

L'esame dei dati soprariportati conferma quanto già si era appurato ed indicato nei precedenti lavori e cioè che le produzioni conseguibili con gli incroci originari giapponesi consentono generalmente ricavi superiori a quelli del bigiallo, in funzione della loro resa a secco e del loro maggior rendimento in seta. I minori valori risultanti per la marca Arancio e Azzurro debbono essere considerati anomali e frutto del mediocre andamento dell'allevamento, effettuato in un solo centro (1).

Le produzioni conseguite ed i ricavi ottenuti con il seme di poliibridi giapponesi, cioè prodotti in Italia con la stessa metodologia giapponese, sono per lo meno pari a quelle degli incroci originari, sicchè è del tutto giustificata la loro tranquilla introduzione negli allevamenti agricoli.

La riproduzione inter-sè degli incroci originari giapponesi è invece da bandire ed i risultati di questa sperimentazione confermano un fatto già noto e riconosciuto.

Sugli incroci Eurasia, i risultati di alcuni tipi in questi allevamenti comparativi contraddicono le conclusioni desunte su allevamenti agricoli che hanno consentito di stabilire:

- a) una produzione in bozzoli per oncia, normale;
- b) una resa a secco intermedia fra quella dei bigialli e quella dei giapponesi;
- c) un impiego alla bacinella pur esso intermedio fra quello dei bigialli e quello dei giapponesi;
- d) qualità organolettiche della seta più vicine a quelle della seta nostrana.

La produzione degli Eurasia merita perciò di essere ulteriormente studiata onde poter dare un definitivo giudizio di valutazione.

Infine, quanto agli altri tipi di incroci allevati, i risultati confermano quanto già era noto sia rispetto ai bigialli che rispetto ai tipi giapponesi.

(1) Dott. DIZZO GIUGLI - Risultati degli allevamenti degli incroci giapponesi originari in comparazione con gli incroci nostrani, nel 1955. - *Bollettino di zoologia agraria e bachicoltura*, Vol. XXI, fasc. III.

PETER KARLSON

MAX PLANCK INSTITUT FÜR BIOCHEMIE · MÜNCHEN

Das Häutungshormon der Arthropoden

I.

Der Biochemiker, der ein Problem der Hormonphysiologie aufgreift und experimentell bearbeitet, kann meist auf Ergebnisse aufbauen, die mit rein biologischen Methoden, vor allem Transplantationsversuchen, gewonnen worden sind. Man könnte das auf die kurze Formel bringen, dass Hormone mit biologischen Methoden erkannt, mit chemischen isoliert werden. Diese Aufgabenteilung liegt in der Natur der Sache; dennoch gehen beide Forschungsrichtungen nicht beziehungslos nebeneinander her, sie sind mannigfach miteinander verknüpft. Es ist reizvoll, diese Verknüpfungen am Beispiel eines Problems aus der Insektenphysiologie, der hormonalen Kontrolle der Häutungen, aufzuzeigen (1).

II.

Die ersten entscheidenden Versuche wurden 1917 und 1922 von STEFAN KOPEČ mitgeteilt. Er hatte bei erwachsenen Raupen das Gehirn durch Schnürung oder durch Exstirpation ausgeschaltet; darauf bließ die Verpuppung aus. Die Durchtrennung der Nerven dagegen hatte keinen Effekt. Die Ergebnisse wurden von KOPEČ richtig dahingehend interpretiert, dass das Gehirn einen stoffliche Faktor sezerniert, der die Häutung und Verpuppung steuert. Indessen fanden diese Arbeiten damals keinen Widerhall. Das mag teils darin begründet sein, dass die Konzeption der Neurosekretion zu jener Zeit

(1) Es ist nicht möglich, im Rahmen dieser kurzen Betrachtung alle Arbeiten, nicht einmal alle wichtigen Arbeiten zu zitieren. Der interessierte Leser wird auf folgende zusammenfassende Schriften verwiesen: *Pflugfelder*, Entwicklungsphysiologie der Insekten, Leipzig 1952; *Wigglesworth*, Physiology of insect metamorphosis, Cambridge 1954; *Karlson*, Biochemical studies on insect hormones, in: *Vitamins and Hormones*, 14, 226-267 (1956).

noch nicht existierte, teils darin, dass man nicht geneigt war, das Vorkommen von Hormonen bei wirbellosen Tieren anzuerkennen.

Ein Jahrzehnt später häuften sich jedoch die experimentellen Befunde. WIGGLESWORTH (1934, 1936) fand an der Wanze *Rhodnius* die Beziehungen zwischen Fütterung, Gehirn und Häutung auf: Der Reiz der Blutmahlzeit veranlasst das Gehirn, ein Häutungshormon auszuschütten.

KÜHN und seine Mitarbeiter CASPARI, PIEPHO und PLACGE (1936) wiederholten und erweiterten die Versuche von KOPEC und bestätigten dessen Deutung. FRÄNKEL (1935) konnte in ähnlicher Weise, durch Ligatur, die Bedeutung des Gehirnkomplices (Gehirn + Weismannscher Ring) für die Pupariumbildung der Fliegenmaden zeigen. Transplantationsversuche von BODENSTEIN (1933), die das wirtsgemäße Verhalten überplanzter Raupenbeinchen zeigten, fügten sich in dieses Bild ein, und um 1939 schien für zahlreiche Insektenordnungen die Wirkung des Gehirns bei Häutung und Verpuppung abgeklärt: Im Gehirn sollte ein Hormon gebildet werden, das Häutung und Verpuppung auslöst (Verpuppungshormon).

