

EFFECTES DELS PRECOCENS SOBRE ELS CORPORA ALLATA DE *BLATTELLA GERMANICA* (L.) (DICTYOPTERA, BLATTELLIDAE)

M.^a DOLORS PIULACHS i XAVIER BELLÉS

Institut de Química Bio-Orgànica del C.S.I.C. Barcelona.

Rebut 7 novembre 1984

SUMMARY

Effects of precocenes on the corpora allata of *Blattella germanica* (L.) (*Dictyoptera, Blattellidae*).

In the present paper the effects induced by precocenes on the *corpora allata* (CA) of *Blattella germanica* are described. Both volumetric and structural changes were studied. Compounds used were precocene 1 (P1), precocene 2 (P2) and ethoxyprecocene 2 (EP2), and they were administered at doses of 50, 100 and 200 mg.

CA volumes of precocene treated insects were smaller in comparison with controls, although a remarkable variability was observed. Nevertheless, only the values obtained on the groups treated with any dose of EP2 or 200 mg of P2 resulted statistically different from controls.

Concerning to structural studies, it is worth to point out that the same precocene treatment resulted in different degrees of CA degeneration. In those cases where the most dramatic changes were observed, the nuclei were scarce and stained dark red, the cytoplasm appeared reduced and granular and the cells were separated, showing large intercellular spaces. Moreover the general shape of the gland resulted notably modified and the sheath was damaged in large portions.

Key-words: Precocenes, *Corpora allata*, *Blattella*, *Dictyoptera*.

INTRODUCCIÓ

El descobriment fet per BOWERS i els seus col·laboradors (6) de les propietats antagonistes de la hormona juvenil (HJ) de dos derivats cromènics (precocè 1 i precocè 2), aïllats de la planta *Ageratum houstonianum*,

ha obert noves perspectives tant en el camp de l'endocrinologia dels insectes com en l'estudi de noves alternatives per al control de plagues.

En aquelles espècies sensibles, els precocens indueixen tot un ventall de símptomes de deficiència d'HJ, tot actuant a través d'un

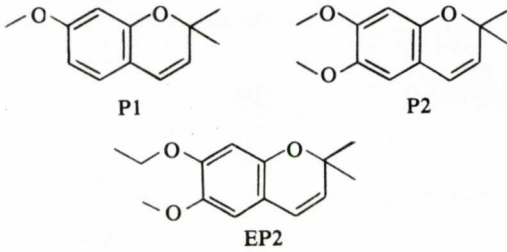


Fig. 1. Estructura dels composts emprats: precocè (P1), precocè 2 (P2) i etoxiprecocè 2 (EP2).

mecanisme d'acció citotòxica específica que comporta la inactivació dels *corpora allata* (CA), glàndules secretores de l'HJ (vegeu les revisions de BOWERS: 4, 5 i de PRATT i col·laboradors: 14).

Quant a l'abast de l'activitat dels precocens sobre dictiópters, han estat estudiades tres espècies. FEYEREISEN *et al.* (9) descrigueren els efectes sobre *Diploptera punctata*, tant a nivell de l'estudi ultraestructural dels CA, com de les perturbacions provocades en la reproducció. D'altra banda, BOWERS (5) induí la inhibició de la producció de feromones sexuals en femelles de *Periplaneta americana* tractades amb precocens.

L'espècie *Blattella germanica* ha estat estudiada per MARTÍNEZ-CARRAU *et al.* (13), els quals observaren els canvis produïts en el complex neurosecretor, mitjançant tècniques de microscòpia de fluorescència; d'altra part, BELLÉS i MESSEGUER (2) i GARCERÀ-ZAMORANO *et al.* (11) descrigueren diversos efectes sobre la fertilitat i, finalment, BALDELLOU *et al.* (1) estudiaren la influència dels precocens sobre l'atracció sexual.

En aquest treball es descriuen els efectes de tres composts precocènics sobre els CA de *B. germanica*, tot analitzant els canvis, tant estructurals como volumètrics, que han estat observats.

MATERIAL I MÈTODES

En tots els experiments s'empraren femelles adultes de *B. germanica*, d'una edat

compresa entre 0 i 24 hores, procedents d'una colònia criada al laboratori segons els mètodes convencionals (3) a 30 (± 1) °C, 60-70 % H.R. i en completa foscor.

Els precocens sintètics, 2,2-dimetil-7-metoxi-2H-cromè (Precocè 1: P1), 2,2-dimetil-6,7-dimetoxi-2H-cromè (Precocè 2: P2) i 7-etoxi-2,2-dimetil-6-metoxi-2H-cromè (Etoxi-precocè 2: EP2) (Fig. 1) foren preparats en el nostre Institut.

