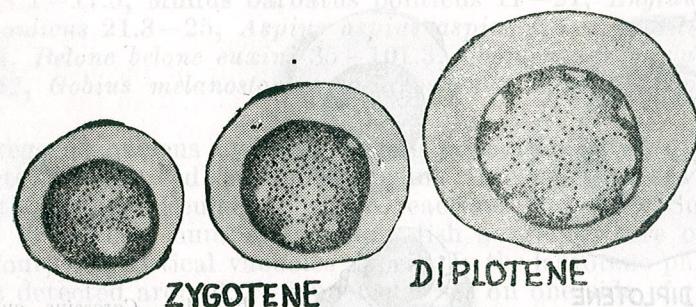


Fig. 1. — *Acipenser ruthenus* (Imm. Ap. 100 — ob. 5).

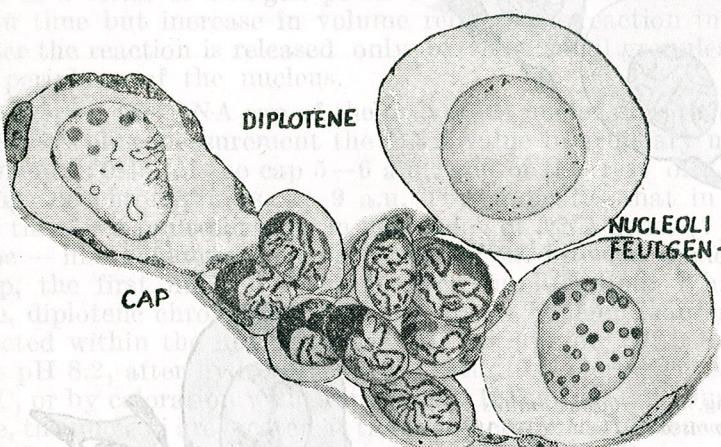


Fig. 2. — *Perca fluviatilis* (Imm. Ap. 100 — ob. 5).

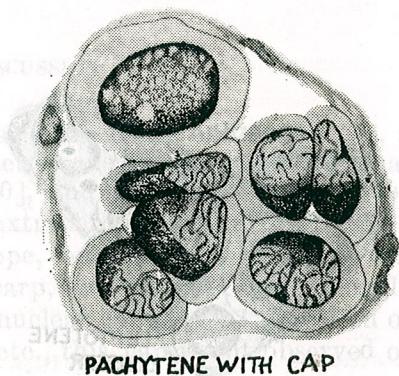
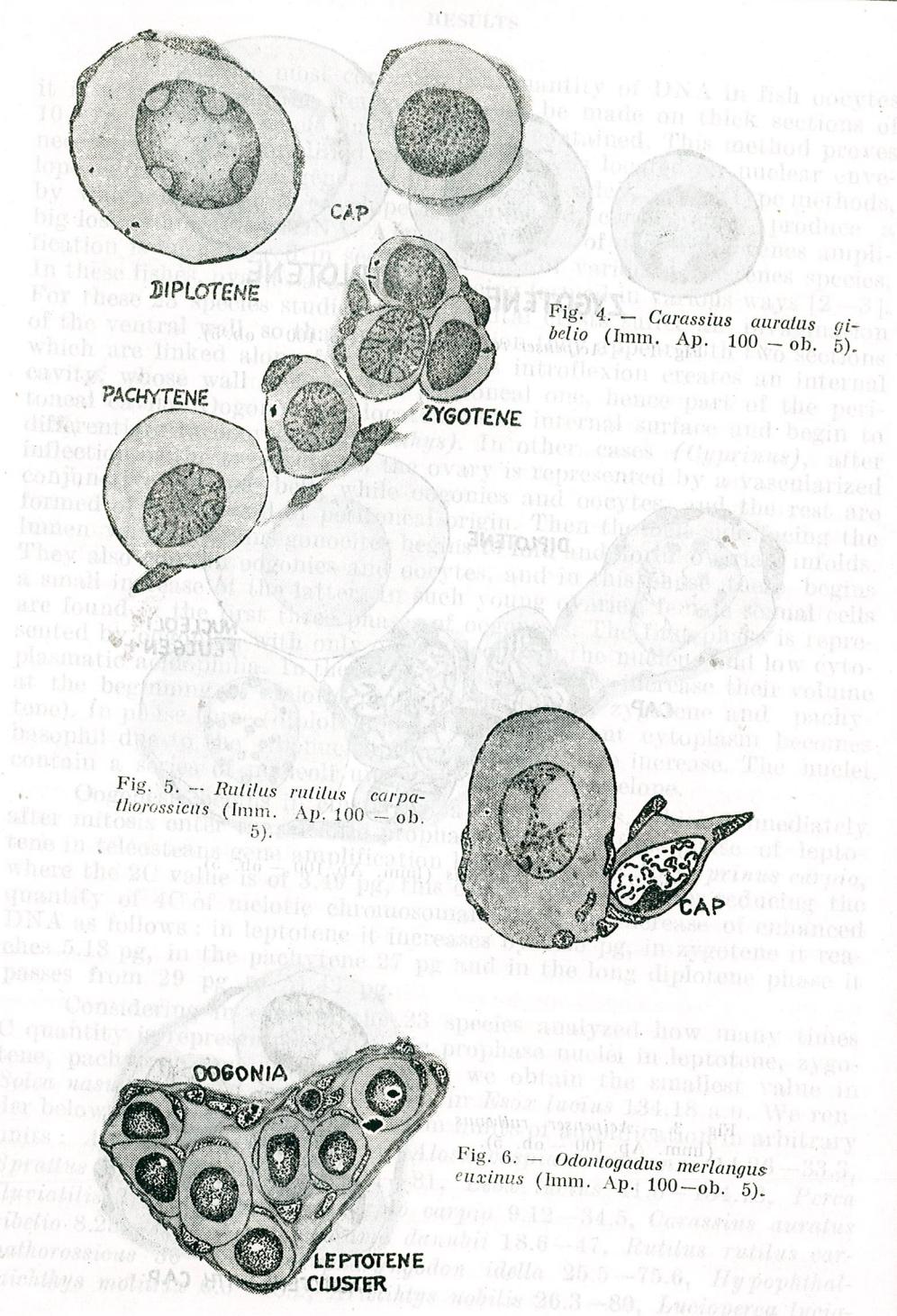


Fig. 3. — *Acipenser ruthenus* (Imm. Ap. 100 — ob. 5).



perca 15.5—37.3, *Lepomis gibbosus* 16.5—49, *Trachurus mediterraneus ponticus* 11.1—17.5, *Mullus barbatus ponticus* 11—21, *Engraulis encrasicolus ponticus* 21.3—25, *Aspius aspius aspius* 6.5—16, *Silurus glanis* 11.6—18.4, *Belone belone euxini* 35—101.3, *Odontogadus merlangus euxinus* 18—42, *Gobius melanostomus melanostomus* 11.4—48, *Solea nasuta* 2.85—12.

As regards nucleus cytology during gene amplification, the following aspects are noticed: oogonies turning into oocytes have compact nuclei with uniform Feulgen positive reaction (Fig. 6,1). Such phases are found in reduced number in young fish ovaries, where oocytes are in phase four, and cortical vacuoles appear. In the leptotene phase, amplification is detected around 2–3 nucleoles set on one side of the nuclear envelope, giving the aspect of a cap (*Hypophthalmichthys*, *Ctenopharyngodon*, etc.) (Figs. 1,2,5). In the pachytene phase of perch oocytes, Feulgen positive cap can be clearly seen, for the rest the nucleus is occupied by pachytene chromosomes. With oocyte increase (Fig. 4), the cap is resolved in a series of Feulgen positive granules, which numerically decrease in time but increase in volume reduces the reaction intensity, so that later the reaction is released only by some small granules dispersed at the periphery of the nucleus.

In sterlet, the DNA cap of the pachytene nucleus has regular edges. Using Swift's plug measurement the DNA value in arbitrary units of the complement is 0.45, of the cap 5–6 a.u., and of the rest of the nucleus including the chromosomes, 2–9 a.u. This indicates that in the whole nucleus there is a multiplication in "cascade" of DNA genes [7] and their envelope — like agglomeration on a wall of the internal nuclear cap. In this cap, the first nucleoli resulted after amplification. While oocytes increase, diplotene chromosomes do not give a Feulgen reaction, but can be detected within the nucleus inner side by staining with bromphenol blue, at pH 8.2, after hydrolysis with a saturated picric acid solution for 4 h/60°C, or by coloration with Amidoblack 10B at pH 2.6. During oocyte increase, the nucleoli are located at the periphery of the nucleus and around them rDNA yields a more or less strong reaction, depending on the nuclear volume. For goldfish in pachytene phase, a small Feulgen positive agglomeration is observed in the middle of the nucleus, then a thin cap during diplotene phase, and afterwards the Feulgen material gathers around the peripheral nucleoli (Fig. 4).

DISCUSSION

Few works on gene amplification in fishes exist [13—14], and only one in which cytospectrophotometric measurements were made [14]. If in amphybian oocytes [7], [10], and in those of some insects [1], [12], amplified DNA appears as extrachromosomal corpuscle, in fishes it gathers on the nuclear envelope, on the inner face. In very young oocytes of roach, sterlet, perch, carp, etc., amplified DNA agglomerates in higher quantity in the form of nuclear cap (Figs. 1, 2, 5). In other species, like mullet, goldfish, garfish, etc., this cap is not observed or is very

reduced, sometimes appearing a centronuclear Feulgen positive corpuscle (Fig. 4).

In insects, a DNA corpuscle was identified in the oogonies and the DNA synthesis continues at the beginning of the meiotic prophase [1], [12], when DNA contents increased by 25% from the total nuclear DNA. In fishes, the oogonies do not present any sign of synthesis, the latter beginning in the leptotene phase and ending in the diplotene one when cortical vacuoles appear, as demonstrated by marked tritiated thymidine studies [4]. Finally, a fine edge around the nucleolus remains at the periphery of the nucleus.

The quantity of amplified rDNA in fishes is much higher in some species compared with other animals. Thus, the quantity of DNA expressed in picograms in meiotic prophase nuclei varise between the following limits:

	2C	prophase DNA	amplified DNA
<i>Acipenser ruthenus</i>	3.2	15—65	8.6—58.6
<i>Alosa caspia nordmanni</i>	1.97	14—33.15	10.43—29.18
<i>Sprattus sprattus phaleratus</i>	4.61	20.95—38	11.70—28.78
<i>Esox lucius</i>	1.05	22—70.45	19.9—68.35
<i>Cyprinus carpio carpio</i>	3.49	16—60.17	9.2—53.19
<i>Carassius auratus gibelio</i>	3.50	14.43—39.36	7.43—32.36
<i>Abramis brama brama</i>	2.78	26.57—66.57	21—61
<i>Rutilus rutilus carpatho-rossicus</i>	1.87	33.72—35.57	30—31.84
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	1.89	24.18—71.44	20.4—67.66
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	1.63	20—57.61	16.74—54.35
<i>Aristichtys nobilis</i>	2.34	30.33—87.6	25.71—83
<i>Lucioperca lucioperca</i>	1.35	10.46—26	5.84—21.38
<i>Lepomis gibbosus</i>	2.35	18.8—56.4	14.10—51.7
<i>Trachurus mediterraneus ponticus</i>	2.7	15—23.58	9.6—18.18
<i>Mullus barbatus ponticus</i>	2.82	15—28.76	9.36—23.12
<i>Engraulis engrassicholus ponticus</i>	1.41	15—17.2	12.18—14.78
<i>Aspius aspius aspius</i>	3.30	10.48—23.65	3.88—17.05
<i>Silurus glanis</i>	2.82	30.64—49	25—43.36
<i>Belone belone euxini</i>	1.17	19.45—56.35	17.22—54.12
<i>Odontogadus merlangus euxinus</i>	1.01	9—23.34	6.97—21.31
<i>Gobius melanostomus melanostomus</i>	2.00	14.30—22.74	10.3—18.74
<i>Solea nasuta</i>	2.00	6—24.5	2—20.5
<i>Percula fluviatilis</i>	2.02	29.12—53.55	25.08—49.51

REFERENCES

- Allen E. R., Cawie M. D., 1968, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., **92**, 477.
- D'Ancona V., Bull. Zool. France, 1956, **81**, 219.
- Goodrich E.S., in *Studies on the structure and development of vertebrates*, Dover Publ., New York, 1958, vol. II, p. 657—719.
- Ionescu Varo M., Rev. roum. biol. anim., 1980, **25**, 121.
- Wied G. L., (ed) *Introduction to quantitative cytochemistry*, Acad. Press, New York, 1972, vol. II.
- Lima de Faria A., Nilsson B., Cawie D., Puga A., Jaworska H., Chromosoma, 1968, **25**, 1.

- Macgregor H. C., Biol. Rev., 1972, **47**, 177.
- Steopoc I., Ionescu Varo M., Vlad M., Acta histochem. (Jena), 1970, **38**, 311.
- Swift H. H., Rasch E. In *Microphotometry with visible light in physical techniques in biological research*, ed. G. Oster, A. W. Pollister, Acad. Press, New York, 1956, vol. III, p. 353—400.
- Thiébaud C. H., Chromosoma (Berlin), 1979, **73**, 29, 37.
- Tomasi J. A., Stain Tech., 1936, **11**, 137.
- Urbani E., Mon. Zool. Ital., 1969, **3**, 55.
- Vlad M., Cell Tissue Res., 1976, **167**, 407.
- Vincent W. S., Halvorson H. O., Chen H. R., Shin D., Exp. Cell Res., 1969, **57**, 240.

Received September 18, 1984

University of Bucharest
Faculty of Biology
Bucharest, Splaiul Independenței 91—95

La chirurgie bilatérale des glandes surrenales chez le rat, la quantité du thymus ou encore présente dans la glande en fonction de stress. Toutefois, cette hypertrophie semble être seulement temporaire, parce que le principe thymique de Bezansonoff-Coniglio se dégrade 50% six mois après l'opération [3]. Si même temps, il faut noter que l'hypertrophie est due à la multiplication des thymocytes actifs, inactifs ou morts, au point de vue immunologique, tandis que la prolifération des lymphocytes actifs de la zone médullaire est faible [1]. Dans ce contexte, il faut espérer à la validité de la conception de l'hypothèse de l'origine des glucocorticoïdes, dont la qualité, bien que immature, semble nécessaire pour l'évolution périodale des réactions immunologiques, particulièrement celle du thymus [1].

À l'issue de cet ouvrage, nous nous sommes proposés de poursuivre les études du thymus à la suite de la surrenalectomie, de manière dynamique, pendant toute la durée de survie des animaux. D'autre part, dans le test pondéré de la glande, nous avons recours à la titration des groupements immuno-chimiques du tissu de thymus, que nous avons trouvés différents en divers cas de stress que l'organisme supporte.

