

histochimiques spécifiques. L'évaluation approchée des poids moléculaires (PM) a été obtenue d'après une courbe établie à partir d'un témoin de sérum humain. La comparaison des activités d'animaux normaux et parasités est faite à l'aide d'un test de F portant sur les intégrations au photomètre intégrateur enregistreur Vernon (type PHI 3 UV) de 6 électrophorèses pour chaque activité et pour chaque lot de crabes.

Résultats. Ils sont regroupés dans un protéinogramme et dans un zymogramme schématiques sur lesquels les poids moléculaires ($PM \times 10^{-3}$) sont indiqués (figure). Le test de F effectué sur la somme des intégrations de chaque fraction protéique ne montre pas de différences significatives entre les animaux normaux et parasités; par contre, elles sont constatées entre ces deux lots pour certaines fractions protéiques. Chez les crustacés sains, 24 bandes ont été révélées, et 19 chez les microsporidiés. La diminution significative ($p < 0,01$) de l'intégration des bandes de PM 470 000 et 375 000 chez les parasités semble compensée par une augmentation de même valeur au niveau PM 60 000; de plus, 3 bandes disparaissent entre les PM 400 000 et 500 000 ainsi que 3 autres entre les PM 105 000 et 55 000; enfin, les crabes parasités se caractérisent par l'apparition d'une importante bande de PM 340 000 et la disparition d'une autre au niveau du PM 105 000. Chez les crabes normaux, 6 fractions ont une activité estérasique non spécifique de dégradation des acides organiques à 2C, les parasités en ont 8 (les 2 fractions supplémentaires se situant aux PM 155 000 et 65 000); chez ces derniers, au PM 480 000, l'intensité est nettement supérieure ($p < 0,05$). Sur les 4 fractions d'activité estérasique de dégradation des acides organiques à 12C, une seule (PM 375 000) diminue chez les parasités ($p < 0,01$). Alors que l'hémolymphe des crabes sains possède 4 fractions protéiques à activité estérasique de dégradation des acides organiques à 14C, celle des parasités en a 5 (la fraction supplémentaire est révélée au PM 60 000); cette apparition et l'augmentation de la bande de PM 375 000 ($p < 0,05$), chez les microsporidiés, semblent compensées par une diminution équivalente au PM 80 000 ($p < 0,01$) par rapport à l'intégration normale. Les activités phosphatase alcaline (PM 250 000), phosphatase acide (PM 145 000), α -glucosidase (PM 240 000) ne montrent pas de différences significatives entre les 2 lots. Quant à l'activité protéasique, elle semble être ef-

fectuée par une seule enzyme de PM approximatif de 340 000; elle est environ 6 fois plus forte dans l'hémolymphe du crabe parasité que dans celle de l'animal sain ($p < 0,05$).

Discussion. La technique utilisée nous permet d'une part d'obtenir un électrophorégramme plus détaillé que précédemment² (24 fractions au lieu de 18), notamment au niveau des fractions que nous avons considérées comme ayant une mobilité moyenne ou rapide, et d'autre part, d'évaluer leur poids moléculaire. En ce qui concerne l'apparition des fractions dans le protéinogramme des animaux parasités, nous pensons que celle de PM 340 000 correspond à une très forte augmentation de l'activité chymotrypsine, et celle de PM 60 000 à l'intensification de l'activité estérasique globale. Les travaux antérieurs effectués en disc-électrophorèse montrent que les Arthropodes microsporidiés ont tous une hémolymphe dont l'électrophorégramme est caractéristique de l'état pathologique considéré; cet électrophorégramme est différent d'un hôte à l'autre bien que les fractions protéiques concernées soient essentiellement celles dont la mobilité est lente ou moyenne^{2,4,5}. Remarquons que non seulement les hôtes étudiés appartiennent à des classes ou des ordres différents (Insectes Lépidoptère⁴ ou Phasmodoptère⁵, Crustacés Brachyura ou Natantia²) dont la physiologie est différente mais que les parasites font partie de genres distincts (Nosema⁴, Pleistophora⁵, Thelohania²). Par contre, Sacculina carcini (Crustacé Rhizocéphale) a une action dissemblable de celle de T. maenadis sur l'hémolymphe de C. mediterraneus car elle provoque l'apparition sur son électrophorégramme d'une fraction de haut poids moléculaire^{6,7}. Puisque chez les crabes parasités par T. maenadis, la seule fraction à activité chymotrypsine de l'hémolymphe augmente très fortement, cette augmentation ne serait-elle pas due à l'induction par la microsporidie d'une synthèse accrue de protéase par son hôte dont elle contrôlerait l'autolyse?