Das Gehirn als innersekretorisches Organ - das war eine unge wohnte Vorstellung. Eine nähere Untersuchung zeigte, dass neurosekretorische Zellen existierten, die für diese Funktion verantwortlich waren (DAY 1940, HANSTRÖM 1938). Eine klare Beziehung zwischen histologisch fassbarer Neurosekretion und der Produktion eines Hormons wurde erstmalig bei Insekten gefunden! Seither wurde dem Phänomen der Neurosekretion - mit Recht - viel Aufmerksamkeit zugewendet (2).

An der Steuerung der Entwicklung sind ausser dem Gehirn noch die Corpora allata beteiligt. Diese Anhangsdrüsen des Gehirns waren den Morphologen schon lange bekannt; ihre Funktion wurde durch die Arbeiten von BOUNHOL (1938), PFLUGFELDER (1937) WIGGLESWORTH (1938) und PIEPHO (1939, 1942) geklärt: Sie produzieren ein larvales Hormon (Juvenilhormon, « Hemmungshormon »), das die Häutung zur Larvenhäutung determiniert und die Entwicklung in Richtung auf die Imago hemmt.

(2) Zusammenfassungen über Neurosekretion: E. Scharer u. B. Scharer, Neurosekretion, in: Handbuch d. mikroskop. Anatomie d. Menschen, Bd. 6, Teil V, S. 952-1056; B. Scharer, über Neuroendokrine Vorgänge bei Insekten, Pflügers Archiv, Bd. 255, 151-163 (1952).

In diese Zeit fallen die ersten erfolgreichen Versuche, Insektenhormone in Form wirksamer Extrakte zu gewinnen (Plagge und BECKER 1938). Aufbauend auf den Schnürungsversuchen von FRAENKEL (1935), konnten BECKER und PLACGE (1939) den ersten brauchbaren Test (an *Calliphoridae* Larven) entwickeln; alkoholische Extrakte aus Puppen erwiesen sich als wirksam, und es wurde die « Art-Unspezifität » des sogenannten Verpuppungshormons erwiesen. Diese Erfolge legten den Grund für die spätere Isolierung des Ecdysons.

III.

Einige Missverständnisse und fehlerhafte Deutungen begannen allerdings in der Folgezeit das Bild zu verwischen. Zum Beispiel gelang es BECKER (1941) nicht, durch Injektion aktiver Extrakte isolierte Hinterstücke von Mehlmottenraupen zur Verpuppung zu bringen; wie wir heute wissen (HANSER und KARLSON 1957), war die verwandte Dosis zu gering. Aus dem negativen Ergebnis leitete BECKER folgende Arbeitshypothese ab: An der Pupariumbildung beziehungsweise Verpuppung sind zwei Hormone beteiligt. Zunächst wirkt ein « Aktivierungshormon » auf die Epidermis ein und löst verstärkte Zelltätigkeit und Mitosen aus; die so vorbereitete Epidermis reagiert auf das « PPARISIERUNGSHORMON » - wir würden heute « Sklerotisierungshormon » sagen - mit Umwandlung der Larvenkutikula in das Puppentännchen, oder (bei Lepidopterenraupen) mit verstärkter Sklerotisierung der Kutikula. Dieses letztere Hormon glaubte BECKER in seinen Extrakten vor sich zu haben.

Die irrtige Deutung, die BECKER selbst seinen Versuchen gab, berechtigte zur Identifizierung des « Sklerotisierungshormons » mit den phenolischen Stoffwechselprodukten, die kurze Zeit später als Sklerotisierungsfaktoren aufgefunden wurden. Die Arbeiten von PRYOR (1940), DENNELL (1947), TODD und Mitarbeitern (1948) ergaben folgendes Bild von den chemischen Vorgängen bei der Bildung der harten Puppenkutikula und des Pupariums: Unter der Wirkung des Enzyms Tyrosinase und anderer Phenoloxidasen wird aus Tyrosin ein Diphenol gebildet und in der Kutikula zum Chinon oxydiert; dieses Chinon reagiert dann mit den Proteinen unter Bildung eines festen Gerüsts, ein Vorgang, der in der Chinonvergerbung des Leders

seine Parallele hat. Eine Reihe von Diphenolen, die sich in der Natur der Seitenkette unterscheiden, wurden isoliert; Modellversuche zeigten, dass die Kutikula fähig ist, solche Diphenole zu dehydrieren und in das Proteingerüst einzubauen (DENNELL 1947). Was lag näher als die von BECKER beschriebenen Veränderungen am isolierten Abdomen der *Calliphora*-Larve als Parallelfall anzusehen, sein Hormon mit den Phenolen zu identifizieren?

Diese Annahme wurde zur allgemeinen Ueberzeugung, die in die Lehrbücher einging, und es schien uninteressant, dem hier wirksamen Stoff weiter nachzugehen. Der *Calliphora*-Test galt als unzuverlässig und unspezifisch. Allerdings war weder von PRYOR noch von DENNELL der einfache Versuch gemacht worden, am isolierten Abdomen von *Calliphora*-Larven durch Injektion solcher Phenole die Pupa-ri-sierung auszulösen. Es hätte sich dabei zeigen müssen, dass die Erklärung nicht zutreffend war.

IV.