Els composts es dissolgueren en acetona, tot ajustant la dosi desitjada a un volum de 2 µl de dissolució, i s'aplicaren tòpicament sobre la regió cervical. Els testimonis foren tractats amb 2 µl d'acetona. Tots els exemplars es mantingueren en absència de mascles durant els experiments i els efectes sobre els CA s'estudiaren 7 dies després del tractament.

La dissecció dels CA es practicà per apertura de la càpsula cefàlica per la regió occipital, tot retirant el teixit muscular i adipós que envolta el foramen occipital. D'aquesta manera hom pot accedir fàcilment als CA, situats a la part retrocerebral, per damunt de l'esòfag i del gangli subesofàgic (Fig. 2).

Després de tenyir amb blau de metilè en solució aquosa a l'1 %, per tal de visualitzar millor el contorn dels dos CA, es mesuraren *in situ* els diàmetres màxim i mínim de les dues glàndules, mitjançant un micròmetre ocular adaptat a una lupa binocular. Si hom considera la morfologia d'un CA com aproximadament el·lipsoidal, es pot calcular el seu volum amb la fórmula:

$$V = 4/3 \pi \left(\frac{r_1 + r_2}{2} \right)^3$$

essent r_1 i r_2 els dos radis, màxim i mínim (3).

Per tal de visualitzar i representar millor les connexions nervioses més fines, alguns exemplars es tenyiren *in situ* amb hematoxilina-eosina.

Totes les disseccions es realitzaren sota líquid de Ringer, tot tenint l'exemplar anestesiats amb diòxid de carboni.

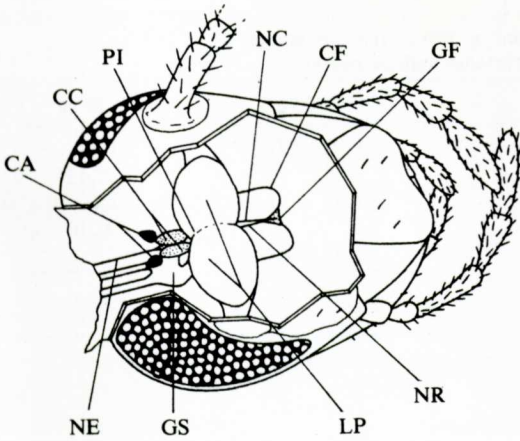


Fig. 2. Sistema nerviós i glàndules retrocerebrals associades en el cap de *Blattella germanica*. L'esòfag i l'aorta han estat suprimites per tal de visualitzar millor el complex retrocerebral. CA: corpora allata, CC: corpora cardiaca, CF: connectiu frontal, GF: gangli frontal, GS: gangli subesofàgic, LP: lòbuls protocerebrals, NC: nervus connectivus, NE: nervi esofàgic, NR: nervi recurrent, PI: pars intercerebralis.

L'estudi histològic dels CA es basà en l'obtenció de talls seriats de la càpsula cefàlica. El material fou fixat amb líquid de Bouin i posteriorment es sotmeté a un tractament amb àcid nítric a l'1 % durant 24 h. Els talls es tenyiren amb el mètode tricròmic de Mallory. Pel que fa a detalls més específics de les tincions i de la metodologia histològica en general, es segueixen les indicacions de DURFORT (8).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Els CA de *B. germanica* presenten una morfologia cordiforme i són aproximadament simètrics, encara que poden trobar-se exemplars amb un índex notable d'asimetria (3). El primer estudi anatómic detallat dels CA d'aquesta espècie pot trobar-se en el treball de HANSTRÖM (12), en el qual cal destacar l'acurada descripció de les connexions dels corpora cardiaca amb el cervell. A la figura 3 hem representat el complex retrocerebral, tot fent especial atenció a les connexions nervioses dels CA. Aquest esquema