MATERIAL ET MÉTHODES

Toutes les expériences ont été faites sur des rats, males Wistar, pesant 100—120 g. Nous avons pratiqué la surrenalectomie bilatérale en insérant dans les individus du contrôle ont subi une «fausse opération». Après l'opération, les animaux ont bénéficié d'un régime alimentaire hypercalorique.

Le dosage des groupements $-SH$ totaux (T), protéiniques (SH_p) et non protéiniques (SH_n) est effectué par une méthode ampermétrique décrite par Goodwin [6]; la quantité s'exprime en $\mu\text{M/g}$ tissu thymique frais. De plus, nous avons calculé le rapport $-SH_p/-SH_n \text{ p. } 100\%$, aux intervalles de 3—5—7—10 jones post-opératoire; chaque échantillon de thymus provenait du thymus des 10 animaux.

DYNAMIQUE DES GROUPEMENTS THIOLIQUES DANS LE THYMUS DES RATS SURRENALECTOMISÉS

VIRGIL TOMA et NICOLAE FABIAN

Bilateral adrenalectomy in male albino Wistar rats, weighing 100 g, induces a thymic hypertrophy which is reduced in the final phase of animals' survival. The noxious action of adrenalectomy is revealed by a rapid and marked increase on the quantity of non-protein - SH groups of the thymus similarly with that observed in malignant tumor bearing rats. Afterwards, these groups diminish similarly as in the maximal phase of survival, their quantity showing a new peak. The total- and protein-thiolic groups present a reduced increase, which finally is attenuated.

L'extirpation bilatérale des glandes (capsules) surrénales induit l'hypertrophie du thymus ou encore prévient l'involution de la glande en conditions de stress. Pourtant, cette hypertrophie semble être seulement fonctionnelle, parce que le principe thymique de Bezsonoff-Comsa se réduit de 50 %, six jours après l'opération [3]. En même temps, il faut remarquer que l'hypertrophie est due à la multiplication des thymocytes corticaux, inertes du point de vue immunobiologique, tandis que la stimulation des lymphocytes actifs de la zone médullaire est incerte [1]. Dans ce contexte, il faut croire à la valabilité de la conception de « l'effet permissif » des glucocorticoïdes, dont la quantité, bien que minimale, est obligatoire pour l'évolution normale des réactions immunologiques, respectivement celle du thymus [1].

Dans cet ouvrage, nous nous sommes proposés de poursuivre les réactions du thymus à la suite de la surrénalectomie, de manière dynamique, pendant toute la durée de survie des animaux. D'autre part, en plus du test pondéral de la glande, nous avons recouru à la titration des groupements thioliques du tissu de thymus, que nous avons trouvés révélateurs en divers cas de stress que l'organisme supporte.

802	691	81,0 ± 81,4	81,0 ± 88,9	80,0 ± 78,01	81,0 ± 62,31
		74—	74—	10,0 >	10,0 >

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Les expériences ont été faites sur des rats mâles Wistar, pesant 200 ± 10 g. Nous avons pratiqué la surrénalectomie bilatérale en même temps ; les individus de contrôle ont subi une « fausse opération ». Après l'intervention, les animaux ont bénéficié d'un régime alimentaire hypersodique.

Le dosage des groupements -SH libres totaux (lt), protéiniques (p) et non-protéiniques (np) est effectué par une méthode ampéroargentométrique [6] ; la quantité s'exprime en $\mu\text{M/g}$ tissu thymique frais. De plus, nous avons calculé le rapport $-SH\ p/-SH\ np\ %$, aux intervalles de 24 heures, 3—5—7—10 jours post-opérations ; chaque échantillon pour dosage provenait du thymus des 10 animaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen E. R., Cave M. D., 1958, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 52, 477.
- D'Abona V., Bull. Zool. France, 1956, 61, 219.
- Goodrich E. S., in *Studies on the structure and development of vertebrates*, Dover Publ., New York, 1968, vol. II, p. 637—719.
- Ionescu Varo M., Rev. rom. biol. anim., 1980, 25, 121.
- Wied G. L. (ed) *Introduction to quantitative cytochemistry*, Acad. Press, New York, 1972, vol. II.
- Elena de Faria A., Nistor H., Cîrstea D., Păsări A., Ionescu M., Chromosoma, 1982, 25, 1.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans les conditions expérimentales créées, les rats surrénalectomisés avaient survécu 9–10 jours. Les données sur le poids du thymus indiquent un accroissement progressif pendant la première partie de l'intervalle, puis vient s'installer la régression de cette hypertrophie (tableau 1). De fait, H. Selye [7] a remarqué, en conditions similaires, l'involution tardive du thymus, que l'auteur attribuait à l'émigration des thymocytes. Par ailleurs, dans le syndrome d'Addison l'accumulation des lymphocytes dans le sang périphérique fut communiquée par Hernberg [4].

En ce qui concerne les groupements thiols, nous avons constaté une augmentation immédiate du taux de la fraction NP, de 46,30% ($p < 0,01$) — après 24 heures. Après trois jours en état surrénoprive des animaux, le taux des groupements $-SH_{NP}$ atteint la valeur de +117% par rapport aux valeurs du contrôle; la fraction $-SH_{LT}$ repré-

Tableau 1

Dynamique des groupements $-SH$ libres totaux (LT), protéiniques (P), non-protéiniques (NP), et du rapport P/NP, du thymus des rats surrénalectomisés (-SR) par rapport au lot de contrôle (C). Les valeurs sont exprimées en $\mu M/g$ de tissu frais et en mg pour le poids de la glande. Les différences en pour cent entre les lots sont estimées par le calcul statistique au moyen du test de Student.

Variantes	$-SH \mu M/g$ poids frais				Poids de la glande (mg)	
	LT	P	NP	P/NP %	C	-SR
Contrôle	10,67 ± 0,19	9,46 ± 0,15	1,21 ± 0,04	7,81 ± 0,13	196	—
-SR/24 ^h	11,15 ± 0,15	9,38 ± 0,08	1,77 ± 0,05	5,30 ± 0,11	188	186
diff. %	+4,50	-0,86	+46,30	-32,14		
p	—	—	<0,01	<0,01		
-SR/3 j	13,50 ± 0,18	10,87 ± 0,08	2,63 ± 0,13	4,13 ± 0,19	190	296
diff. %	+26,52	+14,90	+117	-47		
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		
-SR/5 j	13,14 ± 0,17	11,12 ± 0,09	2,02 ± 0,02	5,50 ± 0,009	184	345
diff. %	+23	+18	+67	+30		
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		
-SR/7 j	12,24 ± 0,31	10,42 ± 0,25	1,82 ± 0,06	5,72 ± 0,05	190	316
diff. %	+15	+10	+50	+26		
p	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		
-SR/10 j	12,14 ± 0,21	9,87 ± 0,12	2,27 ± 0,10	4,35 ± 0,14	200	300
diff. %	+14	+4	+88	-44		
p	0,01	—	0,01	0,01		

* -SR/24^h = 24 heures après la surrénalectomie;

-SR/3 j (etc.) = 3 jours (etc.) après la surrénalectomie.

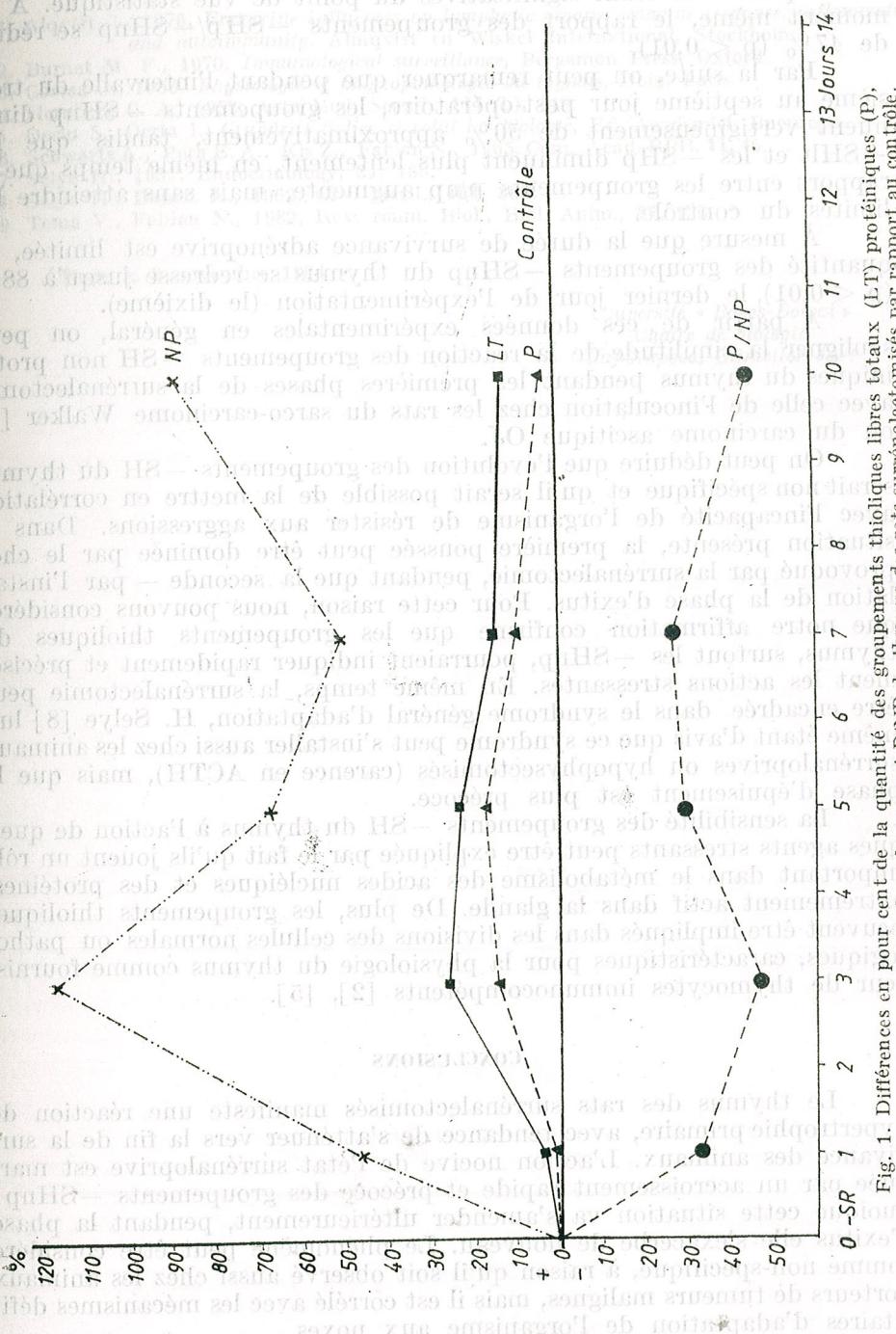


Fig. 1. Différences en pour cent de la quantité des groupements thioliques libres totaux (LT) protéiniques (P), non-protéiniques (NP) et la valeur du rapport P/NP du thymus des rats surrénalectomisés par rapport au contrôle.

sente +27% et celle des -SHp, 15% du contrôle — toutes les différences en pour cent étant significatives du point de vue statistique. À ce moment même, le rapport des groupements -SHp/-SHnp se réduit de 47% ($p < 0,01$).

Par la suite, on peut remarquer que pendant l'intervalle du troisième au septième jour post-opératoire, les groupements -SHnp diminuent vertigineusement de 50% approximativement, tandis que les -SHlt et les -SHp diminuent plus lentement, en même temps que le rapport entre les groupements p/np augmente, mais sans atteindre les limites du contrôle.

À mesure que la durée de survie adrénoprive est limitée, la quantité des groupements -SHnp du thymus se redresse jusqu'à 88% ($p < 0,01$), le dernier jour de l'expérimentation (le dixième).

A partir de ces données expérimentales en général, on peut souligner la similitude de la réaction des groupements -SH non protéiques du thymus pendant les premières phases de la surrenalectomie avec celle de l'inoculation chez les rats du sarco-carcinome Walker [9] ou du carcinome ascite OJ.

On peut déduire que l'évolution des groupements -SH du thymus serait non spécifique et qu'il serait possible de la mettre en corrélation avec l'incapacité de l'organisme de résister aux agressions. Dans la situation présente, la première poussée peut être dominée par le choc provoqué par la surrenalectomie, pendant que la seconde — par l'installation de la phase d'exitus. Pour cette raison, nous pouvons considérer que notre affirmation confirme que les groupements thioliques du thymus, surtout les -SHnp, pourraient indiquer rapidement et précisément les actions stressantes. En même temps, la surrenalectomie peut être encadrée dans le syndrome général d'adaptation, H. Selye [8] lui-même étant d'avis que ce syndrome peut s'installer aussi chez les animaux surrenaloprives ou hypophysectomisés (carence en ACTH), mais que la phase d'épuisement est plus précoce.

La sensibilité des groupements -SH du thymus à l'action de quelques agents stressants peut être expliquée par le fait qu'ils jouent un rôle important dans le métabolisme des acides nucléiques et des protéines, extrêmement actif dans la glande. De plus, les groupements thioliques peuvent être impliqués dans les divisions des cellules normales ou pathologiques, caractéristiques pour la physiologie du thymus comme fournisseur de thymocytes immunocompétents [2], [5].

CONCLUSIONS

Le thymus des rats surrenalectomisés manifeste une réaction de hypertrophie primaire, avec tendance de s'atténuer vers la fin de la survie des animaux. L'action nocive de l'état surrenaloprive est marquée par un accroissement rapide et précoce des groupements -SHnp ; quoique cette situation va s'amender ultérieurement, pendant la phase d'exitus elle s'exacerbe de nouveau. Le phénomène peut être considéré comme non-spécifique, à raison qu'il soit observé aussi chez les animaux porteurs de tumeurs malignes, mais il est corrélé avec les mécanismes déficitaires d'adaptation de l'organisme aux noxes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alqvist J., 1976, *Endocrine influences on lymphatic organs, immune response, inflammation and autoimmunity*. Almqvist en Wiksell International, Stockholm.
2. Burnet M. F., 1970, *Immunological surveillance*, Pergamon Press, Oxford.
3. Comsa J., 1953, *Physiologie et physiopathologie du thymus*, Doin, Paris.
4. Hernberg C. A., 1953, *Acta Med. Scand.*, **144** (b), 149.
5. Oeriu S., Oeriu I., *Grupările tiolice și rolul lor biologic*, Ed. Academiei, București.
6. Schwartz A., Pora E. A., Kis Z., Fabian N., 1965, *Com. Acad. RPR*, **11**, 45.
7. Selye H., 1937, *Endocrinology*, **21**, 169.
8. Selye H., Bajusz E., 1962, *Orv. Hetil.*, **103**, 385.
9. Toma V., Fabian N., 1982, *Rev. roum. Biol.*, **27**, 125.

