

# CRYPTOGAMIE

**R6103A****ALGOLOGIE**

TOME 8 Fascicule 3 1987

LABORATOIRE DE CRYPTOLOGIE  
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE  
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS



PUBLICATION TRIMESTRIELLE

Août 1987

## COMITÉ DE LECTURE

F. ARDRÉ (Paris), Ed. BOUREAU (Paris), P. COMPÈRE (Meise), A. COUTÉ (Paris), G. DUCREUX (Paris), F. GASSE (Paris), P. GAYRAL (Caen), M. GUERLESQUIN (Angers), J.M. JONES (Isle of Man), M.T. L'HARDY (Le Mans), J.W.G. LUND (Ambleside), F. MAGNE (Paris), D. MOLLENHAUER (Frankfurt/Main), G.W. PRESCOTT (Wyoming), C.W. REIMER (Philadelphia), M. RICARD (Paris), J. SEOANE-CAMBA (Barcelone), A. SOURNIA (Roscoff), J.A. WEST (Berkeley).

## MANUSCRITS

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le premier fascicule de chaque tome. Les auteurs sont priés d'adresser leurs manuscrits (en trois exemplaires) au Directeur-Rédacteur de *Cryptogamie, Algologie*, Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle, 12 rue Buffon, 75005 Paris.

Les tirages à part et les illustrations sont à la charge des auteurs.

## ABONNEMENTS A CRYPTO GAMIE

Tome 9, 1988

CRYPTOGAMIE comprend trois sections : ALGOLOGIE, BRYOLOGIE-LICHÉNOLOGIE, MYCOLOGIE.

Abonnement à 1 section :

France	(HT 305 F)	317,20 F
Étranger	HT	335,00 F

Abonnement aux 3 sections :

France	(HT 870 F)	904,80 F
Étranger	HT	950,00 F

Prière de bien vouloir envoyer le montant par chèque bancaire ou par chèque postal libellé à l'ordre de : CRYPTO GAMIE, Algologie, et adressé à :

CRYPTOGAMIE, Algologie  
Laboratoire de Cryptogamie  
12, rue Buffon, 75005 Paris  
C.C.P. : Paris 14 522 31 T

*Cryptogamie, Algologie* est indexé par *Aquatic Sciences Fisheries Abstracts Part 1*, *Biological Abstracts*, *Chemical Abstracts*, *Current Contents*, *Marine Science Contents Tables (F.A.O.)*, Publications bibliographiques du CDST (Pascal).

R 6103A

# CRYPTOGAMIE

## ALGOLOGIE

TOME 8 Fascicule 3 1987

Anciennement REVUE ALGOLOGIQUE

Fondée en 1922 par P. ALLORGE et G. HAMEL

Directeur-Rédacteur : P. BOURRELLY

Éditeur : A.D.A.C.

### SOMMAIRE

L. LECLERCQ. — Végétation et physico-chimie des eaux des rivières naturelles du nord du massif ardennais (Belgique) : typologie des peuplements de diatomées . . . . . 157

R. CHARDARD — L'infrastructure du plasmalemme de *Dunaliella bioculata* (algue verte). Mise en évidence d'un cell-coat; essai de localisation des charges négatives . . . . . 173

E. HEGEWALD and O.L. REYMOND. — The life cycle and taxonomy of *Paradoxia multiseta* Svir. (Chlorophyceae, Chlorococcales), and related taxa . . . . . 191

C.M. PUESCHEL and F. MAGNE. — Pit plugs and other ultrastructural features of systematic value in *Rhodochaete parvula* (Rhodophyta, Rhodochaetales) . . . . . 201

R.E. NORRIS. — Structure and reproduction in *Lenormandiopsis nozawae* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) . . . . . 211

M. CORMACI and G. FURNARI. — *Antithamnion piliferum* sp. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Eastern Sicily (Mediterranean Sea) . . 223

Ouvrages reçus pour analyse . . . . . 233

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle



# CRYPTOGAMIE, ALGOLOGIE

Tome 8 Fascicule 3 1987

---

## CONTENTS

L. LECLERCQ. — Vegetation and physico-chemistry of waters in natural rivers of the northern of the Ardenne (Belgium) : typology of diatoms populations. . . . .	157
R. CHARDARD — Ultrastructure of the plasmalemma in <i>Dunaliella bioculata</i> (Chlorophyta). Evidence for a cell-coat and tentative localization of negative charges. . . . .	173
E. HEGEWALD and O.L. REYMOND. — The life cycle and taxonomy of <i>Paradoxia multiseta</i> Svir. (Chlorophyceae, Chlorococcales), and related taxa . . . . .	191
C.M. PUESCHEL and F. MAGNE. — Pit plugs and other ultrastructural features of systematic value in <i>Rhodochaete parvula</i> (Rhodophyta, Rhodochaetales) . . . . .	201
R.E. NORRIS. — Structure and reproduction in <i>Lenormandiopsis nozawae</i> (Rhodomelaceae, Rhodophyta) . . . . .	211
M. CORMACI and G. FURNARI. — <i>Antithamnion piliferum</i> sp. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Eastern Sicily (Mediterranean Sea) . .	223
Books review . . . . .	233

**VEGÉTATION ET PHYSICO-CHIMIE DES EAUX  
DES RIVIÈRES NATURELLES DU NORD  
DU MASSIF ARDENNAIS (BELGIQUE) :  
TYPOLOGIE DES PEUPELEMENTS DE DIATOMÉES**

Louis LECLERCQ\*

**RÉSUMÉ.**— La typologie que nous proposons, basée sur 430 prélèvements dans 72 stations pendant 3 ans, précise et complète la classification de SYMOENS (1957). Elle est étroitement corrélée à la nature géologique des régions drainées et, incidemment, à la physico-chimie des eaux. Nous décrivons deux assemblages de diatomées : un assemblage à *Eunotia exigua* (Bréb. ex Kütz.) Rabenh., avec 5 variantes trophiques et un faciès saisonnier, dans les eaux acides dystrophes, et un assemblage à *Fragilaria capucina* Desm. var. *lancoolata* Grun. et *Eunotia pectinalis* (O.F. Müll.) Rabenh. var. *minor* (Kütz.) Rabenh., avec 3 variantes trophiques et un faciès altéré, dans les eaux légèrement acides à neutres, oligotrophes à mésotrophes. Les variations saisonnières induisent des modifications parfois très importantes dans la structure des peuplements, certaines stations appartenant à une variante acidophile en hiver puis neutrophile en été. Ces modifications, fondamentales et pourtant mal connues jusqu'à présent, montrent que, pour être suffisamment complète et fiable, une typologie doit être basée sur des prélèvements mensuels ou éventuellement trimestriels, pendant une année au moins et davantage en cas de conditions d'hydraulicité particulières.

En complément à cet article, nous publierons en 1987 un ensemble de 10 préparations microscopiques (numéros de référence dans le texte, au chapitre «Typologie») illustrant chaque variante et faciès, sous le titre général suivant : Diatomées de haute Ardenne (Belgique).

**SUMMARY.** — Our typology, based on 430 samples in 72 stations during 3 years, precise and complete SYMOENS's classification (1957). It is strongly correlated with geological substrate and, incidentally, with physico-chemistry. We describe two diatoms assemblages : the first one with *Eunotia exigua* (Bréb. ex Kütz.) Rabenh., including 5 trophic variants and one seasonal facies, in acid dystrophic waters, the second one with *Fragilaria capucina* Desm. var. *lancoolata* Grun. and *Eunotia pectinalis* (O.F. Müll.) Rabenh. var. *minor* (Kütz.) Rabenh., including 3 trophic variants and one lightly polluted facies, in oligotrophic to mesotrophic, slightly acid or neutral waters. The seasonal variations induce structural changes, in the populations, which are sometimes very important : for example, some stations belong to an acidophil variant of the first assemblage in winter and shift to a neutrophil variant of the second assemblage in summer. Up to now, these fundamental modifications are however unrecognised : they show that it is necessary to dispose of monthly or quarterly samples, during a year at least and more in particular hydraulic conditions to obtain a complete and reliable typology.

\* Centre de recherche et d'éducation pour la conservation de la nature (Centre Marie-Victorin), 21, rue des Écoles, B-6383 Vierves-sur-Viroin - Belgique.

As an addition to this paper, we shall publish in 1987 ten microscope slides, one for each variant and facies (for the numbers of the published samples, see chapter «Typologie»), with this general title : «Diatomées de haute Ardenne (Belgique)».

**MOTS CLÉS :** diatomées, chimie des eaux, hydrobiologie, typologie, rivières naturelles, Ardenne, Belgique.

Le but du présent travail était d'établir une typologie détaillée et d'étudier ensuite la dynamique des peuplements de diatomées de rivières encore intactes, de petite et moyenne importance (0.5 à 4 m de largeur), dans les bassins de l'Amblève, de l'Our, de la Roer et de la Vesdre (figure 1), en relation avec la physico-chimie des eaux et la géologie des régions drainées. A cet effet, 430 prélèvements d'eau et d'algues ont été réalisés dans 72 stations pendant trois années successives.

On trouvera dans FABRI & LECLERCQ (1984) le détail des méthodes et des résultats et la bibliographie complète de cette étude. Nous nous limiterons

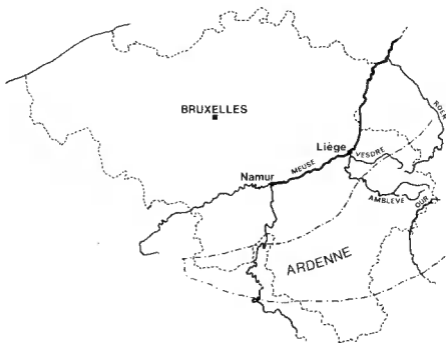


Figure 1 – Carte du territoire belge, avec localisation du massif Ardennais et des 4 bassins prospectés dans leur partie supérieure (Amblève, Our, Roer et Vesdre).

ici à résumer, sous forme d'un tableau physico-chimique et de figures synthétiques, les typologies chimique et algologique que nous avons élaborées et l'effet des variations saisonnières sur les peuplements de diatomées.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le prélèvement d'eau est analysé dans les plus brefs délais pour les paramètres suivants : température, pH, oxygène, conductivité, alcalinité, oxydabilité, chlorures, nitrates, sulfates, calcium, magnésium, potassium, sodium, fer, aluminium, silice, orthophosphates, ammoniacque, nitrites. La méthode statistique des contrastes (Analysis of variance, equal size mixed models : Department of Biomathematics, Univ. California, Los Angeles) a permis de répartir objectivement en classes les teneurs moyennes annuelles de ces paramètres.

A chaque prélèvement d'eau correspond un prélèvement de diatomées réalisé par brossage des faces supérieures de pierres immergées, sur environ 20 cm<sup>2</sup>, nettoyé ensuite à l'acide nitrique à chaud et monté dans une résine d'indice de réfraction élevé (Naphrax). Dans chaque échantillon, 500 valves sont comptées et les résultats sont exprimés en pourcentage d'abondance relative. Les résultats bruts des comptages ont été traités par le Cluster Analysis (méthode de WARD, fusion hiérarchique, distances euclidiennes : Clustan, WISHART, 1978) et par l'analyse en composantes principales (MLAB, KNOTT, 1979).

### PHYSICO-CHIMIE DES EAUX

#### Typologie (tableau I)

D'une manière générale, les eaux naturelles de la région étudiée sont acides à neutres, peu minéralisées, dystrophes à oligo-mésotrophes

Le tableau I permet de déterminer le type d'eau à partir des valeurs moyennes annuelles (3 analyses par an au moins) réparties en classes par la méthode statistique des contrastes. Dans le cas de mesures ponctuelles, on pourra utiliser les valeurs extrêmes, la détermination du type étant cependant plus difficile en raison des recoupements de ces valeurs d'une classe à l'autre. La méthode statistique utilisée fait apparaître la prépondérance de 7 paramètres bien corrélés aux différents types de peuplements de diatomées décrits plus loin sur base d'autres traitements. Ce sont, par ordre d'importance décroissante, le pH, l'alcalinité, les sulfates, le calcium, le magnésium, le fer et l'aluminium. Dans notre étude, les autres paramètres mesurés ne sont pas discriminants. C'est évidemment le cas pour les phosphates, l'ammoniacque et les nitrites, éléments qui induisent des modifications profondes dans les peuplements mais dont les teneurs sont ici toujours nulles ou très faibles puisque seules les stations non polluées ont été retenues au départ.

Le pH détermine 4 types de base : acide avec un pH moyen annuel de 3.6 à 4.5, intermédiaire avec un pH de 4.6 à 5.5, intermédiaire légèrement acide

N° DE GROUPE	PH 4 classes	ALCALINITÉ 6 classes	SULFATES 3 classes	CALCIUM 3 classes	MAGNÉSIUM 1 classe	FER 2 classes	ALUMINIUM 3 classes	
1	3,6- 4,1 ( - ) 3,3- 4,2( 4,3)	0,0- 0,0 ( - ) 0,0- 0,0( - )	11,0-15,0 ( - ) 6,5-15,7(25,3)	1,4- 1,7 ( - ) 0,7- 2,7( 5,5)	0,5- 1,3 ( - ) 0,0- 1,5( 2,3)			acidobiontes
	3,7- 4,4 ( - ) 3,3- 4,6( 5,8)	0,0- 0,3 ( - ) 0,0- 0,0( 2,0)	18,2-27,7 ( 10,3)14,7-23,7(49,0)	3,0- 5,8 ( 2,0) 2,1- 4,2(10,8)	0,9- 1,6 ( - ) 0,1- 2,5( 2,9)	0,0- 2,8 ( - ) 0,0- 2,0( 7,2)	0,4- 1,1 ( - ) 0,1- 1,6( - )	
	4,0- 4,4 ( - ) 3,6- 4,9( 5,8)	0,0- 0,3 ( - ) 0,0- 0,5( 2,0)	14,4-17,6 ( - ) 13,0-19,5(31,8)	3,2- 6,3 ( - ) 2,6- 6,7( 9,5)	0,8- 1,7 ( - ) 0,2- 2,1( 2,3)			
4	4,6- 5,4 ( - ) 3,4- 6,4( - )	0,7- 2,7 ( - ) 0,0- 3,0( 8,0)	9,6-18,0 ( - ) 4,1-22,7(27,3)	2,3- 4,8 ( - ) 1,3- 7,4( - )	0,7- 1,3 ( - ) 0,2- 2,2( 4,0)	0,0- 2,8 ( - ) 0,0- 2,0( 7,2)	0,0- 1,1 ( - ) 0,0- 1,6( - )	acidophiles
	5	4,9- 5,2 ( - ) 4,3- 5,7( - )	0,7- 2,0 ( - ) 0,0- 3,0( 4,0)	18,6-21,8 ( - ) 14,1-20,0(38,3)	5,9- 6,1 ( - ) 2,1- 7,0(10,0)	1,9- 2,8 ( - ) 1,0- 3,1( 4,7)	0,0- 0,5 ( - ) 0,0- 0,2( - )	
6	5,6- 6,5 ( 4,0) 6,4- 7,0( 7,3)	2,8- 5,7 ( 0,0) 0,6-10,0(13,0)	3,8-14,2 ( - ) 1,1-19,4(24,8)	2,5- 4,7 ( - ) 1,1- 5,9( 8,7)	1,0- 1,8 ( - ) 0,0- 2,4( 2,9)	0,0- 0,5 ( - ) 0,0- 0,2( - )	0,0- 0,3 ( - ) 0,0- 1,0( - )	neutrophiles
7	5,7- 6,5 ( - ) 4,6- 6,5( 2,4)	2,9- 5,0 ( - ) 0,0-10,0( - )	20,7-22,2 ( - ) 16,7-25,4( - )	7,9- 8,4 ( - ) 6,0- 9,7(10,6)	2,2- 2,4 ( - ) 1,4- 3,3( 3,5)			
8	6,7- 7,1 ( 5,4) 6,2- 7,0( 7,4)	5,0- 5,7 ( 1,5) 2,0- 8,0(10,9)	2,2- 6,1 ( - ) 1,7- 5,4(10,9)	1,8- 2,1 ( - ) 1,1- 2,7( 4,0)	1,1- 1,6 ( - ) 0,6- 1,7( 2,2)			neutrophiles
9	6,7- 7,1 ( 5,4) 5,7- 7,0( - )	6,0- 8,7 ( - ) 1,0-16,0( - )	7,5- 9,3 ( - ) 0,5-14,3(18,9)	2,4- 4,9 ( - ) 1,7- 5,0( 6,8)	1,2- 1,9 ( - ) 0,6- 2,2( 2,6)	0,0- 0,5 ( - ) 0,0- 0,2( - )	0,0- 0,3 ( - ) 0,0- 1,0( - )	
10	6,9- 7,3 ( 5,5) 6,0- 7,6( - )	9,2-15,3 ( 1,5) 2,0-24,0( - )	3,5- 9,3 ( - ) 0,3-10,3(12,4)	2,2- 7,3 ( - ) 1,9- 7,3( 9,7)	2,1- 3,7 ( - ) 1,4- 4,2( 4,4)			
11	6,9- 7,3 ( - ) 6,6- 7,4( - )	21,0-23,3 ( - ) 1,5-12,0(37,0)	4,3- 7,6 ( - ) 3,2- 8,1( 9,2)	4,4- 5,8 ( - ) 3,5- 6,3( 7,0)	3,4- 4,4 ( - ) 2,2- 6,4( 5,9)			

Tableau I. — Détermination du type chimique à partir des valeurs moyennes annuelles réparties en classes et des valeurs extrêmes des 7 principaux paramètres chimiques. Entre parenthèses : valeurs extrêmes en période de crues très fortes (à gauche) et d'étiage (à droite). Dans les cartouches verticaux : numéros de(s) classe(s). Dernière colonne : types de taxons prédominants.



avec un pH de 5.6 à 6.5, neutre avec un pH de 6.6 à 7.3. Ces types se subdivisent à partir d'autres paramètres (alcalinité, sulfates, calcium, magnésium) en 11 types chimiques étroitement corrélés à la situation géologique des rivières en amont des stations de prélèvement, que la rivière coule sur une seule assise ou, successivement, sur plusieurs. On trouve les types très acides 1 et 2 sur les roches du Revinien 2, les types acides 3 à 5 pour la succession Revinien 2.3 et Salmien, les types légèrement acides 6 et 7 pour la même succession, mais avec un parcours plus bref sur le Revinien 2, les types neutres oligotrophes 8 et 9 sur le Gedinnien et le Siegenien, les types neutres mésotrophes 10 et 11 surtout sur l'Emsien.

L'augmentation progressive du pH et du niveau trophique suit en fait l'échelle stratigraphique, des roches les plus anciennes du Cambrien (Revinien et Salmien) aux plus récentes du Dévonien inférieur (Gedinnien, Siegenien, Emsien). Comme les rivières de la région considérée prennent généralement leur source sur les roches les plus anciennes et coulent vers les plus récentes, la situation est particulièrement adéquate pour une étude typologique et dynamique des peuplements algaux.

### Variations saisonnières

Elles n'existent pratiquement pas dans les eaux les plus acides, sont importantes dans les eaux neutres et très marquées dans les types intermédiaires pour lesquels il n'est pas rare de passer, dans une même station, d'une eau acide en hiver à une eau proche de la neutralité pendant l'étiage estival.

On assiste chaque année, à une augmentation progressive du pH, de l'alcalinité et du fer et à une diminution des sulfates, de l'aluminium et des nitrates de l'hiver à l'automne. Ce sont donc les proportions ioniques qui se modifient alors que la minéralisation globale reste plus ou moins constante sauf quand les débits sont très faibles pendant une longue période : elle peut alors doubler par rapport à la valeur normale (LECLERCQ, 1984a).

## PEUPELEMENTS DE DIATOMÉES

### Typologie (figures 2 et 3)

357 taxons de diatomées, principalement oligotrophes à mésotrophes, composent la flore des rivières étudiées. La structure des peuplements est, le plus souvent, caractérisée par la nette dominance d'un ou de quelques taxons, accom-

Figure 2 (page suivante). — Illustration quantifiée des taxons caractérisant les variantes trophiques et le faciès estival de l'assemblage à *Eunotia exigua*. Chaque valve représentée correspond à 5% d'abondance relative moyenne annuelle. Pour l'identification des taxons, voir fig. 3.

Assemblage à *Eunotia exigua*.

VARIANTE 1

ACIDOPHYTES	ACIDOPHYTES & ACIDOPHYLES	FAIBLEMENT ACIDOPHYLES
NEUTROPHILES OLIGOTROPHES	NEUTROPHILES MESOTROPHES	NEUTRO & TENDANCE ALCAL. ET/OU SAPROPHILES
		AUTRES TAXONS: 1 2

FACIES ESTIVAL

ACIDOPHYTES	ACIDOPHYTES & ACIDOPHYLES	FAIBLEMENT ACIDOPHYLES
NEUTROPHILES OLIGOTROPHES	NEUTROPHILES MESOTROPHES	NEUTRO & TENDANCE ALCAL. ET/OU SAPROPHILES
		AUTRES TAXONS: 3 4

VARIANTE 2

ACIDOPHYTES	ACIDOPHYTES & ACIDOPHYLES	FAIBLEMENT ACIDOPHYLES
NEUTROPHILES OLIGOTROPHES	NEUTROPHILES MESOTROPHES	NEUTRO & TENDANCE ALCAL. ET/OU SAPROPHILES
		AUTRES TAXONS: 2 3

VARIANTE 3

ACIDOPHYTES	ACIDOPHYTES & ACIDOPHYLES	FAIBLEMENT ACIDOPHYLES
NEUTROPHILES OLIGOTROPHES	NEUTROPHILES MESOTROPHES	NEUTRO & TENDANCE ALCAL. ET/OU SAPROPHILES
		AUTRES TAXONS: 3 4

VARIANTE 4

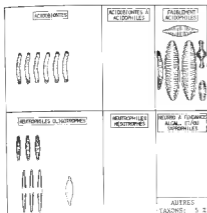
ACIDOPHYTES	ACIDOPHYTES & ACIDOPHYLES	FAIBLEMENT ACIDOPHYLES
NEUTROPHILES OLIGOTROPHES	NEUTROPHILES MESOTROPHES	NEUTRO & TENDANCE ALCAL. ET/OU SAPROPHILES
		AUTRES TAXONS: 7 8

VARIANTE 5

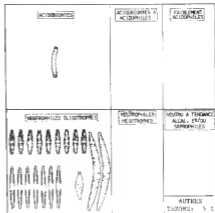
ACIDOPHYTES	ACIDOPHYTES & ACIDOPHYLES	FAIBLEMENT ACIDOPHYLES
NEUTROPHILES OLIGOTROPHES	NEUTROPHILES MESOTROPHES	NEUTRO & TENDANCE ALCAL. ET/OU SAPROPHILES
		AUTRES TAXONS: 8 9

Assemblage à *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Eunotia pectinalis* var. *minor*.

