

abdominal segment of the pupa become entangled in the threads of the bolster which, together with the girdle, holds the pupa in a vertical position. This behaviour corresponds to line A in the Figure.

The great majority of the JHD treated larvae attempted moulting. Larvae treated at 33 h or later prepared usually for a pupal moult, whereas those who had been treated earlier prepared for a supernumerary larval moult (L_6). The former behaved exactly like normal controls ready to pupate. The larvae preparing for an L_6 moult moved to the walls of the rearing boxes, where, after more or less intense spinning, they took on a position with the head pointing downwards. The spinning of these insects was, as a rule, more intense than that of L_4 . The insects treated with JHD at 0–9 h usually spun light webs only and, as a rule, were able to complete moulting to L_6 (Figure, line D) or, in a few cases, never moulted again and became 'dauer-larvae' (Figure, line E).

On the other hand, L_5 treated at 9–33 h with the second JHD spun denser nets (sometimes as densely woven as the platform of a prepupa) and had moulting difficulties. They rarely succeeded in completing the moulting process, because they were not able to get rid of the old head capsule and/or the exocuticle of the body. Except for the last abdominal segments the majority of these larvae could not loosen the old skin from the new integument. This was partly due to the fact that the dorsal rupture in the old exocuticle of the thorax had not taken place. The loosened exocuticle of the hind end became extensively stretched, by the weight of the larval body. After a day or two of unsuccessful moulting movements the insects became quiet, but stayed alive for another 2–3 days. The appearance of these larvae was very characteristic and since they were fixed to the wall of the rearing vessel by the cast skin of the prolegs of the last abdominal segment only, they will be called 'hangers' (Figure, line C).

Part of the hanger-syndroms is the failure to tear the old tracheal cuticle fully out of the spiracles. Therefore, wherever the old cuticle becomes loose, white bands of tracheae run backwards from the spiracles. It is probable that diffusion of air into tracheae is handicapped by the old tracheal strands. This may cause hypoxia in the hangers and hasten their death.

The intense spinning of larvae that will become 'hangers' indicates that these insects, although preparing for a larval moult, partly behave like larvae in the prepupal phase. According to NOVAK's theory this would show that between the L_4/L_5 moult and the time of application of the JHD the nervous system had already developed pupal characters and that this process could not be reversed by the JHDs applied.

However, the most interesting behaviour has been shown by a number of larvae which first spun a complete prepupal silk platform with a bolster of loose silk threads at the lower end and a girdle around the body, but then moved head and thorax out of the girdle, took on a position with the head pointing downwards, and eventually died as 'hangers' (Figure, line B). These insects first

showed the typical prepupal behaviour of larvae ready for the pupal moult, but afterwards changed their behaviour to one related with larval/larval moulting. However, it may be noteworthy that JHDs, when applied at 60 h or later, could never induce such a reversal of behaviour.

The results show that the spinning behaviour of *P. brassicae*, like that of *G. mellonella*², is strongly influenced by the titer of the JH. Initiation of migration and spinning behaviour of normal larvae of *P. brassicae* seems to be induced by the presence of the moulting hormone (MH) and/or a reduced titer of JH. Thus some larvae treated with an JHD during or right after the L_4/L_5 moult will become 'dauer-larvae' which never again spin and moult (Figure, line E) or, after some time of feeding, will migrate and behave like younger larvae preparing for a larval/larval moult (Figure, line D). It is probable that in the former an extremely high titer of JH inhibits the synthesis of the MH, whereas in the latter a short period of a reduced titer of JH allowed MH production.

The development of typical 'hangers' (Figure, line C) seems to indicate that differentiation of the nervous system in the pupal direction begins already at about 9 h after the last larval moult. In agreement with NOVAK's theory the morphogenetic changes in the nervous system cannot be reversed by the application of JH, with the result that prepupal behaviour (intense spinning) is followed by larval behaviour, i.e. taking on a position with the head pointing downwards before the silk platform is finished.