Reçu le 3 novembre 1984

Université « Babes-Bolyai »
Chaire de biologie
Cluj-Napoca, Cliniciilor 5-7

These results demonstrate the ability of Leucotrophins *in vitro* to reduce the capacity of mouse lymphocytes to produce MIF in brominated and thymectomized animals.

INTRODUCTION

Notre intérêt pour cette étude a été stimulé par les travaux de Toma et collab. [3] et Rowley et collab. [7]. Ces auteurs ont trouvé que l'injection du thymus des cobayes 10 jours après l'immunisation au PPD favorise la protéine purifiée et adjuvant Freund complet, conduit à un rapide décès de la réponse des lymphocytes périphériques, mesurée par l'intégration des macrophages. Ils ont spécifié que l'absence de réponse peut être due à la diminution de la thymosine circulante après la thymectomie. Ulteriorment, les données de Thruman et collab. [8] ont montré que la fraction α_1 de la thymosine est très active en ce qui concerne la restauration de la réactivité spécifique MMF au PPD chez les cobayes thymectomisés.

En employant le même modèle expérimental, qui constitue un excellent procédé d'établir les conséquences de la thymectomie en immunobiologie, nous avons testé l'influence de la Leucotrophine, extrait polyprotéique du thymus (Lab. Pharmascient, ELLP) sur la réactivité spécifique et non-spécifique MMF au PPD.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les expériences ont été effectuées sur des cobayes mâles, âgés de deux mois, immunisés avec 10 µg PPD en 0,1 ml Adjuvant Freund Complet,

15 jours après, les animaux ont été testés au PPD (2 U/ml) par intraderm réaction (IDR). Par la suite, les animaux ont été répartis en deux groupes :

— 1er groupement : non immunisés au PPD (témoin) ($n = 5$)

— 2nd groupement : immunisés au PPD (répondeur) ($n = 5$)

seule +27% et celle des -SH₁ du contrôle — toutes les différences en pour cent étaient significatives au point de vue statistique. A ce rapport de 47.9% ($p < 0.01$) devait être ajouté le rapport de 100% ($p = 0.001$).

Par la suite, dans l'ensemble des groupements thymiques, il y a un système au septième jour pour les -SH₁ et pour les -SH₂ (rapport de 100% et de 110.0% ($p < 0.01$)). Le rapport entre les groupements -SH₁ et -SH₂ est de 90.0% ($p < 0.01$). Les limites du deuxième jour sont aussi très élevées, 100% ($p < 0.01$).

A mesure que la durée de survie adrenaloprotective est limitée, la quantité des groupements -SH₁ du thymus chez les animaux 88% ($p < 0.01$), le dernier jour de l'expérimentation (le dixième).

En résumé, d'après les données expérimentales en général, on peut souligner que, dans la réaction des groupements -SH non protéiniques du thymus pendant les premières phases de la surrenalactomie avec celle de l'inoculation chez les rats un sarco-carcinome Walker [9] ou du carcinome ascite [10].

On peut déduire que l'évolution des groupements -SH du thymus serait non spécifique et qu'il serait possible de la mettre en corrélation avec l'incapacité de l'organisme de résister aux agressions. Dans la situation présente, la première poussée peut être dominée par le choc provoqué par la surrenalactomie, pendant que la seconde — par l'instillation de l'aspirine d'exces. Pour cette raison, nous pouvons considérer que notre estimation confirme que les groupements thioliques du thymus, surtout les -SH₁, peuvent indiquer rapidement et précisément les actions stressantes. En même temps, la surrenalactomie peut être entrée dans le syndrome général d'adaptation, H. Selye [8] lui-même étant d'avis que ce syndrome peut s'installer aussi chez les animaux surrenaloprotectifs ou hypophysectomisés (surence en ACTH), mais que la phase d'épuisement est plus précoce.

La sensibilité des groupements -SH du thymus à l'action de quelques agents stressants peut être expliquée par le fait qu'ils jouent un rôle important dans le métabolisme des acides nucléiques et des protéines, extrêmement actif dans la glande. De plus, les groupements thioliques peuvent être impliqués dans les divisions des cellules normales ou pathologiques, caractéristiques pour la physiologie du thymus comme fournisseur de thymocytes immuno-competents [11, 12].

CONCLUSIONS

Le thymus des rats surrenalactomisés manifeste une réaction de hypertrophie primaire, avec tendance de s'atténuer vers la fin de la survie des animaux. L'action nocive de l'état surrenalactomique est marquée par un accroissement rapide et précoce des groupements -SH₁; quoique cette situation va s'améliorer ultérieurement, pendant la phase d'exces elle s'exacerbe de nouveau. Le phénomène peut être considéré comme non-spécifique, à raison qu'il soit observé aussi chez les animaux porteurs de tumeurs malignes, mais il est corrélé avec les mécanismes défensaires d'adaptation de l'organisme aux noxes.

L'EFFET DE LA LEUCOTROPHINA SUR LA RÉACTIVITÉ D'INHIBITION DE LA MIGRATION DES MACROPHAGES AU DÉRIVÉ DE PROTÉINE PURIFIÉE CHEZ LES COBAYES IMMUNISÉS ET THYMECTOMISÉS

MARIÁ-SENA CRIVII¹, V. TOMA², et Z. URAY¹

The influence of Leucotrophina *in vitro* on the secretion of macrophage migration inhibition factor (MMIF) in purified protein derivative (PPD) immunized and thymectomized guinea-pigs was studied using the migration inhibition test. In the immunized control animals, MMIF activity expressed as migration index (MI) was 67.85% ($p < 0.01$).

Two days after thymectomy of immunized animals, MMIF secretion was absent (MI = 102.08%, $p > 0.05$). In the presence of Leucotrophina *in vitro*, these animals had MI of 71.09% ($p < 0.01$).

These results demonstrate the ability of Leucotrophina *in vitro* to restore the capacity of blood lymphocytes to produce MMIF in immunized and thymectomized animals.

INTRODUCTION

Notre intérêt pour cette étude a été stimulé par les travaux de Field et collab. [3] et Rowely et collab. [7]. Ces auteurs ont trouvé que l'ablation du thymus des cobayes 10 jours après l'immunisation au PPD (dérivé de protéine purifiée) et adjuvant Freund complet, conduit à un rapide déclin de la réponse des lymphocytes périphériques, mesurée par la migration des macrophages. Ils ont spéculé que l'absence de réponse a été due à la diminution de la thymosine circulante après la thymectomie. Ultérieurement, les données de Thruman et collab. [8] ont montré que la fraction α_1 de la thymosine est très active en ce qui concerne la restauration de la réactivité spécifique MMI au PPD chez les cobayes thymectomisés.

En employant le même modèle expérimental, qui constitue un excellent procédé d'établir les conséquences de la thymectomie en immunobiologie, nous avons testé l'influence de la Leucotrophina, extrait polypeptidique du thymus (Lab. Pharmacobiol. ELLEM) sur la réactivité spécifique et non-spécifique MMI au PPD.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les expériences ont été effectuées sur des cobayes mâles, âgés de 3 mois, immunisés avec 10 µg PPD en 0,1 ml Adjuvant Freund Complet.

Dix jours après, les animaux ont été testés au PPD (2 UI/ml) par intradermoréaction (IDR). Par la suite, les animaux ont été répartis en deux groupes :

(a) immunisés au PPD (témoins)(n = 5)

(b) immunisés au PPD et thymectomisés ($n = 5$).

La thymectomie a été effectuée dans des conditions stériles. Deux jours après, les animaux ont été exsanguinés par ponction cardiaque, pour obtenir les lymphocytes circulants. On a vérifié si la thymectomie a été complètement effectuée sur tous les animaux.

La suspension des lymphocytes sanguins périphériques (PBL) a été obtenue par la méthode de Boyum [1], sur gradient Ficoll-Paque ; densité 1,077 g/ml (Pharmacia, Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden). La viabilité des lymphocytes a été vérifiée par la méthode d'exclusion avec trypan-bleu. Elle a été toujours au-dessus de 95 %. Les lymphocytes ont été ajustés au 5×10^6 cell/ml.

Les macrophages péritonéaux de cobaye ont été obtenus par stimulation i.p. avec 20–30 ml solution saline. Le jour du test, les macrophages ont été recueillis par lavage péritonéal, en solution saline. Ajustés au nombre de 4×10^7 /ml, les macrophages ont été mélangés en volume 1 : 1 avec les lymphocytes sensibilisés au PPD.

Le test MMI

Le test de l'inhibition directe de la migration a été effectué d'après la méthode de McCoy et collab. [5, 6] en microgoutte d'agarose. On a employé le milieu de culture RPMI (Difco) 50 UI/ml gentamycine, 25 µg/ml Leucotrophina, conformément au schéma suivant :

- (a) des migrations de contrôle en RPMI-1640
- (b) des migrations en présence de l'antigène (PPD)
- (c) des migrations en présence de la Leucotrophina (L)
- (d) des migrations en présence de l'antigène et de la Leucotrophina (PPD + L).

Après 20 heures à 37°C, les aires de migration ont été projetées sur papier Wattman 1, avec un microscope MC-1.

Les résultats exprimés en mg ont été calculés pour leur signification statistique par le test « t » de Student.

L'indice de migration a été obtenu en faisant le rapport des surfaces moyennes de migration (\bar{X}) en présence et en absence de l'antigène.

$$IMS = \left[\frac{\bar{X}(PPD + L)}{\bar{X}(PPD)} \times \frac{\bar{X}(RPMI)}{\bar{X}(L)} \right] \times 100$$

Si,

$\frac{\bar{X}(PPD + L)}{\bar{X}(PPD)} \times 100$ a été statistiquement significatif ($p < 0,05$), l'inhibition a été considérée positive.

On a testé également l'effet de l'inhibition non-spécifique (IMNS) de la Leucotrophina,

$$IMNS = \frac{\bar{X}(L)}{\bar{X}(RPMI)} \times 100$$

si, $p \geq 0,05$, l'inhibition a été considérée non-significative.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Dans les tableaux I—III et la figure 1 sont inscrits les résultats montrant l'effet « in vitro » de la Leucotrophina sur la réactivité MMI au PPD, chez les cobayes thymectomisés.

La moyenne de l'indice de migration au PPD chez les animaux de contrôle a été de 67,85 % ($p < 0,01$) ce qui indique une réponse immunitaire spécifique significative (tableau I). Les cobayes thymectomisés après l'immunisation présentent un IM = 102,8 %, ce qui montre l'absence de la réponse immunitaire cellulaire spécifique (tableaux II et III). Si on ajoute la Leucotrophina au milieu de culture, nous constatons qu'il existe une différence particulièrement significative pour les animaux immunisés et thymectomisés (IM = 71,09 ; $p < 0,01$) (tableaux II et III).

Tableau 1

La valeur moyenne ($n = 3$) de la surface de migration (exprimée en mg) et l'indice de migration (IM %) chez les cobayes immunisés au PPD

No animal	RPMI	PPD
1	63,33	44,00
2	69,00	48,00
3	84,66	56,33
4	76,33	50,33
5	80,00	54,66
$\bar{X} \pm DS$	$74,66 \pm 8,5$	$50,66 \pm 4,99$
IM %	—	67,85
p	—	<0,01

Tableau 2

La valeur moyenne ($n = 3$) de la surface de migration (exprimée en mg) et l'indice de migration (IM %) chez les cobayes immunisés au PPD et thymectomisés, en présence de la Leucotrophina « in vitro ».

No. animal	RPMI	PPD	L	PPD+L
1	40,33	42,66	44,66	29,33
2	50,66	53,33	51,00	31,00
3	55,33	57,66	55,00	46,33
4	71,00	66,66	67,00	40,66
5	56,00	55,66	58,66	47,00
$\bar{X} \pm DS$	$54,66 \pm 11,07$	$55,39 \pm 8,66$	$55,26 \pm 8,36$	$38,86 \pm 8,33$
IM %	—	102,08	101,09	71,09
p	—	>0,05	>0,05	<0,01

Tableau 3

L'inhibition spécifique [1, 2] et non-spécifique [3] de la migration des macrophages chez les cobayes immunisés au PPD et thymectomisés, en présence de la Leucotrophina «in vitro»

N° animal	$\left[\frac{L + PPD}{PPD} \times \frac{RPMI}{L} \right] \times 100$	$\frac{PPD + L}{PPD} \times 100$	$\frac{L}{RPMI} \times 100$
	(1)	(2)	(3)
1	61,40	68,75	110,61
2	57,81	58,74	100,67
3	80,48	80,35	99,40
4	63,58	60,99	94,36
5	80,19	84,44	104,75
X±DS	68,65±10,87	70,71±11,52	101,95±6,09
p	<0,01	<0,01	>0,05

Nous mentionnons enfin, que la Leucotrophina elle-même n'induit aucun effet d'inhibition non-spécifique en ce qui concerne la migration des macrophages «in vitro» ($IM = 101,09\%$; $p > 0,05$) (tableau III).

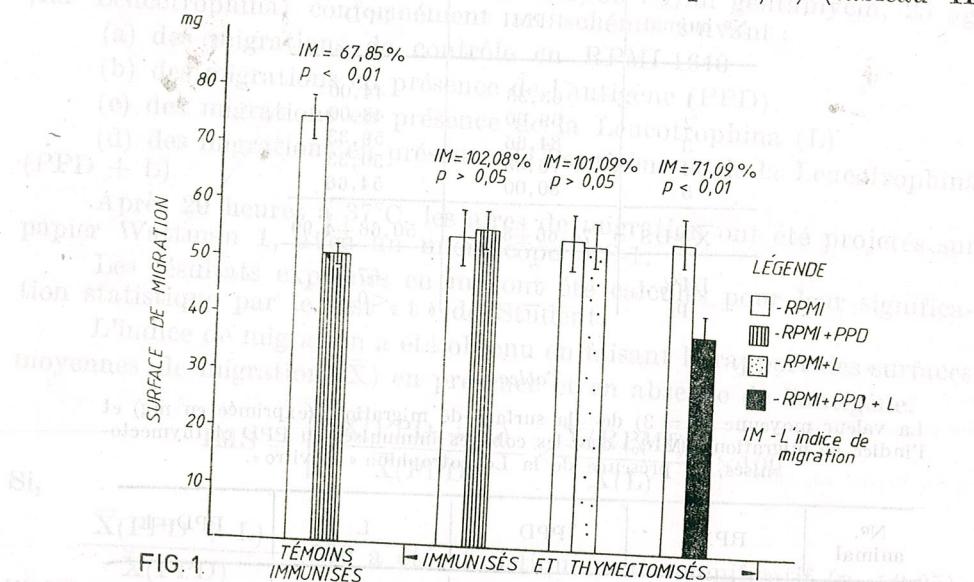


FIG. 1.