Die rein biologischen Untersuchungen über die Entwicklungsphysiologie der Metamorphose haben inzwischen neue Ergebnisse gebracht, die auch bei der Deutung der alten Experimente zu berücksichtigen waren. 1940 beschrieb FUKUDA die Wirkungen der Prothorakaldrüse auf die Verpuppung von *Bombyx*-Raupen; 1944 erschien seine ausführliche Publikation. Die volle Bedeutung dieses Organs wurde jedoch erst klar durch die Untersuchungen von WILLIAMS (1947, 1952) über die Physiologie der Diapause der Saturniiden. Die daraus entwickelten Vorstellungen haben heute noch Gültigkeit: Gehirn und Prothorakaldrüsen bilden ein endokrines System, das Verpuppung und Imagoentwicklung steuert. Vom Gehirn wird ein Hormon abgegeben, das auf die Prothorakaldrüse einwirkt und diese aktiviert (« prothorakotropes Hormon »). Die aktive Prothorakaldrüse produziert das eigentliche « Wachstums- und Differenzierungshormon » (heute Ecdyson genannt), das auf die Epidermis und andere Strukturen einwirkt und Entwicklung und Häutung auslöst. Im Falle der Saturniiden-Puppen wird die Diapause aufgehoben, die Imagohäutung ausgelöst; erwachsene Raupen werden durch das gleiche System zur Verpuppung gebracht.

Bei der Raupenhäutung selbst treten zu diesem System noch die Corpora allata, die das Juvenilhormon sezernieren. Dieses bewirkt die Erhaltung der larvalen Organisation. Wir können diese Zusammenhänge nur streifen; ein wesentlicher Erfolg ist von WILLIAMS (1956) mit der Darstellung corpus-allatum-aktiver Extrakte erzielt worden.

Das prothorakotrope Hormon des Gehirns entsteht in den neurosekretorischen Zellen; es ist identisch mit dem früher angenommenen « Verpuppungshormon » des Gehirns. Das Neurosekret lässt sich mit histologischen Methoden anfärben und erscheint als Kette von Granula, die im Axon vom Gehirn zu den Corpora cardiaca wandern. Das Phänomen des Stofftransportes längs der Nervenbahn ist von B. SCHARER (1952), E. THOMSEN (1954), L. GRANDORI (1955) genauer untersucht worden; es herrscht Einmütigkeit darüber, dass das « Neurosekret » vorwiegend aus Trägersubstanz besteht, die das Hormon adsorbiert oder eingeschlossen enthält. Die chemische Charakterisierung des prothorakotropen Hormons steht noch aus. Die Corpora cardiaca, deren Funktion lange unbekannt war, dürften wohl als Speicherorgan des Gehirn-Hormons anzusehen sein (B. SCHARER).

Die WILLIAMS'schen Befunde gaben Anlass, auch bei anderen Insektenordnungen nach den Prothorakaldrüsen zu suchen und ihre Funktion zu klären. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden in rascher Folge die entsprechenden Strukturen bei Schaben, Libellen, Wanzen, Käfern usw. beschrieben; die experimentellen Befunde zeigten, dass ihre Funktion allenthalben die gleiche ist: Die Bildung des Häutungs- und Differenzierungshormons. Bei Dipteren wurden die grossen Schenkelzellen der Ringdrüsen als den Prothorakaldrüsen homolog erkannt; sie hatten der Deutung lange Schwierigkeiten bereitet. Der physiologische Beweis wurde von POSSOMPÈS (1953) in einer Reihe eindrucksvoller Transplantationsexperimente erbracht.

V.

Völlig unabhängig von diesen Befunden, die sich um 1952 zu einem geschlossenen Bild rundeten, war die chemische Arbeit weitergegangen. Seit 1942 haben wir im Max-Planck-Institut für Biochemie die von BECKER begonnenen Versuche an Extrakten fortge-

In der Folgezeit wurde das Hormon bei verschiedenen Insekten-ordinungen geprüft (Zusammenstellung bei KARLSON, 1956 a, b). Als gemeinsamer Gesichtspunkt aller bisher bekannten Wirkungen darf gelten, dass der Stoff Häutungen oder die vorbereitenden Schritte dazu auslöst. Er hat daher - vom griech. « Ecdysis » = Häutung - den Namen Ecdyson erhalten, wobei die Endung -on auf den Ketonencharakter des Stoffes hinweisen soll. Wir halten diese Bezeichnung für eindeutiger als die bisher eingeführte « Wachstums- und Differenzierungshormon », vor allem weil es Häutungen gibt, bei denen weder Wachstum noch Differenzierung eintritt (z. B. bei Termiten).

VII.

Häutungen sind nicht allein für Insekten, sondern für alle Arthropoden kennzeichnend. Durch die Entdeckung des Y-Organs durch M. GABE (1952) und die daran anschließenden physiologischen Versuche von G. ECHALIER (1955), war die Häutungsphysiologie der Crustaceen in Parallele zu der der Insekten gestellt worden; das Y-Organ wurde geradezu als Häütungsdrüse bezeichnet und als Homologon der Prothorakaldrüse angesehen. Es schien ein reizvolles Problem der vergleichenden Hormonphysiologie, das gegenseitige Verhältnis der Hormone beider Tiergruppen zu untersuchen. Methodisch war es am einfachsten, aus Crustaceenmaterial einen Extrakt herzustellen, diesen in gleicher Weise wie bei *Bombyx* zu reinigen und im *Calliphora*-Test auf Aktivität zu prüfen. Der Versuch, zuerst mit *Crangon vulgaris* als Spender ausgeführt, verlief positiv (Karlson 1956). Es war damit gezeigt, dass die Häütungshormone der Krebse und Insekten sich gegenseitig vertreten können, und dass sie einander sehr ähnlich sind. Inzwischen sind auch aus anderen Crustaceenarten wirksame Extrakte erhalten worden; eine Grossextaktion mit dem Ziel der Reindarstellung des Crustaceenhormons ist im Gange, ebenso Versuche über die Wirkung des Insektenhormons bei Crustaceen.