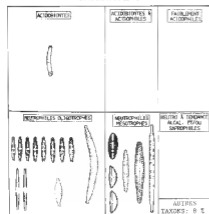
VARIANTE 6



VARIANTE 7



VARIANTE 8



FACIES D'ALTERATION

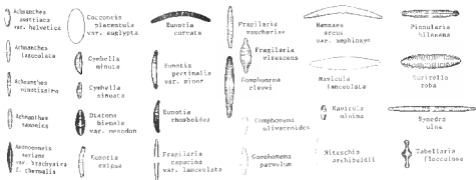
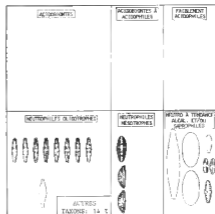


Figure 3. — Illustration quantifiée des taxons caractérisant les variantes trophiques et le faciès d'altération de l'assemblage à *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Eunotia pectinalis* var. *minor*. Chaque valve représentée correspond à 5% d'abondance relative moyenne annuelle.

pagnés de nombreuses espèces peu représentées (jusqu'à plus de 120 dans certaines stations). La richesse floristique peut donc être très élevée alors que la diversité reste faible généralement.

Les moyennes annuelles des abondances relatives des 87 taxons les mieux représentés ont été ordonnées dans un tableau phytosociologique à l'aide de deux analyses multivariées (cluster analysis et analyse en composantes principales : DEPIEREUX & FEYTMANS, 1985) présentées dans LECLERCQ & DEPIEREUX (1987). On y distingue deux assemblages de diatomées, subdivisés en 10 variantes et faciès. Bien qu'il s'agisse d'abondances relatives moyennes annuelles, dont on s'éloigne plus ou moins au fil des saisons, nous avons cependant montré (LECLERCQ, 1984b) que, pour chaque station, le peuplement réel correspondait, à certains moments de l'année, à la composition de la variante à laquelle cette station était rattachée.

Les peuplements moyens retenus ne sont donc pas des assortiments théoriques de taxons obtenus par calcul; ils forment notre typologie en 10 variantes et faciès que nous avons illustrés, de façon très condensée, à partir des 27 taxons les plus abondants et les plus significatifs, aux figures 2 et 3 pour lesquelles chaque valve représentée correspond à 5 % d'abondance relative. Pour la clarté du texte, le patronyme n'accompagne que la première mention de chaque taxon. Le numéro suivant la description des variantes et faciès est celui de la préparation publiée.

#### Assemblage à *Eunotia exigua* (Bréb. ex Kütz.) Rabenh. (fig. 2)

Trouvé dans les eaux dystrophes et oligotrophes, acides, avec une alcalinité nulle ou très faible en été, cet assemblage est caractérisé par la dominance des taxons acidobiontes et acidophiles. Il comprend 5 variantes trophiques et un faciès saisonnier :

— **variante 1** : dominance absolue d'*Eunotia exigua*; type chimique 1, eau très acide avec une alcalinité toujours nulle, sur les roches du Revinien 2 (préparation n° 2527709);

— faciès estival de la variante 1 (plus rarement 5) : dominance d'*Eunotia exigua*, mais développement parfois important du taxon neutrophile *Achnanthes minutissima* Kütz. (taxon différentiel) pendant les étiages estivaux prononcés; type chimique 2, alcalinité généralement nulle à très faible; sur Revinien 2, avec des contacts éventuels avec le Revinien 3, le Salmien et des roches granitiques intrusives (tonalite) (préparation n° 2537709);

— **variante 2** : codominance d'*Eunotia exigua* et *E. rhomboidea* Hust. (taxon différentiel); types chimiques 2 et 3, alcalinité généralement nulle mais des teneurs plus élevées en sulfates et calcium; sur le Revinien 2, dans la partie nord du massif (préparation n° 1397610);

— **variante 3** : dominance d'*Eunotia exigua*, accompagné d'*E. curvata* (Kütz.) Largerst., *E. rhomboidea* et *Anomoeoneis serians* (Bréb. ex Kütz.) P. Cleve var. *brachysira* (Bréb. ex Kütz.) Hust. qui est le principal taxon différentiel; richesse floristique plus élevée; type chimique 4; eaux coulant successivement sur le Revi-

nien 2, 3 et le Salmien (préparation n° 397810);

— **variante 4** : *Eunotia exigua* dominant, *Achnanthes austriaca* Hust. var. *helvetica* Hust. (taxon différentiel) codominant à dominant, *Eunotia rhomboidea*, *Pinnularia hilseana* Janisch; dans les stations les plus minéralisées des types chimiques 3 et 4; dans des eaux coulant successivement sur le Revinien 2, 3 et le Salmien, parfois à proximité de massifs de silex plus ou moins décarbonatés (préparation n° 1437606);

— **variante 5** : *Eunotia exigua* dominant en hiver, codominant avec *Achnanthes minutissima* au printemps et à la fin de l'automne, ce dernier taxon dominant en été autres taxons bien représentés : *Surirella roba* Leclercq, *Fragilaria capucina* Desm. var. *lanceolata* Grun., *Gomphonema parvulum* Kütz., *Nitzschia archibaldii* Lange-Bert.; eaux les plus minéralisées des types chimiques 6 et 7, avec une alcalinité toujours faible mais systématique en été; sources sur Revinien 2 mais trajets plus longs sur le Revinien 3 et le Salmien et, parfois, contacts avec les massifs de silex; la présence constante de *Nitzschia archibaldii* en faible quantité dans certaines stations de cette variante semble indiquer une légère altération liée à la traversée de pâtures (préparation n° 1307706).

**Assemblage à *Fragilaria capucina* Desm. var. *lanceolata* Grun. et *Eunotia pectinalis* (O.F. Müll.) Rabenh. var. *minor* (Kütz.) Rabenh. (fig. 3)**

Caractéristique des eaux oligotrophes à mésotrophes, légèrement acides à neutres, avec une alcalinité pendant toute l'année, cet assemblage est dominé par des taxons neutrophiles, encore associés à l'acidobionte *Eunotia exigua* dans la variante 6. Il comprend 3 variantes trophiques et un faciès d'altération. La présence d'*Eunotia pectinalis* var. *minor*, taxon à tendance acidophile numériquement peu représenté (souvent moins de 5 %) est très constante dans ces trois variantes et est généralement liée à l'abondance de *Fragilaria capucina* var. *lanceolata*. Ce n'est pas le cas du taxon neutrophile codominant, *Achnanthes minutissima*, qui, par son abondance aussi en milieu calcaire, a une amplitude écologique très large et ne peut donc être retenu pour caractériser cet assemblage.

— **variante 6** : proche de la variante 5 mais richesse floristique plus élevée et abondance relative plus faible d'*Eunotia exigua* remplacé par des taxons acidophiles différentiels (*Tabellaria flocculosa* (Roth) Kütz., *Achnanthes saxonica* Krasske, *Eunotia pectinalis* var. *minor*, *Surirella roba* parfois abondant) et des taxons neutrophiles (*Fragilaria capucina* var. *lanceolata*, *Achnanthes minutissima*) qui peuvent devenir dominants en été, dans les eaux les moins minéralisées du type chimique 6; sur les roches du Salmien et du Siegenien 1 (préparation n° 1217806);

— **variante 7** : dominance absolue des neutrophiles, *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Achnanthes minutissima* codominants, *Hannaea arcus* (Ehr.) Patr. (taxon différentiel) abondant, *Gomphonema parvulum*; richesse floristique élevée; types chimiques 8 et 9, eaux neutres les plus oligotrophes dans la région étudiée; sur les roches du Siegenien 2 et 3 et, parfois, celles de l'Emsien (préparation n° 477809);

SYMOENS, 1957	LECLERCQ, 1976	LECLERCQ, 1984 b
Association à <i>Eunotia exigua</i> et <i>Pinnularia subcapitata</i> (eau de type fagnard)	GROUPE 1 fagnard <ul style="list-style-type: none"> <li>— sous-groupe à <i>E. exigua</i></li> <li>— sous-groupe à <i>E. rhomboidea</i></li> <li>— sous-groupe à <i>E. curvata</i></li> </ul> GROUPE 2 intermédiaire <ul style="list-style-type: none"> <li>— sous-groupe à <i>A. austriaca</i> var. <i>helvetica</i></li> <li>— sous-groupe à <i>Surirella roba</i></li> </ul>	Assemblage à <i>Eunotia exigua</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- variante 1 à <i>E. exigua</i> (+ faciès estival à <i>Achnanthes minutissima</i>)</li> <li>- variante 2 à <i>E. rhomboidea</i></li> <li>- variante 3 à <i>E. curvata</i>, <i>Anomoeoneis seriata</i> var. <i>brachystera</i>,...</li> <li>- variante 4 à <i>Achnanthes austriaca</i> var. <i>helvetica</i>,...</li> <li>- variante 5 à <i>Achnanthes minutissima</i>, <i>Surirella roba</i>,...</li> </ul>
Association à <i>Diatoma hiemale</i> et <i>Meridion oivolare</i> (Kurz 1922) Denis 1924. (eau de type ardennais).	GROUPE 3 ardennais <ul style="list-style-type: none"> <li>— sous-groupe à <i>Tabellaria flocculosa</i>, <i>Eunotia pectinabile</i> var. <i>minor</i>, <i>Fragilaria capuina</i>, <i>F. virescens</i>, <i>Achnanthes minutissima</i>,...</li> <li>— sous-groupe à <i>Diatoma mesodon</i>, <i>Navicula rhychocephala</i>, <i>Nitzschia recta</i>,...</li> </ul>	Assemblage à <i>Fragilaria capuina</i> var. <i>lancoolata</i> et <i>Eunotia pectinabile</i> var. <i>minor</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>- variante 6 à <i>Tabellaria flocculosa</i>, <i>Achnanthes saxonica</i>, <i>Surirella roba</i>, <i>Fragilaria virescens</i>,...</li> <li>- variante 7 à <i>Achnanthes minutissima</i>, <i>Ranunculus arcus</i>,...</li> <li>- variante 8 à <i>Achnanthes minutissima</i>, <i>Diatoma mesodon</i>, <i>Gomphonema clevei</i>, <i>Cymbella minuta</i>, <i>Fragilaria vaucheriae</i>,...</li> <li>- faciès d'altération à <i>Achnanthes minutissima</i>, <i>A. lanceolata</i>, <i>Navicula lanceolata</i>, <i>N. minima</i>, <i>Cocconeis plaosentula</i> var. <i>euglypta</i>, <i>Cymbella sinuata</i>,...</li> </ul>

Tableau II. — Comparaison du système de classification phytosociologique de SYMOENS (1957) avec nos groupes définis en 1976 et nos assemblages décrits en 1984.

— variante ■ : dominance d'*Achnanthes minutissima* accompagné de taxons neutrophiles oligotrophes et surtout mésotrophes : *Diatoma mesodon* (Ehr.) Kütz., *Gomphonema clevei* Fricke, *Synedra ulna* (Nitz.) Ehr. (taxons différentiels), *Cymbella minuta* Hilse ex Rabenh., *Fragilaria vaucheriae* (Kütz.) Pet.; type chimique 10 principalement, eaux deux fois plus minéralisées que celles des types 8 et 9; surtout sur les roches du Gedinnien et de l'Emsien (préparation n° 917808);

— faciès d'altération des variantes 7 et 8 : dominance d'*Achnanthes minutissima*, régression des taxons oligotrophes et mésotrophes au profit de taxons alcaliphiles et/ou saprophiles (*Navicula lanceolata* (Ag.) Ehr., *Cocconeis placentula* Ehr. var. *euglypta* (Ehr.) P. Cleve, *Cymbella sinuata* Greg., *Achnanthes lanceolata* (Breb.) Grun., *Navicula minima* Grun., ...) indiquant, dans le cas d'eau naturellement oligotrophes à mésotrophes, une altération liée ici à la traversée de pâtures amendées; types chimiques 10 et 11, eaux plus minéralisées, alcalinité plus élevée; sur Siegenien 3 et Emsien 1; ce faciès est proche de l'association à *Diatoma hiemale* et *Meridion circulare* (Kurz 1922) Denis 1924 (préparation n° 1577709).

### Position phytosociologique des 2 assemblages.

Le tableau II compare, pour le territoire étudié, la classification de SYMOENS (1957), un premier classement résultant d'une analyse multivariée sur nos données d'une année (LECLERCQ, 1976) et notre classification finale basée sur 3 années de prospection.

Les variantes 2 et 3 de notre assemblage à *Eunotia exigua* peuvent être considérées comme la variante type de l'association à *Eunotia exigua* et *Pinnularia subcapitata* décrite par SYMOENS en 1957 pour laquelle nous décrivons 3 nouvelles variantes trophiques et un faciès saisonnier.

Après une année d'étude (1976), nous avons mis en évidence un groupe intermédiaire entre les types fagnard et ardennais (groupe 2), qui se trouve finalement inclus dans l'assemblage à *E. exigua* (variantes 3 et 5).

L'assemblage à *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Eunotia pectinalis* var. *minor*, d'eau oligotrophe à mésotrophe, à tendance légèrement acide ou neutre, est entièrement nouveau; il comprend 3 variantes trophiques qui correspondent à notre premier sous-groupe du groupe 3 (type ardennais pauvre, peu minéralisé, LECLERCQ 1976) et se situe entre l'association à *Eunotia exigua* et *Pinnularia subcapitata* Symoens 1957 et l'association à *Diatoma hiemale* et *Meridion circulare* (Kurz 1922) Denis 1924. Cette dernière, citée dans SYMOENS (1957) pour les eaux de type ardennais au sens large, semble en fait cantonnée, dans le nord du massif ardennais, à des eaux neutres légèrement altérées, d'un niveau trophique supérieur à celui des types naturels (type ardennais pauvre eutrophisé: second sous-groupe du groupe 3 et faciès d'altération). Elle caractérise plutôt des eaux de type ardennais naturellement plus riche, en dehors de la partie nord du massif Ardennais.

## VARIATIONS SAISONNIERES DANS LES 8 VARIANTES ET LES 2 FACIES

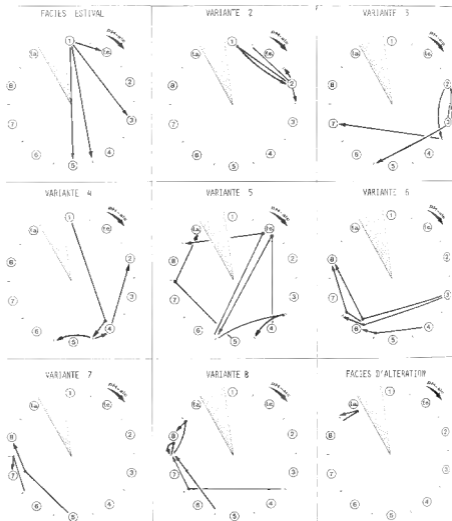


Figure 4. — Représentation graphique des variations saisonnières des peuplements de diatomées réels comparativement aux variantes et faciès moyens des 2 assemblages. Dans chaque cadran (un par variante ou faciès moyen), les 8 variantes et les 2 faciès moyens sont disposés suivant l'augmentation progressive du pH et de l'alcalinité marquée par la flèche courbe en haut à droite des cadrans. Le sens des autres flèches indique l'évolution des peuplements du printemps à l'été puis à l'automne. La variante 1 qui ne présente aucune variation saisonnière n'est pas figurée.



### Variations saisonnières (figure 4).

Grâce à la rapidité de réaction des diatomées, les modifications saisonnières des peuplements suivent de près les modifications physico-chimiques, même si elles sont de courte durée. Ainsi, les crues momentanées d'été et l'augmentation hivernale des débits ont le même effet : elles provoquent, surtout dans les variantes intermédiaires, un retour à des conditions plus acides et une augmentation des taxons acidobiontes et acidophiles dans les relevés. Inversement, les faibles débits d'été et les périodes d'étiage favorisent la prolifération de taxons neutrophiles.

Cet équilibre précaire, au niveau du pH et de l'alcalinité, caractérise les eaux oligotrophes très peu tamponnées de la région étudiée et induit des modifications, parfois spectaculaires, dans la structure des peuplements qui, pour une même station, peuvent s'apparenter à une variante acide en hiver et à une variante neutre très différente en été.

La figure 4 illustre ces modifications de façon graphique : sur un axe circulaire ouvert, les 10 variantes et faciès moyens sont disposés selon l'ordre croissant des valeurs moyennes de pH et d'alcalinité qui les caractérisent. On trouve ainsi l'assemblage à *Eunotia exigua* dans la moitié droite du cercle et l'assemblage à *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Eunotia pectinalis* var. *minor* dans la moitié gauche.

Les modifications des peuplements réels pour toutes les stations dont les peuplements moyens appartiennent à une des variantes moyennes, sont symbolisées par des flèches dont le sens indique le passage de l'hiver à l'été puis à l'automne. On remarquera que, dans la plupart des cas, le peuplement réel correspond au peuplement moyen à certains moments de l'année. Il peut aussi, dans certains cas, se situer entre deux des variantes décrites. On se reportera aux figure 2 et 3 pour juger de l'importance des modifications physiologiques des peuplements.

Si les variations saisonnières peuvent sembler importantes pour toutes les variantes acides, une rectification s'impose cependant : les passages des variantes acidophiles (1-5) aux variantes neutrophiles (6-8) sont rares dans les variantes 1 à 4 car ils sont limités aux périodes de sécheresse exceptionnelles. On peut même observer des évolutions inverses vers des types plus acides au cours des années très pluvieuses. Par contre, pour la variante 5, moins acide, les peuplements réels passent régulièrement d'un assemblage à l'autre (variante 5 à 8 par exemple).

Pour l'assemblage à *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Eunotia pectinalis* var. *minor*, la variante 6 présente les variations les plus importantes (passages des variantes 3 à 6, 4 à 6, 3 à 8, 6 à 8).

Les variantes 5 et 6 sont donc véritablement des « plaques tournantes » qui assurent la transition entre les deux assemblages.

Les modifications sont moins marquées dans les variantes 7 et 8 d'eau neutre. Elles sont très faibles dans le faciès d'altération ce qui témoigne d'un certain effet tampon d'une contamination continue, faible mais suffisante pour masquer l'effet des modifications saisonnières.

## CONCLUSIONS

La prospection détaillée des rivières du nord du massif Ardennais nous a permis d'établir une typologie physico-chimique et algologique qui précise et complète la classification de SYMOENS (1957).

L'association à *Eunotia exigua* et *Pinnularia subcapitata* se trouve ainsi incluse dans l'assemblage à *Eunotia exigua* qui compte 5 variantes trophiques et un faciès saisonnier. Nous décrivons ensuite un nouvel assemblage d'eau neutre oligotrophe avec 3 variantes trophiques (assemblage à *Fragilaria capucina* var. *lanceolata* et *Eunotia pectinalis* var. *minor*). Il comble le hiatus important qui existait entre l'association à *Eunotia exigua* et *Pinnularia subcapitata* Symoens 1957 et l'association à *Diatoma hiemale* et *Meridion circulare* (Kurz 1922) Denis 1924 d'eau plus mésotrophe.

Les prélèvements mensuels ont mis en évidence des variations saisonnières très importantes des caractéristiques physico-chimiques des eaux et de la structure des peuplements de diatomées, surtout pour les rivières coulant successivement sur plusieurs assises géologiques. Dans la majorité des cas, on assiste, de l'hiver à l'été puis à l'automne, à une évolution des conditions dystrophes à oligotrophes ou des conditions oligotrophes à des conditions mésotrophes.

Ces variations, peu étudiées jusqu'à présent ou souvent minimisées dans la littérature sur les eaux courantes, remettent en cause la validité de typologies qui seraient basées sur un seul prélèvement, sans relevé géologique précis. Nous pensons que des prélèvements trimestriels, ou mieux mensuels, s'imposent si l'on veut aboutir à une typologie aussi complète et fiable que possible. Enfin, dans le cas où un tel travail aurait été réalisé, nous avons montré qu'une typologie pouvait être valablement basée sur des moyennes annuelles des abondances relatives et des valeurs des paramètres physico-chimiques.

C'est par ce type d'étude que l'on pourra cerner au mieux l'auto-écologie, encore mal connue, de nombreux taxons rares ou communs, tenter de comprendre la dynamique des peuplements qu'ils forment et disposer ainsi d'un système de référence fiable pour l'étude des altérations dues aux pollutions.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction de M. R. Schumacker, professeur à l'Université de Liège (Station scientifique des Hautes-Fagnes, Mont-Rigi) puis chez M. J. L. De Sloover, professeur aux Facultés universitaires N. D. de la Paix à Namur (laboratoire de Botanique). Nous les remercions pour leur aide et leurs conseils.

## BIBLIOGRAPHIE

- DEPIEREUX E. & FEYTMANS E., 1985 - Modification progressive de la structure des peuplements d'invertébrés benthiques en fonction de la qualité de l'eau de l'Ourthe et de la Lesse (Meuse belge). *Acta Oecologica Appl.* 6 (2) : 81-98.