4 J. Weiser et O. Lysenko, Acta ent. bohemoslov. 69, 97 (1972).

5 F. Demarti-Lachaise et M. Raabe, C. r. Acad. Sci., Paris D 278, 2465 (1974).

6 C. Herberts, C. r. Acad. Sci., Paris D 279, 1625 (1974).

7 N. Andrieux, J. Berreur-Bonnenfant et C. Herberts, C. r. Acad. Sci., Paris 282, 2091 (1976).

Measurement of orientation responses of caterpillars indoors and outdoors on a grid

K. N. Saxena¹, P. Khattar and S. Goyal

Zoology Department, Delhi University, Delhi 110007 (India), 30 November 1976

Summary. A method has been developed to measure orientation responses of caterpillars to various sources of stimuli at predetermined distances on a grid of intersecting ribs indoors and outdoors.

In the course of our study of orientation of the larvae of *Papilio demoleus* and other lepidopterous insects, it was required to investigate the relationship between their responses, particularly taxis, and distances of various sources of stimuli in different combinations. For this study, it was essential that a) each free moving larva would show its response at a predetermined point at the desired distance from a source of stimulus, and b) its response would be sharply defined by allowing it to turn at right angles towards or away from the stimulus source. These requirements could not be met by the techniques

adopted for other lepidopterous larvae²⁻⁴. Satisfactory results were obtained by testing the larvae on a grid, as described below.

Material and methods. The grid (figure). It consists of a series of parallel, transverse ribs of plastic or iron wire intersecting at right angles another series of parallel, longitudinal ribs at desired distances. The surface of the ribs is coarse and their thickness such that the insects can grip the ribs and move on them with ease. The intersections of the ribs are at distances almost equal to the length of the test larvae so that a) a larva can move from

one rib to another only at an intersection, and b) on reaching an intersection, it can turn only at that point and not at the preceding intersection. A distance of about 2 cm between the intersections is suitable for *P. demoleus* larvae. The grid is supported on a 5–7 cm high stand and can be illuminated from above or below by fluorescent day-light tubes through a white fluorescent screen.

Presentation of stimuli. A source of one or more stimuli is placed on or outside the grid on the left or right of the central transverse rib in such a manner that the middle of the stimulus source is in the same plane as the central longitudinal rib at the desired distance from the central intersection of the 2 ribs (figure). The other side of the central transverse rib is left blank or provided with another source of stimulus.

When a source of stimulus is placed on the grid and stimuli from other sources are to be excluded, a vertical opaque screen is placed all round the grid, except at the top which may be open or covered with a glass plate for observation. In outdoor experiments using plants or other

large sources of stimuli, the grid may be placed on a stand of appropriate height at the desired distance from the sources of stimuli.

Measurement of response. Each larva is released on the grid and allowed to move towards the central intersection on the central transverse rib from its preceding intersection with the adjacent longitudinal rib. The larva, on reaching the central intersection, may continue to move forward on the same transverse rib or turn towards one or the other side on the central longitudinal rib. If the larva turns back on the transverse rib towards the preceding section, it is discarded. After recording its response, another larva is similarly tested by allowing it to move on the transverse rib in the reverse direction towards the central intersection. On the basis of ten tests in each replicate, the percentages of larvae moving forward (F) as well as of those turning towards each side (S, B) are calculated.

Results and discussion. In the absence of any directional stimulus, the percentages of *P. demoleus* larvae turning towards both the sides at the central intersection are almost equal ($30.1\% \pm \text{SE } 2.3$ and $28.4\% \pm \text{SE } 2.0$) whereas the percentage of those moving forward is a little higher ($37.1\% \pm \text{SE } 3.1$) and those reversing very low ($4.4\% \pm \text{SE } 1.3$).

In the presence of a stimulus source on one side and none on the other, the difference (S–B) between the percentages of the insects turning towards the stimulus source (S) and towards the opposite blank side (B), would indicate their orientational preference (P). Positive values of the orientational preference would imply attraction and negative values repulsion of the larvae by the stimulus source.