Aus dem heute Erreichten ergeben sich zahlreiche neue Fragestellungen - die zuletzt erwähnten vergleichenden Versuche zeigen das deutlich - , ebenso aber viele Ansatzpunkte für neue Experimente. Es wird jetzt möglich sein, die Wirkung der Insektenhormone im Ein-

zelnen zu untersuchen, ein Programm, das wiederum der Zusammenarbeit von Biologen und Biochemikern bedarf. Die Aufgabenstellung, die der Biochemiker zunächst von der Biologie übernommen hat, gibt er nun an die Biologie zurück - und gleichfalls eines der Werkzeuge, die Aufgaben zu lösen.

RIASSUNTO

L'A. espone in un quadro storico le ricerche e i risultati di questi ultimi 40 anni sulla natura ormonale delle mute e delle metamorfosi degli Artropodi, in modo particolare degli Insetti e dei Crostacei, che iniziatisi nel campo della fisiologia, per merito di KOPEČ, nel 1917, si estesero alla biochimica a partire dal 1938 (PLAGGE e BECKER 1938) giungendo, per merito dell'A. e dei suoi collaboratori, all'isolamento dell'ormone puro cristallizzato che presiede alle mute (BUTENANDT e KARLSON 1954). KOPEČ (1917-1922) sperimentando con legature ed estirpazioni su larve di Lepidotteri, era giunto alla conclusione che il cervello secerne un fattore materiale che presiede alle mute e all'incrisolidamento. Il lavoro rimase senza eco perché allora il concetto di neurosecrezione non esisteva e non si era propensi ad ammettere la presenza di ormoni negli invertebrati.

Nel 1934 ebbero inizio gli esperimenti di WIGGLESWORTH su *Rhodnius*, che portarono lo scienziato a stabilire una relazione fisiologica fra pasto, cervello e muta. KÜHN e i suoi collaboratori CASPARI, PIEPHO e PLAGGE (1936), convalidarono l'interpretazione di KOPEČ, e nel 1935 FRÄNKEL dimostrò sperimentalmente il significato del complesso cervello+anello di Weismann per la formazione del pupario dei Ditteri. BODENSTEIN nel 1933 dimostrava, con esperimenti di trapiantazione, l'influenza ormonale dell'ospite sugli organi in esso trapiantati.

Nel 1939 sembrò chiarito per numerosi ordini d'Insetti l'azione del cervello nei fenomeni della muta e della metamorfosi, e si veniva così affermando il nuovo concetto: quello del cervello come organo a secrezione interna. Nel frattempo gli studi istologici (DAY 1940, HANSTRÖM 1938) dimostravano l'esistenza di cellule neurosecretrici. Per la prima volta negli Insetti veniva trovata una relazione fra la neurosecrezione istologicamente dimostrabile e la produzione di ormoni!

A regolare lo sviluppo sono interessati i *corpora allata*, come è stato chiarito dai lavori di BOUNHIOL (1938), PELUGFELDER (1937), WIGGLESWORTH (1938) e PIEPHO (1939-1942): essi secernono l'ormone inibitorio o giovanile che determina la muta di tipo larvale.

A partire dal 1938 le ricerche d'indirizzo fisiologico incominciarono ad essere accompagnate da quelle biochimiche. PLAGGE e BECKER (1938) fecero i primi estratti alcoolici di pupae di *Calliphora* contenenti l'ormone del-

l'impupamento che risultò non specifico, e nel 1939 svilupparono il primo test usufruibile usando larve di *Callifora*.

Alcuni insuccessi nella sperimentazione di questi estratti condussero BECKER (1941) ad ipotesi che deviarono dalla giusta direzione le ricerche sulla natura dell'ormone e precisamente egli ammise, come ipotesi di lavoro, che alla formazione del pupario relativamente all'impupamento, partecipino due ormoni: 1) *Ormone attivante* che stimola l'attività delle cellule epidermiche e la mitosi; 2) *l'ormone dell'impupamento*, che, agendo sull'epidermide preparata dal I ormone, determina la trasformazione della cuticola nel pupario dei Ditteri o l'aumento della sclerotizzazione nella cuticola delle larve dei Lepidoteri. Tali trasformazioni venivano spiegate con l'azione della trossinasi, ed altri enzimi fenolossidasi, sulla tirosina, che si trasforma in difenolo, il quale nella cuticola viene ossidato in chinone; questo reagisce con le proteine formando una solida impalcatura, secondo un processo simile a quello della concia delle pelli. Si dimostrò che la cuticola, trattata con una serie di difenoli, è in realtà capace di deidrogenare il difenolo e di riacchiudersi nell'impalcatura proteica (1947), cosicchè si credette di poter identificare l'ormone dell'impupamento con i fenoli.