- FABRI R. & LECLERCQ L., 1984 – *Étude écologique des rivières du nord du massif Ardennois (Belgique) : flore et végétation de diatomées et physico-chimie des eaux. 1. Contexte mésologique. Méthodes. Analyses physico-chimiques. Synthèse taxonomique, écologique et floristique. Iconographie. Bibliographie.* Robertville, Stat. scient. Hautes-Fagnes, 379 p., 33 pl. h. t.
- KNOTT G.D., 1979 – A mathematical modeling tool. *Computer Program in Biomedicine*, 10 : 271-280.
- LECLERCQ L., 1976 – *Étude des qualités biologiques et physico-chimiques des rivières et ruisseaux ardennais des bassins de la Vesdre, de la Roer, de l'Amblève et de l'Our (plateaux de la Baraque Michel, d'Elsenborn, de Losheim et de Saint-Vith).* Rapport I.R.S.I.A., 31 p.
- LECLERCQ L., 1984a – Composition chimique des eaux des rivières oligotrophes de haute Ardenne (Belgique) et ses variations saisonnières. *Physio-Géo* 9 : 139-152.
- LECLERCQ L., 1984b – *Étude écologique des rivières du nord du massif Ardennois (Belgique) : flore et végétation de diatomées et physico-chimie des eaux. 2. Typologie des milieux naturels.* Robertville, Stat. scient. Hautes-Fagnes, 5 + 329 p., 6 fig. & 4 tabl. h. t.
- LECLERCQ L. & DEPIEREUX E., 1987 – Typologie des rivières oligotrophes du massif Ardennois (Belgique) par l'analyse multivariée de relevés de diatomées benthiques. *Hydrobiol.*, sous presse.
- SYMOENS J.-J., 1957 – Les eaux douces de l'Ardenne et des régions voisines : les milieux et leur végétation algale. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 89 : 111-314, 11 photos h. t.
- WISHART D., 1978 – *Cluster analysis package.* Edimburg Univ.



**L'INFRASTRUCTURE DU PLASMALEMME  
DE *DUNALIELLA BIOCULATA* (ALGUE VERTE)  
MISE EN ÉVIDENCE D'UN CELL-COAT;  
ESSAI DE LOCALISATION DES CHARGES NÉGATIVES**

R. CHARDARD\*

**RÉSUMÉ.** — L'observation au M.E. de l'Algue verte unicellulaire *D. bioculata* Butcher révèle la présence d'un revêtement fibreux qui recouvre le feuillet externe du plasmalemme. Ce «cell-coat» est constitué de fibrilles plus ou moins longues (25-200 nm) disposées irrégulièrement à la surface cellulaire; elles sont cependant moins denses que celles observées dans les cellules animales.

Les différentes techniques cytochimiques utilisées suggèrent que ces fibrilles seraient de nature glycoprotéiques. Les charges négatives localisées à leur niveau seraient dues, au moins en partie, à la présence d'acide sialique qui a été mis en évidence par des méthodes chimiques, mais dont la concentration reste cependant très faible.

**SUMMARY.** — Electron microscopy of the unicellular green alga *D. bioculata* Butcher shows the presence of a fibrous coat on the external lamella of the plasmalemma. The cell-coat consists of 25-200 nm long fibrils placed irregularly on the cell surface. They are however less dense than in animal cells.

Various cytochemical tests suggest the fibrils to be glycoproteic. The negative charges on fibrils are due, at least partly to sialic acid which can be chemically detected, although present in very low concentration.

**MOTS CLÉS :** Chlorophyta, *Dunaliella bioculata*; microscopie électronique; plasmalemme; «cell-coat»; charges négatives; protéoglycanes; acide sialique.

### INTRODUCTION

La structure de la membrane cellulaire des cellules animales est maintenant bien connue, à la suite d'études faites au ME sur de nombreux types cellulaires à l'aide de divers réactifs et techniques. Ces études ont montré que la surface cellulaire est limitée extérieurement par une couche fibrillaire plus ou moins épaisse appelée glycocalyx ou «cell-coat». Les études cytochimiques ont précisé la nature chimique de ces fibrilles : ce sont des molécules de glycoprotéines

\* Laboratoire de Biologie végétale, Faculté des Sciences, B.P. 347, 51062 Reims.

Laboratoire de Physiologie cellulaire, 12 rue Cuvier, 75005 Paris.

c'est-à-dire des protéines filamenteuses portant latéralement des glucides; accessoirement, on rencontre des glycolipides. Dans la cellule végétale, la situation est différente car la membrane est recouverte par une paroi de nature pecto-cellulosique qui la protège, mais aussi la rend difficilement accessible aux réactifs et aux investigations directes, sauf chez certains organismes ou dans certaines circonstances : champignons Myxomycètes (RYTER et HELLIO, 1980); algues Volvocales : *Dunaliella tertiolecta* (OLIVEIRA et al., 1980); Ulvales : *Enteromorpha prolifera* (LAUR et JONSSON, 1983); protoplastes de végétaux supérieurs (CHARDARD, 1984); Cyanophycées : *Anabaena* (De VECCHI et GRILLI CAIOLA, 1986).

Pour préciser la structure du « cell-coat » des cellules végétales, la nature des molécules responsables des charges négatives, leur localisation à la surface de la cellule, nous avons étudié la surface cellulaire de l'Algue *Dunaliella bioculata* Butcher qui présente la particularité de ne pas posséder de paroi. Les résultats obtenus avec ce matériel sont rapportés dans cette Note.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Dunaliella bioculata* (Culture collection of Algae and Protozoa Cambridge) est cultivée au laboratoire en milieu artificiel (GRIZEAU et al., 1982) à la température de la pièce (20-23°C). La lumière est fournie par des tubes fluorescents (Intensité lumineuse moyenne : 20 W.m<sup>-2</sup>); le régime lumineux est de 16 heures de lumière et 8 h d'obscurité.

#### Traitement pour le M.E.

Les cellules sont fixées par le glutaraldéhyde (GA) 1,75 à 3,5 % (provenant d'une ampoule à 70 %) dissous dans un des milieux suivants :

- milieu de culture lui-même (pH : 7,2)
- cacodylate de Na (0,05 à 0,1 M), pH 7,2 + NaCl 0,5 M
- cacodylate de Na + saccharose (0,25 à 1 M) (EVANS et HOLLIGAN, 1972)
- cacodylate de Na + paraformaldéhyde suivant KARNOVSKY (1965)
- tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 + mannitol 0,9 M pendant 1h30 à 4°C
- tris-maélate 0,2 M pH 5,4 + sorbitol 1,2 M (avec la neuraminidase).

Après 3 lavages dans le milieu tamponné hypertonique (à 4°C), les cellules sont soit post-fixées directement par OsO<sub>4</sub> 1%, soit traitées par les différents réactifs décrits ci-dessous, puis après lavage, post-fixées par OsO<sub>4</sub> pendant 1 à 12 h à la température de la pièce.

Après lavage rapide, les cellules sont alors collectées par centrifugation, enrobées dans la gélose, déshydratées par l'éthanol puis par l'oxyde de propylène et incluses dans l'épon. Les coupes sont confectionnées avec l'ultra-microtome REICHERT OMU 2 et observées avec le microscope électronique JEM 100 C à 80 KV.

**Traitements utilisés pour la mise en évidence du «cell-coat»**

- coloration classique des coupes par l'acétate d'uranyle-plomb suivant VENABLE et al. (1965).
- traitement au ferro-osmium suivant HEPLER (1980).
- traitement PATAG d'après THIERY (1967).
- emploi de traceurs : peroxydase de racine de raifort (HRP Sigma, type II) dissoute dans le milieu de culture à la concentration de 4 mg par ml et appliquée pendant des temps variant de 0h30 à 3h. L'activité de la peroxydase a ensuite été révélée par le tétrachlorure de diaminobenzidine (DAB 4 HCl) (Sigma) et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suivant la technique de GRAHAM et KARNOVSKI (1966).

**Essais de localisation des charges négatives par différentes molécules polycationiques.**

- bleu alcyan 8 G (Michrome n° 24) GURR (BA) suivant NILSSON et BEHNKE (1971)
- rouge de ruthénium (RR) (0.1 %) suivant LUFT (1966)
- hydroxyde de fer colloïdal (HFC) d'après NICOLSON (1972) (modification de la technique de GASIC et al., 1963-1968)
- ferritine cationisée (FC) (ferritine couplée avec le N,N'-diméthyle-1,3-propane-diamine (DMPA), Sigma lot 20 F 80603) appliquée sur les cellules vivantes en milieu hypertonique et suivie d'une fixation par le GA sans lavage préalable (DANON et al., 1972).

**Recherche sur la nature du cell-coat.**

- Action de la pronase B à la concentration de 400 µg/ml, pendant des temps variant de 15 à 60 minutes, à la température de 26°C, sur des cellules vivantes ou fixées préalablement par le GA. Après lavage, les cellules sont traitées par FC ou par HFC.
- Action de la neuraminidase (Nanase) (Sigma, type VIII, lot 129 C 8055-1) à la concentration de 1 à 5 U par ml de milieu contenant les cellules vivantes; ensuite traitement par HFC ou par FC (GASIC et al., 1963). La Nanase a été utilisée soit dissoute dans le tampon acétate 0,1 M pH 5,4 rendu hypertonique par NaCl (0,5 M), soit dans le tampon tris-maléate à même pH.

**Dosage des acides sialiques.**

Le dosage des acides sialiques a été effectué à partir de cellules qui ont été traitées suivant deux conditions :

1 - Les cellules ont été fixées pendant 36h à 4°C par GA 3,5 % dissous dans le milieu de culture, lavées puis déshydratées par l'éthanol souvent renouvelé jusqu'à l'élimination complète des pigments.

2 - Les cellules ont été placées directement dans l'éthanol 70 % puis traitées comme précédemment.

Dans les deux cas, on a appliqué la méthode de WARREN (1959) pour la recherche de l'acide sialique par action de l'acide périodique-acide barbiturique

et la lecture de la densité optique au spectrophotomètre à  $\lambda = 549$  nm. Une gamme étalon contenant une quantité connue d'acide sialique a été réalisée et a permis d'évaluer la concentration d'acide sialique provenant des cellules.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Présence d'un «cell-coat».

L'observation au ME du plasmalemme de *Dunaliella* après fixation par le GA dans certaines conditions dépendant notamment du tampon et de la substance osmorégulatrice (les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant comme solution tampon le milieu de culture lui-même ou le cacodylate-saccharose à pH 7,2) montre, après coloration par l'acétate d'uranyle-plomb, un empâtement à peu près continu du feuillet externe du plasmalemme sur 20 à 30 nm d'épaisseur; cette technique ne permet pas de préciser sa structure. Avec le traitement par le ferro-osmium (HEPLER, 1980), la structure du plasmalemme est plus grossière, mais révèle, sur le feuillet externe des fibrilles courtes et denses (fig. 4, flèches).

### Action des traceurs.

La peroxydase (HRP) est une enzyme de PM assez élevé (= 40.000 d) qui, en elle-même n'est pas visible au ME; mais lorsque elle est fixée par le GA, puis révélée par  $H_2O_2$  et un dérivé de la benzidine : la DAB-4-HCl, elle catalyse la formation d'un polymère opaque aux électrons après action de  $OsO_4$ .

En utilisant la peroxydase comme traceur, on peut mettre en évidence, chez *Dunaliella*, une couche opaque aux électrons, à la limite du cytoplasme (par cette technique, on ne peut révéler le plasmalemme) (fig. 2), de 20 à 30 nm d'épaisseur; sa limite interne est nette, alors que la limite externe est plus irrégulière.

Le dépôt noir observé sur le plasmalemme indique donc la localisation de l'enzyme adsorbée par une couche surmontant le feuillet externe du plasmalemme dont la structure n'apparaît pas avec cette technique. Cependant cette réaction n'a aucune signification quant à la nature chimique des fibrilles du «cell-coat»; les témoins, qui n'ont pas été en contact avec la peroxydase, ne montrent aucun précipité, ce qui indique également l'absence de peroxydase endogène (fig. 3).

### Techniques cytochimiques

La réaction PATAG (THIÉRY, 1967) met en évidence la structure de ce «cell-coat», en même temps qu'elle apporte une précision sur sa nature chimique (fig. 5). Elle montre en effet un revêtement dense de fibres assez courtes (30-40 nm) dont la structure fine, avec cette technique, reste imprécise par suite de leur densité (fig. 6, rfc) et des fibrilles plus longues (100-200 nm), au trajet sinueux, dispersées à la surface du plasmalemme (fig. 6, fl). La longueur mesurée ne représente pas la longueur réelle, car la taille des grains d'argent diminue la résolution et empêche de suivre leur trajet d'une manière précise (fig. 5, 6, 7 et 8).



Ces diverses techniques montrent que *Dunaliella* possède un plasmalemme recouvert d'un revêtement fibreux constitué de deux sortes de fibrilles : les unes courtes, serrées et abondantes se présentent comme un empatement du feuillet externe du plasmalemme dont la structure est ainsi difficile à mettre en évidence; les autres, fines, longues et moins nombreuses sont disposées de place en place. La surface cellulaire de *Dunaliella* ressemble donc à un tapis à poils ras duquel émergent des poils «longs». Ce revêtement fibreux est rarement rencontré chez les cellules végétales, car la présence d'une paroi gêne souvent l'observation du plasmalemme; il n'a été signalé que chez *Dunaliella tertiolecta* (OLIVEIRA et al., 1980). Il est présent chez la plupart des cellules animales et a reçu le nom de glycocalyx puis de «cell-coat». L'usage a privilégié l'emploi de ce dernier terme. Dans les cellules prélevées dans le tissu, il reste mince (50-100 Å); dans quelques catégories de cellules où le plasmalemme est directement en contact avec le milieu, le «cell-coat» présente un développement important (épaisseur : 200-1000 Å) : unicellulaires (*Amoeba*, *Trypanosoma*, *Gregarina* (SCHREVEL et al. 1979); cellules isolées (érythrocytes, LUFT, 1976); cellules présentant un bord libre (entérocytes, THIÉRY et RAMBOURG, 1974; cellules du rein, LUFT, 1976), etc.

Le «cell-coat» de *Dunaliella* n'est cependant pas rigoureusement analogue à celui des cellules animales. L'association des fibrilles courtes et longues semble assez originale. La structure la plus proche rencontrée dans les cellules animales se trouve chez *Amoeba proteus* où le «cell-coat» comprend deux parties : «amorphous layer» et «fuzzy layer» (SCHREVEL et al., 1979). On remarquera toutefois que les fibrilles de *Dunaliella* sont plus fines que celles d'*Amoeba* (dont le diamètre est compris entre 100 et 600 Å) et moins longues et moins denses que celles des entérocytes où elles peuvent atteindre 500 à 2000 Å de long.

Du point de vue chimique, la réaction positive du test PATAG au niveau des fibrilles, caractérisée par la présence de grains d'argent absents chez les témoins (fig. 9) confirme d'une part l'existence d'un revêtement fibreux et d'autre part signale la présence de polysaccharides sur les fibrilles.

#### Essais de localisation des charges négatives.

Dans les cellules animales, les fibrilles du «cell-coat» sont des glycoprotéines portant des acides sialiques (MATOSKA et SIRACKY, 1980; NICOLSON, 1973) dont les groupements acides sont responsables des charges négatives détectées à la surface du plasmalemme et qui peuvent être révélées en utilisant de petites molécules cationiques (bleu alcyon, rouge de ruthénium) ou des complexes polycationiques tels que l'hydroxyde de fer colloïdal (HFC) ou la ferritine cationisée (ferritine-DMPA).

A la différence de ce qu'ont obtenu d'autres auteurs (OLIVEIRA et al. 1980; NILSSON et al., 1971), le BA nous a toujours donné des résultats négatifs, quelles que soient les conditions utilisées. Le RR, par contre, appliqué suivant la technique de LUFT (1966) met en évidence un revêtement dense aux électrons, de 40 à 80 nm d'épaisseur, de forme irrégulière, dans laquelle on recon-

naît, suivant les incidences de la coupe, des pyramides, des piliers, ou même parfois un dépôt continu (fig. 19). Sa structure est homogène. On peut penser que les fibrilles n'apparaissent pas avec cette technique parce qu'elles sont agglomérées sous l'effet des charges positives du RR à qui sa petite taille moléculaire permet de pénétrer jusqu'à la base des fibrilles (fig. 20). Certaines coupes subtangentes du plasmalemme (fig. 18, en bas de la figure) montrent une structure en «nid d'abeilles», comme si les fibrilles étaient localisées sur le plasmalemme suivant un dessin géométrique. Il est plus vraisemblable que ces figures sont le résultat des réactions entre les charges négatives des fibrilles et les charges positives du marqueur.

Avec la ferritine cationisée (FC), on observe également un marquage discontinu de la surface cellulaire : des agrégats de grains de ferritine sont déposés de place en place sur le plasmalemme (fig. 10, flèches), avec cependant une certaine variabilité suivant les cellules ou les régions cellulaires : parfois toute la cellule est couverte par de tels agrégats disposés à intervalles réguliers (fig. 10); sur d'autres cellules, ces agrégats sont localement abondants et peuvent même confluer alors que le reste de la cellule en est dépourvu : enfin d'autres cellules n'en présentent aucun.

L'examen à plus fort grossissement de ces agrégats montre que les granules de ferritine ne sont pas déposés directement sur le plasmalemme, mais à une certaine distance de celui-ci, de l'ordre de 50 à 100 nm, comme si les charges négatives avec lesquelles ils réagissent étaient localisées uniquement à l'extrémité des fibrilles «longues», dont on soupçonne la présence dans certains cas (fig. 11, flèches). Cet aspect, différent de celui observé après d'autres marqueurs, appelle quelques commentaires :

— **Les agrégats de ferritine.** Ils peuvent être interprétés comme le résultat de l'attraction des charges positives de la molécule de FC sur les groupes électro-négatifs situés à l'extrémité des fibrilles «longues».

— **Les différences de marquage entre le RR et la FC.** La réaction positive avec le RR implique l'existence de charges négatives sur toute la longueur des fibrilles, alors que la localisation des molécules de ferritine indique des charges négatives uniquement à leur extrémité. On peut expliquer ces différences en admettant qu'elles sont dues à la taille des molécules du marqueur. En effet, la FC est une grosse molécule organique qui peut avoir des difficultés à atteindre la base des fibrilles, alors que la molécule de RR, de relativement petite taille, est plus apte à parvenir à leur base.

L'hydroxyde de fer colloïdal (HFC) appliqué suivant la technique de NICOLSON (1972), se dépose sur le plasmalemme en formant un liseré très dense, dû à la diffraction des électrons par les molécules de fer. A plus fort grossissement ( $\times 60.000$ , fig. 13), on voit que ce liseré n'est pas une structure simple mais qu'il est formé en réalité d'un film continu directement appliqué sur le plasmalemme et de dépôts irréguliers situés à une certaine distance de lui, auquel ils sont reliés par des piliers. La réaction avec HFC est considérée comme l'une des plus spécifiques des charges négatives (GASIC et al. 1968); les résultats obtenus avec cette méthode sont donc précieux : ils indiquent que chez *Durva-*

*liella*, les charges négatives sont réparties aussi bien sur les fibrilles «courtes» que sur les fibrilles «longues». On doit cependant tenir compte que le pH très bas (1,6) auquel réagit HFC n'est pas favorable à une bonne conservation des structures et peut ainsi provoquer des distorsions dans la répartition des charges négatives.

Malgré certaines divergences de détail dans les résultats obtenus avec les différentes techniques, on peut conclure que les fibrilles qui forment le «cell-coat» de *Dunaliella* portent des charges négatives dues vraisemblablement à la présence de fonctions acides, comme chez les cellules animales et chez certaines cellules végétales (HELLIO et RYTER, 1980; OLIVEIRA et al., 1980; LAUR et JONSSON, 1983; CHARDARD, 1984; DE VECCHI et CAIOLA, 1986). Toutes les cellules ne présentent pas le même aspect sans doute parce que la présence des fibrilles ainsi que leur nature chimique sont sujettes à variations, en rapport avec l'état physiologique des cellules et plus particulièrement avec les étapes de renouvellement du plasmalemme.

### Nature chimique des fibrilles.

#### Action de la pronase

Pour connaître la nature chimique des fibrilles, savoir si elles sont glycoprotéiques ou glycolipidiques, nous avons fait agir la pronase B sur les cellules vivantes (il n'y a pas d'effet sur les cellules fixées) pendant 15 à 60 minutes; après lavage, elles ont été traitées par FC. On constate qu'après des temps «courts» (30 mn), le marquage est encore présent (fig. 14), mais d'aspect différent de celui observé normalement sur les cellules non traitées par la pronase (fig. 10 et 11) : les grains de ferritine forment un dépôt mince, presque continu, déposé directement sur le plasmalemme, sans formation d'agrégat important. Pour expliquer cette localisation on doit admettre que les charges négatives libérées par l'attaque de la fibrille protéique sont adsorbées par d'autres composés membranaires ou bien que l'hydrolyse des fibrilles «longues» rend accessible aux marqueurs électropositifs les sites négatifs des fibrilles «courtes».

Après des temps plus longs (60 mn), aucun marquage n'apparaît (fig. 15), indiquant que les fibrilles ont disparu. On peut donc conclure que les fibrilles hydrolysées par l'enzyme sont de nature protéique.

#### Action de la neuraminidase (Nanase)

Après action de la Nanase en tampon acétate à pH 5,4, on observe une simplification de la structure membranaire, notamment une disparition du «cell-coat», mais aussi une mauvaise conservation des autres constituants cellulaires et du plasmalemme. Les cellules témoins traitées par le tampon acétate seul à pH 5,4 meurent en 30 mn. Un autre tampon, le tris-maléate, essayé à ce même pH, produit seulement un arrêt de la motilité cellulaire et se montre ainsi moins défavorable. Nous avons donc utilisé la Nanase dissoute dans le tampon tris-maléate sur les cellules vivantes, suivi d'un traitement par FC ou par HFC (dans ce dernier cas, après fixation). Les résultats obtenus avec ces deux marqueurs ne sont pas concordants : après HCF (fig. 16), un liseré dense dû aux molécules

ferriques entoure encore la membrane; il est cependant plus fin que chez les témoins (comparer les fig. 12 et 16). Après action de la FC par contre, on ne distingue plus aucun marquage par la ferritine, ce qui signifierait une disparition des charges négatives par hydrolyse de l'acide sialique (fig. 17), si la technique était entièrement sûre. Mais la structure caractéristique du plasmalemme a également disparu au cours de ce traitement, indiquant que l'on est en présence de cellules «pelées» sous l'action de l'enzyme ou du tampon au pH utilisé. L'action de la Nanase ne donne donc pas de renseignements significatifs quant à la nature chimique des molécules porteuses des charges négatives.

En conclusion des études cytochimiques entreprises, on peut dire que les cellules de *Dunaliella* sont entourées par un «cell-coat» fibrillaire dont les constituants sont des fibrilles «courtes» et «longues» de nature vraisemblablement glycoprotéique, c'est-à-dire constituées de protéines structurales plus ou moins longues portant latéralement des glucides (bien que la technique de RAMBOURG (1967) à l'acide phosphotungstique en milieu très acide, qui détecte les groupements hydroxyles des glycoprotéines, ait donné des résultats négatifs) et des charges négatives dues sans doute à des fonctions acides. Dans les cellules animales, c'est l'acide sialique qui tient ce rôle (MATOSKA et SIRACKY, 1980). Nous avons donc essayé de caractériser chimiquement cette substance chez *Dunaliella*.