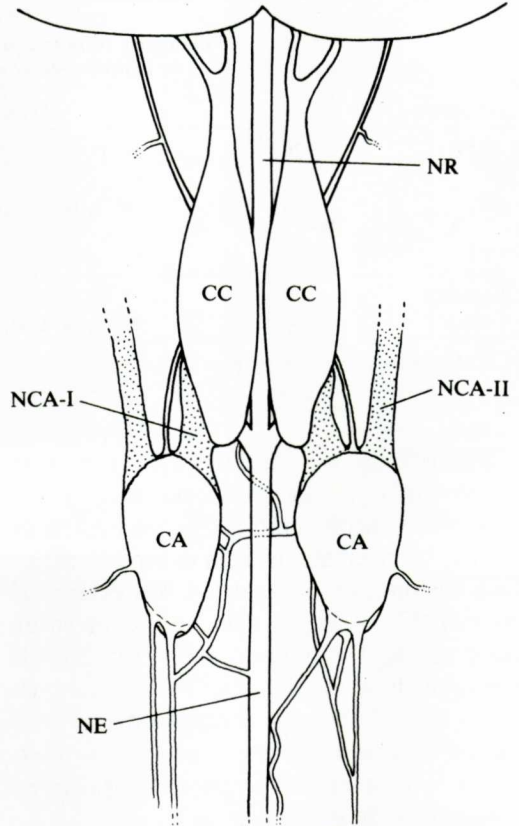


Fig. 3. Complex retrocerebral de *Blattella germanica* en visió dorsal. La commissura basal dels corpora cardiaca, l'aorta i l'esòfag han estat suprimites per tal de visualitzar millor les connexions. CA: corpus allatum, CC: corpus cardiacum, NCA I,II: nervi corporis allati I i II, NE: nervi esofàgic, NR: nervi recurrent.

coincideix bàsicament amb el d'altres Blàtids estudiats més recentment (vegeu, per exemple, l'estudi general de CAZAL: 7 o els esquemes, fets sobre *Periplaneta americana*, de WILLEY: 17 o de FRASER i PIPA: 10).

Pel que fa al volum dels CA dels exemplars tractats amb precocens, els valors mesurats resultaren, en general, més petits en comparació amb els controls, encara que s'observà una notable dispersió en els resultats (Taula I). De tota manera, els valors obtinguts en els grups tractats amb EP2, a qualsevol de les dosis emprades, o bé amb P2 a la dosi de 200 µg, resultaren significativament més petits que els dels controls.

TAULA I.
 Volum dels corpora allata ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$) de femelles adultes
 de *Blattella germanica* tractades amb precocens.

Compost	N	200 μg	100 μg	50 μg
EP2	20	0,95 \pm 0,20*	1,23 \pm 0,37*	1,11 \pm 0,43*
P2	20	1,04 \pm 0,49*	1,42 \pm 0,38	1,60 \pm 0,46
P1	20	1,44 \pm 0,58	1,63 \pm 0,30	
Acetona	20	1,59 \pm 0,52		
Control	20	1,84 \pm 0,44		

* Diferències significatives ($p < 0,05$) respecte dels exemplars tractats amb acetona (prova t de Student).

Els estudis estructurals dels CA amb microscòpia òptica es realitzaren sobre exemplars tractats amb 200 μg de P2 i 50 μg d'EP2, en comparació amb controls tractats amb acetona. En el cas dels CA d'exemplars control (Fig. 4-5), els nuclis presentaven un color rosat, el citoplasma blanc i la càpsula envoltant la glàndula, blau fosc; a més, els nuclis eren abundants, el citoplasma mostrava poques granulacions i les cèl·lules s'observaven molt aplegades, sense deixar gaires espais intercel·lulars.

Pel que fa als exemplars tractats amb precocens, és interessant remarcar que el mateix tractament va induir diferents graus d'alteració dels CA, especialment en els experiments fets amb 50 μg d'EP2. En aquells casos en què s'observaren els canvis més dràstics, la glàndula presentava escassos nuclis que es tenyien de color vermell fosc, el citoplasma apareixia reduït i granular, i les cèl·lules estaven separades per amplis espais intercel·lulars. D'altra banda, la morfologia de la glàndula mostrava modificacions importants, tot observant-se notables porcions de la càpsula deteriorades (Fig. 6-7).

Tots aquests canvis són similars als observats amb microscòpia òptica sobre CA d'exemplars d'altres espècies tractats amb precocens, com l'Heteròpter *Oncopeltus fasciatus* (16) o l'Ortòpter *Locusta migratoria* (15), i representen símptomes evidents de degeneració de la glàndula.

Agraïments

Ens complau agrair a la Dra. Mercè Durfort i al Dr. Àngel Messeguer, les interessants discussions mantingudes sobre el tema i la lectura crítica del manuscrit. El finançament d'aquest treball ha anat a càrrec del «Joint American-Spanish Committee for Scientific and Technological Cooperation» (1664/82) i de la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica» (3296/79).