Il résulte que la Leucotrophina apporte une restauration de la capacité des lymphocytes sensibilisés au PPD, de sécréter le MMIF, chez les cobayes thymectomisés. La réponse immune cellulaire spécifique de ces animaux a été semblable à la réponse des animaux de contrôle (tableaux II et III).

Nos données, comme les données d'autres auteurs [8], suggèrent que les lymphocytes qui ont commencé de réagir avec l'antigène sont incapables de venir à maturité ou de cantonner la rate et les ganglions lymphatiques en absence de l'hormone thymique.

En conséquence, les lymphocytes restent en circulation et quand ils sont provoqués «in vitro» avec l'antigène sensibilisateur, ils sont incapables de réagir par la sécrétion de MMIF, excepté le cas où la hormone thymique est présente [7, 8].

Nous avons trouvé que la Leucotrophina aussi comme la fraction α_1 de thymosine induit le redressement de la réactivité lymphocytaire MMIF in vitro chez les cobayes immunisés et thymectomisés. On connaît que ces animaux sont IDR positifs au PPD, comme les animaux non-thymectomisés et que les lymphocytes provenus de la rate ou des ganglions lymphatiques répondent à l'antigène par la sécrétion de MMIF même en absence de la thymosine [8].

Emerson et collab. [2] ont émis le concept conformément auquel les lymphocytes dans les premières phases de réaction à l'antigène sont sélectivement attrapés par la rate et les ganglions lymphatiques. Ainsi que d'autres auteurs suggèrent, le sang est probablement l'organe défec-tueux du point de vue immunitaire et la thymectomie joue un rôle négatif et à peu près rapide sur la réactivité des lymphocytes circulants envers un antigène, en ce qui concerne la sécrétion des lymphokines [8].

En conclusion, nous supposons que l'activation antigène-induite est dépendante de la présence du thymus ou de l'hormone thymique. Les extraits thymiques, comme la thymosine ou la Leucotrophina, sont actifs du point de vue immunobiologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boyum, A., 1968, J. Clin. Lab. Invest., **21**, (Suppl.), 77-89.
2. Emerson, E. E., Thrus, D. R., 1974, J. Immunol., **5**, 113, 1575-1582.
3. Field, E. J., Ghent, B. K., 1975, Lancet, **i**, 49.
4. Luckey, R. D., *Thymic Hormones*, 1973, Univ. Park Press, London.
5. Maurer, B. A., Siwarski, D. F., Fichetti, G. P., McCoy J. L., Dean, J. H., Herberman, R. B., Immunopharmacol., 1978, **1**, 57-69.
6. McCoy, J. L., Ames, R. J., 1980, *Manual of Macrophage Methodology: Collection, Characterization and Function*, Inc. New York.
7. Rowley, D. A., Gowans, J. L., Atkins, R. C., Ford, W. L., Smith, E. M., 1972, J. Exp. Med., **136**, 2, 499-513.
8. Thruman G. B., Low, L. K., Rossio, J. L., Goldstein, A. L., 1981, *Progress in Cancer Research and Therapy*, vol. 20, Raven Press, New York, 145-157.

Reçu le 21 juin 1984

¹ Institut Oncologique
Cluj-Napoca, Str. Republicii 34-36

² Université « Babeș-Bolyai »
Faculté de Biologie
Cluj-Napoca, Str. Clinicilor 5-7

Nos données concordent avec celles d'autres auteurs [8] qui démontrent que l'antibiotique diminue la croissance de la tumeur et favorise la survie des animaux immunodéprimés au cours de l'application topique ou d'injection intraveineuse.

Par contre lorsque les lymphocytes totaux ou séparés de la circulation sont exposés à l'antibiotique *in vitro*, il existe une inhibition de l'attività lymphocyttaire totale ou séparée de la circulation due à l'antibiotique.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs. Il est intéressant de souligner que l'antibiotique A 37.4 possède une action cytostatique sur les cellules tumorales et immunomodulatrice sur les cellules normales.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

Il nous paraît donc que l'antibiotique A 37.4 possède une action antitumorale et immunomodulatrice dans les deux types de tumeurs.

THERAPEUTIC EFFECTIVENESS OF THE NEW ANTIBIOTIC PREPARATION A 37.4 ON SOME TUMORAL SYSTEMS

P. ROTINBERG, AL. SAUCIU *, SMARANDA KELEMEN and ECATERINA DUCA

The *in vivo* repeated testing of the antibiotic preparation A 37.4 on rats bearing various tumoral lines demonstrated the reproducibility and stability of its antitumoral activity observed when given in combination with NsMC 1980. The comparative analysis of the evaluation indexes of anticancerous action induced by this drug with those stipulated by the screening programs allow us to appreciate drug A 37.4 as a potential cancerostatic agent. Moreover, the protective effect of NsMC to the high cytotoxicity of this isolate was also pointed out.

In a previous paper [15] we demonstrated both the *in vitro* cytotoxic activity on HeLa cell cultures and the *in vivo* antitumor action on animals bearing Guérin T-8 solid tumors, of a new antibiotic preparation of biosynthesis. A 37.4, isolated at the Center for Antibiotic Research, Iași, Romania.

Because of the variability in response to the experimental animals the major concerns one has with a screening system are its reproducibility and stability [9].

In the present investigation the results obtained by repeated testing of the antibiotic isolate A 37.4 in combined therapy with chemically modified nystatin (NsMC) on rats bearing various tumor lines are exposed.

MATERIAL AND METHODS

White Wistar female rats weighing 150 g with transplanted tumors have been used in these experiments.

The tumor lines were Guérin T-8 lymphotropic epithelioma in solid subcutaneous form and the intraperitoneal ascitic form, as well as Walker 256 solid subcutaneous carcinosarcoma.

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

The i.p. treatment was applied either alone by administration of the drug A 37.4, at two-day intervals, in a dose of 0.075 mg/Kg b.w., or combined, by injection of the same dose of A 37.4 over the same time interval, concomitantly with a daily i.p. administration of NsMC 1980 in a dose of 300 mg/Kg b.w.

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

REV. ROUM. BIOL.—BIOL. ANIM., TOME 30, N° 1, P. 57—62, BUCAREST, 1985

The evaluation of antitumor action was made by the determination of mean tumor regression for solid tumors, by the increase of the mean survival time in the case of ascitic tumors, and by the calculation of the statistic significance and the T/C value (where T = mean tumor weight or mean survival time for the treated group and C = mean tumor weight or mean survival time for the controls).

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

RESULTS

The treatment with A 37.4 alone, at least up to the dose used by us, failed to demonstrate its antitumor activity since due to its high cytotoxicity the animals with all tumor lines used in the screening tests, died after 2–3 injections.

Table 1 presents the results obtained when the antitumoral action of the preparation A 37.4 in combination with NsMC 1980 was retested on rats bearing Guérin T-8 solid tumors.

Table 1

Retesting the antitumor activity of the combined treatment with A 37.4 (0.075 mg/kg b.w./i.p.) at 2 days) and NsMC 1980 (300 mg/kg b.w./i.p./daily) on solid Guérin T-8 tumor. Figures in brackets indicate the number of animals

Group/Treatment	Mean tumor weight (g)	% Tumor regression	Statistic significance	T/C value
CONTROL	19.9 ± 2.9(12)	—	—	—
A 37.4 + NsMC 1980	10.7 ± 1.5(9)	46.3	p < 0.01	0.54

In comparison with the control group it was observed that this combined treatment induced a significant decrease ($p < 0.01$) of the mean tumor weight, which allows an estimate of a mean tumor regression of 46.3% and a T/C value of 0.54. A case of tumor undevelopment was also observed.

Taking into account the T/C value of 0.53 in the first test [15], the product of the T/C values in the two tests is 0.28. The $T/C \times 100$ value in the second test is 54%. Knowing that the $T/C \times 100$ value of the first test [15] was 53%, the limits of acceptable variation (29.1–96.5%) have been calculated, the $T/C \times 100$ value in the retest being within this range.

The *in vivo* investigation of rats bearing Walker 256 carcinosarcoma gave the results presented in Table 2. In the initial experimental test, besides the antitumor effect exhibited by the isolate A 37.4 in association with NsMC, also the action of the drug vehicle agent, diluted propylene glycol (1 : 10) and of the associated drug NsMC on tumor development were tested.

It was observed that the solvent did not modify the tumor evolution when compared to the control, whereas NsMC administration induced a slight but nonsignificant antitumor effect (tumor regression of 9.2% and T/C of 0.92).

Table 2

Antitumor activity of antibiotic preparation A 37.4 (0.075 mg/kg b.w./i.p./at 2 days), administered in association with NsMC 1980 (300 mg/kg b.w./i.p./daily), on solid Walker 256 tumor. Figures in brackets indicate the number of animals

Group/Treatment	Mean tumor weight (g)	% Tumor regression	Statistic significance	T/C value
CONTROL	15.3 ± 2.5(12)	—	—	—
DILUTED PROPYLENE GLYCOL	15.0 ± 2.0(9)	—	N.S.	0.99
NsMC L ₂ 1980	13.9 ± 1.4(9)	9.2	N.S.	0.92
A 37.4 + NsMC 1980	9.0 ± 1.0(9)	41.2	p < 0.05	0.58
CONTROL	10.9 ± 1.7(12)	—	—	—
A 37.4 + NsMC 190	4.2 ± 2.0	61.5	p < 0.02	0.38

Compared to the control group, the combined treatment with A 37.4 and NsMC 1980 induced a significant ($p < 0.05$) mean tumor regression of 41.2% with a corresponding T/C value of 0.58.

The $T/C \times 100$ value required to establish the admissible variation range is 58%, with a lower limit of 31.8% and an upper one of 105.5%.

The retest experiment confirmed the antitumor action induced by A 37.4 in combination with NsMC. The mean tumor weight significantly decreased ($p < 0.02$) compared to the control, indicating a tumor regression of 61.5% and a T/C value of 0.38.

The product of the T/C values in the two tests is 0.22.

The $T/C \times 100$ value in the second test was 38%, that is within the calculated limits (31.8–105.5%).

The investigation of the antitumor activity of the preparation A 37.4 which seemed to be conditioned by the therapeutic association with NsMC 1980 was extended to a tumor line of ascitic type (Table 3).

Table 3

Antitumor activity of isolate A 37.4 (0.075 mg/kg b.w./i.p./at 2 days), administered in association with NsMC 1980 (300 mg/kg b.w./i.p./daily), on ascitic tumor. Figures in brackets indicate the number of animals

Group/Treatment	Mean survival time (days)	% Increase in survival time	Statistic significance	T/C
CONTROL	17.9 ± 1.3(12)	—	—	—
DILUTED PROPYLENE GLYCOL	17.5 ± 0.9(10)	—	N.S.	0.98
NsMC L ₂ 1980	19.7 ± 1.1(10)	10.0	N.S.	1.10
A 37.4 + NsMC 1980	23.3 ± 2.1(8)	30.2	p < 0.05	1.30
CONTROL	23.8 ± 1.5(14)	—	—	—
A 37.4 + NsMC 190	30.8 ± 1.5(10)	30.0	p < 0.01	1.29

Once again, it is observed that the drug vehicle agent did not influence the normal evolution of the tumor, whereas NsMC induced a slight, but nonsignificant, increase of the mean survival time (10%).

However, the isolate A 37.4 in association with NsMC induced a significant ($p < 0.05$) increase of the mean survival time by 30.2% correlated with a T/C value of 1.30. Moreover, two cases of tumor undifferentiation were registered.

The T/C $\times 100$ value in the first test was 130%, the minimal and maximal limits of the acceptable variation range being 71.4% and 236.6%.

The retesting experiment gave similar results, which demonstrate the antitumor action of A 37.4 characterized by a significant ($p < 0.01$) increase of the survival time by 30% and a T/C value of 1.29.

The product of the T/C values obtained in the two tests is 1.67. The T/C $\times 100$ value in the retest is 129% which is situated within the calculated variability range.

DISCUSSION

Although there is a marked continuous progress in cancer diagnosis and treatment, the antineoplastic chemotherapy is characterized by a low efficiency. This imposed extended and intense investigations for the identification of new pharmacological cancerostatic agents as well as the discovery of new ways of action on the malignant process [5], [13], [20].

The discovery of a cancerostatic drug and its use in the human antineoplastic chemotherapy is the result of a complex and rigorous investigation. The chemotherapeutic screening programs devoted to this purpose, require an initial laboratory stage devised to identify new antitumor agents followed by a clinical trial, the only one which allows their inclusion into the group of pharmacological cancerostatic agents [8] [9], [16], [17], [18].

In our *in vivo* screening protocol on tumour-bearing animal of the antitumoral activity of some new secondary metabolites of biosynthesis, characterized after the preliminary *in vitro* tests performed on HeLa cell cultures as significant cytotoxic and/or cytostatic agents, the evaluation of their activity was based on the selection criteria of some compounds in the group of antitumoral substances established by the screening programs of the Institute of Microbiology and Experimental Therapy in G.D.R and of the Cancer Chemotherapy National Service Center in U.S.A. [8], [9].

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

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

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

— in a third stage, the verification and confirmation of the antitumor activity is performed by a third test, when the product of the three T/C values should be 0.08 for solid type tumors ; the pharmacological action of the drug is also studied.

In the light of the above our results obtained after the antitumor activity screening of the antibiotic preparation A 37.4 could be discussed.

Firstly, the demonstration of the antitumor activity of the drug tested by us is conditioned by the therapeutic association with NsMC 1980, in all three tumor lines.

In the first test of the antitumor activity of the isolate A 37.4 on rats bearing either Walker 25 carcinosarcoma or ascitic tumors, a significant antitumor action was observed.

The comparison of the values of antitumor activity evaluation indexes obtained in the first test with those imposed by the programs mentioned above shows an identity or a considerable similarity of the values.

If the positive result obtained in the initial test on Guérin T-8 solid tumor [15] is taken into account we may consider that the conditions required for the second step screening are fulfilled.

The retesting of the activity of the preparation A 37.4 in association with NsMC on the three tumoral lines used in our laboratory gave the following results :

- the induction of mean tumor regression in the case of solid tumor lines and the increase of the mean survival time for the ascitic tumors which ascertain again the significant action of the secondary metabolite A 37.4 ;

- the product of the T/C values obtained in the first and second tests for each tumor system used are very close to the values required by the American screening program for the second step ;

- the T/C $\times 100$ values in the retests for all three tumor lines have been situated within the limits of the admissible variation range which thus characterize the screening systems as highly reproducible and stable.