### Recherche de l'acide sialique

Elle a été effectuée par la méthode de WARREN (1959) au periodate-acide barbiturique qui a fait ses preuves dans l'étude de la cellule animale et dans certaines cellules végétales (LAUR et JONSSON, 1983).

Les résultats obtenus par la lecture au spectrophotomètre de la densité optique (DO) à  $\lambda = 549$  nm sont les suivants :

	Condition 1 (cellules fixées par le GA)	Condition 2 (cellules fixées par l'éthanol)
lecture au temps $t_0$ de la DO	0,038	0,016
lecture au temps $t_1$ (après 2 mn) de la DO	0,037	0,018

On peut expliquer les différences obtenues entre les conditions 1 et 2 en admettant que le GA utilisé en 1 préserve mieux les glycoprotéines que l'éthanol, ce qui est confirmé par les électrographies. Par comparaison avec la gamme étalon établie à partir de solutions titrées d'acide sialique, on trouve que les résultats de la condition 1 correspondent à une concentration en acide sialique de l'ordre de 1  $\mu\text{g}$  pour une aliquote de 200  $\mu\text{l}$ . Le volume initial du surnageant était de 2,5 ml; la teneur totale en acide sialique est donc de 12,5  $\mu\text{g}$  pour 463 millions de cellules (numérations faites avec la cellule de MALASSEZ). On voit que l'acide sialique, s'il est présent à la surface de la cellule de *Dunaliella*

n'y est qu'en très faible proportion. Il existe donc, à cet égard, une différence importante avec les cellules animales, où les quantités d'acide sialique par rapport au poids des cellules sont beaucoup plus importantes. Chez les quelques cellules végétales où la recherche de l'acide sialique a été faite, on note une grande diversité : les sialo-glycoprotéines recouvrent la membrane d'*Enteromorpha prolifera* (LAUR et JONSSON, 1983) alors qu'elles sont absentes de la surface du Myxomycète *Dictyostelium discoideum* (GILKES et WEEKS, 1977).

### CONCLUSION

Les recherches cytologiques et cytochimiques entreprises sur *Dunaliella bioculata* confirment les premières recherches effectuées sur l'espèce voisine *D. tertiolecta* (OLIVEIRA et al., 1980). Elles montrent que ces Algues unicellulaires sans paroi possèdent à leur surface un revêtement fibrillaire comparable au «cell-coat» de nombreux types de cellules animales. Dans le domaine végétal, ce revêtement a été mis en évidence dans quelques cas (ROLAND, 1969; RYTER et HELLIO, 1980; OLIVEIRA et al., 1980; LAUR et JONSSON, 1983; CHARDARD, 1984; DE VECCHI et GRILLI CAIOLA, 1986), mais sa structure n'avait pas été nettement décrite. Chez *D. bioculata*, on a vu que les fibrilles qui le composent sont de deux types : les unes courtes et abondantes recouvrent le feuillet externe du plasmalemme avec lequel elles font corps; leur structure est difficile à déterminer. Les autres, plus longues et moins denses, sont implantées irrégulièrement à la surface du plasmalemme. Toutes deux sont de nature glycoprotéique et portent des charges négatives qui pourraient être dues à des fonctions acides et, pour certaines au moins, à de l'acide sialique. Cependant, d'autres expériences utilisant des inhibiteurs des fonctions acides (méthylation) devraient être entreprises pour préciser ce point.

La recherche de l'acide sialique par voie chimique a montré que celui-ci est présent à la surface de la cellule de *Dunaliella*, bien qu'en très faible quantité. Il pourrait donc être considéré comme un des responsables des charges négatives détectées sur les microfibrilles. Mais les charges négatives mises en évidence par voie cytochimiques semblant relativement abondantes, on peut se demander si d'autres groupements électronégatifs, par exemple les groupements phosphate ou sulfate ne sont pas présents eux aussi, bien qu'ils n'aient pas été formellement identifiés.

Les incidences de la présence d'une telle structure et des fonctions qu'elle porte n'ont pas encore été envisagées, mais on peut penser qu'elles sont importantes dans différents domaines : dans celui de l'absorption des ions et des molécules où il est possible que le «cell-coat» se comporte comme une résine échangeuse d'ions et fixe certains corps électropositifs; dans celui de la reconnaissance des cellules où la présence de molécules chargées doit établir à la surface des cellules une sorte de carte d'identité cellulaire (REISERT 1980); dans celui de la reproduction enfin, si on en croit les résultats récemment obtenus par LAUR et JONSSON (1983) et par JONSSON et al. (1985).

## BIBLIOGRAPHIE

- CHARDARD R., 1984 — Détection au microscope électronique des sites anioniques du plasmalemme des protoplastes de feuilles de blé. *109e Congr. Natl. Soc. Savantes Dijon 1984*, II : 119-130.
- DANON D., GOLDSTEIN L., MARIKOVSKY Y. et SKUTELSKY E., 1972 — Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surface. *J. Ultrastruct. Res.* 38 : 500-510.
- DE VECCHI L. et GRILLI CAIOLA M., 1986 — An ultrastructural and cytochemical study of *Anabaena* sp. (Cyanophyceae) envelopes. *Phycologia* 25 : 415-422.
- EVANS L.V. et HOLLIGAN M.S., 1972 — Correlated light and electron microscope studies on brown algae. *New Phytol.* 71 : 1161-1172.
- GASIC G.J. et BERWICK L., 1963 — Hale stain for sialic acid-containing mucins. *J. Cell Biol.* 19 : 223.
- GASIC G.J., BERWICK L. et SORRENTINO M., 1968 — Positive and negative colloidal iron as cell surface electron stain. *Lab. Invest.* 18 : 63-71.
- GILKES N.R. et WEECK G., 1977 — The purification and characterisation of *Dictyostelium discoideum* plasma membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 464 : 142-156.
- GRAHAM R.C. et KARNOVSKY M.J., 1966 — The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14 : 291-302.
- GRIZEAU D., CALVAYRAC R. et PUISEUX-DAO S., 1982 — Action de l'éthyl-S-dipropylthiocarbamate (EPTC) et de certains de ses antagonistes sur la croissance de *Dunaliella bioculata*. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 294, ser. III : 355-358.
- HELLIO R. et RYTER A., 1980 — Relationships between anionic and lectin receptors in the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* and their role in phagocytosis. *J. Cell Sci.* 41 : 89-104.
- HEPLER P.K., 1980 — Membrane in the mitotic apparatus of barley cells. *J. Cell Biol.* 86 : 490-499.
- JONSSON S., LAUR M.L. et PHAM-QUANG L., 1985 — Mise en évidence de différents types de glycoprotéines dans l'extrait inhibiteur de la gamétogénèse chez l'*Enteromorpha prolifera*, chlorophycée marine. *Cryptogamie, Algologie* 6 : 253-264.
- KARNOVSKY M.J., 1965 — A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27 : 137 A.
- LAUR M.L. et JONSSON S., 1983 — Détection d'acides sialiques — ou de substances apparentées — chez *Enteromorpha prolifera* (Müller) J. Agardh. *Cryptogamie, Algologie* 4 : 105-110.
- LUFT J.H., 1966 — Ruthenium red staining of the striated muscle cell membrane and the myotendinal junction. In *Electron microscopy* vol. II : 65-66, R. UYEDA éd. Maruzen, Tokyo.
- LUFT J.H., 1976 — The structure and properties of the cell surface coat. *Int. Rev. Cytol.* 45 : 291-382.
- MATOSKA J. et SIRACKY J., 1980 — Negative surface charge of epithelial cells from benign and malignant breast tissues in organ culture. *Biol. cell.* 39 : 221-224.
- NICOLSON G.L., 1972 — A rapid method for determining the topological distribution of anionic sites on membrane surfaces. *J. Supramol. Struct.* 1 : 159-164.
- NICOLSON G.L., 1973 — Anionic sites of human erythrocytes membranes. I - Effect of trypsin phospholipase C and pH on the topography of bound positively charged colloidal particles. *J. Cell Biol.* 57 : 373-387.

- NILSSON J.R. et BEHNKE O., 1971 — Studies on a surface coat of *Tetrahymena*. *J. Ultrastruct. Res.* 36 : 542-544.
- OLIVEIRA L., BISAPULTRA R. et ANTIA N.J., 1980 — Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzymes treatments. *New Phytol.* 85 : 385-392.
- RAMBOURG A., 1967 — Détection des glycoprotéines en microscopie électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 265 : 1426-1429.
- REISERT P.S., 1980 — Plant cell surface structure and recognition phenomena with reference to symbiose. *Int. Rev. Cytol. suppl.* 12 : 71-112.
- ROLAND J.C., 1969 — Mise en évidence sur coupes ultrafines de formations polysaccharidiques directement associées au plasmalemme. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 269 : 939-941.
- RYTER A. et HELLIO R., 1980 — Electron microscope study of *Dictyostelium discoideum* plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis. *J. Cell. Sci.* 41 : 75-88.
- SCHREVEL J., KIEDA Cl., CAIGNEUX E., GROS D., DEMOTTE F. et MONSIGNY M., 1979 — Visualization of cell surface carbohydrates by a general two-step lectin technique : lectins and glycosylated cytochemical markers. *Biol. Cell* 36 : 359-366.
- THIERY J.P., 1967 — Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6 : 987-1018.
- THIERY J.P. et RAMBOURG A., 1974 — Cytochimie des polysaccharides. *J. Microscop.* 21 : 225-232.
- VENABLE J.H. et COGGESHALL R., 1965 — A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 25 : 407-408.
- WARREN L., 1959 — The barbituric acid assay of silicic acids. *J. Biol. Chem.* 234 : 1971-1975.

## EXPLICATION DES FIGURES

Toutes les figures se rapportent à *Dunaliella bioculata* cultivée en milieu de culture artificiel. Les conditions de fixation et de traitement sont brièvement indiquées. La barre située dans le bas de la figure représente 0,25  $\mu\text{m}$ , sauf spécification contraire.

Fig. 1 : Le plasmalemme (dont la structure caractéristique est bien visible par endroit) est recouvert sur sa face externe par un revêtement de structure imprécise (flèche). GA-caco 0,1 M pH 7,2-saccharose-OsO<sub>4</sub>; color. : acét. uran.-Pb. Fig. 2 : Peroxydase révélée par la DAB-4-HCl et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le liseré noir qui ceinture la cellule indique la présence de l'enzyme adsorbée sur la partie externe du plasmalemme. Fig. 3 : Témoin de l'expérience précédente, réalisée sans HPR : aucun dépôt n'apparaît à la surface du plasmalemme. Fig. 4 : Traitement par le ferro-osmium. Les fibrilles courtes situées sur le feuillet externe du plasmalemme sont nettement mises en évidence. Dimension de la barre : 0,1  $\mu\text{m}$ .

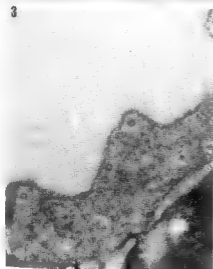
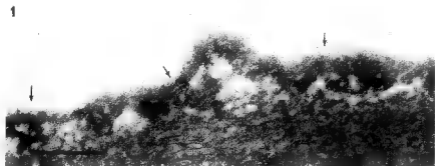
Fig. 5 : Réaction PATAG. Mise en évidence de microfibrilles à la surface du plasmalemme. Dimension de la barre : 0,5  $\mu\text{m}$ . GA-caco + saccharose-OsO<sub>4</sub>. Fig. 6 : Réaction PATAG. Détail du plasmalemme et des fibrilles du «cell-coat» soulignées par les grains d'argent. fl: fibrilles longues; rfc: fibrilles courtes pl: plasmalemme. Fig. 7 : Réaction PATAG. Plasmalemme coupé subtangentiellement et montrant la base des microfibrilles (flèches). Fig. 8 : Réaction PATAG. Autre aspect du plasmalemme avec des fibrilles plus ou moins réfléchies vers la base (fl). Fig. 9 : Réaction PATAG. Témoin traité sans acide périodique : aucun dépôt d'argent n'est visible à la surface du plasmalemme (pl).

Fig. 10 : Ferritine cationisée. Des amas de FC sont déposés de place en place et à une certaine distance du plasmalemme (flèche). Fig. 11 : Amas de ferritine, détail. Présence de fibrilles (flèches) très faiblement contrastées, entre les amas de ferritine et le plasmalemme, laissant supposer que seules les extrémités des fibrilles portent des charges négatives. Fig. 12 : Hydroxyde de fer colloïdal. Un dépôt noir intense entoure toute la cellule. Dimension de la barre : 0,5  $\mu\text{m}$ . Fig. 13 : Hydroxyde de fer colloïdal, détail. On observe un dépôt mince et continu directement appliqué sur le plasmalemme et des amas non adhérents au plasmalemme (flèches).

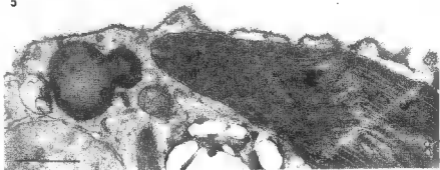
Fig. 14 : Action de la pronase sur la cellule vivante (400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 mn) suivie d'une réaction avec la FC. Le dépôt de ferritine, très mince est directement appliqué sur le plasmalemme (flèches). Cet aspect est différent de celui obtenu après action de la FC seule (comparer avec les fig. 10 et 11). Fig. 15 : Même technique. Action de la pronase pendant 60 mn. Il n'existe plus aucun marquage par la FC. Le plasmalemme (pl) reste encore visible. Fig. 16 : Action de la neuraminidase sur les cellules vivantes suivie d'une réaction avec HFC. On observe un mince dépôt de fer à la surface de la cellule. Ce dépôt est cependant plus mince que dans les cellules non traitées par la Nanase (Fig. 12 et 13). Fig. 17 : Action de la Nanase suivie d'une réaction avec FC. On n'observe aucun dépôt de FC à la surface de la cellule. On remarque également que le plasmalemme a disparu, sans doute désorganisé par le traitement enzymatique.

Fig. 18 : Rouge de ruthénium, 0,1 %. Coupe longitudinale d'un flagelle. Le RR révèle le «cell-coat» sur le plasmalemme coupé perpendiculairement en haut et subtangentiellement en bas de la figure. Dans ce dernier cas, on voit que le «cell-coat» n'a pas une répartition homogène et qu'il semble affecter une disposition en «nid d'abeilles». Fig. 19 : Rouge de ruthénium 0,1 %. Aspect de la surface cellulaire où l'on observe des amas colorés par le RR sous forme de monticules isolés (flèches) ou associés localement en un mur continu (double flèche). Fig. 20 : Détail de la fig. précédente. Aspect des monticules constitués de microfibrilles colorées par le RR et agglomérées en amas homogènes sous l'effet des charges positives du RR (flèches).

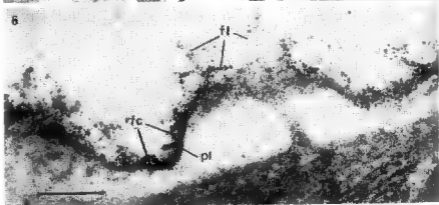




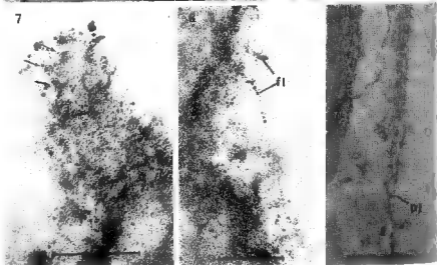
5

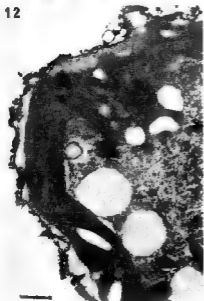
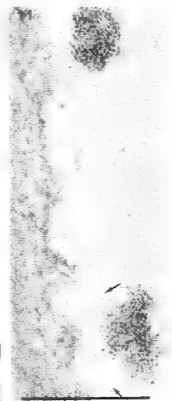
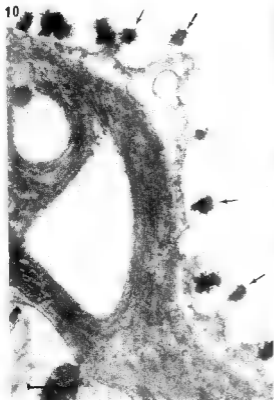


6



7

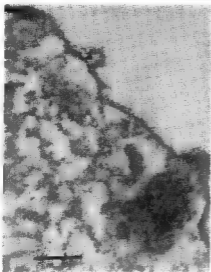
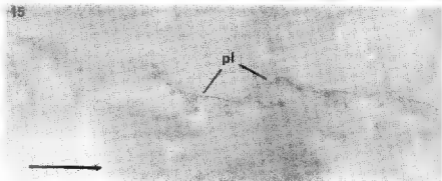




14

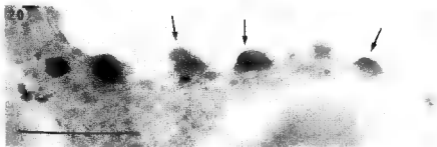
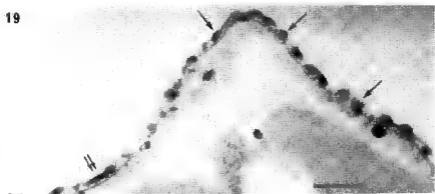
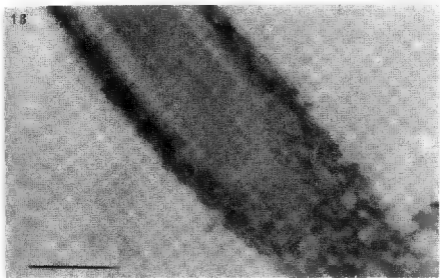


15



17







**THE LIFE CYCLE AND TAXONOMY  
OF *PARADOXIA MULTISETA* SVIR. (CHLOROPHYCEAE,  
CHLOROCOCCALES), AND RELATED TAXA**

E. HEGEWALD\* and O.L. REYMOND\*\*

**ABSTRACT.** — The coenobia of *Paradoxia multiseta* form within the mother cell wall and not by aggregation of free swimming cells. The release of daughter cells follows dissolution of the mother cell wall. Mature vegetative cells are identical, whether formed from coenobia or free, single cells. Both zoospores and young vegetative cells have two contractile vacuoles. A stigma is found in zoospores as well as in vegetative cells. Cysts are observed. Unlike cells developing from zoospores, autospores lack bristles and appendages and have less pronounced heteropolarity.

*Ankyra paradoxioides* is transferred to *Paradoxia* as *P. paradoxioides* (Cirik) Hegew. et Reymond. Clearer distinctions have been observed between *Paradoxia* and *Ankyra* ability to produce coenobia, behavior of mother cell wall at sporulation, presence of bristles, fine structure of the pyrenoid and appearance of cell pole are the differentiating criteria. The identity of *Actinastrum guttula* Playfair (= *Paradoxia multiseta*?) is discussed.

**RÉSUMÉ.** — Les cénobes de *Paradoxia multiseta* se forment dans la cellule mère et non par association de zoospores nageant librement. La libération des cellules filles se fait par gélification de la paroi de la cellule mère (et non par une déchirure). Qu'elles soient indépendantes ou faisant partie d'un cénobe, les cellules végétatives adultes ont une forme identique. Les zoospores ainsi que les jeunes cellules végétatives ont deux vacuoles pulsatiles. On observe un stigma aussi bien chez les zoospores que chez les cellules végétatives. Des kystes peuvent être formés lors du cycle vital. Contrairement aux cellules se développant à partir de zoospores, les autospores ne développent que très tardivement les soies et les appendices, et leur dissymétrie antéro-postérieure est moins prononcée.

*Ankyra paradoxioides* Cirik est transférée dans *Paradoxia* (*P. paradoxioides* n. comb.). La distinction entre les genres *Paradoxia* et *Ankyra* devient un peu plus claire : aptitude à produire des cénobes, comportement de la paroi mère lors de la sporulation, présence de soies, morphologie du pyrénoïde et forme des pôles cellulaires. Le cas de *Actinastrum guttula* Playfair (= *Paradoxia multiseta*?) est discuté.

**KEY WORDS :** *Paradoxia*, *Ankyra*, *Actinastrum*, zoospores, coenobia, life cycle, taxonomy.

\* KFA, IBT 3, Postf. 1913, D-5170, Jülich, FRG.

\*\* Université de Lausanne, Institut d'Histologie et d'Embryologie, Rue du Bugnon 9, CH-1005 Lausanne, Switzerland.

## INTRODUCTION

Although *Paradoxia multiseta* Svirenko (1928) has been observed world wide, it is always rare and therefore, little is known about the life cycle. Nevertheless, some hypotheses have been developed. FOTT (1953) proposed that the coenobium was formed through the junction, but not the copulation, of two free swimming zoospores, which then form the typical leaf-like anterior appendages. BOURRELLY (1966) suggested that according to the hypothesis of FOTT (1953), *Paradoxia* should be placed in the Hydrodictyaceae. WAWRIK (1977) observed that the protoplast of one cell of *Paradoxia* divided in four parts, while CIRIK (1978) saw the division in two parts. REYMOND & DRUART (1982) supposed, after observing a few EM micrographs of rare field material, that zoospores were formed. They hypothesised that the flagella did not function, because of the very early formation of the coenobium inside the mother cell wall.

In addition to the above mentioned hypothesis directly concerning the life cycle of *Paradoxia*, REYMOND (1979) established that the ultrastructure of the anterior leaf-like appendages of *Paradoxia multiseta* is similar to that of species of *Ankyra*. From his observation it was proposed that these two genera are more closely related than previously thought, and their life cycle might be comparable. *Ankyra* is a frequently encountered alga. SWALE & BELCHER (1971) who studied the ultrastructure and the life cycle of a strain of *Ankyra*, also observed zoospores. Later, FOTT (1974) observed the formation of resting stages (cysts) in *A. judayi* (G.M. Smith) Fott. KRIENITZ & HEYNIG (1982) made the same observation in *Ankyra lanceolata* (Kors.) Fott (= *A. spatulifera* (Kors.) Fott). According to this literature review, our knowledge of the life cycle of *Paradoxia multiseta* is incomplete. An attempt to culture *Paradoxia* failed and only one young vegetative cell was briefly observed (REYMOND, 1979). More recently a strain was successfully isolated by the first author, and its life cycle was observed and briefly discussed (HEGEWALD & REYMOND, 1985). The main ultrastructural features of the adult vegetative cells and cysts were previously published by REYMOND & HEGEWALD (1987). Our present purpose is to show and discuss more extensively than before the life cycle of *Paradoxia multiseta* and reconsider the taxonomic position of some related species.

