

Ricerche cromatografiche preliminari sugli aminoacidi liberi in alcuni Emitteri Omotteri e Coleotteri

Studi del Gruppo di lavoro del C. N. R. per le virosi: XXXI.

PREMESSA

La cromatografia su carta permette un'indagine analitica molto accurata di substrati costituiti da un numero elevato di sostanze fra loro simili. È per questo motivo che i ricercatori che si sono occupati dello studio del metabolismo degli aminoacidi negli Insetti hanno recentemente impiegato la cromatografia su carta in aggiunta ad altri metodi di analisi.

Negli Insetti il numero e la quantità degli aminoacidi liberi presenti nell'emolinfa sembrano essere in genere piuttosto elevati (WIGLESWORTH, 1950; CHAUVIN, 1956); questi elementi sono stati tratti dalle indagini particolareggiate, compiute però su poche specie, da USSING (1945, 1946), PRATT (1950), DUCHATEU ed altri (1952, 1958), FLORKIN (1959), BUCK (1953), BHEEMESSWAR (1959). Qualche altro Autore (AGRELL, 1949; KENNAUGH, 1958) ha inoltre rivolto l'attenzione ad aspetti particolari del metabolismo azotato di singole specie.

La cromatografia su carta per l'indagine degli aminoacidi presenti nell'emolinfa degli Insetti è stata impiegata, fra i primi, da AUCLAIR e coll. (1953), LEWALLEN (1957, 1958), mentre MALTAIS e coll. (1952) e LAMB (1959) hanno compiuto ricerche cromatografiche sulla melata di alcuni Afidi. Basandosi poi sulla considerazione che gli aminoacidi costitutivi sono tipici di ciascuna specie, alcuni Autori (BUZZATI-TRAVERSO e coll., 1953; EICHHORN, 1958; KIRK e coll., 1954) hanno discusso e confrontato cromatogrammi di specie diverse allo scopo di rendere un aiuto alla sistematica anche più minuta, laddove le differenze morfologiche vengono meno.

Nell'intento di dare un apporto sperimentale, sia pure modesto, alla conoscenza del metabolismo degli aminoacidi negli Insetti, ho ricercato questi composti mediante cromatografia su carta in alcuni Emitteri Omotteri Afididi (*Chaitophorus versicolor* Koch, *Brachycaudus cardui* (L.)) e Coleotteri (*Attagenus piceus* Ol., *Chrysomela decemlineata* Say, *Melolontha melolontha* L.). Tale studio preliminare è stato effettuato anche allo scopo di acquisire qualche elemento atto al proseguimento di ricerche più minute di natura sistematica afidologica, alle quali mi dedico da qualche anno. Le ricerche medesime rientrano nel quadro delle indagini condotte dal Gruppo di lavoro del C.N.R. sulle Virosi delle piante e mirano ad illustrare un gruppo di Insetti di importanza primaria nella trasmissione delle virosi in discorso.

MATERIALI E METODI

Tutte le cromatografie sono state eseguite usando come solvente la miscela alcool isobutilico-acido acetico-acqua nei rapporti 40:10:50. Durata della cromatografia: 15 h. Temperatura della camera cromatografica durante l'analisi: 20° C. Sviluppo della cromatografia mediante il seguente rivelatore: ml 25 di soluzione di ninidrina allo 0,2 % in alcool etilico, ml 1 di 2-4-6 trimetilpiridina, ml 5 di acido acetico glaciale (BORTAZZI, 1957). Per le prove in bianco ho determinato gli R_f ⁽¹⁾ di soluzioni di aminoacidi puri su carta Whatman 1 e 3; solvente e rivelatore le miscele già descritte. Alcune prove preliminari mi hanno indicato che, per il modesto numero di aminoacidi presenti nel substrato preso in esame, potevo limitarmi ad eseguire cromatografie monodimensionali ascendenti. Ho compiuto le analisi facendo migrare sul medesimo foglio sia la sostanza da analizzare che una miscela di aminoacidi puri appositamente preparati per il confronto e l'identificazione.