Based on the comparative analysis of the evaluation index values of the antitumor activity obtained in the first and partially in the second *in vivo* screening tests we may conclude that the antibiotic preparation A 37.4 is a potential cancerostatic agent with a broad action spectrum.

Therefore, it is advisable to extend the investigations of this secondary metabolite in order to obtain new data which could justify its use in the clinical tests.

As already mentioned in the previous paper [15] we regard this investigation as valuable not only because of the identification of a potential antitumor agent (A 37.4) but also for proving a new functional property of NsMC, besides those already known [1], [2], [3], [10], that is, the induction of a protective effect upon normal cells to the high cytotoxicity of the drug A 37.4, thus conditioning its anticancerous activity.

It is difficult to explain at present the mechanism by which NsMC 1980 induced its protective effect. However, it is supposed that it may act either by a competition with A 37.4 on the membrane receptors, considering the known membranotropic effect of nystatin, by a chemical interaction forming complexes with A 37.4 or by an activation of the immunological system [3], [4], [6], [7], [11], [12], [19], [20], [21]. This new functional potency of NsMC 1980 makes possible its use in the combined antitumor chemotherapy, taking into account especially the increased efficiency of polychemotherapy [14].

REFERENCES

- Brandsch R., Rotinberg P., Sauciuc Al., Csöngle Brandsch, Smaranda Kelemen, Ecaterina Duca, Elena Hefco, 1980, Trav. Mus. Hist. Nat. Gr. Antipa, **XXII**, 59.
 - Brandsch R., Rotinberg P., Sauciuc Al., Csöngle Brandsch, Smaranda Kelemen, Ecaterina Duca, 1980, Trav. Mus. Hist. Nat. Gr. Antipa, **XXII**, 127.
 - Brandsch R., Rotinberg P., Csöngle Brandsch., Sauciuc Al., Smaranda Kelemen, 1980 Rev. Roum. Biol., **25**, 63.
 - Fiszer L., Mordarski M., 1979, Int. Symp. Antib., Weimar, G.D.R., 16.
 - Fleck W. F., 1979, Int. Symp. Antib., Weimar, G.D.R., 8.
 - Härtl A., Kirchner E., Fleck W., Unger E., 1979, Unt. Symp. Antib., Weimar, G.D.R., 18.
 - Iaremenko K. V., Eremeev A. A., Tereshin I. M., 1977, Antibiotiki, **2**, 153.
 - Jungstand von W., Gutsche W., Wohlraupe K., 1971, Drug Res., **21**, 404.
 - Leiter J., Abbott B. J., Schepartz S. A., 1969, Cancer Res., **29**, 20.
 - Lupașeu Gh., Sauciuc Al., Iancu I., Nanescu G., Nufescu L., Bendescu M., 1979, VI Simp. Cerc. Val. Prod. Med. Biostim., București, 103.
 - Lyashenko V. A., Aleksander S. K., 1978, Antibiotiki, **XXIII**, 1009.
 - Niessen E., 1979, Int. Symp. Antib., Weimar, G.D.R., 15.
 - Oki T., 1982, Biotechnol. Bioeng., **22**, 831.
 - Praga C., 1975, In: Antitumor Antibiotics. Soviet-Italian Symp., Moscow, 64.
 - Rotinberg P., Sauciuc Al., Smaranda Kelemen, Ecaterina Duca, 1984, Rev. roum. Biol. anim., **29**, 2, 133.
 - Schepartz S. A., 1971, Cancer Chemother. Rep., **2**, 3.
 - Schepartz S. A., 1976, Cancer Treatm. Rep., **60**, 975.
 - Schepartz S. A., 1977, Jap. J. Antib., **XXX**, S35.
 - Svanberg L., Hellekant C., 1977, Jap. J. Antib., **XXX**, S57.
 - Tereshin I. M., Mikhailets G. A., Yaremenko K. V., 1975. In Antitumor Antibiotics. Soviet-Italian Symp., Moscow, 250.
 - Volkova L. M., Diachovskaja R. F., Konovalova M. P., 1979, Antibiotiki, **24**, 295.

Received February 24, 1984

*Biological Research Center
Iași, Calea 23 August 2014*

*Center for Antibiotic Research
Valea Lupului-Jasi*

EFFECTS OF MITOINHIBITORY AND CHROMOSOMAL ABERRATION CAUSED BY ALPHA NAPHTHYL AND BETA NAPHTHOXY ACETIC ACIDS IN MICE

OLGA CILIEVICI and EMILIA GHIDU

The adverse effect of two herbicides, alpha naphthyl acetic acid (in doses of 0.6 mg/mouse) and beta naphthoxy acetic acid (in doses of 1.0, 0.2 and 0.02 mg/mouse) was tested in mice. The herbicides were administered for two and five weeks by gavage in a suspension of gum arabic. Proliferation in the hematopoietic marrow was ascertained by computing the stathmokinetic index (SI) for 86,000 cells. The result showed a strong inhibition of mitoses under the action of the alpha naphthyl acetic acid. This inhibition is directly proportional to the herbicide doses. The mitoinhibitory action of the beta naphthoxy acetic acid was smaller. Both herbicides induced chromosomal aberrations of the following type: chromatid gaps, deletions, centric fusions and aneuploidy.

The ever wider use of herbicides raises a number of problems concerning their effects on the environment and man. Knowing the acute and chronic adverse effects of herbicides is of great practical importance as it may prevent their introduction into nature or limit their use [8] [9].

Herbicides — chemicals used against weed proliferation — may enter the organism of animals and man via the airways or food, causing irritation of the mucosa, allergic and other immediate effects, but they may also have a more severe impact in time, being mutagenic and teratogenic [3] [12] [18].

This paper reports on the action of two auxinic herbicides on chromosomes and cell proliferation in the hematogenous marrow of the mouse.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out on 220 white mice of both sexes, distributed into 14 experimental groups. The herbicides tested were the alpha naphthyl acetic acid in doses of 0.6 mg, 0.2 mg and 0.06 mg/mouse and beta naphthoxy acetic acid in doses of 1.0 mg, 0.2 mg and 0.02 mg per mouse. The herbicides were suspended in gum arabic solution and were given by gavage for two or five weeks.

Two hours before sacrifice the mice were injected with a 0.04% colchicine solution with a view to metaphases accumulation. Femoral marrow was harvested in a 0.07 M KCl solution which was used to create the hypotonic shock. The cell suspension was fixed in a 3 : 1 mixture of methylvic alcohol and acetic acid. The smears were stained with Giemsa solution. The stathmokinetic index(SI) was calculated by the formula :

$SI = \frac{\text{no. of mitoses}}{\text{no. of cells}} \times 100$ for about 86,000 cells. Analysis of the mitoses and chromosomal aberrations was made using 6 animals selected at random from each experimental batch. The data were then processed for statistic significance.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Herbicides — over 100 products known until now, are used in fighting weed growth. The alpha naphthyl acetic acid and beta naphthoxy acetic acid are part of the group of auxinic herbicides.

The alpha naphthyl acetic acid is known as : Nu Tone, Stafast, Alphaspra, etc., its rough formula is $C_{12}H_{10}C_2$ and molecular weight 186.21. The LD_{50} for the rat is 1000 mg/kg. It is used in agriculture in doses of 0.01—40 ppm as a stimulator of plant growth.

The beta naphthoxy acetic acid is known as : No A, B No A, No Seed, etc., its rough formula is $C_{12}H_{10}O_3$ and molecular weight 202.21. It is used in agriculture in doses of 0.1—50 ppm.

There are few reports concerning the adverse action of these pesticides.

Suminari [11] has experimented the action of alpha naphthyl acetic acid on rats and noticed that it has antitumoral effects. Trunaut [15] administered the same acid to mice and found that it has a carcinogenic effect. Hitzenberger [6] reported that the acid has a coleritic effect. More recently Verschuren [16] has analyzed the adverse effects of this herbicide on the rat. The doses used were 200, 1,000 and 5,000 ppm.

In our experiment we used doses of 0.6 mg, 0.2 mg, 0.06 mg/mouse and noticed the following alterations after a 2-week interval : a strong inhibition of cell proliferation in the hematogenous marrow at doses of 0.6 mg/mouse given for two weeks. The mean value of SI was 1.94 which represents a decrease of 74% as against the controls.

The batch treated with 0.2 mg alpha naphthyl acetic acid had an SI of 2.73, 64% less than in the controls, whereas the group receiving 0.06 mg showed an SI mean value of only 3.58, being only 48% lower than in the controls (Table 1).

Table 1
SI values in the hematogenous marrow of mice treated with alpha naphthyl acetic acid

No. anim.	Dose	No. weeks	No. cells	No. mitosis	SI	Standard deviation	Error of differ. exper/controls
6	0.6 mg	2	12,000	233	1.94	0.1257	0.028
6	0.2 mg	2	12,325	337	2.73	0.1467	0.038
6	0.06 mg	2	12,970	465	3.58	0.1631	0.009
6	0.6 mg	5	12,000	549	4.57	0.1900	0.038
6	0.2 mg	5	12,000	600	5.00	0.1980	0.010
6	0.06 mg	5	13,190	878	6.72	0.2181	0.009
Controls			12,000	919	7.65	0.2420	

The decrease in SI is directly proportional to the dose of the tested herbicide.

The animals receiving alpha naphthyl acetic acid for 5 weeks in doses of 0.6 mg, had an SI of 4.57, which is 41% less than in the control. The mice given a dose of 0.2 mg has an SI value of 5.0, 35% less than in the control and the group receiving 0.06 mg had an SI of 6.72, being 13% less than in the controls. Though the mitoinhibitory effect appears weaker the direct relationship between the hematogenous marrow proliferation inhibition and the dose of alpha naphthyl is obvious (Fig. 1).

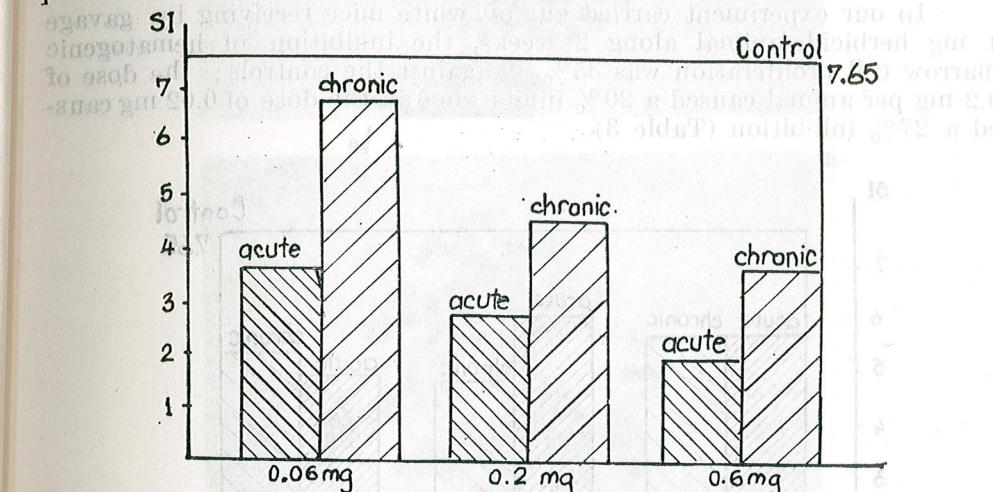


Fig. 1. — Stathmokinetic index in bone marrow of mice treated with alpha naphthyl acetic acid.

The survival rates of the animals after 5 weeks of treatment with alpha naphthyl acetic acid was the following : 40% in the first groups (0.6 mg) and 50% of the second and third groups (0.2 and 0.06 mg, respectively).

Chromosomal aberrations were noticed in the cells of the hematopoietic marrow under the action of the alpha naphthyl acetic acid given in a dose of 0.6 mg per mouse. The aberrations were : chromatid gaps, centromeric breaks, acentric fragments, pycnotic mitoses, stellar mitoses, aneuploid and polyploid metaphases (Table 2).

Table 2

Incidence of chromosomal aberrations induced by two herbicides alpha naphthyl acetic acid and beta naphthoxy acetic acid in white mice

	Dose	Metaphases			Gaps	Deletions	Centr. fusion	Centrom. break	Stellar metaphase
		nor- mal	aneupl.	polipl. %					
Alpha naph. acetic ac.	0.6	73.17	8.55	2.42	6.02	1.20	9.19	0.21	2.42
Beta naph. acetic ac.	1.0	65.08	2.36	0.59	3.55	1.47	7.10	4.73	19.45
Control	—	98.05	1.45	0.30	0.20	—	0.80	—	—

alpha naphthyl acetic acid on mouse chromosomes
a metaphase; b centromeric aberrations; c chromosomal irregularities; d stellar; e polypl. metaphase

The literature data concerning the second herbicide tested in our experiment are even poorer. Trigy [14], using small concentrations of beta naphthoxy acetic acid given in early stages to vine branches and in the blooming period, noticed that the herbicide leaves no residue and is not toxic to man. The same author mentions a weak bactericidic effect of this herbicide on gram-positive bacteria. Dubos [2] notices the inhibitory effect exerted by doses of 0.001 and 0.01% on the development of *Mycobacterium tuberculosis*, and Zamboni [17] reports for the same herbicide, a coleritic effect.

In our experiment carried out on white mice receiving by gavage 1 mg herbicide/animal along 2 weeks, the inhibition of hematogenic marrow cell proliferation was 35% as against the controls; the dose of 0.2 mg per animal caused a 20% inhibition and the dose of 0.02 mg caused a 27% inhibition (Table 3).

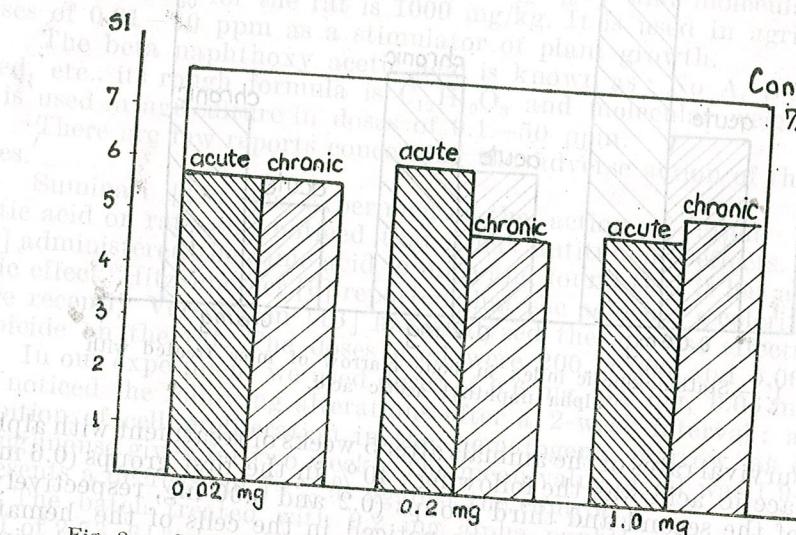


Fig. 2. — Stathmokinetic index in bone marrow of mice treated with beta naphthoxy acetic acid.