## MATERIAL AND METHODS

A unialgal strain of *Paradoxia multiseta* was isolated in 1982 from the reservoir «Haltener Stausee» (FRG) and later deposited at the Algae Collection of the University of Göttingen (FRG) as SAC B 18.84 (SCHLÖSSER, 1984) and the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (USA) as UTEX 2460 (STARR & ZEIKUS, 1987). Most observations were made with light microscopy. The techniques used for EM were published in REYMOND & HEGEWALD (1986).



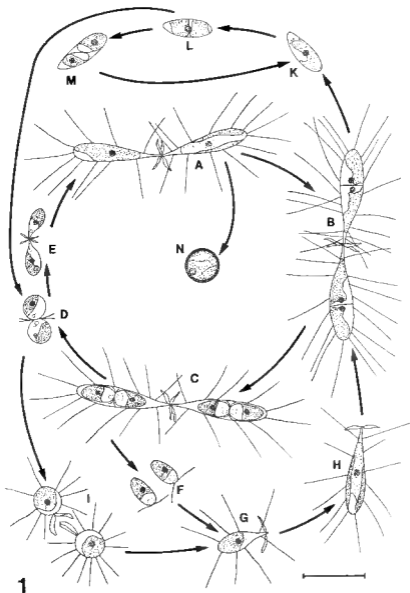
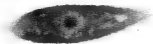
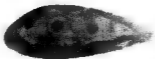


Fig. 1 - The life cycle of *Paradoxia multiseta*. A-E, typical cycle including only coenobial stages. C, F-H, B, cycle with formation of free zoospores. D, I, G, H, B, cycle including the separation of coenobial cells after their release from the mother cell. K-M, autospore formation. A, N, cycle including the formation of a resting stage (cyst). Its germination has not yet been observed. Bar : 10 μm.

2



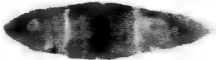
3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13

## RESULTS

Within the mother cell wall, two (Fig. 1B, 1C, 3, 4), four (Fig. 5, 6) or sometimes more daughter cells are formed which are released in seconds by a quick dissolution of the cell wall. The only remnants of the mother cell wall found with light or electron microscopy are the anterior tips of the cells, with their leaf-like appendages (Fig. 13). The daughter cells are released in joined pairs (Fig. 1D) or individually as zoospores (Fig. 1F). The former cells (Fig. 1D) are attached at their anterior tips and swim for about a minute, after which the flagella disappear and the typical leaf-like appendages are formed (Fig. 1E, 12). Because of the curvature of cells in the attachment area, no details of flagella loss were observed. Shortly after their release, the daughter cells usually produce bristles. Two contractile vacuoles remain active long after the disappearance of the flagella but are not present in adult cells. A stigma is always present in zoospores and vegetative cells at the EM level but is not always visible with light microscopy. On rare occasions, the cells of the young coenobia separate and become normally developed vegetative cells (Fig. 1I, 1G). When free, biflagellate zoospores are released from the mother cell wall, they swim for a long time, then their flagella disappear and leaf-like appendages are formed. The resulting unpaired vegetative cells are identical to each of the paired vegetative cells (Fig. 1F, 1G). We have never observed free swimming cells coming in contact with each other to produce paired cells and for this reason it is unlikely that coenobia are formed by the aggregation of free swimming cells. Occasionally the vegetative cells form resting stages (cysts), each with a thick wall (Fig. 1N, 10). Germination of the cysts has not yet been observed. The occasional appearance of zoospores with 4 (Fig. 14) or more flagella is probably the result of abnormal development. The abnormal zoospores have flagella which are arranged in sometimes widely separated pairs. They also have a larger cell

Fig. 2-10. *Paradoxia multisetata*. Bright field light microscope micrographs of Spurr resin flat embedded cells. Cell to cell junction, flagella or leaf-like appendages are not visible here. Bar: 10  $\mu$ m. Figs 2 to 10 are the same scale. Fig. 2: Two vegetative cells constituting the coenobium. Fig. 3: Cell with two nuclei. Fig. 4: Mother cell divided into two daughter cells. Fig. 5: Mother cell divided into four daughter cells (typical arrangement). Fig. 6: Mother cell divided into four daughter cells (untypical arrangement). Fig. 7: Zoospore. Fig. 8: Young vegetative cell just after the disappearance of the flagella. Fig. 9: Young vegetative cell a few hours after its formation. Fig. 10: Cyst. Fig. 11: Electron micrograph of a section. Young vegetative cell with nucleus, chloroplast, two huge vacuoles and several profile of one (or eventually two) mitochondrion. Bar: 1  $\mu$ m. Fig. 12, 13. Electron micrographs of material deposited on formvar coated grids. Fig. 12: Detail of the distal part of two young and still enrolled leaf-like appendages at the apical pole of a young vegetative cell after the disappearance of the flagella (the cell body is not visible here). It is not always possible to distinguish between flagella and forming appendages with the light microscope. Therefore the short transition period between flagella disappearance and appendage formation is not yet fully documented. Fig. 13: Remnants of the mother cell wall after its dissolution: apical part of the mother cell wall with its leaf-like appendages. Bar: 1  $\mu$ m.

volume than normal and two chloroplasts. Because cell fusion was never observed, we suggest that these are the result of incomplete cell division. However, they apparently are able to develop into vegetative cells, i.e., few cells are observed with two apical cell poles, both with leaf-like appendages (Fig. 15), which also indicates incomplete cell division. These cells also have two pyrenoids.

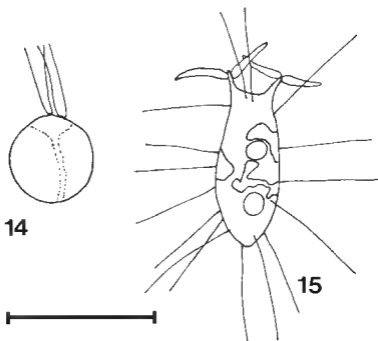


Fig. 14, 15. *Paradoxia multiseta*. Bar : 10  $\mu$ m. Fig. 14. Abnormal zoospore with four flagella. Fig. 15. Abnormal vegetative cell with divided apical pole.

In older cultures, possibly due to nutrient limitation, autospores are exclusively produced (Fig. 1K). They are very unlike the other vegetative cells in appearance having neither bristles nor apical appendages. And the apical cell pole is broadly blunt and not elongated or only slightly. The autospores are also very small, usually less than 10  $\mu$ m long. In the mother cell autospore production is preceded by one or two divisions of the chloroplast (Fig. 1L). After the autospores are formed they remain within the mother cell wall (Fig. 1M), apparently for hours. The remnants of the mother cell wall remain visible in the media unlike those from zoospore production, although they are finally dissolved. Autospores can also produce paired (or single) zoospores (Fig. 1L, 1D), but we do not know the conditions of their induction.

## DISCUSSION

From our observations we conclude that none of the earlier hypotheses concerning the life cycle of *Paradoxia multiseta* are fully correct. It is now accepted (KOMAREK & FOTT, 1983) that *Paradoxia* and *Ankyra* are taxonomically related as proposed by REYMOND & DRUART (1982). In *Ankyra*, SWALE & BELCHER (1971) found that the mother cell wall either breaks transversally into two parts or a hole is formed in the side of the center; in each case the empty cell wall remains visible for a long time. With another strain of *Ankyra* (Hegewald 1985-1) we also observed the mother cell wall breaking into two parts when releasing spores. Differences in the break down of the mother cell wall during sporulation offer a relatively good means of distinguishing these two genera. It is not yet absolutely clear whether the zoospores inside the mother cell wall are briefly free before the coenobia form (as for example in *Pediatrum*), or whether they are never fully separated during their formation. In any case this kind of coenobium differs from that in all other Chlorococcales and Volvocales by the position of the cell junction. Although we might expect sexuality from the two paired cells, similar to the copulation in Volvocales, it was never observed. In addition to these observations, REYMOND & HEGEWALD (1986) found (with one exception) obvious differences of pyrenoid ultrastructure between *Paradoxia* and *Ankyra*. So both genera are little bit better separated than before (REYMOND & DRUART 1980; KOMAREK & FOTT, 1983), even if actually none of the diacritical characters are absolute. *Paradoxia* has bristles which are missing in *Ankyra*. *Paradoxia* in nature usually and in culture often, has paired cells with a blunt basal cell pole, while *Ankyra* is always unicellular and has an acute basal cell pole (The leaf-like appendages are in *Ankyra* and *Paradoxia* at the apical pole, not at the basal cell pole as described by KOMAREK & FOTT (1983)).

Due to the relative value of the diverse characters belonging to *Paradoxia* and *Ankyra*, the place of some taxa can be a problem to the taxonomists :

*Paradoxia pelletieri*, though unicellular is clearly not an *Ankyra*, as proposed in KOMAREK & FOTT (1983). In addition, new observations of this species in Lake Léman (1986) by DRUART (personal communication) confirms that it is a separate species and not a single celled *Paradoxia multiseta*.

*Ankyra paradoxioides* Cirik is similar to *P. multiseta* in that it also has bristles and a blunt basal cell pole which is less obtuse. Although we do not know whether the mother cell wall dissolves or breaks in two parts prior to sporulation, there is no doubt that the species belongs to the genus *Paradoxia*. It differs from *P. multiseta* in having a less blunt basal cell-pole, two thicker bristles below the apical pole and 2-3 at the basal pole :

*Paradoxia paradoxioides* (Cirik) Hegew. et Reymond.

Basionym : *Ankyra paradoxioides* CIRIK (1978), *Rev. Algol.*, N.S. 13 : 210.

*Ankyra calcarifera* (Kisel.) Fott has a single spine below the apical pole, which may prove to be similar to the bristles of *Paradoxia*. However, it is doubt-

lessly an *Ankyra*, by virtue of its very acute elongated basal pole and splitting of cell walls in sporulation. A problem arises with *Ankyra inerme* Reymond & Druart, which shows a breaking of the mother cell wall (unpubl.) and the lack of bristles (typical of *Ankyra*), but also horsetail-like appendages (unpubl.) and a blunt basal cell pole more typical of *Paradoxia*. In addition to this taxonomical discussion, the coenobial alga *Actinastrum guttula* was not described clearly by PLAYFAIR (1916) but is certainly representative of *Paradoxia*, as previously stated by FOTT (1953) and KOMAREK & FOTT (1983). Despite sharp details in the drawing of other taxa in the same plate, the poor representation of the anterior leaf-like appendages of the coenobium of *Actinastrum guttula* make us believe that details like the bristles, which are sometimes very fine or sparse (rarely absent, KOMAREK, 1974) were probably overlooked by bright field microscopical observations, rather than missing. We studied the type sample for *A. guttula*, but could find only few algae and no *Paradoxia*. A synonym between *Paradoxia multiseta* and *Actinastrum guttula* is very likely. However without much more detailed information concerning Playfair's material (or really identical material) this decision would be premature and *Actinastrum guttula* must be considered as a *nomen dubium*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. B. Droz and Mr. P.A. Milliquet for the EM facilities, Mrs G. Groehn for help in culturing and Dr. J. Zeikus for his conscientious correction of the language. We also thank Mrs. A.-M. Philippe for her help in the typing of the manuscript. We are grateful to Prof. P. Bourrelly and Dr. H.R. Preisig for their scientific attention during the corrections of the final manuscript.

#### REFERENCES

- BOURRELLY P., 1966 — *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. I. Les algues vertes*. Paris, Boubée, 511 p.
- CIRIK S., 1978 — *Ankyra paradoxioides*, nouvelle espèce de Chlorococcales de Turquie (Chlorophyceae). *Rev. Algol. n. s.* 13 : 207-210.
- FOTT B., 1953 — *Paradoxia multiseta* Svirenko ve fytoplanktonu ceskych rybniku. *Preslia* 25 : 365-367.
- FOTT B., 1974 — Taxonomische Übersicht der Gattung *Ankyra* Fott 1957 (Characiaceae, Chlorococcales). *Preslia* 46 : 289-299.
- HEGEWALD E. & REYMOND O.L., 1985 — Reproduction and morphological characterization of *Paradoxia multiseta* Svirenko (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Book of abstracts. Phycol. Congr. 2. Copenhagen (Abstracts)* : 63.
- KOMAREK J., 1974 — Taxonomische Bemerkungen zu einigen Arten der Mikroflora der Teiche in Böhmen. *Acta Sci. Mus. Bohem. Merid.* 14 : 161-190.

- KOMAREK J. & FOTT B., 1983 — Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. In HUBER-PESTALOZZI G. (Ed.), *Das Phytoplankton des Süßwassers. Die Binnen-gewässers* 16, 7/1, 1044 p.
- KRIENITZ L. & HEYNIG H., 1982 — Beobachtungen an *Ankyra lanceolata* (Kors. 1953) Fott 1957 und *Ankyra spatulifera* (Kors. 1953) Fott 1957 (Chlorococcales) im Frei-land. *Arch. Protistenk.* 126 : 265-271.
- PLAYFAIR G.I., 1916 — Australian freshwater phytoplankton. Protococcoideae. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* 41 : 832-852.
- REYMOND O.L., 1979 — Étude morphologique et systématique des genres *Paradoxia* et *Ankyra* (Chlorococcales). *Schweiz. Z. Hydrol.* 40 : 350-357.
- REYMOND O.L. & DRUART J.C., 1980 — *Ankyra inerme* nov. sp., nouvelle espèce de Chlorococcales du lac Léman. *Cryptogamie, Algologie* 1 : 219-227.
- REYMOND O.L. & DRUART J.C., 1982 — Étude morphologique et taxonomique de *Paradoxia pelletieri* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Phycologia* 21 : 27-33.
- REYMOND O.L. & HEGEWALD E., 1987 — Les caractéristiques ultrastructurales de la cellule végétative et du kyste chez *Paradoxia multiseta* (Chlorophyceae, Chlorococcales). *Arch. Sci. Genève* 40 : 65-76.
- SCHLÖSSER U.G., 1984 — Sammlung von Algenkulturen, Göttingen : Additions to the Collections since 1982. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 97 : 465-475.
- STARR R. & ZEIKUS J., 1987, in press — The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* Suppl.
- SVIRENKO D., 1928 — Recherches sur la flore algologique de la rivière Ingouletz. *Arch. Russ. Protistol.* 7 : 25-74.
- SWALE E.M.F. & BELCHER J.H., 1971 — Investigation of a species of *Ankyra* Fott by light and electron microscopy. *Brit. Phycol. J.* 6 : 41-50.
- WAWRICK F., 1977 — Beobachtungen an *Pachycladon umbrinus*, *Micractinium bornheimense*, *Paradoxia multiseta* und der Infektion einer *Mallomonas*-Population. *Arch. Protistenk.* 119 : 60-67.





**PIT PLUGS AND OTHER ULTRASTRUCTURAL FEATURES  
OF SYSTEMATIC VALUE IN *RHODOCHAETE PARVULA*  
(RHODOPHYTA, RHODOCHAETALES)**

Curt M. PUESCHEL\* and F. MAGNE\*\*

**ABSTRACT** — *Rhodochaete parvula* Thuret was considered to be unique among the red algae in having pit connections that are not occluded by pit plugs. Pit plugs, consisting only of cores, are now demonstrated to occur in this species. Plug caps and cap membranes were not found. Although more specialized than earlier thought, the condition found in *Rhodochaete* is likely to represent the ancestral character state of red algal pit plugs. Unlike most red algae, Golgi bodies in *Rhodochaete* are not closely and consistently associated with mitochondria. One or more peripheral, encircling thylakoids are present in the plastids, another condition likely to represent the ancestral condition of red algae.

**RÉSUMÉ.** — Le *Rhodochaete parvula* Thuret était jusqu'à présent considéré comme possédant des punctuations intercellulaires dépourvues de synapse. On démontre ici qu'en réalité cette dernière existe bien, mais qu'elle est constituée seulement par le bouchon synaptique, à l'exclusion des capes et des membranes. Bien que plus spécialisée qu'on le pensait, cette condition correspondrait vraisemblablement à l'état ancestral de l'appareil synaptique des algues rouges. Chez *Rhodochaete*, au contraire de la plus grande partie des algues rouges, les corps de Golgi ne sont pas étroitement et constamment associés aux mitochondries. La présence dans les plastides d'un ou plusieurs thylakoïdes enveloppants peut être considérée comme un autre caractère archaïque des algues rouges.

**KEY WORDS** : Bangiophycidae, chloroplasts, Golgi bodies, pit connections, pit plugs, *Rhodochaete*, Rhodophyta.

### INTRODUCTION

*Rhodochaete parvula* Thuret, the sole member of the Rhodochaetales (Bangiophycidae), is a minute, filamentous species that has been collected only a few times from the Mediterranean Sea and once from the Caribbean Sea (TAYLOR, 1971). The distinctive life history and other aspects of the biology of this alga have been elucidated by MAGNE (1960) and BOILLOT (1969; 1975; 1978).

\* Department of Biological Sciences, State University of New York at Binghamton, Binghamton, New York 13901 and \*\* Laboratoire de Biologie Végétale Marine, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 7 Quai Saint-Bernard, 75230 Paris Cedex 05.

A unique constellation of characters makes this alga of considerable phylogenetic interest. Its simple reproductive system is appropriate for a bangiophyte, yet *Rhodochaete* also possesses several important florideophytean features. It has apical growth, isomorphic alternation of generations, and pit connections in both gametophyte and sporophyte life history phases.

Although pit connections in *Rhodochaete* are not detectable in fresh specimens, they are sometimes apparent in cytological preparations that cause swelling of cells (MAGNE, 1960). BOILLOT (1978) used electron microscopy to examine pit connections in both life history phases. She reported that the connections were filled by dense material but did not contain well-defined pit plugs. Pit connections between vegetative cells in other red algae invariably contain pit plugs (PUESCHEL & COLE, 1982), unless secondarily removed (e. g. AGHAJANIAN & HOMMERSAND, 1978). In light of the unique pit connections reported by BOILLOT (1978) and the importance of *Rhodochaete* to unravelling the phylogeny of red algae, further ultrastructural study of this species was undertaken.

## MATERIALS AND METHODS

Sporophytes and gametophytes of *Rhodochaete parvula* of a strain isolated from the Mediterranean Sea (Villefranche-sur-mer, France) were cultured in modified Provasoli enriched seawater medium at 14°C on a long day (16·8) photoperiod under cool white fluorescent light at an intensity of 20  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Both sporophytes and gametophytes were fixed in 2.5 % glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate, 0.2 M sucrose followed by dilutoin and rinsing in buffer and postfixation in 2 %  $\text{OsO}_4$ . Other sporophytes were fixed as above except that the postfixative also contained 3 %  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , or the primary fixative solution also contained 2 % tannic acid. In a fourth procedure, 1 %  $\text{KMnO}_4$  1 %  $\text{NaCl}$  was the only fixative used. Before dehydration the filaments were washed in distilled water and pressed onto gelatin-coated glass slides or onto the surface of agar according to CHATTON (1927) to obtain the alignment of filaments in one plane. Dehydration in a graded ethanol series was followed by propylene oxide rinses and infiltration with Epon or Spurr low viscosity resin. Sections were stained with 2 % aqueous uranyl acetate and Reynold's lead citrate.

## OBSERVATIONS

It is commonly observed that algae freshly collected from the wild yield better ultrastructural preservation than those kept in culture for long periods (PICKETT-HEAPS, 1975). Unfortunately, in this study we did not have fresh specimens with which to make such comparisons. Our approach was to use a variety of fixation procedures, but some problems, especially the shrinkage of cells were common to all fixations. For this reason, measurements given for such dimensions as length of the plugs could be artificially large due to stretching of

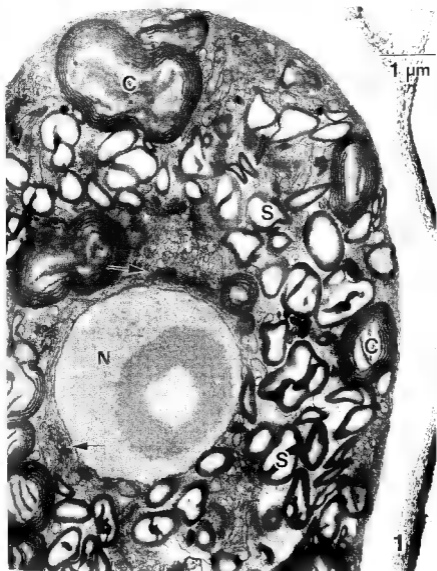
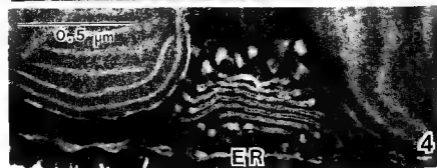
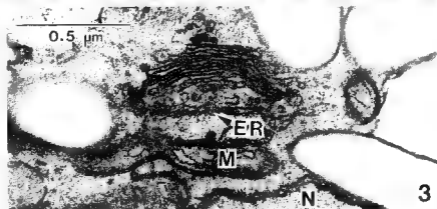
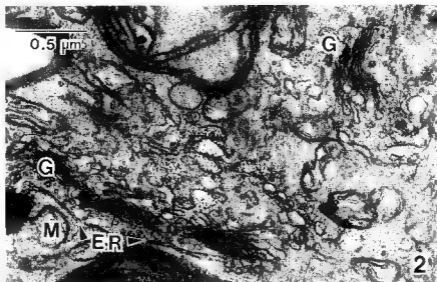


Fig. 1 - Apical cell of *Rhodochaete* sporophyte. Golgi bodies (arrows) are particularly numerous near the nucleus (N). Chloroplasts (C) have peripheral encircling thylakoids. Starch grains (S) are numerous in the cytoplasm. Osmium/ferricyanide postfixation.

the connection between the shrinking cells, whereas the values for plug diameters may be somewhat reduced.



