

## Studi sull'emolfinfa degli insetti

2<sup>a</sup> Nota - Ricerche sulle proteine in larve di *Bombyx mori* di IV<sup>a</sup> e V<sup>a</sup> età mediante elettroforesi su carta.

In un recente studio sul potere tampone dell'emolfinfa in larve di *Bombyx mori* (1), veniva posta in evidenza l'importanza del ruolo giocato dal complesso proteico, in essa contenuto, nello svolgersi di quella funzione, e la sicura azione dei componenti proteici nel determinare i valori di fondo della curva del  $\beta$ .

Già DRILHON (2) aveva effettuato l'esame elettroforetico delle proteine dell'emolfinfa del Baco da seta, constatando una variazione quantitativa delle sue diverse frazioni a seconda dello sviluppo larvale. Concludeva infine col rilevare le notevoli differenze riscontrate fra il complesso proteico larvale, quello ninfale e quello immaginale ed osservando per quest'ultimo come differenze si riscontrassero pure tra maschi e femmine.

Approfondendo le indagini con esami condotti giornalmente per tutta la durata della IV<sup>a</sup> e V<sup>a</sup> età larvale, è stato possibile mettere in evidenza, oltre ai fenomeni osservati dall'A. citato, anche un andamento periodico dell'organizzazione proteica, che lascia supporre una stretta coincidenza fra tale organizzazione e le fasi della vita larvale.

### *Materiale e metodo.*

Per effettuare il presente lavoro sono state impiegate larve di *Bombyx mori* di incrocio bigiallo a femmina oro in IV<sup>a</sup> e V<sup>a</sup> età, dalle quali veniva prelevata l'emolfinfa mediante puntura del tegumento in corrispondenza del secondo o terzo segmento toracico, in

(1) REALI G. - Il potere tampone in larve di *Bombyx mori* di IV<sup>a</sup> e V<sup>a</sup> età - Boll. Zool. Agr. e Bach., Vol. XXI, fasc. 1, Milano, 1955.

(2) DRILHON A. - Etude electrophoretique des proteines de l'hémolymph du *Bombyx mori* - C. R. Ac. Sci., Tomo 238, n. 25, Paris, 1954.



posizione dorsale, e conseguente aspirazione della gocciolina di liquido fuoruscita con micropipetta di vetro. Tale micropipetta veniva in precedenza umettata con piccolissime quantità di eparina, allo scopo di impedire, o quanto meno ritardare notevolmente, il processo di coagulazione dell'emolinfa nel corso dell'elettroforesi.

Il materiale in tal modo prelevato, affatto esente da inquinamenti di sorta, veniva distribuito, nella quantità di cc. 0,02, sulle strisce di carta leggermente inumidite di soluzione tampone, operazione necessaria per ottenere una uniforme distribuzione di quel liquido, notevolmente viscoso.

L'elettroforesi era effettuata con apparecchio El-Vi, su strisce di carta Wathman 1 di 4 cm. di larghezza e 30 cm. di lunghezza, con differenza di potenziale, applicata per la durata di 12 ore, di 150 Volts e 0.002 Ampère, alla temperatura di 20° C., in un bagno di soluzione tampone di Veronal sodico della seguente composizione e caratteristiche:

Veronal sodico . . . . .	gr.	5,88
Acetato di sodio crist. . . . .	»	3,88
Ossalato di potassio . . . . .	»	1,28
HCl N/10 . . . . .	cc.	20,00
H <sub>2</sub> O . . . . .	q. b. a	1000
pH = 8,68	μ = 0,1	

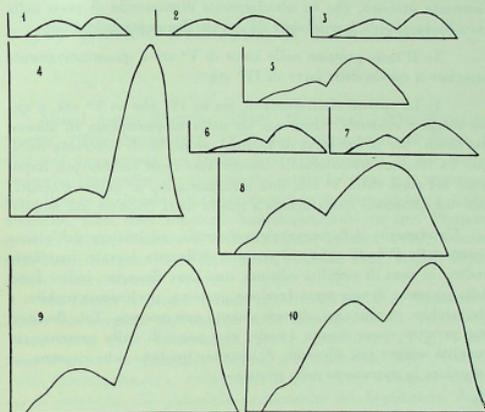
Per la colorazione si procedeva al fissaggio in stufa a 100° C. per 5', seguito dalla permanenza per 30' in un bagno di bleu di bromofenolo allo 0,1% in acqua, ed infine allo sviluppo in soluzione acquosa di acido acetico allo 0,3%.

La lettura veniva effettuata, dopo diafanizzazione con soluzione di α-bromonafalina in olio di vaselina, mediante colorimetro El-Vi a cellula fotoelettrica; l'area dei diagrammi era valutata col planimetro.

*Dati sperimentali.*

I grafici che si riportano rappresentano la media di una decina di elettroforesi condotte giornalmente sull'emolinfa di altrettante larve. Giova qui porre in evidenza come gli spettri elettroforetici ot-

tenuti sulle diverse larve della stessa età presentassero una grande uniformità di valori, i quali non fornivano mai, tra un individuo e l'altro, scarti superiori al 5%.



Spettri elettroforetici dell'emolinfa di larve di *Bombyx mori* durante la IV<sup>a</sup> e V<sup>a</sup> età.