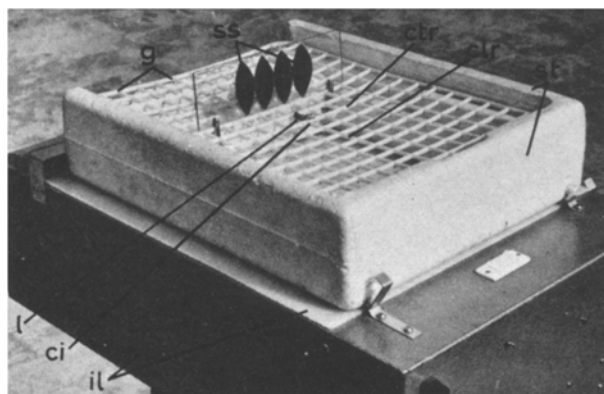
In order to illustrate the above method, some observations on the responses of the last (fifth) instar larvae of *Papilio demoleus* to the leaves of their host plant *Citrus limettoides* and a non-host *Gossypium hirsutum* are given in the table. Both the host and the non-host leaves elicited an almost equal larval attraction which declined with the increase in the distance.

The grid is particularly suitable for the study of orientation of caterpillars for the following reasons: Caterpillars of a number of lepidopterans find it difficult to move on a flat smooth surface. They can move with ease on a flat coarse surface e.g., wire gauze, filter paper, but they often turn by varying angles at irregular distances. Therefore, on such a surface, it is not possible to control the distance of the stimulus source from the larva at the time of its response. Also, it is not certain whether or not the larva turning in any direction is doing so in response to the stimulus. A 2–3 mm thick wire provides a convenient surface on which the larva can move. But, on a straight wire the larva moves and stops from time to time to turn its head and thorax to right or left. In such cases, it would again be difficult to decide whether or not the turning of the larva is spontaneous or in response to the stimulus. Such difficulties are avoided in the grid, the ribs of which provide a convenient substratum for the larval movement, and the intersections provide the opportunity for the larvae to turn at these points rather than inbetween.

Oriental responses of the last (fifth) instar larvae of *Papilio demoleus* to certain plant leaves presented at different distances on the grid

Plant*	Distance** (mm)	Percent larvae*** $\pm$ SE turning and moving towards Stimulus source (S)	Blank side (B)	Oriental preference (P)
Citrus limettoides	10	86.0 ± 4.0	2.0 ± 2.0	84.0
	15	80.0 ± 3.2	8.2 ± 2.5	72.0
	20	70.0 ± 4.5	8.0 ± 2.0	62.0
	25	58.0 ± 2.0	16.0 ± 2.5	42.0
	30	48.0 ± 2.0	16.0 ± 4.0	32.0
Gossypium hirsutum	10	86.0 ± 2.5	2.0 ± 2.0	84.0
	15	76.0 ± 4.0	2.0 ± 2.0	74.0
	20	64.0 ± 4.0	12.0 ± 3.7	52.0
	25	48.0 ± 7.4	12.0 ± 2.0	36.0
	30	40.0 ± 4.5	12.0 ± 3.7	28.0

* Square-shaped piece (20 × 20 mm) of a freshly excised leaf. ** The given distances varied by ± 3 mm because of the swaying of the head by the moving larvae. *** The remaining larvae moved forward.



Apparatus for testing orientational responses of caterpillars on a grid. *ci*, Central intersection of the ribs of the grid; *cl*, central longitudinal rib of the grid; *clr*, central transverse rib of the grid; *g*, grid; *il*, illuminator housing day-light fluorescent tube lights covered on top with a white fluorescent screen; *l*, larva; *ss*, stimulus source (host plant leaves); *st*, stand supporting the grid.

- 1 The authors are grateful to the University Grants Commission, New Delhi, for grant which partially supported this work and to the Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, for the Junior Research Fellowships to P. K. and S. G.
- 2 B. Götz, *Z. vergl. Physiol.* 22, 429 (1936).
- 3 A. Hundertmark, *Z. vergl. Physiol.* 24, 563 (1937).
- 4 J. Meisner and K. R. S. Aescher, *Nature* 242, 332 (1973).