

'X-Chromosome' in the Honey-Bee

A lively controversy has been going on since the presence of a sex-chromosome was reported by MANNING¹⁻³. He claims that a heteropycnotic hook-shaped chromosome, called the X-chromosome, lags and is later excluded during the male meiosis II. Consequently, sperms with 15 chromosomes instead of 16 are produced. Envisaging maleness for the X-chromosome and femaleness for the autosome, MANNING put forward a scheme of genic balance where X/15A is a male, producing sperms with C/15A, and X/30A is a female, producing eggs with X/15A. However, the very existence of the 'X-chromosome' has been viewed with a lot of scepticism, because such a chromosome was hitherto unobserved and unthought of in the honey-bee.

In the living cells of *Apis indica*, the present author (SHARMA et al.⁴) has observed that one chromosome definitely lags behind in the late anaphase of male meiosis II, but it is not excluded from the ultimate telophase mass. The same observation was later confirmed in still another honey-bee species, *A. dorsata* (KUMBKARNI⁵). That the lagging element is surely ultimately included in the nuclear make-up of the spermatid is further proved *inter alia* by the presence of 32 identical premeiotic chromosomes in the zygogenetic female in both species. The author has made more or less similar observations in the carpenter-bee, *Xylocopa fenestata* (KUMBKARNI⁶), the formicid ant, *Camponotus compressus* (KUMBKARNI⁷), the wasp, *Polistes hebraeus*, the braconid, *Bracon nicevillei*, and the sawfly, *Athalia proxima* (KUMBKARNI⁸). In all these cases it may be emphasized that: (1) the lagging chromosome always joins the others in the spermatid-nucleus formation; (2) it does not display any appreciable difference in size or shape and is not heteropycnotic; (3) there is no counterpart of the lagging chromosome in the female germ cells; (4) the lagging element is not witnessed in all the cells - rather, it has far less occurrence in the Hymenoptera other than the bees; (5) the hooked nature of the lagging chromosome is dis-

played also by many chromosomes of both the germ - and somatic - cells in *X. fenestata*.

Therefore it is not possible to attach any sex-determining significance to this lagging chromosome in the honey-bee or other Hymenoptera. The lagging may be explained as a simple case of partially delayed anaphase segregation due to factors not well comprehended so far. Or else it could be that the lagging is the relic behaviour reminiscent of the extinct zygogenetic male Hymenoptera before the male parthenogenesis set in the group. At the same time it is imperative to consider the 'multiple sex allele' theory, propounded for *Habrobracon* by WHITING⁹ and later applied to *Apis* by ROTHENBÜHLER¹⁰ and others, as equally valid, tentatively for all other Hymenoptera also.

Zusammenfassung. Das bei Drohnen in der Anaphase der zweiten Reifeteilung nachhinkende Chromosom wird schliesslich in den Spermatidenkern aufgenommen. Entgegen dem Vorschlag von MANNING¹⁻³ kann diesem Chromosom deshalb keine geschlechtsbestimmende Bedeutung zugeschrieben werden.

C. G. KUMBKARNI

Department of Zoology, Government College, Ludhiana (India), November 2, 1964.

¹ F. J. MANNING, Microscope 7, 175 (1949).

² F. J. MANNING, Microscope 8, 7 (1950).

³ F. J. MANNING, Evolution 6, 443 (1952).

⁴ G. P. SHARMA, B. L. GUPTA, and C. G. KUMBKARNI, J. R. microsc. Soc. 79, 337 (1961).

⁵ C. G. KUMBKARNI, Indian J. exp. Biol. 2, 65 (1964).

⁶ C. G. KUMBKARNI, Cytologia, in press (1965).

⁷ C. G. KUMBKARNI, Caryologia, in press (1965).

⁸ C. G. KUMBKARNI, Doctoral thesis, Panjab University, Chandigarh, India (1961).

⁹ P. W. WHITING, Quart. Rev. Biol. 20, 231 (1945).

¹⁰ W. C. ROTHENBÜHLER, J. Hered. 48, 160 (1957).

Développement du virus de la maladie des noyaux denses de *Galleria mellonella* en culture de tissus de Lépidoptères

Une maladie à virus, différente de tous les types connus chez les invertébrés, a été mise en évidence récemment chez le Lépidoptère *Galleria mellonella* L.¹. Elle est caractérisée par une évolution rapide dans tous les tissus de la cavité viscérale, par l'hypertrophie des noyaux avec formation de corps volumineux intranucléaires et par la lyse du cytoplasme. Le virus responsable de la maladie a été isolé et purifié. Au microscope électronique, il apparaît parasphérique, d'un diamètre de 21 à 23 mμ avec contours hexagonaux. La maladie a pu être reproduite sur larves de *G. mellonella*, par contamination buccale ou par injection des virus purifiés.