In the batch treated with beta naphthoxy acetic acid in the same doses of 1.0, 0.2 and 0.02 mg/mouse inhibition of mitosis was present showing values around 30% (see Fig. 2 for these variations).

Survival of the animals in the 3 groups treated with beta naphthoxy acetic acid for 5 weeks varied with the dose. In the lot receiving 1.0 mg/mouse survival was 30%, in the lot receiving 0.2 mg/animal it was better, i.e. 70% and in the lot receiving 0.02 mg/animal only 50% of the animals survived.

It is worth noticing an increased sensitivity of the male mice to this herbicide as mortality among them was higher than in the females.

As concerns chromosomal aberrations, we noticed the presence of chromatid gaps, deletions, centromere breaks, centric fusions, chromosomal despiralization, stellar metaphases (19%) and pycnotic metaphases (Table 2).

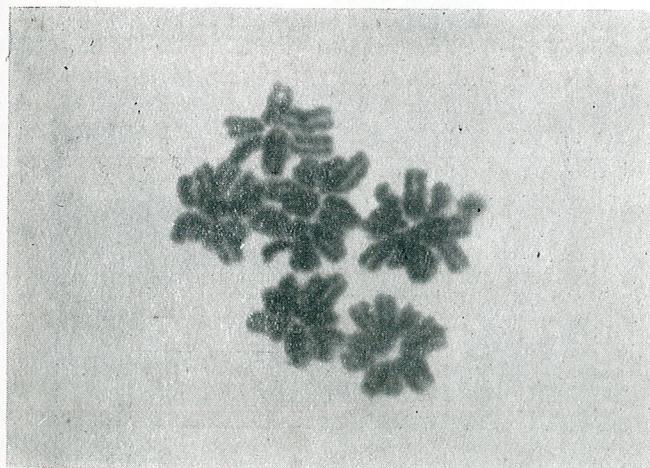
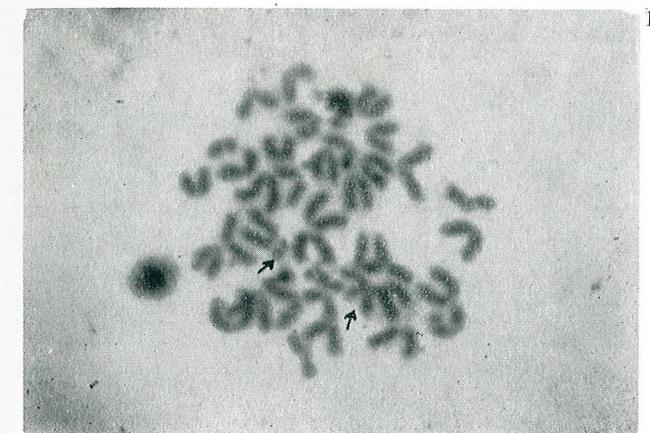
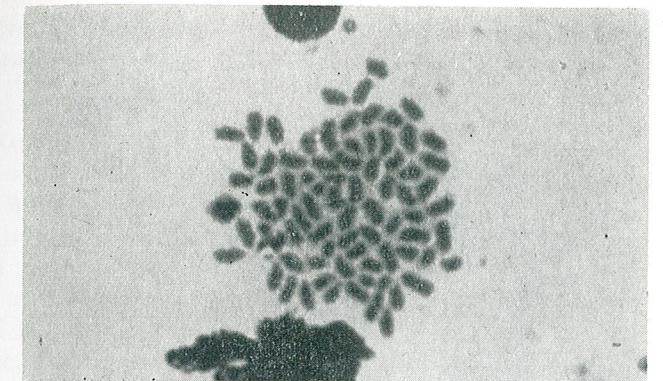
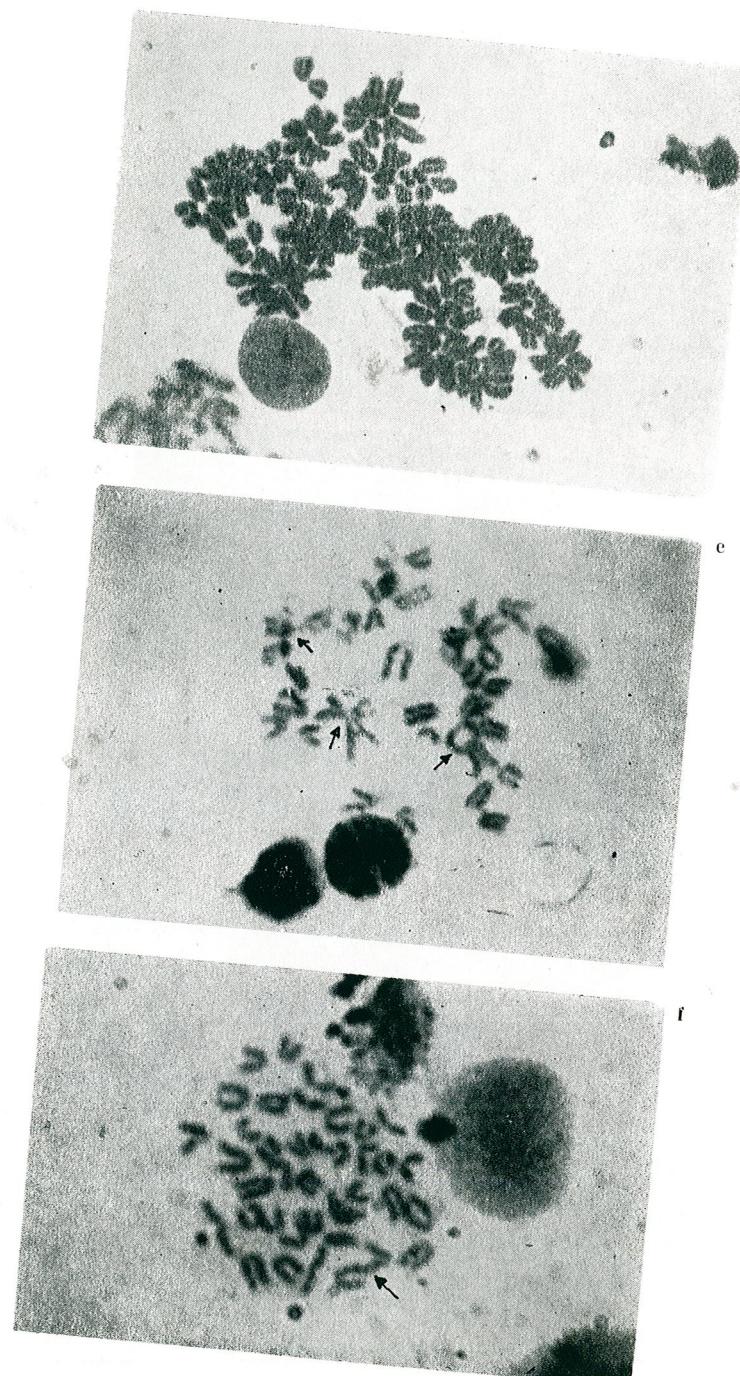


Fig. 3. — Effects of alpha naphthyl acetic acid and beta naphthoxy acetic acid on mouse chromosomes.

a. polyplloid metaphase; b. centromeric attractions, chromosomal fragmentation; c. stellar polyplloid metaphase;



d. stellar polyplloid metaphase; e. Centromeric attraction, gaps, ring chromosome, despiralization. f. association at telomeric level.

As concerns the mutagenic effects of these herbicides we found no bibliographical data. There are, however, researches showing the mutagenic effect of pesticides. Thus, Dulont et al. [4] noticed chromosomal aberrations in cultures of the L cells, induced by malathion in doses of 0.1 and 10 µg/ml. Tashkojajev [13] examined the action of Kotoran and magnesium chloride on rats and noticed a clastogenic action. Kirushkin [7] noticed chromosomal aberrations under the action of two pesticides, Zineb and Clorofos. Georgian [5] reports a mutagenic action of aldrin and phosamidon, Raicu et al. [10] examined the effect of several pesticides and reported a mutagenic effect for zinc phosphide and vecor on certain rodents. Cilievici et al. [1] reported the mutagenic effect of a fungicide, i.e. Ziram on two strains of mice: C3H and AK.

Table 3

SI values in the hematopoietic marrows of mice treated with beta naphthoxy acetic acid

No. anim.	Dose	No. weeks	No. cells	No. mitosis	SI	Standard deviation	Error of differ. exper/controls
6	1 mg	2	12,355	618	5.00	0.196	0.003
6	0.2 mg	2	12,597	774	6.14	0.213	0.003
6	0.02 mg	2	12,462	700	5.61	0.206	0.003
6	1 mg	5	12,560	680	5.40	0.201	0.003
6	0.2 mg	5	12,010	593	4.93	0.197	0.011
6	0.02 mg	5	12,275	691	5.62	0.203	0.003
6	Control		12,000	919	7.65	0.242	—

CONCLUSIONS

Investigation of the adverse action of two herbicides, alpha naphthyl acetic acid and beta naphthoxy acetic acid, on the hematoforming marrow and chromosomes revealed the following:

Alpha naphthyl acetic acid given by gavage for two weeks has a strong inhibitory action on proliferation in the mouse hemato-forming marrow (74%, 64% and 48% as against the controls).

After 5 weeks of treatment the decrease in SI is of 41%, 35% and 13%.

The decrease in SI is directly proportional to the herbicide dose.

The beta naphthoxy acetic acid administered for 2 weeks also inhibits mitosis by 35%, 20% and 27%. The same values were found in the mice receiving this herbicide for 5 weeks.

Both herbicides in doses of 0.6 mg (alpha naphthyl acetic acid) and 1 mg (beta naphthoxy acetic acid), induced the following chromosomal aberrations: chromatid gaps, centric fusions, deletions, pycnotic mitoses.

In conclusion, both herbicides have an inhibitory action on hematopoietic marrow mitosis and induce chromatid and chromosomal aberrations in the mouse.

REFERENCES

1. Cilievici Olga, Ghidus Emilia, Crăciun Carmen, 1982, Scientific session IMF, Abstracts vol. 9-10, Ed. Ministerul Educ. și Învăț., București.
2. Dubos R.J., 1946, Proc. Soc. Exptl. Biol. med., **63**, 317.
3. Dinerman A. A., Rojdestvenskaia N. A., 1974, Ghig. i Sanit., **2**, 23.
4. Dulont F. H., Laramandy M. I., Bianchi N. O., 1978, XIV Intern. Congr. of Genet. Moscow, Abstracts, part II, 233.
5. Georgian Liliana, 1975, Mutation Res., **31**, 103.
6. Hitzenberger G., Klein K., 1958, Wien Med. Wochensch., **108**, 504.
7. Kiruskin V. A., 1975, Ghig. i Sanit., **9**, 43.
8. Kuzmenko N. I., 1980, Ghig. i Sanit., **9**, 88.
9. Nikonorow M. 1981, Pesticidele în lumina toxicologiei mediului, Ed. Ceres, București.
10. Raicu P., Duma D., Gavrila L., Voicu L., Hamar H., Tuța A., 1978. In Probleme de biologie evoluționistă, Ed. Academiei, București, p. 123.
11. Sumanari T., 1940, Med. Acad. Kioto, **32**, 176.
12. Suțeanu E., Gherdan A., Ghergariu S., Popescu O., 1977, Toxicologie și toxicoză, Ed. didactică, București.
13. Tashkojavev P. I., 1978, XIV Intern Congr. of Genetics, Moscow, Abstracts, 289.
14. Trig C., 1948, Ohio J. of Sci., **48**, 48.
15. Trunaut R., 1949, Ann. Pharm. Franc. **6**, 538.
16. Verschuren H. G., 1976, Rev. of Toxicology, **5**, 3, 371.
17. Zamboni P., 1963, Arch. Hol. Sci. Farmacol., **13**, 1, 92.
18. El-Zoka T. A., Mc Kenzie W. H., 1980, Human Genetics, **32**, 6, 154 A.

Received December 12, 1983

Faculty of Medicine
Laboratory of Biology and Genetics
Bucharest, Alexandru Sahia 19-21

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF SOME CASES OF HAIRY CELL LEUKEMIA

N. MIRANCEA and DORINA MIRANCEA

The purpose of our investigations is to present the results of morphological investigations of blood, bone marrow and spleen in patients suffering from hairy cell leukemia. Some special structural and ultrastructural aspects are presented in the paper: pseudoinclusions lined by hairy cells, erythrocyte rosettes round the hairy cells, aberrant distributions of genetic material during the mitotic divisions, ribosome-lamella structures, cell organelles under destruction process, etc. The electron microscopic examination helped us to investigate the dynamics of ultrastructural modifications shown by some hairy cells; by their cellular prolongations they are implied in the seclusion process, endocytosis and erythrocytes degradation; therefore at least in some cases of hairy cell leukemia, hairy cells together with the other major factors participate in the generation and maintenance of anemia.

Hairy cell leukemia is a rare disease, determined by the proliferation and accumulation of malignant mononuclear cells. The cells have a characteristic morphology (they present numerous long cytoplasmic projections). The original cell line of this cell type has not been established with certainty [2]. The disease has a chronic evolution; the patients present pancytopeny, hepatomegaly, bone marrow, blood, spleen and lymph nodes infiltration with malignant hairy cell type [5]. Sometimes the differentiated diagnosis for hairy cell leukemia based on usual morphological observation is hard to establish. In these cases the cytochemical and/or electron microscopic investigations offer valuable data to give a correct diagnosis.

MATERIAL AND METHODS

The biological material (blood, bone marrow and spleen) under morphological study was processed according to the usual techniques. Before electron microscope examination the biological material was prefixed in 2% glutar-aldehyde in sodium cacodylate buffer, then post-fixed in 2% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer. The inclusion was made in synthetic polymers. The ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The examination was made under the JEM 7 electron microscope.