FUKUDA intanto (1940-1944) rivelava, sul piano puramente biologico, l'azione della ghiandola protoracica sull'incrisalidamento delle larve di *Bombyx mori*, ma spettava a WILLIAMS (1947, 1952), nelle sue ricerche sulla fisiologia della diapausa nei Saturniidi, di spiegare completamente l'importanza di questo organo, e di giungere alla conclusione ancor oggi valida, che cervello e ghiandole protoraciche formano un sistema endocrino che presiede alla muta e alla metamorfosi. Il cervello secreta un ormone — *ormone protoracotropo* — che agisce sulla ghiandola protoracica, la quale attivata, secreta l'ormone vero e proprio della crescita e della differenziazione (oggi chiamato *ecdison*). A questo sistema si uniscono i *corpora allata*, che secernono l'ormone giovanile tendente a conservare l'organizzazione larvale. Nel 1956 riuscì a WILLIAMS di preparare un estratto attivo del *corpus allatum*. L'ormone protoracotropo è prodotto dalle cellule neurosecretorie del cervello ed è identico con quello antecedentemente chiamato ormone dell'impupamento. Esso si colora con metodi istologici e viene trasportato lungo gli assoni che dal cervello vanno al corpo cardiaco (B. SCARRER 1952, E. THOMSEN 1954, L. GRANDORI 1955). Non è per ora conosciuta la natura chimica di questo ormone. Il corpo cardiaco dovrebbe servire come organo d'immagazzinamento del neurosecreto (B. SCHARBER).

Le ghiandole protoraciche sono state trovate anche in altri ordini di Insetti: *Blattoidei*, *Pseudoneuroteri*, *Emitteri*, *Coleotteri*, ecc. (1), e si è

(1) Il dottor A. FABRIZIO, assistente alla cattedra di Entomologia dell'Università di Milano, ha illustrato nel 1955-56 le ghiandole protoraciche dei seguenti Insetti: *Apis mellifica* L., *Polistes gallicus* L., *Hoplocampa brevis* Klug., *Arge pagana* Pand. (Nota della Direzione).

concluso che la loro funzione è in tutte le specie la stessa: la produzione dell'ormone della muta e della differenziazione.

Per i ditteri *Possompis* ha dimostrato con esperimenti convincenti che la ghiandola pericardiale dell'anello di Weismann è omologa alle ghiandole protoraciche degli altri ordini d'Insetti.

La fase biochimica conclusiva s'inizia nel 1942, per opera dell'A. e dei suoi collaboratori, con la ripresa degli esperimenti del BECKER, ripresa avvenuta nell'Istituto Max Planck per la Biochimica. Si è usato il *test-Callifora* che è stato perfezionato per un metodo di dosaggio quantitativo dell'ormone. Come materiale di partenza si è usufruito in un primo tempo delle pupe di *Callifora*, ma in seguito si è dimostrato molto più opportuno usare crisalidi di *Bombyx mori*, e all'epoca dei lavori inglesi sui fattori sclerotizzanti (dei quali lavori l'A. e i suoi collaboratori a causa della guerra hanno avuto in ritardo notizie), gli estratti erano talmente arricchiti in principio attivo, da dimostrare sul *test-Callifora*, un'azione indubbia in quantità minime, frazioni di microgrammi.

Nell'estate del 1953, per mezzo della Società di Ricerche tedesca, l'A. e coll. hanno potuto disporre di 2000 Kg. circa di bozzoli di *Bombyx mori*, e dai 500 Kg. di crisalidi vive che i bozzoli hanno fornito, e con l'aiuto della Società tedesca Hoffmann-La Roche A. G. essi sono riusciti ad ottenere un concentrato dal quale hanno isolato l'ormone cristallizzato (BUTENANDT e KARLSON 1954), che si è dimostrato essere un chetone non saturo della presumibile formula $C_{19}H_{26}O_4$. Dai 500 Kg. di crisalidi hanno ottenuto 25 mg. di ormone, ciò che corrisponde ad un arricchimento di 20 milioni di volte. L'azione dell'ormone è molto forte: 0,0075 µg. per larva, producono l'azione biologica di un'unità *Callifora*, corrispondente al 50-70% nella formazione dei pupari. È stato questo il primo ormone degli Insetti isolato allo stato puro, e la reazione biologica del *test-Callifora* si è dimostrata specifica e molto sensibile.

In collaborazione con WILLIAMS che ha operato con crisalidi di Saturniidi in diapausa, prima con l'estratto concentrato poi con l'ormone puro (estratto non da un organo ma dall'intera crisalide), si è giunti alla conclusione che l'ormone ottenuto è senza dubbio identico all'ormone delle ghiandole protoraciche, raro caso nelle ricerche ormonali in cui soltanto dopo il suo isolamento in forma pura viene stabilito in modo senza dubbio univoco il luogo di formazione di una sostanza attiva.

L'ormone puro è stato sperimentato in vari ordini d'Insetti e si può concludere dal punto di vista generale (WILLIAMS 1956 a, b), che esso promuove le mute o i processi preparatori ad esse. Perciò esso è stato denominato *ecdison*, nome composto da *ecdysis*=muta in greco, e dalla desinenza *on* per il suo carattere chetonico, denominazione che l'A. preferisce a quello fino ad oggi usato di ormone della muta e della differenziazione, soprattutto perchè si verificano negli Insetti mute che, come nelle Termiti, non sono accompagnate da crescita e differenziazione.

La scoperta dell'organo Y da parte di CABE (1952) nei Crostacei, nei quali pure si verificano mute, e gli studi fisiologici di ECHALIER (1955),

hanno condotto a considerare tale organo come ghiandola della muta. L'A. ha riuscito a preparare un estratto attivo dell'organo Y (KARLSON 1957) di *Crangon vulgaris* e di altre specie di Crostacei. Le prove con l'estratto di *Crangon*, su test-Callifora sono state positive. E' in corso un'estrazione in grande allo scopo d'ottenere l'ormone puro dai Crostacei, come anche sono in corso prove sull'azione dell'ormone degli Insetti sui Crostacei.

Sarà ora possibile studiare nei particolari l'azione dell'ormone puro degli Insetti, programma che richiederà la collaborazione dei biologi e dei biochimici.