BIBLIOGRAFIA

- BALDELLOU, M.I., X. BELLÉS i M.D. PIULACHS (1984). *Influence du traitement avec des précoces sur le comportement sexuel d'Oxycarenus lavaterae* (F.) (Heteroptera, Lygaeidae) et de *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). In: *Processus d'acquisition précoce. Les communications* (A. de Haro et X. Espadaler eds.) pp. 53-56. Publ. Univ. Autònoma de Barcelona - Soc. Fr. Et. Comport. Animal.
- BELLÉS, X. i A. MESSEGUER (1981). *Sterilizing effects of 6,7-dimethoxy-2,2-dimethylchroman on Blattella germanica* (L.). In: "Juvenile Hormone Biochemistry" (G.E. Pratt and G.T. Brooks eds.) pp. 421-424, Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- BELLÉS, X. i M.D. PIULACHS (1983). *Desarrollo de los corpora allata, oocitos y glándulas colaterales durante el primer ciclo gonotrófico de Blattella germanica* (L.). Rev. Esp. Fisiol. 39:149-154.
- BOWERS, W.S. (1981). *How Anti-Juvenile Hormones Work*. Amer. Zool., 21:737-742.
- BOWERS, W.S. (1982). *Toxicology of the Precocens*. In: *Insecticide Mode of Action* (J.R. Coats ed.), pp. 403-427, Academic Press, New York.
- BOWERS, W.S., T. OHTA, J.S. CLEERE i P.A. MARSE-