Les tissus sensibles étant connus et le virus responsable purifié, nous avons envisagé la réalisation de l'infection in vitro, sur culture de tissus.

Matériel et méthodes. (a) Les cultures cellulaires: Nous avons prévu l'infection de cultures de cellules de deux

Lépidoptères, l'un *G. mellonella* étant l'espèce de laquelle le virus a été isolé, l'autre *Bombyx mori* L. dont les cultures cellulaires sont maintenues en permanence dans notre Laboratoire.

Les cellules cultivées provenaient de l'enveloppe de chaînes ovariques de chrysalides. Le principe de mise en culture était celui décrit antérieurement pour ce type de tissus^{2,3}, avec emploi des milieux G.m. 17 et B.m. 22. Les cultures ont été réalisées selon les techniques de la goutte posée et de couches cellulaires à partir d'explants en suspension, en fioles reversibles et en tubes à lamelles. La culture des fibroblastes de chaînes ovariques de Lépidoptères est réalisée le plus souvent à 23°. Toutefois, afin de se rapprocher des conditions de développement du virus dans *G. mellonella* (insectes vivants de 28 à 30°), nous avons maintenu les cultures à 26°C.

¹ C. VAGO, G. MEYNADIER et J. L. DUTHOIT, Ann. Epiphyties 15, 473 (1964).

² C. VAGO et S. CHASTANG, Exper. 14, 426 (1958).

³ C. VAGO et S. CHASTANG, C. r. Acad. Sci. 257, 903 (1960).

(b) La matière infectieuse: Après contamination, par voie buccale, de larves de *Galleria*, avec une suspension de virus purifiés, la période du début de la formation des plages amorphes nucléaires a été précisée (à 28°: 4 jours). L'hémolymphe prélevée aseptiquement, à ce moment est introduite directement et immédiatement dans la culture. En effet, en attendant d'établir la courbe d'évolution du virus dans l'animal vivant (étude en cours) nous avons supposé par analogie avec les polyédries que c'est à ce moment là que le virus est le plus abondant dans l'hémolymphe et dans les tissus. Le contrôle au microscope électronique, après coloration négative à l'acide phosphotungstique⁴, a montré la présence d'un grand nombre de virus parasphériques.

(c) Modes de contamination: Les fibroblastes maintenus en culture continue ont été infectés par l'addition de milieu contenant 0,5% d'hémolymphe infectieuse. Cette dernière ne subit aucun traitement inhibiteur de tyrosinase car le faible quantité introduite ne provoque pas de mélanisation notable. Avec les cultures établies à partir d'explants, le changement de milieu est effectué au bout de 2-3 jours environ de culture, après la migration des

fibroblastes, en remplaçant le milieu normal par celui contenant l'hémolymphe infectieuse. Dans ce cas, comme dans le premier, la matière infectieuse reste pendant 24 h en contact avec les cellules.

Résultats. Quatre jours après l'infection, on observe l'hypertrophie des noyaux de quelques fibroblastes dans les cultures infectées.

A partir de ce moment, on note l'apparition de plages à l'intérieur des noyaux dont l'hypertrophie continue à s'accroître. Ces plages sont uniformément colorées en gris-bleuâtre avec la méthode de l'hémalum érythrosine (Figures 1 et 2), et elles remplissent de plus en plus les noyaux, ne laissant qu'un halo moins dense. Elles sont basophiles et s'imprègnent fortement avec le bleu de méthylène ou le violet de cristal. Elles sont Feulgen positives, avec augmentation progressive de l'intensité de cette réaction.

Même à un stade évolué de l'infection, toutes les cellules de la culture ne présentent pas les altérations du type qui vient d'être décrit. Toutefois, l'hypertrophie nucléaire et la réduction d'émission de pseudopodes deviennent de plus en plus généralisées (Figure 3).

Les cultures infectées présentent, dans leur ensemble, des signes de dégénérescence et au bout de 6 jours ne montrent qu'un faible développement, alors que les cultures témoins continuent à proliférer.