S U M M A R Y

The Author draws a historical picture of the researches and their results in the last 40 years on the hormonal nature of the moultings and metamorphoses of the Arthropods, and particularly of Insects and Crustacea, that, having been first started in the physiological field, thanks to KOPEČ in 1917, were since 1938 extended to biochemistry (PLAGGE and PECKER 1938), finally reaching, thanks to the Author and his collaborators, to the isolation of the pure crystallized hormone that presides over the moulting process (BUTENANT and KARLSON 1954). KOPEČ, (1917-1922) by experimenting on ligatures and extirpations on Lepidoptera larvae, had come to the conclusion that the brain secretes a material factor that presides over moultings and chrysalidation. This study carried no echo because at the time, the conception of neurosecretion did not even exist and nobody was inclined to admit the presence of hormones in invertebrates.

WIGGLESWORTH's experiments on RHODNIUS were started in 1934, and they brought this scientist to establish a physiological relation between meal, brain and moulting. KÜHN and his collaborators GASPARI, PIEPHO and PLAGGE (1936), consolidated KOPEČ's interpretation and FRÄNKEL, in 1935, proved experimentally the meaning of the unit brain + Weismann ring in the pupation of Diptera. BODENSTEIN, in 1933, proved through transplantation experiments, the hormonal influence of the host on the organs transplanted into it.

It seemed, in 1939, that the action of the brain on many organs of Insect with regards to the phenomena of pupation and metamorphosis, had been cleared, and one was thus led to word a new conception, namely: that the brain is an internally secreting organ. In the meantime, histological researches (DAY 1940, HANSTRÖM 1938) proved the existence of neurosecreting cells. For the first time a relation was found in Insects between histologically proved neurosecretion and the production of hormones!

The *corpora allata* have an important function in ensuring a regular development as appears clearly from the works of BOUNHOL (1938), PLUGGELER (1937) WIGGLESWORTH (1938) and PIEPHO (1939-1942): they secrete

the inhibitory or juvenile hormone that determines the moulting process of the larval type.

From 1938 onwards, biochemical researches are being carried on together with the physiological researches. PLAGGE and BECKER (1938) made the first extracts of *Calliphora* pupae containing the pupation hormone that proved to be non-specific, and in 1939 they developed the first usable test from Callifora larvae.

A few failures in experimenting on these extracts led BECKER (1941) to emit certain hypothesis that deviated from the right course the researches on the nature of the hormone, and he admitted precisely, as a working hypothesis, that, in relation to the pupating process, two hormones take part in the making of the pupa, namely: 1) the « activating hormone » that stimulates the activity of the epidermal cells and of the mitose; 2) the « pupation hormone » that, by acting on the epidermis prepared by hormone 1, determines the change in the cuticle in the pupae of Diptera or the increased sclerotization in the cuticle of Lepidoptera larvae. Such changes were explained by the thyroxinase's action and that of other phenoloxidase enzymes on the thyroxine, that changes into di-phenol, which gets oxidized into quinone in the cuticle; this quinone reacts with the proteins, building up a solid structure, according to a process similar to that through which skins are tanned. It was proved that the cuticle, when treated with a series of di-phenols is, in reality, capable of dehydrogenating the di-phenol and encloses it in a proteinic structure (1947), so it was believed one could identify the pupating hormone with the phenols.

FUKUDA, in the meantime, (1940-1944) revealed, only and purely from a biological standpoint, the action of the prothoracic gland on the chrysalidation of the *Bombyx mori* larvae, but it befell on WILLIAMS (1947, 1952), through his researches on the physiology of diapause in *Saturniidae* to explain exhaustively the importance of this organ, and to come to the conclusion, still valid at the present day, that brain and prothoracic glands constitute an endocrine system that presides over moulting process and metamorphosis. The brain secretes a hormone - *protoracotropic hormone* - that acts on the prothoracic gland that, being activated, secretes the real and proper hormone of growth and differentiation (called to-day: *ecdison*). The *corpora allata* that secrete the juvenile hormone that tends to preserve the larval organization, get united with this system. WILLIAMS succeeded in 1956 in preparing an active extract of *corpus allatum*. The prothoracotropic hormone is produced by the neurosecreting cells of the brain and is identical to the previous one called the *pupating hormone*. It gets coloured through histological methods and is carried along the axons that go from the brain to the cardiac body (B. SCARRER 1952, E. THOMSEN 1954, L. GRANBØI 1955). The chemical nature of this hormone is not known for the time being. The cardiac body ought to serve as an organ for storing the neurosecretion (B. SCHARRER).

Protoracic glands have been also found in other Insects such as: Blaptoida, Pseudoneuroptera, Hemiptera, Coleoptera, etc. (1) and one has arrived to the conclusion that their function is the same in all the species, namely: the production of the moulting and differentiating hormone.

As regards Diptera, POSSOMPÈS has proved through convincing experiments, that the pericardial gland of the Weismann ring is similar to the protoracic glands of the other orders of Insects.

The conclusive biochemical phase starts in 1942, thanks to the Author and his collaborators, who took up again BECKERS' experiments; this took place in the Max Planck Biochemical Institute. The test used was the Callifera test improved on, for a method for the quantitative dosage of hormones. Callifera pupae were the material used for the first experiments, but it was found that *Bombyx mori* chrysalides were more suitable for the purpose, and at the time when the works on sclerotizing factors were being issued in England (that the Author and his collaborators only heard of later, because of the war), the extracts were so rich in active principles, that they bore evidence of a definite action in minimum quantities, fraction of micrograms, on the Callifera test.