However, contrary to the predictions of NOVAK's theory, a direct influence of JH on behaviour can also be demonstrated in those individuals which show the normal sequence of prepupal behaviour to the point when prepupal contraction of the body and a pupal moult should occur, but which instead return to larval behaviour (Figure, line B). These individuals show that true reversal of JH dependent behaviour from an ontogenetic later to an ontogenetic earlier pattern is possible, if the morphogenetic processes of nervous differentiation have not proceeded too far.

Zusammenfassung. Werden Raupen des Kohlweisslings *Pieris brassicae* im letzten Stadium mit synthetischen Juvenilhormonderivaten behandelt, so zeigen sie vor der nächsten Häutung, je nach Hormonspiegel, entweder das für eine Puppen- oder für eine Larvenhäutung charakteristische Verhalten. In Insekten, deren Nervensystem bereits teilweise präpupal determiniert ist, kann ein hoher Hormonspiegel eine Umkehr vom ontogenetisch späteren Präpupalverhalten zur ontogenetisch früheren Stufe des typischen Larvalverhaltens induzieren.

G. BENZ

Department of Entomology, Swiss Federal Institute of Technology Zürich, CH-8006 Zürich (Switzerland), 17 August 1973.

Mise en évidence d'une émission d'isoxanthoptérine et de riboflavine par différentes espèces d'Ascidies

GOODBODY¹, en mettant en évidence une apparition d'ammoniaque dans l'eau où avaient séjourné des Ascidies, avait montré que l'excrétion par accumulation ne pouvait être considérée comme la forme exclusive de l'élimination de l'azote par les espèces de ce groupe.

Nous décrivons ici des expériences analogues portant sur 9 espèces différentes, qui nous ont permis d'identifier 2 composés organiques fluorescents riches en azote: la riboflavine et l'isoxanthoptérine, parmi d'autres métabolites externes. La présence des ptérines² parmi les

Tableau I. Concentrations de l'isoxanthoptérine et de la riboflavine trouvées dans l'eau de mer des milieux expérimentaux des différentes espèces

Espèces mises en expérience		Poids frais (g)	Isoxanthoptérine (µg/l)	Riboflavine (µg/l)
<i>Ciona intestinalis</i> (Cionidae)	I	72	0,04	—
<i>Phallusia mammillata</i> (Ascidiidae)	I	230	0,02	—
	II	660	0,15	—
<i>Ascidella aspersa</i> (Ascidiidae)	II	70	—	2,20
<i>Ascidia mentula</i> (Ascidiidae)	II	300	—	—
<i>Synoicum argus</i> (Polyclinidae)	I	230	0,06	—
<i>Sidnyum elegans</i> (Polyclinidae)	II	110	—	—
<i>Molgula oculata</i> (Molgulidae)	I	96	0,03	—
	II	80	—	0,15
<i>Polycarpa pomaria</i> (Styellidae)	II	80	0,10	—
<i>Clavelina lepadiformis</i> (Clavelinidae)	II	35	—	—

Les chiffres I et II correspondent à la première et à la deuxième série d'expériences. Les poids frais sont ceux des populations mises en expérience.

substances habituelles excretées par les Crustacés planctoniques marins (ammoniaque, acide urique, urée), comme celle de la xanthoptérine chez *Microcosmus*³ et celle de l'isoxanthoptérine et de la riboflavine chez *Ascidella aspersa*⁴, rendaient en effet possible l'hypothèse d'une telle émission chez les Ascidies.