Conclusions. Ces observations montrent que l'introduction du virus de la «maladie des noyaux denses» dans les cultures de fibroblastes des Lépidoptères *G. mellonella* et *B. mori* provoque des altérations cellulaires caractéristiques, semblables à celles observées dans les tissus des insectes atteints⁵. Ces lésions ne ressemblent à aucun type d'altérations notées en cultures de tissus d'invertébrés. En particulier, elles sont d'une nature entièrement différente des inclusions nucléaires consécutives aux infections à virus de polyédries. La formation de plages intranucléaires basophiles, Feulgen positives, permet d'établir certaines analogies avec les lésions provoquées par certains adénovirus. Les études en cours, au microscope électronique, de coupes ultrafines de cultures cellulaires et de tissus d'animaux malades sont appelées à apporter des renseignements sur ce point.

Non seulement les cellules de l'hôte normal du virus sont réceptives, mais également celles d'une autre espèce de Lépidoptères. Ce fait dénote une certaine affinité interspécifique du virus, tout au moins dans des conditions «in vitro».

Les résultats relatés permettent d'envisager désormais l'étude à l'échelle cellulaire de la pathogénèse de ce nouveau type de virose. Ils constituent aussi la première infection de culture de tissus par un virus d'invertébrés sans corps d'inclusions polyédriques.

Summary. In tissue cultures of ovarian tubes of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori* (Lepidoptera) infected by the virus of the 'disease of dense nuclei' of *G. mellonella*, fibroblasts show changes characteristic of the disease. These changes consist of the formation of intranuclear, Feulgen-positive, basophilic masses and are followed by lysis of the cells.

C. VAGO et J. LUCIANI

Laboratoire de Cytopathologie, I.N.R.A.,
Saint-Christol-les-Alès (Gard, France),
le 19 janvier 1965.

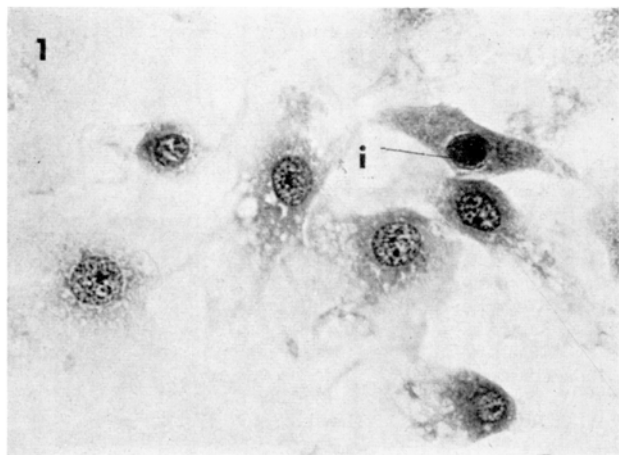


Fig. 1. Culture de fibroblastes de *Bombyx mori*. Lésion nucléaire avec formation d'inclusion dense (i) quatre jours après infection avec le virus de la maladie à noyaux denses de *Galleria*. Hémalum-érythrosine.

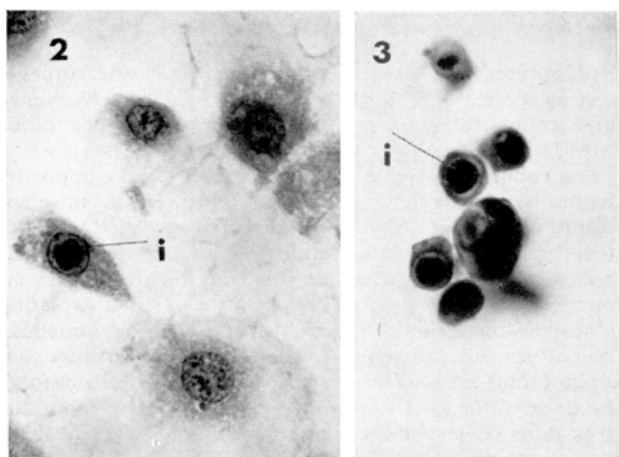


Fig. 2. Inclusion intranucléaire (i) en voie de formation dans la même culture.

Fig. 3. Culture de fibroblastes de *Galleria mellonella* infectée avec le même virus. Arrondissement des cellules avec inclusions denses intranucléaires. Hémalum-érythrosine.

⁴ S. BREENER et R. W. HORNE, Biochim. biophys. Acta 34, 103 (1959).

⁵ A. AMARGIER, C. VAGO et G. MEYNADIER, Arch. Virusforsch., sous presse (1964).