The vegetative cells of both sporophytes and gametophytes are elongate, uninucleated cells with numerous chloroplast profiles (fig. 1). The chloroplasts are usually described as numerous and discoid, but serial sectioning was not performed to determine whether these discoid units were connected. Pyrenoids were lacking. Unlike some bangiophytes, the chloroplasts in *Rhodochaete* had one or more peripheral thylakoids that were parallel to the chloroplast envelope and thus encircled the other thylakoids (figs. 1 and 2). This was true of chloroplasts of both sporophytes and gametophytes.

The cell wall was densely fibrillar and evenly thick except at the apical end of the filament (fig. 1). The wall covering the dome-shaped tip of the apical cell was thinner and considerably less dense, as might be expected for a thallus with apical growth. Starch grains were numerous and variable in outline. Microbody-like structures were observed in proximity to the nucleus in some cells.

Golgi bodies were numerous, especially in apical cells (fig. 2). Although dictyosomes were often in proximity to the nucleus, the relationship was not an intimate one (fig. 3). Endoplasmic reticulum (ER), not the nuclear envelope, occupied the forming (cis) face of the dictyosome. This Golgi-ER relationship was a consistent one and the two organelles were usually separated by a region rich in vesicles, presumably, in transit between the two (figs. 2-4). Mitochondria were often nearby, but they did not occupy the cis face of the cisternal stack (fig. 3), as typically is found in the florideophytes. In addition to their perinuclear position, Golgi bodies were also common near the cell surface, with the cis face of the Golgi separated from the plasmalemma only by a cisterna of parietal ER (fig. 4).

The sporophyte and gametophyte generations of *Rhodochaete* differed conspicuously in the dimensions of their pit plugs and subtly in the substructure of the plugs (figs. 5 and 6). The length of the plugs in sporophytes ranged from about 1.2 to 1.8  $\mu\text{m}$ , which was about twice the size of plugs in gametophytes. The widest portion of the plugs was near the ends where they contacted the cytoplasm (figs. 5 and 6). The ends had a diameter of about 0.35  $\mu\text{m}$  in sporophytes and 0.2  $\mu\text{m}$  in gametophytes. From the ends, the plug tapered towards the middle. The narrowest portion of the plug often was cylindrical (figs. 5 and 6) rather than just a constriction. In sporophytes, this constricted region was up to 0.3  $\mu\text{m}$  long and it had a relatively constant diameter in the range of 0.1 to 0.15  $\mu\text{m}$ . In gametophytes, the constriction was not as long and the upper range of its diameter was 0.1  $\mu\text{m}$ . The midpoint of the cylindrical portion of the plug

Fig. 2 - Golgi bodies (G) have cisternae of ER (ER) at their forming faces. Mitochondria (M) may be nearby, but they are not intimately associated with the Golgi. Osmium/ferricyanide postfixation. Fig. 3 - A Golgi body is present near the nucleus (N), but ER is at the forming face of the dictyosome. Osmium/ferricyanide postfixation. Fig. 4 - In a negative image created by tannic acid, ER near the cell surface occupies the forming face of the dictyosome. Mature Golgi vesicles are cut off towards the center of the cell.

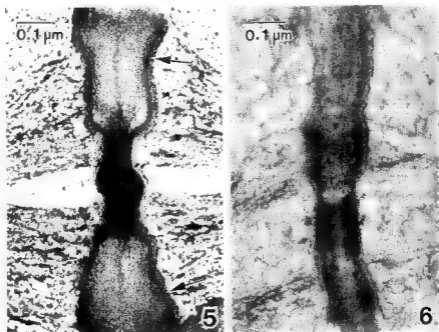


Fig. 5 - Pit plug of a sporophyte thallus, postfixed with osmium/ferricyanide. Note the dense, cylindrical mid-region. The plasmalemma (arrows) is continuous from cell to cell along the sides of the plug. Fig. 6 - Pit plug of gametophyte, osmium postfixation. The dense central portion of the plug is penetrated by a channel of less electron-density. No indication of the presence of plug caps or cap membranes is found in either phase of the life history.

sometimes showed a slight bulge (fig. 5). The constricted portion of the plug was generally more electron dense than the wider regions closer to the cytoplasm (figs. 5 and 6). In the gametophytes, a narrow shaft of low density appeared to penetrate into the denser matrix of the constriction (fig. 6). This was less apparent in sporophytes (fig. 5).

The plasmalemma, as in all pit connections, lined the sides of the plug core and was continuous from cell to cell (fig. 5). However, no membrane was found between the cytoplasm and the plug core, nor were plug caps present in any of the fixation regimes used, either in gametophytes or sporophytes. Some plugs detached completely from the adjacent cells they once connected and seemed to suffer little distortion or stretching. In other preparations, the persistence of the attachment and the shrinkage of the cells appeared to stretch the plugs. In some such cases, fine filaments, which may represent a component of the cytoskeleton, were observed to stretch from the end of the plug into the cytoplasm.

## DISCUSSION

The present study demonstrates that pit plugs are present in *Rhodochaete parvula*, contrary to the report of BOILLOT (1978) that the pit connection is occupied by compacted protoplasm. This finding is of considerable importance for it indicates that the structures in *Rhodochaete* are homologous to the pit plugs in other red algae and presumably are similar in their chemical composition and mode of deposition.

In florideophytes, the pit plugs may have a complex organization including a plug core, plug caps of one or two layers, and associated membranes (PUESCHEL & COLE, 1982). In contrast, the pit plugs in *Rhodochaete* are structurally simple; they consist of a plug core, without caps and without a membrane between the core and the cytoplasm. The *Rhodochaete* plugs, which are the minimum level of organization identifiable as a pit plug, are consistent with expectations generated by the relatively simple plugs in the Bangiales, which have only a slender cap layer and no cap membrane (PUESCHEL, 1987). They are also strikingly similar in both size and basic organization to the pit plugs recently demonstrated ultrastructurally in *Compsopogon*, a freshwater bangiophyte (SCOTT, THOMAS & SAUNDERS, in manuscript). The commonality of plug structure in these two primitive taxa lends support to the notion that a plug core without caps or cap membranes is the ancestral condition of the pit plug.

Cells of the sporophyte generation of *Rhodochaete* are larger than those of the gametophytes. It is not too surprising then that the pit plugs in gametophytes are smaller. A relationship between cell size and plug dimensions is apparent in many red algae. A more unusual feature of *Rhodochaete* is the dense matrix in the cylindrical midsection of the plug. In gametophytes, the dense material is not solid; a shaft of less dense material penetrates the denser matrix. More study of both generations is necessary to evaluate this particular feature.

The close spatial association of the forming faces of the Golgi bodies with mitochondria is a distinctive feature of red algal cell structure. *Rhodochaete* does not follow this general pattern. The Golgi are consistently paired with ER; any relationship with mitochondria is less consistent and intimate. SCOTT (1984) did a survey of Golgi associations that showed a correlation between the types of organelle associations and taxonomic groupings. Whereas the florideophytes all have an affiliation of Golgi and mitochondria, several families among the bangiophytes lack this feature. The present study demonstrates that the Rhodochaetales fall among those groups whose Golgi bodies are associated with neither mitochondria nor nuclei.

Elucidating the pattern of thylakoid disposition in *Rhodochaete* adds to our perspective on the organization of red algal chloroplasts. At one time, based on a relatively small taxonomic sample, the absence of a peripheral encircling thylakoid was believed to be associated with the «lower Rhodophyceae», whereas the more advanced red algae were believed to have one or more peripheral thylakoids (BISALPUTRA, 1974). Many additional taxa have been examined

since that view was expressed. The Rhodochaetaceae is the last family of the bangiophytes to be characterized. It is now clear that the absence of peripheral thylakoids is a specialization found in the gametophytes of the Bangiaceae (COLE & CONWAY, 1975) and some members of the Porphyridiales (GANTT & CONTI, 1965; EVANS, 1970; SCOTT, 1986). Other members of the Porphyridiales do have encircling thylakoids (eg. DEASON, BUTLER, & RHYNE, 1983; FORD, 1984) and the conchocelis phase of the bangialean life history shares this feature (COLE & CONWAY, 1975). The Boldiaceae (SHEATH & HYMES, 1980), Erythropeltidaceae (MCBRIDE & COLE, 1971), Compsopogonaceae (NICHOLS, RIDGWAY, & BOLD, 1971), and Rhodochaetaceae all have peripheral thylakoids. This configuration may prove to be the primitive condition of thylakoid disposition in red algae.

The wall of the apical cell of *Rhodochaete* is conspicuously thinner at the tip, presumably reflecting tip growth. This condition is similar to that found in the conchocelis developing from germinating carpospores of *Porphyra variegata* (PUESCHEL & COLE, 1985).

If one accepts the entirely plausible proposition that unicellularity, absence of sex, and absence of pit plugs are all derived conditions in extant bangiophytes, then it is clear that *Rhodochaete* is perhaps the most phylogenetically important red alga known, a view previously expressed by CHADEFAUD (1963).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of H. Eichelberger and the helpful suggestions of J. Scott. This study was supported by NSF grant BSR 83-20598 to C. Pueschel.

#### REFERENCES

- AGHAJANIAN J.G. and HOMMERSAND M.H., 1978 - The fine structure of the pit connections of *Batrachospermum sirodotii* Skuja. *Protoplasma* 96 : 247-265.
- BISALPUTRA T., 1974 - Plastids. In : STEWART W.D.P. (Ed.), *Algal Physiology and Biochemistry*. Berkeley, Univ. of Calif. Press, pp. 124-160.
- BOILLOT A., 1969 - Sur le cycle de *Rhodochaete parvula* Thuret. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 269 D : 2205-2207.
- BOILLOT A., 1975 - Cycle biologique de *Rhodochaete parvula* (Thuret) (Rhodophycées, Bangiophycidées). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 39 : Suppl., 67-83.
- BOILLOT A., 1978 - Les punctuations intercellulaires du *Rhodochaete parvula* Thuret (Rhodophycées, Bangiophycidées). *Rev. Algol.* n. s. 13 : 251-258.
- CHADEFAUD M., 1963 - Sur les organes reproducteurs et l'évolution des Rhodophycées : une hypothèse. *Rev. Algol.* n. s. 6 : 255-269.



- CHATTON E., 1927 - La microinclusion à l'agar-paraffine, technique protistologique et embryologique. *Bull. Histol. Appl.* 4 : 355-363.
- COLE K. and CONWAY E., 1975 - Phenetic implications of structural features of the perennating phase in the life history of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophyceae, Rhodophyta). *Phycologia* 14 : 239-245.
- DEASON T.R., BUTLER G.L., and RHYNE C., 1983 - *Rhodella reticulata* sp. nov., a new coccoid rhodophycean alga (Porphyridiales). *J. Phycol.* 19 : 104-111.
- EVANS L.V., 1970 - Electron microscopical observations on a new red algal unicell, *Rhodella maculata* gen. nov., sp. nov. *Brit. Phycol. J.* 5 : 1-13.
- FORD T.W., 1984 - A comparative ultrastructural study of *Cyanidium caldarium* and the unicellular red alga *Rhodosorus marinus*. *Ann. Bot.* 53 : 285-294.
- GANTT E. and CONTI S.F., 1965 - The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* 26 : 365-381.
- MAGNE F., 1960 - Le *Rhodochaete parvula* Thuret (Bangioïdée) et sa reproduction sexuée. *Cah. Biol. Mar.* 1 : 407-420.
- MCBRIDE D.L. and COLE K.M., 1971 - Fine structural studies on several Pacific Coast representatives of the Erythropeltidaceae (Rhodophyceae). *Proc. Int. Seaweed Symp.* 7 : 159-164.
- NICHOLS H.W., RIDGWAY J.E., and BOLD H.C., 1966 - A preliminary ultrastructural study of the freshwater red alga *Compsopogon*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 53 : 17-27.
- PICKETT-HEAPS J.D., 1975 - *Green Algae. Structure, Reproduction and Evolution in selected genera*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, 606 p.
- PUESCHEL C.M., 1987 - Absence of cap membranes as a characteristic of some red algal orders. *J. Phycol.* 23 : 150-156.
- PUESCHEL C.M. and COLE K.M., 1982 - Rhodophycean pit plugs : an ultrastructural survey with taxonomic implications. *Amer. J. Bot.* 69 : 703-720.
- PUESCHEL C.M. and COLE K.M., 1985 - Ultrastructure of germinating carpospores of *Porphyra variegata* (Kjellm.) Hus (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 21 : 146-154.
- SCOTT J., 1984 - Electron microscopic contributions to red algal phylogeny. *J. Phycol.* 20 : Suppl., 6.
- SCOTT J., 1986 - Ultrastructure of cell division in the unicellular red alga *Flintella sanguinaria*. *Canad. J. Bot.* 64 : 516-524.
- SHEATH R.G. and HYMES B.J., 1980 - A preliminary investigation of the freshwater red algae in streams of southern Ontario, Canada. *Canad. J. Bot.* 58 : 1295-1318.
- TAYLOR W.R., 1971 - Notes on algae from the tropical Atlantic Ocean - V. *Brit. Phycol. J.* 6 : 145-156.



**STRUCTURE AND REPRODUCTION  
IN *LENORMANDIOPSIS NOZAWAE*  
(RHODOMELACEAE, RHODOPHYTA)**

Richard E. NORRIS\*

**ABSTRACT.** — Four species of *Lenormandiopsis* Papenfuss have been described: the type species, *L. latifolia* (Harvey et Greville) Papenfuss, from Australia, *L. lorentzii* (Weber-van Bosse) Papenfuss, from Indonesia, Japan, Australia and Natal, *L. parthasarathii* (Krishnamurthy) Krishnamurthy from south India and *L. nozawae* R.E. Norris, from Natal. Tetrasporophytes are known for all four species, but females are known for only *L. lorentzii*, *L. parthasarathii* and *L. latifolia*. A recent collection of *L. nozawae* has provided additional information on its structure and reproduction including the first description of male and female reproductive organs. New information is also provided on the structure of tetrasporangial branches in *L. nozawae*, and comparison of these structures with those in other species and *Amansieae* genera is provided.

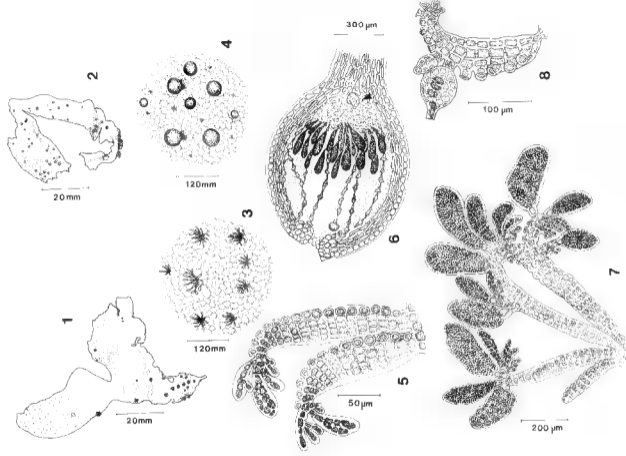
**RÉSUMÉ.** — Quatre espèces de *Lenormandiopsis* ont été décrites : l'espèce-type *L. latifolia* (Harvey et Greville) Papenfuss, d'Australie; *L. lorentzii* (Weber-van-Bosse) Papenfuss, d'Indonésie, du Japon, d'Australie et du Natal; *L. parthasarathii* (Krishnamurthy) Krishnamurthy, du sud de l'Inde; *L. nozawae* R.E. Norris, du Natal. Les tétrasporophytes sont connus chez ces quatre espèces, mais les gamétophytes femelles ne sont connus que chez *L. lorentzii*, *L. parthasarathii* et *L. latifolia*. Une collection récente de *L. nozawae* a fourni des informations complémentaires sur sa structure et sur sa reproduction; les organes reproducteurs mâles et femelles sont décrits pour la première fois, et des précisions sont aussi données sur la structure des rameaux tétrasporifères. Ces structures sont comparées à celles des autres espèces de *Lenormandiopsis* et de certains genres d'*Amansieae*. (traduit par la rédaction).

**KEY WORDS :** *Lenormandiopsis*, morphology, Rhodophyceae, reproduction, Rhodomelaceae.

### INTRODUCTION

*Lenormandiopsis* Papenfuss (1967), formerly known as *Aneuria* Weber-van Bosse (1911), belongs to the *Amansieae*, a tribe in the Rhodomelaceae that has primary dorsiventrality expressed by inrolled branch apices and trichoblasts that are formed in a regular series, unilaterally along the primary axis, on the convex

\* Department of Botany, University of Natal, Pietermaritzburg 3200, South Africa.



side. *Lenormandiopsis* has large, deeply lobed or unbranched thalli comprised of polysiphonous axes, but without a conspicuous midrib, and having broadly expanded lateral wings that are formed from divisions of four lateral pericentral cells (WEBER-VAN BOSSE, 1911; OKAMURA, 1929; NORRIS, 1987). The fifth pericentral cell is ventral and segments bearing trichoblasts have the trichoblast basal cell (eventually becoming the scar cell) embedded between the two dorsal pericentral cells. A single layer of cortical cells is formed on the broad surfaces of the pericentral cells and their medullary derivatives.

Specimens of *Lenormandiopsis* are rarely found, and little is known about early stages in development of thalli or its reproductive stages. Previous studies on *Lenormandiopsis* provide little detail on development of thalli and report mainly on tetrasporophytes. Female plants were reported by NOZAWA (1965), KRISHNAMURTHY (1967) and NORRIS (1987). Male plants were described only for *L. parthasarathi* (Krishnamurthy) Krishnamurthy in Krishnamurthy et Joshi (1970) by KRISHNAMURTHY (1967).

A recent collection of specimens of *L. nozawae* R.E. Norris from northern Natal has provided plants in all phases of reproduction. The knowledge gained from a study of these plants and their reproductive organs is provided in addition to more complete information on development of thalli and the special reproductive branchlets in this genus.

## MATERIALS AND METHODS

The collection of *Lenormandiopsis nozawae* (Natal Benthic Algal Research Program (Nat) n<sup>o</sup> 4132) came from 2.5 km offshore from Sodwana Bay, northern Natal. Specimens were found by divers, J. Dench and D. Smith, at a depth of 56 m occurring on stable sand. The dive was made on 16-V-1986 through the auspices of the Natal Parks Board. Specimens were fixed in 5% formalin in seawater and returned to the laboratory where they were examined and processed for herbarium sheets (NU 9722, 9724- tetrasporophytes, NU 9725- male and female) and microscope slides, the latter prepared by mounting in aniline blue stained corn syrup mounting medium (MIN-THEIN and WOMER-SLEY, 1976).

Fig. 1. Male thallus of *Lenormandiopsis nozawae* (NU 9725). The large clusters of dark material represent pustulate callus-like tissue that may be eroded parasites. Small distal spots on the left lobe represent sori of male branchlets. Fig. 2. Female thallus of *Lenormandiopsis nozawae* (NU 9725) on which are distributed stalked cystocarps. Fig. 3. Slightly magnified fertile region of male thallus showing sori of male branchlets. Fig. 4. Slightly magnified fertile region of a female thallus showing sori of female branchlets and stalked cystocarps. Fig. 5. Two young male branchlets showing dorsal row of scar cells and distal trichoblasts. Fig. 6. Section of a cystocarp. Note large cells (arrowhead) at base of pseudoparenchymatous gonimoblast and sterile gonimoblast filaments following inner contour of the pericarp. Fig. 7. Male branchlets bearing spermatangia. Note that the two right hand branchlets are branched. Fig. 8. Female branchlet bearing two procarpal branchlets. Note that these fertile branchlets replace trichoblasts in the middle region of the branchlet.

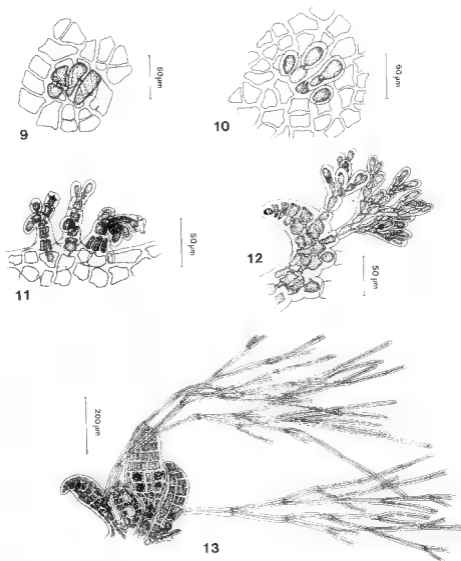


Fig. 9. Embedded periclinal branchlet, at a very early stage of development, from which upright tetrasporangial branchlets originate. Cortical cells of the thallus cover the branchlet at this stage. Fig. 10. First cells of erect branchlets arising from the embedded cells of a branchlet similar to the one shown in Fig. 9. Fig. 11. Section of cortex showing erect branchlets in a tetrasporangial sorus at an early stage of development. Note that scar cells have formed on all three branchlets. Fig. 12. Distal part of a young tetrasporangial branchlet showing highly branched trichoblasts. The curved distal end, having no trichoblasts, probably is an early developmental stage in the formation of a stichidium. Fig. 13. Several young tetrasporangial branchlets, two of them bearing highly branched mature trichoblasts.

## RESULTS

Two gametophyte and two tetrasporophyte specimens of *L. nozawae* were found in the collection. It was fortunate that a gametophyte of each sex was present, both specimens being apparently mature but small (both specimens are approximately 8 cm long) and having a somewhat distorted shape (Figs. 1, 2). A tetrasporophyte present in this collection (Fig. 14) is the most complete and largest specimen known for this rare species, being approximately 38 cm long and 12 cm broad in its largest dimension. This tetrasporophyte shows a growth form indicating it is a perennial plant in having a branched basal stipitate section, each branch of which terminates in a broad blade, presumably of seasonal growth. The proximal stipitate part of this plant probably originated by secondary thickening of axes along with erosion of the lateral winged regions.

These observations strongly suggest that gametophytes and tetrasporophytes are heteromorphic in *L. nozawae*, but further collections of gametophytes are needed before such a conclusion can be substantiated. There was no suggestion of heteromorphy between tetrasporophytes and female gametophytes described for *L. lorentzii* (NOZAWA, 1965) nor for the type species of *Lenormandiopsis*, *L. latifolia* (NORRIS, 1987). KRISHNAMURTHY (1967), however, mentioned that the tetrasporophytes of *L. parthasarathii* are more robust than the gametophytes of that species.

Male and female reproductive structures are borne on fertile cylindrical polysiphonous branchlets in clusters (small sori) in no particular pattern on both surfaces of the blades (Fig. 3, 4).