Matériel et méthodes. Deux séries d'expériences ont été faites au mois de juillet 1972. Les Ascidies (tableau I) provenaient de la région de Roscoff (Bretagne Nord). Après leur récolte, elles furent placées en eau de mer courante, au laboratoire. Au bout de 3 semaines, les populations de chaque espèce furent abondamment lavées, puis introduites dans des aquariums distincts contenant chacun environ 3 l d'eau de mer filtrée sur membrane Millipore de 0,45 µm de porosité. Les conditions expérimentales furent semblables dans les 2 séries d'expériences: éclairage, heure, température de l'eau (18°C ± 0,5); la durée de la première fut de 3 h, celle de la seconde 6 h. A la fin des incubations, un échantillon de 2 l était prélevé par aquarium, filtré sur membrane (0,45 µm) et congelé par de la carboglace. L'extraction des substances fluorescentes a été faite selon la méthode utilisée par l'un d'entre nous⁵: adsorption sur Florisil, élution à l'acétone à 30 %, passage sur Sephadex G-10. La chromatographie a été réalisée sur papier Whatman No 1 dans le propanol-ammoniaque à 1% (2:1) et la révélation sous une lampe à U.V. émettant à 360 nm. Nous avons ainsi constaté que les taches apparues étaient différentes par leur nombre et leur couleur de fluorescence suivant les extraits. Parmi ces composés, la riboflavine et l'isoxanthoptérine ont été identifiées par co-chromatographie avec les substances de référence, sur couches minces, dans 3 systèmes de solvants (tableau II) et la formation des produits de photolyse (lumichrome pour la riboflavine). Leurs concentrations dans l'eau ont été déterminées en comparant les intensités de fluores-

cence des taches sur les chromatogrammes initiaux avec celles de quantités connues des mêmes substances de synthèse, puis en rapportant au litre les quantités trouvées.

Résultats. Nous avons ainsi constaté que parmi les substances identifiées: a) l'isoxanthoptérine est celle qui est la plus fréquente (*Polycarpa*, *Synoicum*, *Ciona*, *Phallusia* et *Molgula*); b) la riboflavine se trouve dans 2 échantillons, celui d'*Ascidella* (dont le corps même contient ce composé) et de *Molgula* de la première série; c) l'émission se fait avec une certaine variabilité: la nature du ou des produits excretés varie d'une espèce à l'autre au sein d'une même famille, mais aussi d'une expérience à l'autre pour la même espèce (*Molgula*). En ce qui concerne *Phallusia*, les quantités d'isoxanthoptérine libérées deviennent sensiblement voisines, si elles sont ramenées à l'unité de poids, de temps, et de volume: $2,9 \times 10^{-5}$ µg/g de poids frais/h par l pour la première expérience et $3,9 \times 10^{-6}$ pour la seconde.

Conclusion. Pour la première fois, l'existence d'une émission de métabolites externes – à l'exception de l'ammoniaque – est mise en évidence chez les Ascidies. Il s'agit d'une substance azotée, l'isoxanthoptérine, et d'une vitamine du groupe B, la riboflavine. Des expériences ultérieures seront faites pour préciser l'origine de la variabilité des résultats.

Summary. A liberation of external metabolites – excepting ammonium – is shown for the first time in the Ascidians. Riboflavin and isoxanthopterin are identified by chromatography in the sea water where nine different species have been kept.

A. MOMZIKOFF⁶ et F. GAILL⁷

Institut Océanographique, Laboratoire de Physiologie des Êtres marins, 195 rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (France); et Laboratoire de Biologie des Invertébrés marins, Muséum National d'Histoire naturelle, 75005 Paris (France), 14 juin 1973.

Tableau II. Rf de l'isoxanthoptérine et de la riboflavine dans différents solvants après rechromatographie sur couches minces

Solvant	Isoxanthoptérine	Riboflavine
Propanol-ammoniaque à 1% (2:1)	0,20	0,41
Butanol-acide acétique eau (4:1:1)	0,18	0,35
Propanol-pyridine eau (3:1:1)	0,18	0,04
Eau	0,50	0,53

¹ I. GOODBODY, J. exp. Biol. 34, 297 (1957).

² A. MOMZIKOFF, Cah. Biol. mar., 14, 327 (1973).

³ P. KARRER, C. MANUNTA et R. SCHWYTZER, Helv. chim. Acta 31, 1214 (1948).

⁴ A. MOMZIKOFF, Archs Zool. exp. gén., 114, 3 (1973).

⁵ A. MOMZIKOFF, à paraître (1973).

⁶ Institut Océanographique, Laboratoire de Physiologie des Êtres marins, 195, rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (France).

⁷ Laboratoire de Biologie des Invertébrés marins, Muséum National d'Histoire Naturelle, F-75005 Paris (France).