RESULTS

Case D.N., male, 59 years old. When sternal puncture was performed in order to collect bone marrow particles (which were further processed according to electron microscopic technique), the patient presented 94% polymorphic lymphoid cells in the blood; most of them were large with pale cytoplasm and irregular edges. These nontypical lym-

REV. ROUM. BIOL.—BIOL. ANIM., TOME 30, N° 1, P. 69—74, BUCAREST, 1985

Fig. 2. — Case D.N. (bone marrow). Similar aspect as in Fig. 1. (1) = erythrocyte or erythrocyte fragment secluded by a membrane; (2) = elongations; (3) = erythrocyte fragments in various stages of degeneration; (4) = a hairy cell. (x 3,300).

phoid cells suggested hairy type cells. The histological examination showed a diffuse lymphocytic infiltrate in the bone marrow. The electron microscopic investigation of the bone marrow helped us to diagnose the case: hairy cell leukemia.

The electronmicrographs obtained from ultrathin sections of bone marrow showed the prevalence of hairy cells (Figs 1 and 2). Hairy cells are of various shapes, in most cases oval, of medium or small size, in few cases large (in comparison with normal erythrocytes). The hairy cells have a large number of thin cytoplasmic prolongations. They may be as long as 1/3 or more from the cell diameter. Sometimes, large sections of the cytoplasm of such cells extend forming thinner extenstions. If one such prolongation is connected to another one from the same cell, or of one from the normal cell surface, recombinations of plasmalemma are obtained with endocytosis vacuoles; they can be noticed at various levels of the cytoplasm.

The cell nuclei are polymorphic; the elongated ones are prevalent but some of them are deeply incised or even hyper-segmented. Some hairy cells are binucleated. The nuclei have a fine structured chromatin; the dense one is scarce and generally attached to the internal membrane of the nuclear envelope, interrupted here and there (at the level of the nuclear pores). A nucleolus is sometimes found in the nucleus.

Some hairy cells have a richer cytoplasm. The mitochondria and free ribosomes are prevailing in the cytoplasm of these cells. The mitochondria are distributed round the nucleus, but in many hairy cells they agglomerate round one cellular pole (polarised distribution), the active part of the cell, where the cellular extensions participate actively in the formation of endocytosis vesicles. In the incision of some nuclei the Golgi apparatus can be found sometimes surrounding a centriole. The centriole presents centriolar satellites. Ribosome lamellae complexes were found within the cytoplasm of some hairy cells; they are structures specific to hairy cell leukemia.

Special mention should be made of the fact that in this cell type, some hairy cells, by their very long cytoplasmic projections, contain erythrocyte fragments or even whole erythrocytes which they block (Figs. 1, 2). Erythrocyte fragments in various stages of lysis are noticed in the cytoplasm of such cells.

Case L.M., male, 42 years old. During blood harvesting for the electron microscope examination, the blood count of patient L.M. showed a higher number of lymphocytes (62%) in comparison with the small number of segmented granulocytes (10%). The presence of nontypical cells (21% from the nucleated cells) was noticed — their morphology suggested identification with the hairy cells. The results of the morphological examination of the blood and bone marrow correlated with the clinical-biological data of the patient helped us to diagnose the case as hairy cell leukemia.

The electronmicroscopic study shows that there are numerous hairy cells with cytoplasmic extenstions. These extenstions are sometimes interconnected or join the plasmalemma of the cell body in order to form endocytosis vesicles. Various stages in the evolution of these vesicles can be noticed.

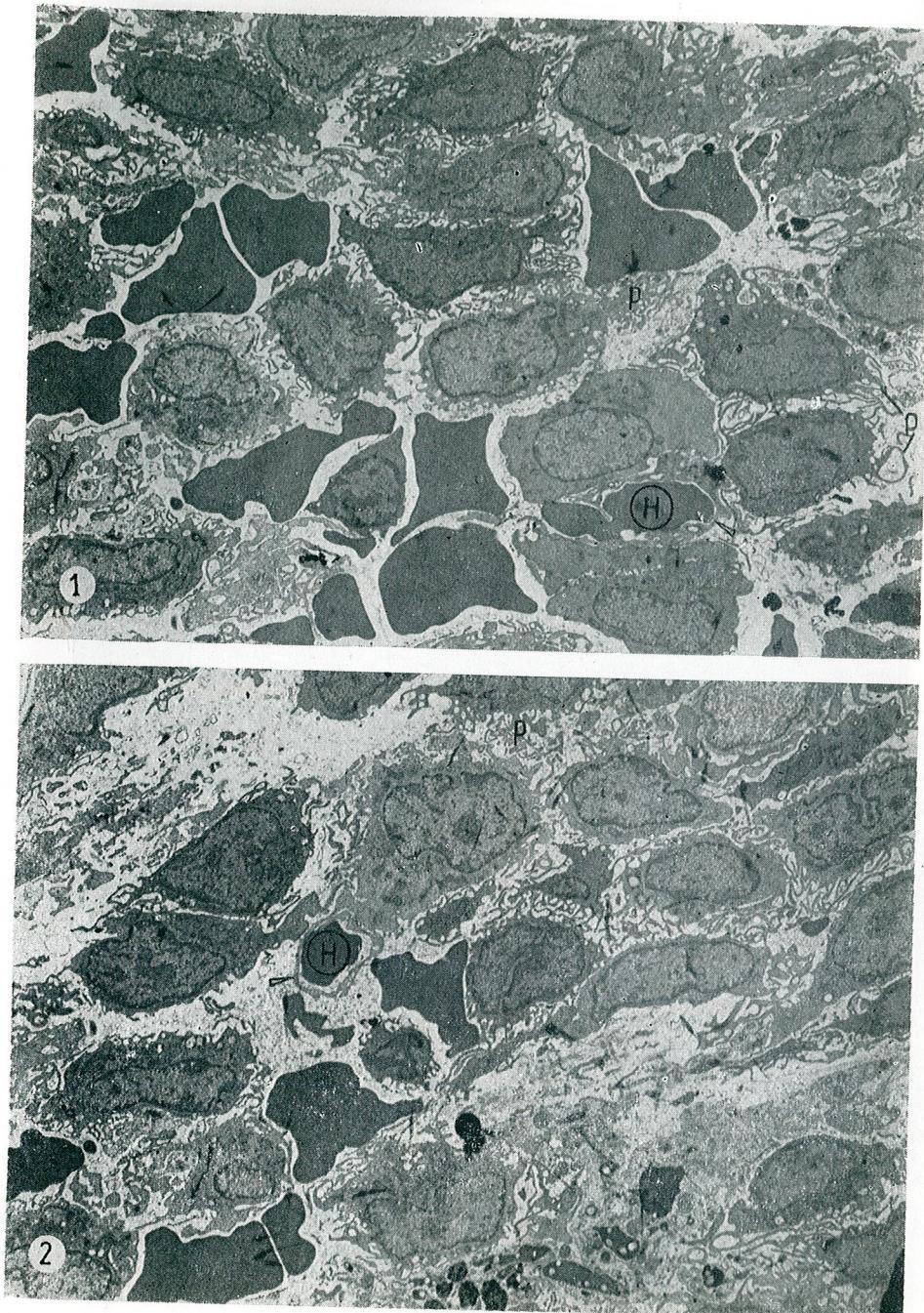


Fig. 1. — Case D.N. (bone marrow). Hairy cells present many characteristic cytoplasmic prolongations (p). The N/C ratio is high and some nuclei are nucleolated. There is little heterochromatin and it is attached to the internal membrane of the nuclear envelope. Hairy cells present numerous endocytosis vesicles and cytoplasmic organelles have polarised distribution. The cell prolongation (—) seclude and break the erythrocyte (H). ($\times 3,600$).

Fig. 2. — Case D.N. (bone marrow). Similar aspect as in Fig. 1; (p) = cytoplasmic prolongations; (H = erythrocyte or erythrocyte fragment secluded by a cytoplasmic prolongation (—) of a hairy cell. Erythrocyte fragments in various stages of degradation. ($\times 3,300$).

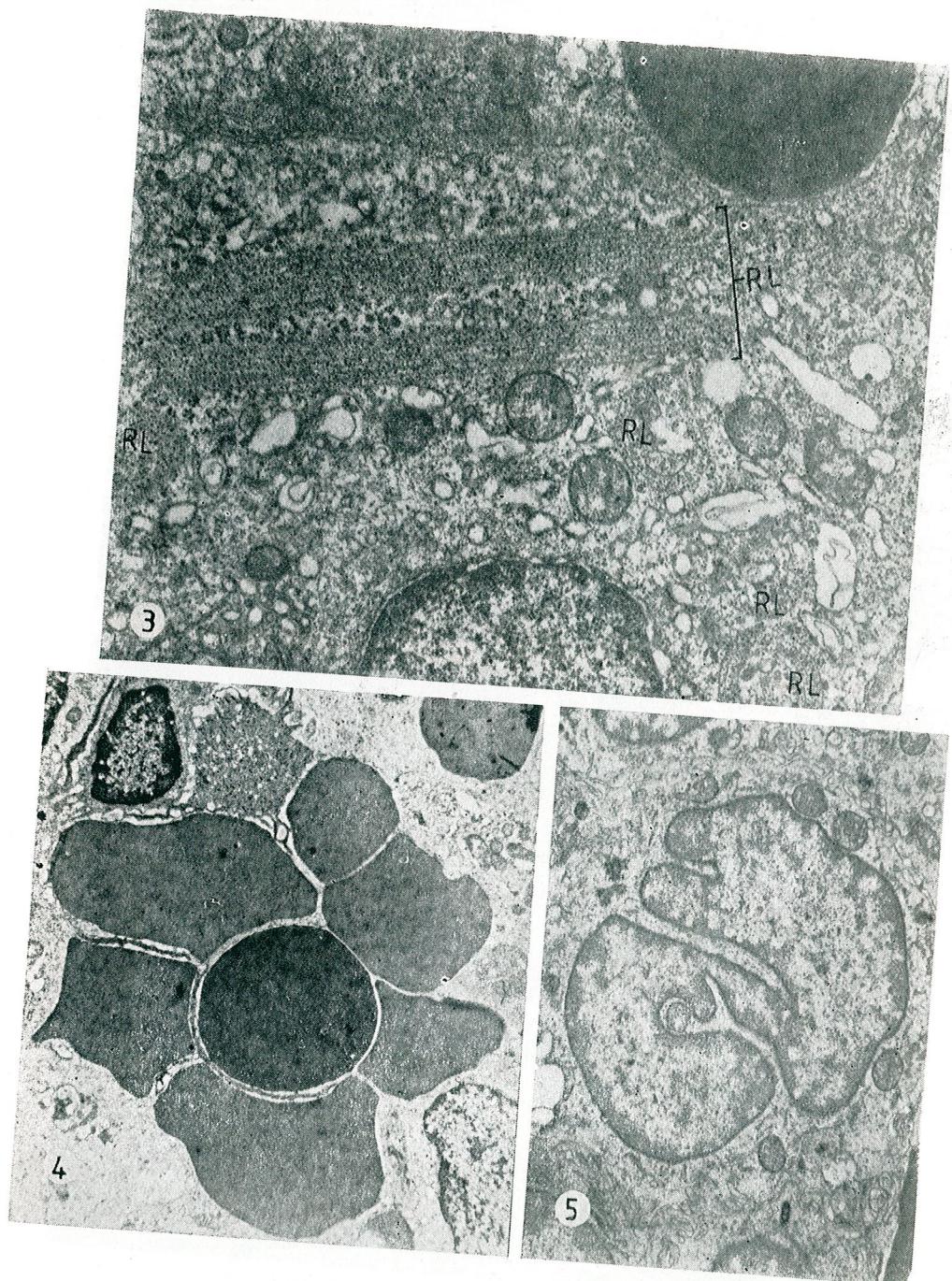


Fig. 3. — Case L.M. (spleen). Several ribosome-lamellae complexe cross, longitudinally and obliquely sectioned in a hairy cell cytoplasm (RL); ($\times 23,000$).
 Fig. 4. — Case L.M. (spleen). An erythrocyte rosette is surrounded by hairy cell cytoplasmic prolongations ($\times 6,100$).
 Fig. 5. — Case C.A. (spleen). Multiply and deeply incised nucleus of a hairy cell ($\times 7,200$).

The patient was splenectomised. After electromicroscopic examination many hairy cells were noticed in the spleen. The hairy cells in the spleen present numerous cytoplasmic extinctions alike to the blood cells. The prevailing cell population in the spleen has a higher proportion of N/C. The nuclei show a high degree of polymorphism. Some are circular and others oval in section; others are either deeply incised or convoluted. The chromatine has a fine structure. There are a lot of nucleated nuclei. The nucleoli are large and of a reticular structure. There are some nuclei with two nucleoli. Sometimes, the nucleolus is placed close to the nuclear envelope or even sticks to it. The electromicroscopic examination revealed the aberrant distribution of the genetic material during the mitotic division.

Some cells in the cytoplasm are scarce (a narrow strip round the nucleus) penetrating also into the extinctions of hairy cells. There are however many hairy cells with much cytoplasm with a lot of mitochondria, long profiles of endoplasmic reticulum and ribosomes. We notice the fact that in the vicinity of hairy cells nuclei, there are several mitochondria, endoplasmic reticulum and ribosomes surrounding well-developed dyctiosomes. A lot of mitochondria in the cytoplasm of some hairy cells undergo degradation (the cristae are partly or totally destroyed); they seem to participate in the formation of myelin fibres. Vacuoles are seen in the cytoplasm; their content is clearly electromicroscopic (they are perhaps dilatations of the endoplasmic reticulum). Some small cellular organelles, especially ribosomes and small vesicles penetrate the cytoplasmic extinctions of hairy cells. Some hairy cells have ribosome-lamellae structures in the neighbourhood of the nucleus; sometimes, several ribosome-lamellae complexes are found in only one cell (Fig. 3). Some cells are in an advanced stage of degradation, so that the nucleus or large areas of the cytoplasm are destroyed; they are replaced by electron-dense-particle structures that break the cytoplasm and leave the cell. Sometimes, the erythrocyte rosettes are surrounded by hairy cells cytoplasmic prolongations (Fig. 4).

Case C.A., male, 54 years old. The clinical and laboratory investigations established the diagnosis of hairy cell leukemia. The patient was splenectomised. After examination of spleen ultrathin sections, some wide areas with proliferative lesions of hairy cells were noticed. The prevalence of large cells, some of them with long cytoplasmic prolongations, with a higher N/C ratio with polymorphic nuclei (sometimes deeply and multiple incised (Fig. 5) nucleolated, ribosome-lamellae structures, are ultrastructural aspects supporting the diagnosis of hairy cell leukemia.

The electronmicrographs suggest an advanced stage of disease evolution, because numerous pseudosinuses are found; their walls are made of neoplastic hairy cells, displayed on a basal lamina. Moreover, some hairy cells have cytoplasmic organelles in various stages of alteration. Generally in the vicinity of the nucleus, ribosome-lamellae structures are noticed in the cell cytoplasm; some cells present 3–4 ribosome-lamellae complexes. Sometimes, in the intercellular spaces long cytoplasmic extinctions are noticed; they belong to hairy cells occurring on

other planes than the ultrathin section under examination. Quite frequently, one single spleen hairy cell is surrounded by an erythrocyte rosette.