- 1 - In 1<sup>a</sup> giornata della IV<sup>a</sup> età
- 2 - » 2<sup>a</sup> » » » » »
- 3 - » 3<sup>a</sup> » » » » »
- 4 - » 4<sup>a</sup> » » » » »
- 5 - Durante la 4<sup>a</sup> muta.
- 6 - In 1<sup>a</sup> giornata della V<sup>a</sup> età.
- 7 - » 2<sup>a</sup> » » » » »
- 8 - » 3<sup>a</sup> » » » » »
- 9 - » 4<sup>a</sup> » » » » »
- 10 - » 5<sup>a</sup> » » » » »

Dall'esame delle strisce e dei grafici emergono fatti che portano alle seguenti considerazioni:

1) Si nota un aumento progressivo della quantità di proteine dal primo giorno di ogni età fino all'ultimo della stessa. Tale incremento, poco appariscente durante le prime giornate di ogni età, di-

viene quanto mai netto nelle ultime, nel corso delle quali i valori del tasso proteico aumentano in misura quanto mai rilevante.

2) In corrispondenza della quarta muta si ha una caduta del contenuto proteico, che va ulteriormente diminuendo di poco nella giornata successiva, per iniziare da questa l'aumento giornaliero.

3) Il tasso proteico nelle larve di V<sup>a</sup> età è quantitativamente superiore a quello delle larve di IV<sup>a</sup> età.

4) Lo spettro elettroforetico, sia in IV<sup>a</sup> che in V<sup>a</sup> età, e qui con maggior evidenza, manifesta un netto sdoppiamento in almeno due bande, per la comparsa di frazioni proteiche di differente mobilità. La frazione meno mobile assume una mole sempre più imponente nel corso della V<sup>a</sup> età, fino a raggiungere, in quinta giornata, una concentrazione quasi uguale a quella della frazione più mobile.

L'andamento della curva elettroforetica, ad iniziare dall'ultimo giorno della IV<sup>a</sup> età e fino al termine della vita larvale, manifesta inoltre, in zona di mobilità minima, una lieve flessione, indice forse della presenza di una terza frazione proteica, pochissimo mobile, e che sarebbe, in ogni caso, di mole quanto mai modesta. Tale flessione può peraltro essere dovuta a code, rese possibili dalla presenza, in quantità sempre più rilevanti, di sostanze lipidiche, che riescono ad ostacolare la migrazione delle proteine.

\*\*\*

Dai fatti suesposti appare evidente che, almeno durante il corso della IV<sup>a</sup> e V<sup>a</sup> età larvale, l'aumento del contenuto proteico in emolinfa di *Bombyx mori* ha un andamento periodico aderente alle fasi larvali.

La difficoltà di eseguire accurati rilievi giornalieri sulle piccolissime larve delle prime tre età non ha permesso di accertare sperimentalmente lo stesso fenomeno anche in tali stadi.

Successivi studi, già intrapresi, potranno esattamente stabilire l'andamento qualitativo e quantitativo del fenomeno, fornendo un preciso quadro dell'organizzazione proteica e delle sue modificazioni nel corso della vita larvale del *Bombyx mori*.

Dot. ATTILIO FORMIGONI

## Le ghiandole protoraciche in alcuni Imenotteri

Alcuni Autori (FUKUDA, 1940; WILLIAMS, 1947; WIGGLESWORTH, 1952; BODENSTEIN, 1953) hanno dimostrato nel torace di Pterigoti appartenenti ad Ordini diversi la presenza di due organi endocrini simmetrici il cui prodotto regola la muta e la metamorfosi. Queste ghiandole, chiamate dapprima ipostigmatiche, poi protoraciche, sono state illustrate morfologicamente in altri Pterigoti (LYONET, 1762; VERNON e BISSON, 1891; TOYAMA, 1902; SCHARNER, 1948; KAISER, 1949; LEE, 1948; SELLIER, 1951; RAHM, 1952; JONES, 1953; WELLS, 1954).

Nei Ditteri le grandi cellule laterali dell'anello di Weismann, anche esse sorgente dell'ormone della metamorfosi (E. THOMSEN, 1942; VOCT, 1943; BODENSTEIN, 1943; POSSOMPES, 1953), e nei bassi Pterigoti le ghiandole ventrali (PELUGFELDER, 1947; CAZAL, 1948; DEROUX-STALLA, 1948; ARVY e GABE, 1953) vengono considerate omologhe alle ghiandole protoraciche dei Lepidotteri, degli Ortotteri e degli Emitteri.

SCHMIEDER (1942) dimostra con legature toraciche che esiste nella regione anteriore del secondo segmento toracico di *Tripoxylon politum* (Hymenoptera) un organo che controlla la metamorfosi.

WILLIAMS (1948) descrivendo le ghiandole protoraciche di *Platysamia* afferma di aver osservata la loro presenza anche nella larva di un Imenottero, *Cimbex americana*.

L'HELIAS (1951) e SCHALLER (1951-1952), in seguito a esperimenti con legature postcefaliche, giungono alla conclusione che nella larva di Ape il centro d'origine dell'ormone della metamorfosi si trova nel torace.

L'HELIAS (1952) nella larva di Ape descrive due formazioni fusiformi formate da numerose piccole cellule assai ammassate, poste dietro gli stigmi protoracici e le interpreta come ghiandole protoraciche, pur essendo esse morfologicamente del tutto diverse dalle