The region of apical growth of *L. nozawae* was illustrated and described by NORRIS (1987) showing early development of the blade and the conspicuous row of trichoblasts, soon becoming scar cells, that is produced only by cells of the primary axis. Male and female fertile branchlets develop a trichoblast for each branch segment, whereas tetrasporangiate branchlets have scar cells only in a few proximal segments below the swollen part that bears the tetrasporangia. (This swollen tetrasporangial-bearing part of the branchlet may be termed a *stichidium* in the sense of the definition provided by ABBOTT and HOLLENBERG (1976), in which only tetrasporangial-bearing branchlets are designated by this term. The term has also been used by various authors in a broader sense to include male reproductive branchlets in a wide variety of red algal genera).

Trichoblasts, occurring on primary vegetative and endogenous fertile branches, are colourless and often unicellular in *Lenormandiopsis* (NORRIS, 1987). Trichoblasts on fertile branchlets may be unicellular or multicellular and highly branched (Figs. 12, 13). In both vegetative and fertile branches of *Lenormandiopsis* trichoblasts originate as the first derivative of an axial cell, the initial being cut off on the convex (dorsal) side as a small protuberant cell, a process termed exogenous in the Rhodomelaceae (ABBOTT & HOLLENBERG, 1976). The branched trichoblasts have a form typical for some genera of the Amansieae (*Rytiphlaea*, *Amansia* and *Vidalia* according to FALKENBERG (1901)) in that

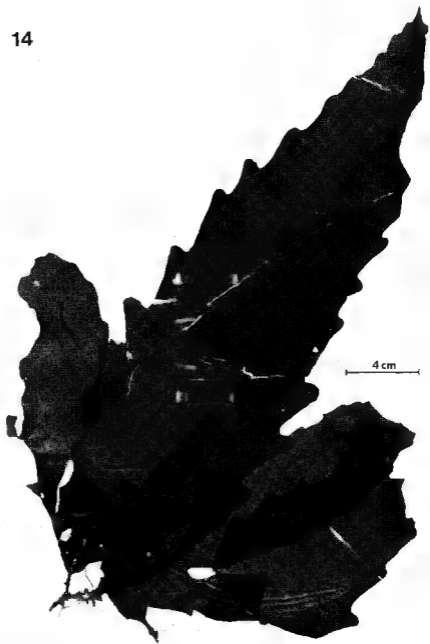


Fig. 14. Thallus of a large tetrasporophyte of *Lenormandiopsis nozawae* (NU 9722) showing the branched perennial stipe, each branch terminating in a blade. The central large tapered blade has evenly spaced marginal lobes typical for this species.



they become fully formed at an early stage inside a vesicle comprised of apparently liquid wall material that envelopes all cells of the trichoblast. The vesicle has a thin membrane (cuticle) that bursts leaving remains of the cuticle attached to the internal stalk cell, and an envelope reforms around the cell contours of the trichoblast. At this stage the trichoblast cells rapidly enlarge, expanding to form a monosiphonous highly branched filament that soon is deciduous leaving a large conspicuous scar cell, partly submerged in the thallus, which is the stalk cell of the original trichoblast.

As mentioned above, trichoblasts may be very simple in *Lenormandiopsis*, often represented by two cells, an interior stalk cell and a terminal cell, the latter being deciduous and the stalk cell remaining as a scar cell, a cell that has protuberant wall material, obviously severed from another cell. Scar cells, whether derived from single-celled or multicellular trichoblasts, all have the same structure. In young parts of the thallus scar cells can be identified in every segment in *Lenormandiopsis*, but in more proximal regions of thalli, under the influence of intercalary cell divisions, they are difficult to find.

Thallus primary and secondary axes are identifiable in distal regions near the inrolled branch apex but soon lose their identity because there is no development of special cortication around them. Apices of secondary branches can be identified at tips of conical shallow lobes on margins of some thalli (Fig. 14). In young parts of the thallus apex some of the secondary branch apices may support a single cylindrical or slightly flattened marginal sterile branch. The primary axis of this branch sometimes bears a series of scar cells, representing broken off trichoblasts, and the number of pericentral cells is variable but usually more than five. Such marginal branches are not always formed, and their very small size and deciduous nature also make them difficult to find. Thallus proliferations may occur on torn margins and small adventitious thalli sometimes develop on stipes of adult thalli (Fig. 14).

### Ontogeny and structure of fertile branchlets :

Clusters of endogenously derived fertile branchlets are formed in no apparent order on both thallus surfaces. At first investigation it was thought that the fertile branchlet clusters developed on axes (NORRIS, 1987), but this cannot be substantiated by subsequent investigations. It is now concluded that they occur in no special arrangement although the clusters of branchlets are fairly regularly spaced. It also seems evident that fertile branchlet clusters can be initiated even in fully mature regions of the thallus. Ontogeny of the branchlet cluster (sorus) has been studied in a tetrasporophyte of *L. nozawae*. In this plant the initiation of a branchlet cluster, as observed from the thallus surface, occurs by cutting off of a short curved row of cells (Fig. 9) from a medullary cell of the thallus. The first branchlet, which is orientated periclinally, is embedded beneath the cortex and upright branchlets that penetrate the cortex are initiated from each cell of the embedded branchlet (Fig. 10). All of the initial branchlets are monosiphonous, but the protuberant ones soon become poly-

siphonous (Fig. 11). Divisions of cells in the basal region of the protuberant branchlets, as well as divisions of the original embedded branchlet, cause a small and relatively thin erumpent mass of tissue to develop from which emerge many upright polysiphonous branchlets, each beginning as a monosiphonous filament. In this way the clusters of fertile branchlets are formed and sterile branchlets have not been identified with certainty in these sori. Each fertile branchlet in tetrasporophyte, male or female plants is dorsiventral, determinate, and produces five pericentral cells in each segment in addition to the stalk cell of a dorsal trichoblast, the cell that becomes a scar cell when the trichoblast is lost. Proximal and distal axial cells in the fertile branchlet may have fewer corticating or pericentral cells, or occasionally none, resulting in fertile branchlets that are tapered at both distal and proximal ends.

**Male branchlets :** Male fertile branchlets bear a series of dorsal trichoblasts in early stages (Fig. 5), but as the fertile branchlet matures it continues the series by forming trichoblasts transformed into spermatangial branchlets (Fig. 7). Each spermatangial branchlet has a small stalk cell inserted between pericentral cells of the fertile branchlet, comparable to the stalk cell of the trichoblast, and an enlarged external stalk cell. The spermatangial branchlet represents the complete highly branched trichoblast condensed to a small unit having a dorsiventral aspect in which the dorsal internal branchlets are longer than those in ventral positions. No terminal sterile cells are present in the spermatangial branchlet, all surface cells being fertile (Fig. 7). Male polysiphonous branchlets of *L. nozawaae* may have one or two secondary polysiphonous branchlets that develop endogenously on segments in addition to trichoblasts or spermatangial branchlets (Fig. 7). There appears to be no particular order in the development of these secondary branchlets of the polysiphonous axis.

**Female branchlets :** Fertile branchlets on female plants (Fig. 8) are similar in appearance, in early stages, to those on male plants. They have a polysiphonous structure that tapers to a narrow proximal stalk that becomes greatly thickened by cortication (Fig. 4) as cystocarps develop. Procarps with their pericarp initials are produced in place of trichoblasts in proximal to middle positions on the fertile branchlet, only one or two such procarps being produced on each branchlet. Because female reproductive branchlets replace trichoblasts, as spermatangial branchlets do in male branchlets, it can be assumed that the two branchlets are basically the same, the female branchlet differing in having a polysiphonous distal segment. Usually only a single cystocarp develops in each cluster of fertile branchlets (Fig. 4), but occasional twinned cystocarps can be found on the same stalk. The cystocarp stalk is the proximal segment of the fertile branchlet that becomes greatly thickened by cortication.

An apical protuberant cell is present on the distal part of the young pericarp before fertilization, which probably represents a sterile cell of the trichoblast that bears the procarpal structure. The stalk of the procarpal branch is polysiphonous having four or five pericentral cells. Few stages in early development of cystocarps were observed but the four-celled carpogonial branch was seen. It

could not be determined if there are one or two groups of sterile cells attached to the supporting cell. It may be assumed for the present, however, that two groups are present, a situation similar to the procarp structure reported by NOZAWA (1965) for *L. lorentzii*.

A significant difference exists in the structure of the female fertile branchlets reported by Nozawa for *L. lorentzii* and those found in *L. nozawae*. Nozawa showed the fertile branchlet to be terminated by a trichoblast and she did not show nor discuss the scar cells that should be present on the dorsal side of the fertile branchlet in that species. The fertile female branchlet structure of *L. lorentzii* probably is similar to that of *L. nozawae* and *L. latifolia*, the latter previously reported by NORRIS (1987). In my estimation, it is basic in the genus, and possibly the Amansieae, that scar cells are present on the dorsal side of endogenous branchlets, and in gametophytes the branchlet terminates in an apical cell that first exogenously produces a trichoblast or a fertile branchlet on every segment. Tetrasporangial stichidia usually have no trichoblasts formed in the fertile region, but exceptions in the Amansieae can be cited (*i. e.* a few lower fertile segments in *L. lorentzii* and in all segments of stichidia in *Kuetzingia natalensis*). The number of procarps produced on each fertile branchlet in *L. lorentzii* is up to four, as reported by Nozawa, whereas one or two are known to occur on fertile branchlets of *L. nozawae*. An important feature of *Lenormandiopsis* cystocarps is that a fusion cell was not observed in *L. lorentzii* by Nozawa nor was one found in cystocarps of *L. nozawae*. KRISHNAMURTHY (1967), however, stated that fusion cells are present in cystocarps of *L. parthasarathii*. NOZAWA (1965) mentioned that the lower region of the gonimoblast in *L. lorentzii* is pseudoparenchymatous. Large fusion cells are found in most species of Rhodomelaceae so the possible absence of one in some species of *Lenormandiopsis* is particularly interesting and significant. It may be that a very small fusion cell is produced in *L. nozawae*, as shown in Fig. 6, but several separate large cells rather than a fusion cell are present in some other cystocarps. In other ways the cystocarps of *Lenormandiopsis* species seem to be much the same. The peculiar gonimoblast filaments that form a loose tissue lining the inner side of the cystocarp (Fig. 6) is present in *L. nozawae* and *L. latifolia* but was not mentioned as being present in *L. parthasarathii* by KRISHNAMURTHY (1967).

**Tetrasporangial branchlets** : Fertile branches bearing tetrasporangia in *L. nozawae* have two sections, a proximal narrow polysiphonous region and a distal longer and wider section in which the tetrasporangia are borne (Fig. 13), the distal region being termed the stichidium. The proximal section has scar cells on each segment whereas no scar cells are present on the distal section (in one branch a scar cell was found on the proximal segment of the stichidium). Trichoblasts never have been found terminating the distal section of the tetrasporangial branchlet. Because of the absence of scar cells and trichoblasts on the distal section of the fertile branch, the region bearing the tetrasporangia, I interpret this area as a region similar to the male and female branches but without the corresponding stalk cells. In *L. nozawae*, therefore, the fertile tetrasporangial

branch represents a sessile single distal tetrasporangial stichidium, in which fertile and sterile cells are present in a predictable pattern according to their development, with a proximal sterile segment that bears scar cells, a segment functioning as a stichidial stalk. Both the stichidium bearing tetrasporangia and the male and female fertile branchlets are dorsiventrally orientated, each having curved distal ends and stronger development of cells on the dorsal side causing a general curve to the branch.

KRISHNAMURTHY (1967) mentioned that reproductive branchlets of gametophytes in *L. parthasarathii* are borne «in two alternating series along the convex surface of the recurved branch». These structures in *L. nozawae*, as well as in *L. latifolia*, are in a single series on the convex side of the branchlet but in some places their pit connections may alternate their attachment to the left or right sides of the adaxial cell. Trichoblasts in the latter two species are also always in a single series that may slightly alternate positions according to attachment points on the axial cell.

Tetrasporangial branchlets in *L. latifolia* and *L. lorentzii* have a structure identical to that of *L. nozawae*. In these species also, therefore, the stalk segment of the branchlet bears scar cells on each segment and represents a branchlet that bears a single sessile stichidium in which scar cells are absent and in which no terminal trichoblasts are found. Scar cells occasionally occur on one or two lower segments of the stichidial part of the branch, identified by a slightly larger diameter than the proximal region, this tendency being more common in *L. lorentzii* than in the other two species.

## DISCUSSION

Discovery of gametophytes of *L. nozawae* and the reinvestigation of tetrasporophytes have allowed a more complete description of this species and, in addition, have provided a better understanding of the genus. Male reproductive structures are typical for the Amansieae and procarpial and cystocarpic structures are similar to *L. lorentzii*, *L. parthasarathii* and *L. latifolia*. The production of sexual reproductive structures on special fertile branchlets in clusters on the blade also provides a basis for speculation on phylogenetic links within the Amansieae. Tetrasporangial fertile branchlets also show structure, revealed by the presence of trichoblasts on the proximal segments, suggesting that they may be produced in much the same way as the gametangia but, because of their sessile position on the fertile branch, this relationship has been more obscure.

Position and type of trichoblasts produced in *Lenormandiopsis*, all cells being preformed in a vesicle that bursts as the cells mature, relates this genus with *Rytiphlaea*, *Amansia* and *Vidalia*, a group within the Amansieae delimited on this character by FALKENBERG (1901). Because of the expansive nature of the thallus, *Lenormandiopsis* probably is more closely related to *Amansia* and *Vidalia* rather than to *Rytiphlaea*. The presence of simple cortication on the thallus separates *Lenormandiopsis* from *Amansia* and the thin cortication and

expansive blade without conspicuous veins seem to set the genus well apart from *Vidalia*. It is concluded, therefore, that *Lenormandiopsis* is a genus having characters that separate it from other genera in the Amansieae but recognizing that there is little detailed knowledge of structure and reproduction in this tribe and that with new information additional taxonomic reorganization may be necessary.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Collection of the specimens used in this study by Mr. J.S. Dench and Mr. D. Smith who dove to 56 m for them is gratefully acknowledged. The specimens were contributed by the Natal Parks Board to the Natal Benthic Marine Algae project which is supported by the South African Council for Scientific and Industrial Research. Facilities for this research are provided by the Department of Botany, University of Natal, Pietermaritzburg, and I am grateful for the support of members of this Department, in particular Professor R.N. Pienaar. Mr. D. Tunnington has provided the photograph and I am grateful to Mrs Olive Anderson for her very fine drawings. Mrs. Belinda White has provided excellent research assistance. I am also grateful to Dr. T. Horiguchi for translating Dr. Nozawa's Japanese article into English.

#### REFERENCES

- ABBOTT I.A. & HOLLENBERG G.J., 1976 — *Marine algae of California* Stanford Univ. Press, Stanford, U.S.A. xvi + 827 p.
- FALKENBERG P., 1901 — Die Rhodomelaceen des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. *Fauna und Flora des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. Monographie* 26, xvi, + 754 p.
- KRISHNAMURTHY V., 1967 — *Aneuria parthasarathi* sp. nov., a dorsiventral Rhodomelaceae from Cape Comorin, South India. *Phykos* (Prof. Iyengar Mem. Vol., 1966) 5 : 181-186.
- KRISHNAMURTHY V. & JOSHI H.V., 1970 — *A check-list of Indian marine algae*. Central Salt & Mar. Chem. Res. Inst., Bhavnagar, 37 p.
- MIN-THIEN U. & WOMERSLEY H.B.S., 1976 — Studies on southern Australian taxa of Solieriaceae, Rhabdoniaceae and Rhodophyllidaceae (Rhodophyta). *Austr. J. Bot.* 24 : 1-166.
- NORRIS R.E., 1987 — *Lenormandiopsis* (Rhodomelaceae, Rhodophyceae), newly recorded from Africa, with a description of *L. nozawae* sp. nov. and comparison with other species. *Jap. J. Phycol.* (in press).
- NOZAWA Y., 1965 — On the female organ of «Sujinashigusa», *Aneuria lorenzii* Weber van Bosse from Japan. *Bull. Jap. Soc. Phycol.* 13 : 76-80.
- OKAMURA K., 1929 — *Icones of Japanese algae*. Vol. VI, Pl. CCLI-CCLV.
- PAPENFUSS G.F., 1967 — Notes on algal nomenclature - V. Various Chlorophyceae and Rhodophyceae. *Phykos* (Prof. Iyengar Mem. Vol., 1966) 5 : 95-105.
- WEBER-VAN BOSSE A., 1911 — Notice sur quelques genres nouveaux d'algues de l'archipel Malaisien. *Ann. Jardin Bot. Buitenzorg. 2e Sér.*, 9 : 25-33.



**ANTITHAMNION PILIFERUM SP. NOV.**  
**(CERAMIACEAE, RHODOPHYTA)**  
**FROM EASTERN SICILY (MEDITERRANEAN SEA)**

Mario CORMACI\* and Giovanni FURNARI\*

**ABSTRACT.** – In this paper the authors describe a new species of the genus *Antithamnion* Naegeli, *A. piliferum* sp. nov., from the Eastern coast of Sicily (Mediterranean Sea). It shows creeping filaments from which erect filaments arise. The erect filaments bear opposite branchlets decussately arranged. The branchlets are alternately ramified bearing pinnae and pinnules of secondary order. The gland cells are always placed on two-celled branches (pinnae or pinnules). All the terminal cells are provided with two (rarely one) long hyaline hairs. A comparison with related species of *Antithamnion* was carried out. Reproduction unknown. A key to *Antithamnion* species from the Mediterranean is proposed.

**RÉSUMÉ.** – Les auteurs décrivent une nouvelle Céramiacée récoltée sur la côte orientale de la Sicile (Mer Méditerranée) appartenant au genre *Antithamnion* : *A. piliferum* sp. nov. Le thalle possède des filaments rampants d'où s'élèvent des axes dressés portant des pleuridies opposées et décussées. Les pleuridies présentent des ramules disposés alternativement et eux-mêmes porteurs de pinnules. Les cellules sécrétrices se localisent sur des ramules ou des pinnules bicellulaires. Les cellules terminales sont prolongées par deux longs poils hyalins, plus rarement un seul. Les caractères de la nouvelle espèce sont comparés avec ceux des espèces affines. Les individus fertiles sont inconnus. Une clé de détermination des *Antithamnion* méditerranéen est proposée à la fin du travail.

**KEY WORDS :** *Antithamnion piliferum* sp. nov., Ceramiaceae, Sicily, Mediterranean Sea.

### INTRODUCTION

The genus *Antithamnion* Naegeli 1847 is represented in the Mediterranean Sea by *A. cladodermum* (Zanardini) Hauck<sup>1</sup>, *A. cruciatum* (C. Agardh) Naegeli, *A. heterocladum* Funk, *A. tenuissimum* (Hauck) Schiffner (G. FELDMANN-

[1] This species has probably to be referred to the genus *Balliella* Itono et Tanaka. Nevertheless, because sexual structures are yet unknown, the nomenclatural recombination has not been made (HUISMAN et KRAFT, 1984; ATHANASIADIS, 1985).

\* Istituto e Orto Botanico dell'Università, via A. Longo 19, 95125 Catania (Italy).

MAZOYER, 1940; BOUDOURESQUE, 1984; GIACCONE et al., 1985), *A. antillanum* Boergesen (SCHIFFNER, 1931 (doubtful record); BOUDOURESQUE et VERLAQUE, 1976), and *A. ogdeniae* Abbott (ATHANASIADIS, 1985).

During the research on marine benthic flora and vegetation of the Eastern coast of Sicily, a species of Ceramiaceae belonging to the genus *Antithamnion* Naegeli was collected.

In spite of the lack of fertile specimens, vegetative features of this taxon are sufficient to recognize it as a new species.

### MATERIAL AND METHODS

All the thalli were hand-collected using SCUBA at Capo Passero (Syracuse, Italy) (see map) at 18 m depth epiphytic on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves. All the observations were made on fluid preserved material. Material preserved in buffered 3% formalin in sea water was used for preparation of microscope slides. Iodine-Potassium iodide was used as temporary stain for photograph.



Map of Sicily showing the type locality of *Antithamnion piliferum* sp. nov.

Herbarium specimens (holo- and isotypes) are held at the Botanical Institute of University of Catania.



## OBSERVATIONS

*Antithamnion piliferum* sp. nov.

*Diagnosis* : plantae epiphyticae, ecorticatae; axibus repentibus substrato adfixis rhizoideis pluricellularibus disco terminali praeditis. Axibus erectis, 2-4 mm altis, ramulis oppositis decussatisque instructis. Ramulis alternatim ramosis; pinnis uni- multicellularibus. Pinnae multicellulares 1-3 pinnulas, unicellulares, in exteriore latere gerentes. Pinnae bicellulares atque pinnulae bicellulares proximales, singula cellula glandulosa, in ambabus cellulis insistenti, ventraliter instructae. Pinnae et pinnulae glanduliferae cellula basali longiori quam ea apicali, 2-3 plo in pinnis, 1-1.5 plo in pinnulis. Omnibus cellulis terminalibus 2(1) hyalinis pilis, ad 200  $\mu$ m longis, praeditis. Reproductione ignota.

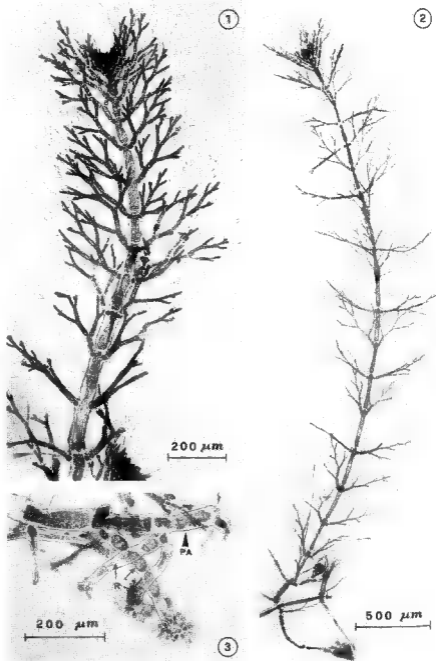
Plants epiphytic, unicorticated; with creeping filaments fastened to the substratum by means of many-celled rhizoids ending in a disc. The erect filaments, 2 mm (in thalli with axial cells measuring 170 x 50  $\mu$ m) up to 4 mm tall (in thalli with axial cells measuring 250 x 25  $\mu$ m), bear opposite branchlets decussately arranged. These branchlets (250-370  $\mu$ m long) are alternately ramified, bearing one to many-celled pinnae. The many-celled pinnae are provided with one to three pinnules, each of one or two cells, growing on the abaxial side. The two-celled pinnae and the proximal two-celled pinnules, carry on the adaxial side a gland cell which rests on both of them. Pinnae and gland-bearing pinnules show the basal cell longer than the apical one (2 to 3 times in pinnae, 1 to 1.5 times in pinnules). All the terminal cells are provided with 2(1) hyaline hairs each to 200  $\mu$ m long. Reproduction unknown. Named on account of the presence of hairs.