Gli afidi *Chaitophorus versicolor* Koch e *Brachycaudus cardui* L. sono stati raccolti in campagna rispettivamente su *Populus* sp. (Milano, 15.IX.1958, ♀ ♀ partenogenetiche attere) e su *Chrysanthemum* sp. (Legnano, 1.XI.1958, ♀ ♀ partenogenetiche attere). Lavati accuratamente gli individui con acqua distillata, li ho asciugati su carta da filtro e ne ho ottenuto il succo triturandoli in mortaio con sabbia

(1) Il valore di R_f , che dà la misura della velocità di migrazione di un composto, risulta dal rapporto tra lo spostamento dal punto di partenza dello stesso composto e quello del fronte del solvente.

di quarzo. Durante l'operazione il mortaio è stato continuamente refrigerato mediante miscela frigorifera ghiaccio-sale posta tutt'intorno. Ho ripreso il succo con ml 1 di acqua distillata e ne ho quindi direttamente eseguita l'analisi. Cromatografia ascendente su carta Whatman 1.

Le analisi di *Attagenus piceus* Ol. sono state compiute soltanto su larve allevate in laboratorio su frumento. Ne ho ottenuto il succo con la stessa metodologia impiegata per gli afidi. Cromatografia ascendente su carta Whatman 1.

Per le ricerche su *Chrysomela decemlineata* Say e *Melolontha melolontha* L. ho usato larve provenienti rispettivamente da allevamento di laboratorio su piantine di patate e da raccolta in campagna (orti coltivati in Castiglione d'Intelvi). L'emolinfa è stata prelevata dalle larve pungendole (senza per altro ucciderle) con uno spillo entomologico e direttamente analizzata. Analisi cromatografica ascendente eseguita su carta Whatman 3 per *C. decemlineata* e su carta Whatman 1 per *M. melolontha*.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei substrati presi in esame la tecnica cromatografica impiegata ha permesso di identificare gli aminoacidi liberi riportati in tabella.

Nella letteratura consultata non compaiono dati riguardanti la presenza di aminoacidi negli Afidi. Nei cromatogrammi relativi a questi insetti i pigmenti verde (*C. versicolor*) o nero (*B. cardui*) hanno ostacolato una nitida visibilizzazione delle macchie degli aminoacidi presenti in minime quantità. Nella tabella sono stati riportati soltanto gli aminoacidi che si sono nettamente evidenziati con la ninidrina e dei quali si è potuto calcolare il rispettivo R_f .

Anche riguardo all'*A. piceus* mancano dati bibliografici. L'acido glutammico ha dato una macchia evidente ma molto debole. Tra gli aminoacidi da me trovati nell'emolinfa delle larve di *C. decemlineata* ho creduto di poter identificare quello che ha dato una debole macchia ad R_f 0,355 con l'acido glutammico oltre che per la corrispondenza del suo valore di R_f con quello presentato da questo aminoacido nelle collaterali prove in bianco eseguite, anche per il fatto che alcuni ricercatori (DUCHATEAU e FLORKIN, 1958; BUCK riportato da CHAUVIN, 1956) hanno trovato questo composto nell'emolinfa di adulti. L'arginina e la fenilalanina da me rinvenute sono confermate pure da DUCHATEAU e FLORKIN; la prolina ha dato una macchia molto

Insetto	Aminoacidi	Colore della macchia	R _f
<i>Brachycaudus cardui</i> (L.) (succo totale di ♀ ♀ partenogenetiche attere)	glicina	porpora bruno	0,308
	arginina?	porpora bluastro	0,330
	ossiprolina	giallo brunastro	0,415
	valina	porpora bluastro	0,520
	leucina	porpora	0,643
<i>Chaitophorus versicolor</i> Koch (succo totale di ♀ ♀ partenogenetiche attere)	glicina	porpora bruno	0,311
	arginina?	porpora bluastro	0,330
	treonina?	porpora bluastro	0,360
	ossiprolina	giallo brunastro	0,425
	valina	porpora bluastro	0,510
	leucina	porpora	0,580
<i>Attagenus piceus</i> Ol. (succo totale di larve prossime alla maturità)	acido glutammico	porpora brunastro	0,135
	istidina	porpora bruno	0,252
	arginina	porpora bluastro	0,308
	treonina	porpora bluastro	0,355
	ossiprolina	giallo brunastro	0,431
	valina	porpora bluastro	0,505
	tirosina	porpora bruno	0,556
	leucina	porpora	0,640
<i>Chrysomela decemlineata</i> Say (emolinfa di larve di IV età)	arginina	porpora bluastro	0,252
	glicina	porpora bruno	0,308
	acido glutammico?	porpora bluastro	0,355
	alanina	porpora bluastro	0,385
	prolina	giallo chiaro	0,431
	valina	porpora bluastro	0,505
	fenilalanina	porpora verdastro	0,556
	leucina	porpora	0,640
<i>Melolontha melolontha</i> L. (emolinfa di larve prossime alla maturità)	asparagina	bruno arancio	0,080
	acido glutammico?	porpora bluastro	0,127
	istidina	porpora bruno	0,215
	arginina	porpora bluastro	0,250
	ossiprolina	giallo brunastro	0,262
	alanina	porpora bluastro	0,382
	valina	porpora bluastro	0,412
	tirosina	porpora bruno	0,464
	isoleucina	porpora	0,587