In the summer of 1953, thanks to the German Research Society the Author & coll. were able to have at their disposal about 2000 kg. of *Bombyx mori* cocoons, and from the 500 kg. of live chrysalides supplied by these cocoons, and with the help of the German Firm Hoffman-La Roche A. G., they succeeded in obtaining a concentrate from which they isolated the crystallized hormone (BUTENANDT and KARLSON 1954), that proved to be a non-saturated ketone of which the formula is presumed to be $C_{28}H_{40}O$. They obtained from the 500 kg. of chrysalides 25 mg. of hormone which corresponds to a rate of enrichment of 20 millions. The action of the hormone is very strong: 0.0075 µg. per larva, produce the biological action of 1 Callifera unit, corresponding to 50/70% in the formation of pupae. This has been the first Insect hormone isolated in a pure state, and the biological reaction of the Callifera test has proved to be specific and very sensitive.

In collaboration with WILLIAMS who operated on Saturniidae chrysalides in diapause, first with concentrated extract and then with the pure hormone (extracted not from one organ but from the entire chrysalid), we came to the conclusion that the hormone obtained is, without any possible doubt, identical to the hormone of the protoracic glands, which is a rare case in hormonal researches in which it is only after it has been isolated in a pure form, that one can establish in a certainly univocal way, the location of the formation of an active substance.

The pure hormone has been experimented on in various orders of Insects and one can state as a conclusion from a general point of view

(1) Dr. FOREMIGNI, assistant at the Institut of Entomology (University in Milan), illustrated in 1955-1956 the protoracic glands of the following Hymenoptera: *Apis mellifica* L., *Polistes gallicus* L., *Hoplocampa brevis* Klug., *Arge pagana* Pand.

(WILLIAMS 1956 a, b), that it promotes moulting or its preparatory processes. It has therefore been called *ecdysone* (ecdysis = moulting in Greek) with the ending in « on » because of its ketonic character, and the Author prefers this name to the one applied up to now, that was: « moulting and differentiating hormone », most of all because there are moultings in Insects that, as in the case of Termites, are not accompanied by growth and differentiation.

The discovery by GARE (1952) of the Y organ in Crustacea, where moulting equally takes place, and ECHALIER's physiological researches (1955), have led to consider this organ as a gland of the moulting process. The Author has succeeded in preparing an active extract of the Y organ (KARLSON 1957) of *Crangon vulgaris* and other species of Crustacea. The tests with extract of Crangos on Callifera test, were positive. An extraction on a large scale is in course, with the aim of obtaining the pure hormone of Crustacea, and also, the action of Insects hormone on Crustacea, is being tested.

It will now be possible to study the particulars of the action of Insects' pure hormone, and this will require co-operation on the part of biologists and biochemists.

LITERATUR

- BECKER E. 1941 - Ueber Versuche zur Anreicherung und physiologischen, Charakterisierung des Wirkstoffs der Puparisierung. - Biol. Zbl. 61, 360-388.
- BECKER E. und PLACK E. 1939 - Ueber das die Pupariumbildung auslösende Hormon der Fliegen. - Biol. Zbl. 59, 326-341.
- BUNHOL I. I. 1938 - Recherches expérimentales sur le déterminisme de la métamorphose chez les lépidoptères. - Bull. biol. Suppl. 24, 1-199.
- BUTENANDT A. und KARLSON P. 1954 - Ueber die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. - Z. Naturforsch., 9 b, 389-391.
- DAY M. F. 1940 - Neurosecretory cells in the ganglia of Lepidoptera. - Nature (London) 154, 264.
- DENNEL R. 1947 - A Study of an insect enzyme: the formation of the puparium of *Sarcophaga falcata* Pand. (Diptera). - Proceed. Royal Soc. London, Ser. B, 134, 79-110.
- ECHALIER C. 1955 - Rôle de l'organe Y dans le déterminisme de la mue de Carcinides (*Carcinus*) *moenas* L. (Crustacés Décapodes); Expériences d'implantation. - C. r. Acad. Sci. (Paris) 240, 1581-1583.
- GARE M. 1953 - Sur l'existence, chez quelques Crustacés Malacostracés, d'un organe comparable à la glande de la mue des Insectes. - C. r. Acad. Sci. 237, 1111-1113.
- FRAENKEL G. (1935) - A hormone causing pupation in the blowfly *Calliphora erythrocephala*. - Proc. Roy. Soc. B, 118, 1-12.
- FUKUDA E. 1940 - Induction of pupation in silkworm by transplanting the prothoracic gland. - Proc. Imp. Acad. Tokyo 16, 414-416.
- FUKUDA S. 1944 - The hormonal mechanism of larval moulting and metamorphosis in the silkworm. - J. Fac. Sci. Tokyo Imp. Univ. Sect. 4, 6, 477-532.
- GRANDORI L. 1955 - Anello di Weismann, metamorfosi e neurosecrezioni in *Calliphora*