Type locality : Capo Passero (Syracuse, Italy), epiphytic on *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves at 18 m depth.

Holotype : CAT 490 sterile; collected by M. Cormaci and G. Furnari, 11 June 1983.

Distribution : known from the type locality at 18 m depth. Also collected, in the same locality, at 10 and 25 m depth in June 1983 and at 15 m depth in November 1984.

The thalli (Figs. 1, 2) consist of a prostrate system from which erect filaments arise. Decumbent filaments are fastened to the substratum (*Posidonia oceanica* leaves) by means of multicellular rhizoids ending in an adhesive disc (Fig. 3). Erect branches bear pairs of opposite branchlets decussately arranged (Fig. 4). The basal cells of the branchlets are characteristically smaller than the other ones, and nearly quadrate in form. From these cells lateral branches adventitiously originate and, in the lowermost parts of the thallus, the rhizoids too (Fig. 5). The branchlets are alternately ramified with one- or many-celled pinnae. From the many-celled ones, 1-3 pinnules one- or two-celled, generally issue unilaterally from the abaxial side (Fig. 6). Both the two-celled pinnae and the two-celled pinnules have the basal cell longer than the apical one (2-3 times in the pinnae,



1.5 times in the pinnules). They also bear on the adaxial side one gland cell which rests on both of them (Figs. 7, 8). Terminal cells are provided with two, rarely one, long hyaline hairs (Fig. 9).

### REMARKS

*Antithamnion piliferum*, even though lacking reproductive organs, belongs, undoubtedly, to the genus *Antithamnion* on the basis of the following features: (sub-)equal whorl-branchlets, that initiate in a regular sequence, arranged in opposite pairs and each with a small basal cell, quadrate in form and gland cells borne on special two-celled branches. These vegetative characters are typical of the genus *Antithamnion* as defined by WOLLASTON (1968, 1971, 1972).

From the pattern of branching *A. piliferum* appears to be related to both *A. ogdeniae* and *A. antillanum* Boergesen as described by BOERGESSEN (1930) on the basis of the specimens from the Canary Islands<sup>1</sup>. Specimens from the Antilles, in fact, showed branching of erect axes which was opposite but not decussate (BOERGESSEN, 1917) and unequal-dimorphic whorl branchlets (ATHANASIADIS, 1985).

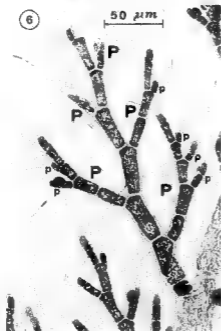
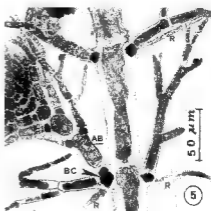
A pattern of branching similar to *A. piliferum*, is also showed by both *A. therminieri* Nasr and BOERGESSEN's *Antithamnion* sp. (BOERGESSEN, 1917: 229-230). But the former, as pointed out by ATHANASIADIS (1985), bears unequal-dimorphic whorl branchlets (this feature led ATHANASIADIS to consider it conspecific with *A. antillanum*), and the latter, unlike *A. piliferum*, has a quite extended prostrate system and no gland cells.

*A. piliferum* differs from the above mentioned species in the whorl branchlets that are quite short with a rachis of few cells (up to 10). This character is also showed by *A. diminutum* Wollaston that, however, bears 1-3 opposite pairs of pinnae at the lower parts of whorl branchlets (WOLLASTON, 1968; 1984, under *Antithamnion* sp.) as also *A. ogdeniae* occasionally does (ATHANASIADIS, 1985). Such pairs of pinnae are never showed by *A. piliferum*.

Moreover in *A. therminieri*, *A. antillanum* and *A. ogdeniae* the unramified pinnae as well as numerous pinnules, are many-celled; while in *A. piliferum* they are one- or two-celled and the two-celled ones, which bear the gland cell, show, as above mentioned, the basal cell to be longer than the apical one. The gland cells in *A. piliferum* are scattered on the thallus and always borne on two-celled

[1] These specimens, according to ATHANASIADIS (1985) have to be referred to *A. ogdeniae*.

Figs. 1-3 — *Antithamnion piliferum* sp. nov. Fig. 1: Habit of a specimen with shorter cells. Fig. 2: Habit of a specimen with longer cells. Fig. 3: Rhizoids (R) from a reduced prostrate axis (PA).



branches (pinnae and pinnules with the above mentioned characteristics). On the contrary, in *A. ogdeniae* gland cell branches consist of two or three cells (ABBOTT, 1979; ATHANASIADIS, 1985); in *A. diminuatum* of two to four (-five) cells (WOLLASTON, 1968; 1984, under *Antithamnion* sp.); in *A. antillanum* of two to four (rarely more) cells (BOERGESEN, 1917; ITONO, 1969 (as *A. lherminieri*), 1977; BOUDOURESQUE et VERLAQUE, 1976<sup>1</sup>; ABBOTT, 1979; WOLLASTON, 1984), and in *A. lherminieri* of two to six cells (NASR, 1941) or rarely of more than ten cells (ABBOTT, 1979).

Finally, the occurrence of hyaline hairs in the genus *Antithamnion*, is very rare. *A. cruciatum*, the type species of the genus, does not show any, either in the cells bearing carpogonial branches (L'HARDY-HALOS, 1968) unlike the related genus *Antithamnionella* Lyle does (L'HARDY-HALOS, 1968, Fig. 9D; 1985, Figs 27 and 41). Only in *A. cruciatum* var. *profundum* G. Feldmann-Mazoyer, L'HARDY-HALOS (1968 Fig. 14F) depicts a hyaline hair but it seems almost occasional. Terminal hair cells were observed in culture plants (female gametophytes) of *A. heterocladum* Funk (ATHANASIADIS, 1983) and in field specimens of Boergesen's *Antithamnion* sp. (BOERGESEN, 1917 : 229-230), but in both these taxa they were borne only singly.

Therefore, as far as we know, *A. piliferum* is the only species of *Antithamnion* in which pairs of terminal hairs (the functional significance of which is at present unknown) regularly occur.

Vegetative features of *A. piliferum* can be summarized as follows :

- whorl branchlets opposite and decussately arranged
- (sub-)equal whorl branchlets short (up to 10 cells)
- no pairs of opposite pinnae on whorl branchlets
- gland cells placed only on two-celled branches which have the basal cell longer than the apical one
- terminal cells provided with pairs of hyaline hairs.

1. On the basis of ATHANASIADIS' (1985) remarks, specimens from Corsica have probably to be referred to *A. ogdeniae*.

Fig. 4-9. — *Antithamnion piliferum* sp. nov. Fig. 4 : Detail of branching of an erect axis. The whorl-branchlets are opposite and decussately arranged. Fig. 5 : The lowermost part of an erect axis. Origin of rhizoids (R) and of an adventitious branch (AB). (BC) Basal cell of the branchlet. Fig. 6 : Branchlet bearing pinnae (P) with pinnules (p). Fig. 7 : Gland cell resting on a two-celled pinnule. Fig. 8 : Gland cell resting on a two-celled pinna. Fig. 9 : Detail of terminal hyaline hairs.

**Key to the Mediterranean species, varieties and formae  
of *Antithamnion* based on vegetative features**

- 1a Unequal-dimorphic whorl-branchlets. Gland cells or not . . . . . 2
- 1b Equal or sub-equal whorl-branchlets opposite and decussately arranged.  
Gland cells or not . . . . . 3
- 2a No gland cells . . . . . *A. heterocladum* Funk
- 2b Gland cells on specialized branches of 2-4 (rarely more) cells . . . . .  
. . . . . *A. antillanum* Boergesen<sup>1</sup>
- 3a No gland cells . . . . . *A. tenuissimum* (Hauck) Schiffner
- 3b Gland cells on specialized branches . . . . . 4
- 4a Whorl-branchlets alternately ramified . . . . . 5
- 4b Whorl-branchlets oppositely or unilaterally (also alternately in var. *profundum*)  
ramified . . . . . 6
- 5a Terminal cells provided with pairs of hyaline hairs. Whorl-branchlets short  
up to 10 cells. Gland cells on 2-celled branches which show the basal cell  
usually longer . . . . . *A. piliferum* sp. nov.
- 5b No such terminal pairs of hyaline hairs. Whorl-branchlets long up to 17 cells.  
Occasionally pairs of opposite pinnae at the lower part of whorl-branchlets.  
Gland cells on 2-3 celled branches . . . . . *A. ogdeniae* Abbott
- 6a Pinnae unilateral and/or opposite; if opposite then generally unequal. Cells  
1-5 times longer than broad . . . . . 7
- 6b Pinnae mostly unilateral or alternate, rarely opposite. Cells 5-7 times longer  
than broad . . . . . *A. cruciatum* (C. Agardh) Naegeli  
. . . . . var. *profundum* G. Feldmann-Mazoyer
- a) Only erect axes . . . . . f. *profundum*
- b) Axes mostly prostrate . . . . . f. *radicans* G. Feldmann-Mazoyer
- 7a Cells 1-2 times longer than broad . . . . . *A. cruciatum* (C. Agardh) Naegeli  
. . . . . var. *pumilum* (Harvey) L'Hardy-Halos<sup>2</sup>
- 7b Cells 3-5 times longer than broad . . . . .  
. . . . . *A. cruciatum* (C. Agardh) Naegeli var. *cruciatum*
- a) Only erect axes . . . . . f. *cruciatum*
- b) Axes mostly prostrate . . . . . f. *radicans* (J. Agardh) Collins et Hervey

Three more taxa are reported from the Mediterranean Sea, but their validity and/or taxonomic rank appear doubtful. They are : *A. cruciatum* var. *comosum* Schiffner, *A. cruciatum* var. *comosum* f. *moniliatum* Schiffner and *A. cruciatum* f. *fragilissimum* (Zanardini) Hauck. The first two taxa are reported only by SCHIFFNER (1926) respectively from Gulf of Naples and Capodistria. Schiffner's descriptions are poor : neither iconography, nor informations on whorl branchlets branching are given. So, they don't appear well characterized and their validity remains doubtful. *A. cruciatum* f. *fragilissimum* is reported from

1. Mediterranean reports of this species have probably to be referred to *A. ogdeniae*.

2. Reported from Catalan coast by BALLESTEROS et ROMERO (1982).

the Adriatic Sea by ZANARDINI (1860, as *Callithamnion fragilissimum* Zanardini), HAUCK (1885), DE TONI (1903, as *A. fragilissimum* (Zanardini) De Toni), PREDA (1908), PIGNATTI (1962); from the Aegean Sea by GERLOFF and GEISSLER (1971), HARITONIDIS and TSEKOS (1974, 1976). The examination of Zanardini's specimens (in *exsiccata*) held in Museo Civico Storia Naturale of Venice, did not permit to observe either thallus structure, or if there were, any gland cells which, on the other hand, aren't mentioned in the description neither are showed in the iconography. Therefore, the taxonomic rank of this taxon remains doubtful. In fact, if it had gland cells like *A. cruciatum*, then it could be considered, according to HAUCK (1885), as a form with whorl branchlets regularly alternately ramified. On the contrary, if gland cells were not arranged as in *A. cruciatum* or were completely lacking, then it could be treated as a species.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Director of Museo Civico Storia Naturale of Venice for the facilities for the examination of Zanardini's Herbarium.

This work was supported by a Grant from the Italian Ministry of Public Education.

#### REFERENCES

- ABBOTT I.A., 1979 — Some tropical species related to *Antithamnion* (Rhodophyta, Ceramiales). *Phycologia* 18 : 213-227.
- ATHANASIADIS A., 1983 — The life history of *Antithamnion heterocladum* (Rhodophyta, Ceramiales) in culture. *Bot. Mar.* 26 : 153-157.
- ATHANASIADIS A., 1985 — North Aegean marine algae. I. New records and observations from the Sithonia Peninsula, Greece. *Bot. Mar.* 28 : 453-468.
- BALLESTEROS E. and ROMERO J., 1982 — Catálogo de las algas bentónicas (con exclusión de las diatomeas) de la costa Catalana. *Collect. Bot. (Barcelona)* 13 : 723-765.
- BOERGESEN F., 1917 — The marine algae of Danish West Indies. 3. Rhodophyceae. *Dansk. Bot. Ark.* 3 : 145-240.
- BOERGESEN F., 1930 — Marine algae of the Canary Islands. Rhodophyceae. III. Ceramiales. *Kongel. Danske Vidensk.-Seelsk. Skr.* 9 : 1-159.
- BOUDOURESQUE Ch.F., 1984 — Groupes écologiques d'algues marines et phytocénoses benthiques en Méditerranée nord-occidentale : une revue. *Giorn. Bot. Ital.* 118 (1-2) suppl. 2 : 7-42.
- BOUDOURESQUE Ch.F. et VERLAQUE M., 1976 — Sur quelques Rhodophycées intéressantes des côtes de Corse. *Bull. Soc. Phycol. France* 21 : 56-64.
- DE TONI J.B., 1903 — Sylloge Algarum omnium hucusque cognitarum. Vol. IV. Floridearum. Sectio III. Patavii.
- FELDMANN-MAZOYER G., 1940 — Recherches sur les Cériamiacées de la Méditerranée occidentale. Alger, 510 p.
- GERLOFF J. and GEISSLER U., 1971 — Eine revidierte Liste der Meeresalgen Griechenlands. *Nova Hedwigia* 22 (3-4): 721-793.
- GIACCONE G., COLONNA P., CLEMENTE G., MANNINO A.M., TORNATORE E., COR-

- MACI M., FURNARI G. and SCAMMACCA B., 1985 — Revisione della flora marina di Sicilia e isole minori. *Boll. Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania*, 18 (326) : 537-781.
- HARITONIDIS S. and TSEKOS I., 1974 — A Survey of the Marine Algae of Thassos and Mytilene Islands, Greece. *Bot. Mar.* 17 : 30-39.
- HARITONIDIS S. and TSEKOS I., 1976 — Marine Algae of the Greek West Coast. *Bot. Mar.* 19 : 273-286.
- HAUCK F., 1885 — Die Meeresalgen Deutschlands und Oesterreichs. Rebenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Bd. 2. Leipzig.
- HUISMAN M.J. and KRAFT T., 1984 — The genus *Balliella* Itono & Tanaka (Rhodophyta : Ceramiaceae) from Eastern Australia. *J. Phycol.* 20 : 73-82.
- ITONO H., 1969 — The genus *Antithamnion* (Ceramiaceae) in Southern Japan and adjacent waters. I. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 18 : 29-45.
- ITONO H., 1977 — Studies on the Ceramiaceous algae (Rhodophyta) from Southern parts of Japan. *Biblioth. Phycol.* 35 : 1-499.
- L'HARDY-HALOS M.T., 1968 — Les Ceramiaceae (Rhodophyceae-Florideae) des côtes de Bretagne : 1. le genre *Antithamnion* Naeg. *Rev. Algol. n. s.* 9 (2) : 152-183.
- L'HARDY-HALOS M.T., 1985 — Les Céramiacées (Rhodophycées, Floridées) des côtes de Bretagne. II. Particularités biologiques de l'*Antithamnion sarniense* (Lyle) G. Feldmann et de l'*A. spirographidis* Schiffner. *Rev. Cytol. Biol. Végét.-Bot.* 8 : 89-116.
- NAEGELI C., 1847 — *Die neueren Algensysteme*. Zurich, 275 p., 10 pl.
- NASR A.H., 1941 — Some new and little known algae from the Red Sea. *Rev. Algol.* 12 : 57-76.
- PIGNATTI S., 1962 — Associazioni di alghe marine sulla costa veneziana. *Mem. Ist. Ven. Sci. Lett. Arti* 32 (3) : 1-134.
- PREDA A., 1908 — *Flora italica cryptogama. II. Algae : Florideae*. 1 (2), Rocca S. Casciano, 462 p.
- SCHIFFNER V., 1926 — Beiträge zur Kenntnis der Meeresalgen. *Hedwigia* 66(5) : 293-320.
- SCHIFFNER V., 1931 — Neue und bemerkenswerte Meeresalgen. *Hedwigia* 71 : 139-205.
- WOLLASTON E.M., 1968 — Morphology and taxonomy of southern australian genera of *Crouantiae* Schmitz (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Austral. J. Bot.* 16 : 217-417.
- WOLLASTON E.M., 1971 — *Antithamnion* and related genera occurring on the Pacific coast of North America. *Syesis* 4 : 73-92.
- WOLLASTON E.M., 1972 — Generic features of *Antithamnion* (Ceramiaceae, Rhodophyta) in the Pacific Region. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 7 : 142-145.
- WOLLASTON E.M., 1984 — Species of Ceramiaceae (Rhodophyta) recorded from the International Indian Ocean Expedition, 1962. *Phycologia* 23 : 281-299.
- ZANARDINI G., 1860 — *Iconographia phycologica adriatica ossia scelta di ficee nuove o più rare del mare Adriatico*. Vol. I. Antonelli, Venezia.



## OUVRAGES REÇUS POUR ANALYSE

SOURNIA A., 1986 — Atlas du phytoplancton marin, vol. 1 : introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées. Edit. C.N.R.S., 219 p.

Cet atlas illustré de 373 figures étudie les genres de Cyanophycées (4 gen.), de Dictyochophycées (1 gen.), de Dinophycées (131 gen.) et de Raphidophycées (2 gen.) du plancton marin. Pour chaque genre nous trouvons la référence originelle, l'étymologie, la typification, la synonymie, la bibliographie, la diagnose, les affinités, l'écologie et le nombre d'espèces. Des tableaux placés dans le texte facilitent le travail de détermination; nous avons ainsi un tableau général des ordres de Dinophycées, et pour les Dinophysales, les Noctilucales, les Gymnodinales, les Peridinales des tableaux de genres.

Une bibliographie très complète de 21 pages et un index terminent le volume.

Cet ouvrage remarquable, qui fait honneur à son auteur, sera un instrument de travail pratique, indispensable à tous ceux qui s'intéressent à la vie du milieu marin.

P. Bourrelly

KRISTIANSEN J. et ANDERSEN R.A., 1986 — Chrysophytes : aspects and problems. Cambridge Univ. Press, 1 vol. relié, 337 p.

Ce volume groupe 21 communications présentées au 1er Symposium international sur les Chrysophytes de Grand Forks (U.S.A.) en 1983. Nous y trouvons 6 chapitres : 1) définition et affinités; 2) taxonomie surtout consacrée aux genres à écailles siliceuses et aux genres loriqués; 3) biologie cellulaire avec des notes sur la formation des écailles chez *Synura* et la fluorescence chez *Ochromonas*; et l'A.D.N. des plantes chez *Olisthodiscus*; 4) dynamique des populations des planctons à Chrysophycées; 5) écologie et biogéographie des Chrysophycées à écailles siliceuses; 6) paléobiologie des kystes siliceux et des écailles dans le sédiment des lacs, écailles fossiles du précambrien du Canada.

Cette brève énumération des chapitres de l'ouvrage montre tout l'intérêt de ce volume qui touche aux plus divers disciplines.

P. Bourrelly

MOORE J.A., 1986 — Charophytes of Great Britain and Ireland. Bot. Soc. Brit. Isles, 1 vol. 140 p.

Ce petit volume, d'un format de poche, permettra la détermination facile des Charophytes de nos régions. Les 20 premières pages présentent le monde des Charophytes et le vocabulaire particulier de ce groupe : développement, structure végétative et sexualité, écologie. Puis vient la systématique et la des-

cription des taxons. Nous y trouvons 12 espèces de *Chara* (et leurs variétés), 1 *Lamprothamnium*, 1 *Nitellopsis*, 8 *Nitella*, 3 *Tolypella*. Enfin, 17 cartes montrent la répartition géographique de ces taxons en Grande Bretagne et Irlande. Des clefs dichotomiques permettent de déterminer genres, espèces et variétés.

Une bibliographie sommaire, un glossaire et un index terminent le volume.

L'illustration est abondante et très soignée : pour chaque taxon, la diagnose sur une page et sur la page en face les figures : vues d'ensemble et de détails.

Comme on le voit un petit volume mais une excellente documentation : vraiment une réussite !

P. Bourrelly

De PUYTORAC P., GRAIN J. et MIGNOT J.P., 1987 – **Précis de protistologie**. Boubée édit., 1 vol., 581 p.

Ce Précis est le fruit du travail de l'équipe de l'Université de Clermont-Ferrand et traite de tous les Protistes, animaux et végétaux. Il est illustré de 302 figures (en vérité 302 planches) et de 12 planches photographiques. Il est divisé en 5 parties : 1) structure et ultrastructure; 2) reproduction; 3) physiologie; 4) place actuelle des Protistes dans la biosphère; 5) systématique. Les algologues y trouveront des études intéressantes sur les Dinophycées, les Chrysophycées, les Prymnophycées, les Cryptophycées, les Euglénophycées, les Volvocales et les Choanoflagellés. De nombreux schémas précisent l'ultrastructure des divers taxons. Dans la 4ème partie est traitée l'écologie des protistes, le parasitisme et le commensalisme. Cette trop succincte analyse montrera, nous l'espérons, la richesse et la diversité de la documentation fournies par cet ouvrage. Un index des genres et espèces étudiés facilitera les recherches.

En conclusion un ouvrage de base qui est recommandé aussi bien aux algologues qu'aux zoologistes et à tous ceux qui s'intéressent au monde aquatique.

P. Bourrelly

Commission paritaire 15-9-1981 - N° 60590  
Dépôt légal n° 13460 - Imprimerie de Montligeon  
Sorti des presses août 1987

Imprimé en France

Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)  
Président : A. Couté; Secrétaire : D. Lamy  
Trésorier : R. Baudoin; Directeur de la publication : H. Causse