DISCUSSIONS

Hairy cell leukemia, also called leukemic reticuloendotheliosis or leukemia with trichocytes, represents 2% of all total acute leukemias (Flandrin and Daniel, 1974, quoted by Micu, D., and Manolescu, N., 1981, [6]. Golomb, H. M., [3] shows that 71% of the patients are men and, 29% women. Our statistical data show that seven out of ten patients are males [7].

The high N/C ratio, the numerous and deep investigations in the nucleus, the finely structured chromatin, nuclei with large nucleoli of a reticular type, a cytoplasm rich in ribosomes, and especially the presence of ribosome-lamellae complexes and the cytoplasmic extinctions of hairy type in some bone marrow, spleen and blood cells of the patients reported above and investigated by means of electron microscope, all these suggested a diagnosis of hairy cell leukemia.

The electronmicroscopic images as a whole obtained from ultrathin sections of bone marrow (case D.N.) helped us investigate the dynamics of hairy cells. Therefore, at first, a polarisation of cellular organelles is noticed (especially of mitochondria). The cell in the area with more abundant cytoplasm and richer in organelles will shoot forth a lot of extinctions; they shall actively participate in the endocytosis process (pinocytosis); the phagocytosis of some thrombocyte and erythrocyte fragments. After endocytosis the cell withdraws its extinctions; phagocytosed fragments are noticed in the cytoplasm of these cells as well as lysosomes, multivesicle bodies, remnants of digested endocytized fragments. Even in this stage, the mitochondria have a polar distribution in the cytoplasm (perhaps as necessity for their participation in the energy releasing processes that accompany the digestion of endocytized fragments). In a final stage, the cell starts its degradation; the nucleus becomes pyknotic and is gradually destroyed; this process develops simultaneously with the detachment of some cytoplasmic extensions from the cell body until the cell is totally destroyed.

We consider that the cytoplasmic extensions have the role to enlarge the exchange surface of the cell with the external environment. Our electronmicroscopic findings regarding the cytoplasmic extensions of hairy cells to the seclusion and degradation process of erythrocytes helped us to establish the following stages:

- I. Erythrocyte seclusion by the cytoplasmic extensions.
- II. Erythrocyte fragmentation, a process that implies the participation of two or more hairy cells.
- III. Erythrocyte fragments are lysed, by emitting lysosomal enzymes in the intercellular space or even whole lysosomes: —lysosomal enzymes break the erythrocytes, at the beginning only in part.

Fig. 3. — Case C.A. (spleen). Multiply and deeply incised nucleus of a hairy cell ($\times 7,200$).

— the remaining erythrocyte fragments are definitively lysed in the intercellular spaces. The material resulted after lysis may be taken over by hairy cells; they present an intense process of endocytosis even in the limitrophe part of the erythrocyte destruction area.

The electronmicroscopic findings suggest the following modality to eliminate the lysosomal enzymes from the cells surface. Along a large part of the long cellular axis, or at only one pole, portions of cytoplasm are individualised; they keep a fragile connection with the rest of the cell by its fine projections. By enlarging gradually the narrow space separating the cytoplasmic porticos from the rest of the cell, and finally by breaking the side walls, the cytoplasmic portions detach from the body of the hairy cell. In some cases, 2 or 3 parallel portions can be noticed; they maintain a peripheral position to the cell they are made of. By gradual degradation, lysosomal enzymes are emitted in the intercellular spaces that attack the erythrocytes from their neighbourhood. Sometimes, the cytoplasmic portions, before detaching from the hairy cell body, delimit a phagosome; that includes the erythrocyte itself or the erythrocyte fragment to be destroyed.

We appreciate that these ultrastructural aspects have an important physiopathological significance for this category of patients. Considering these morphological aspects we noticed that besides the other major factors that induce anaemia in these situations (dislocation of hematopoietic isles from the marrow by hairy cell proliferation etc.) it is possible that seclusion, degradation and endocytosis of some erythrocytes by hairy cells should contribute to anaemia (the patient presented 7 g hemoglobin/100 during the bone puncture).

Vileu, A., [8] shows that in some pathological cases, the bone marrow macrophage may phagocytate erythrocytic precursors, even in the compartment of erythrocytes formation. It is well known that in case of extrabody circulation, of valvular prosthesis implantation or in case of microangiopathic anaemias, the erythrocytes can be fragmented because of fibrin fragments formed on the vascular walls [8]. In these cases, by mechanical erythrocyte sectioning, a schisocyte and a pinched erythrocyte result. We noticed that such erythrocyte fragments may occur also in the bone marrow in cases of hairy cell leukemia. Some electronmicrographs show that an extension of the hairy cell penetrates deeply into an inclosed erythrocyte fragmentation. The consequences of erythrocyte fragmentation are dangerous from a physiopathological point of view. It is known that erythrocytic fragments have a limited functional capacity and their life is as short as a few hours [1], [4]. We may conclude that hairy cells may be implied in the generation and maintenance of anaemia by the mechanism described above.

In some cells cytoplasm, generally in the neighbourhood of a nucleus one or more ribosome-lamellae complexes can be seen. Most authors, who described such structures, consider them as specific to hairy cells. Lennert, K. [4] shows that the nature of ribosome-lamellae complexes is not well known. In a study previously presented [7] we showed the direct connections between the cytomembranes of the ribosome-lamellae and the external membrane of the nuclear envelope; we considered therefore that the lamellar component of these complexes derives from the

external membrane of the nuclear envelope. The membranes derived from the membrane of the nuclear cover are spiral at equal distances along them. The core of these complexes is formed of electrondense-particle structures (perhaps, according to aspect and size, some ribosomes grouped) and of vesicles of various sizes.

CONCLUSIONS

1. The results of an electronmicroscopic study of some cases of hairy cell leukemia demonstrate that this type of proliferation is a morphopathological entity; the cytoplasmic projections, typical for this type of malignant cell proliferation in the bone marrow, spleen or blood, were not found in other types of malignant cells studied by us.

2. From a physiopathological point of view the cytoplasmic projections of hairy cells have an important role. Besides the fact that these projections increase the exchange cell surface with the environment mainly by their participation in endocytosis, some hairy cells, by means of these cytoplasmic projections, seclude the erythrocytes. We appreciate that the seclusion and degradation of erythrocytes by hairy cells takes place in three stages. Therefore, we consider that hairy cells contribute to some extent to the generation and maintenance of the patients' anaemia.

3. The ribosome-lamellae complexes are structures specific to hairy cell leukemia. We consider as probable the derivation of ribosome-lamellae complex membranes from the external membrane of the nuclear envelope.

4. Hairy cell leukemia is a clinical-morphological entity, being a malignant lymphoreticular disease, less usual, which requires suitable treatment.

REFERENCES

- Bessis M., 1972, *Cellules du sang normal et pathologique*. Paris, Masson et cie.
- Cohen H. J., George E. R., Kremer, B., 1979, *Blood*, **53**, 4, 764–776.
- Golomb H. M., 1978, *Cancer*, **42**, 2, 946–956.
- Lennert K., 1978, *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease*. Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
- Mann R. B., Jaffe E. S., and Berard C. W., 1979, *Amer. J. Path.*, **94**, 1, 103–192.
- Micu D., Manolescu N., 1981, *Celulele leucemice*. Ed. Academiei, Bucureşti.
- Mirancea N., Caloianu-Iordache Maria, Dosios Liliana, Ursea Constanța, Mirancea Dorina, Paper presented at the Symposium Biol. cel. și comparată, Acad. R.S.R., Bucureşti, 11–12 Dec. 1980.
- Vileu A., 1977, *Eritrocitul*, Ed. medicală, Bucureşti.

Received April 22, 1982

Institute of Biological Sciences
Bucharest, Splaiul Independenței 296.

A. SOÓS, L. PAPP (Editors), *Catalogue of Palearctic Diptera*, vol. 9; *Micropezidae-Agromyzidae*, 460 pp.; vol. 10: *Clusiidae-Chloropidae*, 402 pp., Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.

We already have the ninth and the tenth volumes (the first two printed) of the new *Catalogue of Palearctic Diptera* published by Akadémiai Kiadó under the direction of two well-known contemporary dipterologists, Á. Soós and L. Papp.

Conceived as a distribution of 14 volumes, this work is the fruit of the co-operation of an international team of outstanding specialists working on the Diptera of the largest and the most important zoogeographic region of our planet.

According to the aims expressed by the board of editors (G. Morge, E. P. Nartshuk, L. Papp, R. Rozkošný, Á. Soós and V. F. Zaitzev), the scope of the catalogue is to synthesize the main taxonomic-nomenclatural and distributional data on the palearctic Diptera species described between 1758 and 1980–1981, thus filling up a serious extant void space of literature, in relation to the recent catalogues of Diptera from other zoogeographic regions, published from 1965 to the present. The necessity and the topicalness of the publication of such a material is justified by the fact that the hitherto sole catalogue concerning these insects, that of Becker, Bezzı, Kertész and Stein, *Katalog der paläarktischen Dipteren* (Budapest, 1903–1907) is already outdated, incomplete and partially obsolete, and other works of synthesis, as Lindner's series of monographs *Die Fliegen der paläarktischen Region* (started in 1924) are also old (at least partially) and non-homogeneous. In addition, the last 80 years have brought so many contributions, changes and revisions, that the publication of a new and actual catalogue became well-nigh essential for dipterologists.

Reasons belonging to the extent and structure of the work, to the "geographic distribution" of the authors and their possible different standpoints in defining the content and limits of the families treated, determined the board of editors to abandon any suprafamilial assignment and any serial numbering of families, in their (and in our too) view these omissions being of no or little theoretical and practical importance. With regard to family succession the editorial board decided to follow (with some minor differences) the one adopted in the important and well-known Opredelitej nasekomych evropejskoy tchasti SSSR, 5 (2) (Leningrad, 1970).

As a rule, for most of families, the material has been published after a complete or partial revision and actualization of taxa, and these revised parts reflect the latest views on the respective families. In the other cases, although this special revision was not made, the catalogue presents the current state of knowledge on the families.

For every taxon, the new catalogue presents both the valid and invalid names, even for the species represented by type-materials that are not palearctic (mentioned in the text as "not Palearctic"). The catalogue also contains the unavailable names, questionable synonyms, names established on incorrect determinations and on subsequently lost type-materials, errors and emendations, which are grouped under "nomina dubia" or "doubtful genera and/or species", all these being treated at the end of each family. Taxa (even the invalid ones) are followed by the author's name, date of publication and/or description, and by the abbreviated main-reference data. For the genera there is specified the type-species, and for the species the type-locality and the distribution.

With regard to genera sequence within the family, the valid names of genera are arranged in alphabetical succession, grouped according to the subfamilies and/or tribes, or in accordance with the current systematic order. The valid names of species and subspecies are also alphabetically listed, while the invalid names of all taxa, as synonyms or "nomina dubia", are listed only chronologically.

For the easier orientation of the reader the different taxa are printed with different typographical characters.

The species distribution is given by means of a judicious system of abbreviations in accordance with the geographic units and the extant political realities. Thus, for the European territory (except USSR) were used the current abbreviations of the country names, and the territory of the USSR was divided into nine large zones (figured also on an annexed map), each formed by smaller regions, codified by the abbreviation of the names of the unional republics. For the other zones, as Asia (except USSR) and North Africa, the names of the countries are given in extenso.

In the ninth volume, compiled by K. Elberg, K. B. Gorodkov, V. G. Kovalev, N. P. Krivosheina, E. P. Nartshuk, V. W. Tanasijshuk, V. F. Zaitzev (USSR), R. H. Foote (USA), G. Morge (GDR), L. Papp, Á Soós (Hungary), A. C. Pont (England), R. Rozkošný and J. Zuska (Czechoslovakia), there are presented 322 valid genera with 72 subgenera, 2759 species and 72 subspecies, assigned to 28 families: *Micropezidae*, *Neriidae*, *Megamerinidae*, *Tanypezidae*, *Strongylophthalmyiidae*, *Psilidae*, *Pyrgotidae*, *Platystomatidae*, *Olitidae*, *Ulidiidae*, *Tephritidae*, *Helcomyzidae*, *Coelopidae*, *Dryomyzidae*, *Sepsidae*, *Sciomyzidae*, *Lauzanidae*, *Celyphidae*, *Chamaemyiidae*, *Cremifantiidae*, *Periscelididae*, *Piophilidae*, *Thyreophoridae*, *Neotriphilidae*, *Pallopteridae*, *Lonchaeidae*, *Odiniidae* and *Agromyzidae*. This volume contains also 215 synonymous generic and 1135 specific names, and nearly 540 emendations, errors, incorrect identifications, "nomina dubia" and "doubtful genera and species".

The tenth volume, compiled by H. Anderson (Sweden), G. Bächli (Switzerland), B. H. Cogan (England), K. B. Gorodkov, N. P. Krivosheina, E. P. Nartshuk (USSR), L. Papp, Á Soós (Hungary) and M. T. Rocha Pité (Portugal), contains 254 valid genera with 90 subgenera, 2222 species and 20 subspecies, belonging to 26 families: *Clusiidae*, *Acartophthalmyidae*, *Heleomyzidae*, *Trixoscelididae*, *Pseudopomyzidae*, *Anthomyzidae*, *Opomyzidae*, *Chyrotomidae*, *Aulacigastridae*, *Stenomicridae*, *Asteiidae*, *Cryptochetidae*, *Sphaeroceridae*, *Tethinidae*, *Diastatidae*, *Drosophilidae*, *Curtonotidae* and *Chloropidae*. In the volume are presented also 209 synonymous generic and 764 specific names together with nearly 540 emendations, errors, incorrect identifications, "nomina dubia" and "doubtful genera and species".

Each volume ends with a rich bibliography and a consistent index of taxa.

These excellent books are of the greatest interest to all specialists working in the field of both the pure and applied Entomology, and we are eagerly waiting for the other volumes to come up.

Justin Ghizdavu

AVIS AUX AUTEURS

La « Revue roumaine de biologie — Série de biologie animale » publie des articles originaux d'un haut niveau scientifique de tous les domaines de la biologie animale : taxonomie, morphologie, physiologie, génétique, écologie, etc. Les sommaires de revues sont complétés par d'autres rubriques, comme : 1 : *La vie scientifique*, qui traite des manifestations scientifiques du domaine de la biologie : symposiums, conférences, etc. 2. *Comptes rendus* des livres de spécialité parus en Roumanie.

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

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

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

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

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

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