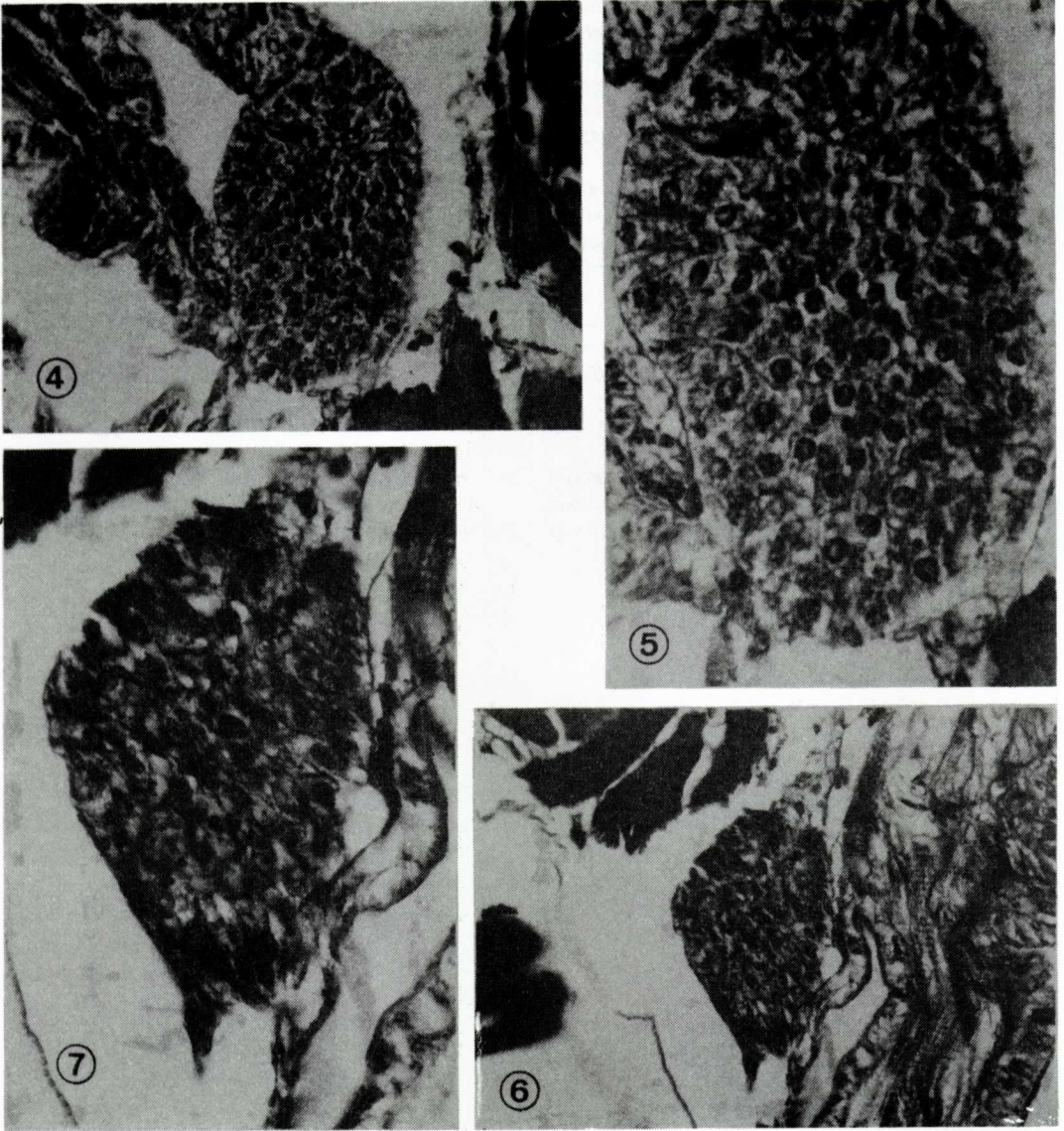


Fig. 4. *Corpora allata* de *Blattella germanica* de 7 dies d'edat. 4-5: Exemplar control. La glàndula presenta un aspecte compacte i està ben delimitada per la càpsula conjuntiva; no s'aprecien espais intercel·lulars i les cèl·lules tenen nuclis normals en els que es poden visualitzar molt bé els nuclèols. 6-7: Exemplar tractat amb 50 µg d'etoxiprecocè 2. La glàndula presenta una disminució notable del volum; la càpsula que l'envolta s'observa desintegrada en alguns punts; hi ha una reducció del nombre de cèl·lules i els nuclis són escassos, tot presentant un aspecte picnòtic (tinció segons el mètode de Mallory) (Fig. 4,6: × 500; Fig. 5,7: × 1.000).

- LLA (1976). *Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants*. *Science* 193:542-547.
7. CAZAL, P. (1948). *Les glandes endocrines rétrocérébrales des insectes (Étude morphologique)*. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, Suppl. 32, 227 pp.
8. DURFORT, M. (1977). *Algunes tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals*. *Seminaris d'Estudis Universitaris*, 4, 27 pp., Institució Catalana d'Història Natural.
9. FEYEREISEN, R., G. JOHNSON, J. KOENER, B. STAY i

- S.S. TOBE (1981). *Precocenes as pro-allatocidins in adult female* *Diptera punctata: a functional and ultrastructural study*. *J. Insect Physiol.* 27:855-868.
10. FRASER, J. i R. PIPA (1977). *Corpus allatum regulation during the metamorphosis of* *Periplaneta americana: axon pathways*. *J. Insect Physiol.* 23:975-984.
11. GARCERÀ ZAMORANO, M.D., T. MARTÍNEZ CARRAU, A. LLAVADOR ENGUIX, R. MARTÍNEZ PARDO i A. NÚÑEZ CACHAZA. (1981). *Precocene II induced sterility in four insect species*. In: *Juvenile Hormone Biochemistry* (G.E. Pratt and G.T. Brooks eds.) pp. 311-314 Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
12. HANSTRÖM, B. (1940). *Inkretorische Organe, Sinnesorgane und Nervensystem des Kopfes einiger niederer Insektenordnungen*. *Kungl. sv. Vetensk. Handl.* 18:1-226.
13. MARTÍNEZ CARRAU, T., R. MARTÍNEZ PARDO i A. NÚÑEZ CACHAZA (1981). *Detection of precocene-induced changes on the neuroendocrine complex of* *Blattella germanica* by "in vivo" applied fluorochromes. In: "Regulation of Insect Development and Behaviour" (F. SEHNAL, A. ZABZA, J.J. MENN and B. CYMBOROWSKI eds.), pp. 405-410, Technical University of Wrocław.
14. PRATT, G.E., R.G. JENNINGS i A.F. HAMNETT (1981). *The mode of action of Precocenes*. In: "Regulation of Insect Development and Behaviour" (F. SEHNAL, A. ZABZA, J.J. MENN and B. CYMBOROWSKI eds.), pp. 347-356, Technical University of Wrocław.
15. SCHOONEVELD, H. (1979). *Precocene-induced necrosis and haemocyte-mediated breakdown of corpora allata in nymphs of the locust, Locusta migratoria*. *Cell. Tissue Res.* 203:25-33.
16. UNNITHAN, G.C., K.K. NAIR i W.S. BOWERS (1977). *Precocene-induced degeneration of the corpus allatum of adult females of the bug Oncopectus fasciatus*. *J. Insect Physiol.* 23:1081-1094.
17. WILLEY, R.B. (1961). *The morphology of the stomodeal nervous system in Periplaneta americana (L.) and other Blattaria*. *J. Morph.* 108:219-262.