- erythrocephala Meig. e *Musca domestica* L. - Boll. Laboratorio Zool. Generale e Agraria « Filippo Silvestri », Partici XXXIII, 198-243.
- AGRIAS « Filippo Silvestri », u. TOMA A. R., 1918 - The Occurrence of phenolic substances in Arthropods. - Biochem. Journ., 43, 474-479.
- HACKMAN R. H., PIVON M.G.M. - Ueber die Wirkung des Metamorphose-Hormons auf HANSEK G. und KARLSON P., 1957 - Ueber die Wirkung des Metamorphose-Hormons auf die Epidermis von Ephestia-Dauerraupen. - Biol. Zbl., 76, 129-141.
- HANSEK G. und KARLSON P., 1957 - Ueber die Wirkung des Metamorphose-Hormons auf die Epidermis von Ephestia-Dauerraupen. - Biol. Zbl., 76, 129-141.
- HANSTRÖM B., 1938 - Zwei Probleme betreffs der hormonalen Lokalisation im Insektenkopf. - Lunds Univ. Arskr., N. F. Avd 2, 34, Nr. 16 1-17.
- KARLSON P. und SCHÄZLER H., 1955 - Ueber die Tyrosinase der Calliphora-Larven. - Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 300, 35-41.
- KARLSON P., 1956 - Biochemical Studies on Insect Hormones. - Vitamins and Hormones XIV, 227-266; Academic Press New York.
- KARLSON P., 1956 - Chemische Untersuchungen über die Metamorphosehormone der Insekten. - Annales Sci. Naturelles, Zool., 18, 125-137.
- KÜHN A. und PIVON H., 1936 - Ueber hormonale Wirkungen bei der Verpuppung der Schmetterlinge. - Nachr. Ges. Wissensch. Göttingen, Mathem.-physik. Kl. Fachgruppe VI; Nachrichten a. d. Biologie, 2, Bd. 141-154.
- KÜHN A. und PIVON H., 1938 - Die Reaktion der Hypodermis und der Versonschen Drüsen auf das Verpuppungshormon bei Ephestia kühniella Z. - Biol. Zbl., 58, 12-51.
- PIVON H., 1939 - Hemmung der Verpuppung durch Corpora allata von Jungraupen bei der Wachsmotte *Galleria mellonella* L. - Naturwiss., 27, 675-676.
- PIVON H., 1942 - Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie der Insektenmetamorphose. Ueber die Puppenhäutung der Wachsmotte *Galleria mellonella* L. Roux' Arch. Entw. Mechanik d. Organismen 141, 500-583.
- PLUCKELSDER O., 1937 - Bau, Entwicklung und Funktion der Corpora allata und corpora cardiaca von *Distippus morosus* Br. - Z. wiss. Zool., 149, 477-512.
- PLAGE E. und BECKER E., 1938 - Wirkung artiger und artfremder Verpuppungshormone in Extrakten. - Naturwiss., 26, 430-431.
- POSSOMPÉS B., 1953 - Recherches expérimentales sur le déterminisme de la métamorphose de *Calliphora erythrocephala* Meig. - Arch. Zoolog. Expériment. et Générale 89, 203-264.
- PIVON M.G.M., 1910 - On the hardening of the ootheca of *Blatta orientalis*. - Proceed. Ry. Soc., London, B 128, 378.
- SCHÄZLER H., 1952 - Neurosecretion, XI. The effects of nerve section on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect *Leucophaea maderae*. - Biolog. Bulletin 102, 261-272.
- THOMSEN E., 1954 - Experimental evidence for the transport of secretory material in the axons of the neurosecretory cells of *Calliphora erythrocephala*. - Publ. Stat. zool. Napoli suppl. 44, 48-49.
- WIGGLESWORTH V. B., 1934 - The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and 'metamorphosis'. - Quart. J. microsc. Sci., 77, 190-222.
- WIGGLESWORTH V. B., 1936 - The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). - Quart. J. microsc. Sci., 79, 91-121.
- WILLIAMS C. M., 1952 - Physiology of Insect Diapause IV. The Brain and Prothoracic Glands as an endocrine system in the Cecropia silkworm. - Biol. Bull., 103, 120-138.
- WILLIAMS C. M., 1947 - Physiology of insect diapause, II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm *Platysmia cecropia*. - Biol. Bull., 93, 89-98.
- WILLIAMS C. M., 1956 - The juvenile hormone of insects. - Nature, 178, 212-213.

R. CASSER

J. R. GEIGY S. A. - BASILEA - SEZIONE RICERCHE

Il problema degli Acari in frutticoltura, viticoltura e floricoltura

La presenza degli acari sulle piante coltivate varia molto a seconda della specie e varietà della pianta e varia pure a seconda della località, i metodi di coltura, i trattamenti con insetticidi e le condizioni meteorologiche.

Essi hanno assunto un'importanza economica nei frutteti, nei vigneti e nelle coltivazioni delle piante da fiore, tanto da richiedere in questi ultimi anni trattamenti chimici e biologici. L'andamento di tali trattamenti ha però dimostrato che il problema degli acari è molto complesso e richiede approfondite conoscenze delle varie specie presenti. Siccome da un lato i problemi riguardanti gli acari si presentano simili nei vari paesi europei, e d'altra parte essi sono di varia natura, e non possono essere risolti che dalla collaborazione di parecchi specialisti in tempo utile, nella primavera del 1956, ha avuto luogo in Wageningen un simposio degli acarologi europei, che ha offerto l'occasione di discutere e anche, quando possibile, di coordinare i problemi di sistematica, biologia, ecologia e della lotta chimica e biologica degli acari fitofagi economicamente più importanti. In mancanza di specialisti, i paesi mediterranei erano rappresentati soltanto da una delegazione francese, dal qual fatto si dimostra che proprio in questi paesi, specialmente riguardo a quelle che sono per loro tipiche colture, praticamente non vengono fatte ricerche sugli acari, che potrebbero servire agli entomologi pratici nella loro lotta. Io auguro quindi che il presente riassunto del problema degli acari nei paesi del Nord-Europa, serva di sprone agli entomologi dei paesi mediterranei, spingendoli ad affrontare studi e ricerche simili nei loro paesi e per le loro tipiche colture, che sarebbero sicuramente di grande utilità pratica per la loro agricoltura.