intensa, segno della presenza del composto in quantità notevole rispetto agli altri aminoacidi. Il minor numero di aminoacidi da me riscontrati rispetto a quelli elencati dagli Autori sopradetti deve probabilmente addursi al fatto che le mie analisi sono state eseguite su larve.

Le cromatografie eseguite su emolinfa di *M. melolontha* hanno rivelato la presenza di asparagina, quantunque in quantità non molto elevata; ciò concorda con quanto riferito da USSING (1946). Non ho mai trovato invece lisina e triptofano. Le tracce di acido aspartico indicate da USSING e da BUCK (in CHAUVIN, 1956) possono forse essere identificate con alcune macchie presenti nelle cromatografie da me eseguite, con una colorazione così lieve e poco nitida per cui non ho potuto determinarne con sufficiente esattezza i valori di R_f . Macchie molto nette e con intensa reazione cromatica hanno dato istidina, ossiprolina ed isoleucina, in accordo con le determinazioni degli Autori sopracitati.

I risultati delle ricerche preliminari da me eseguite fanno intravedere un'utile applicazione di metodi cromatografici anche nello studio della sistematica di alcuni Insetti che, come nel caso degli Afidi, sono talvolta discriminabili soltanto in base alla conoscenza della pianta ospite.

Una proficua messa a punto del metodo, realizzata dalla stretta collaborazione fra l'entomologo ed il chimico, potrà senza dubbio permettere di ottenere frutti più completi e scientificamente vantaggiosi.

RIASSUNTO

Su alcuni Emitteri Omotteri (femmine partenogenetiche attere di *Chaitophorus versicolor* Koch e *Brachycaudus cardui* (L.)) e Coleotteri (larve di *Attagenus piceus* Ol., *Chrysomela decemlineata* Say e *Melolontha melolontha* L.) l'A. ha eseguito ricerche cromatografiche su carta per identificare gli aminoacidi liberi presenti: essi risultano in apposita tabella nel testo. Tale studio preliminare ha avuto lo scopo di porre le basi per un'applicazione del metodo nella discriminazione sistematica degli Insetti e di alcuni Afidi in particolare.

SUMMARY

On some species of Hemiptera Homoptera (apterous viviparous females of *Chaitophorus versicolor* Koch and *Brachycaudus cardui* (L.)) and Coleoptera (larvae of *Attagenus piceus* Ol., *Chrysomela decemlineata* Say and *Melolontha melolontha* L.) the A. has made paper chromatographic researches in order to identify the free aminoacids: they are related in a table in the text. Such introductory study has been carried out the purpose of laying the foundations for an application of the method in the systematic distinction of Insects and particularly of some Aphids.

BIBLIOGRAFIA

- AGRELL I., 1949 - *Occurrence and metabolism of free amino acids during Insect metamorphosis*. Acta Physiol. Scand., Stockholm, 18, 247-258, 5 figg.
- AUCLAIR J. - L., DUBREUIL R., 1953 - *Etudes sur les acides aminés libres de l'hémolymph des insectes par la méthode chromatographique sur papier filtre*. Canad. Journ. Zool., Ottawa, 31, 30-41.
- BHEEMESWAR B., 1959 - *Some aspects of amino acid metabolism in insects*. Proc. IVth Int. Congr. Bioch. 1958, XII, Bioch. of Insects, 78-89.
- BOTTAZZI V., 1957 - *La cromatografia su carta negli studi di tassonomia batterica. Nota I: Generalità*. Ann. Microbiol. Enzimol., Milano, VII (V-VI), 3-21, 7 figg.
- BUCK J. B., 1953 - *Physical properties and chemical composition of insect blood*. In: ROEDER K. D., *Insect Physiology*, J. Wiley, New York-Chapman & Hall, London, pp. 147-191, figg. 38-40.
- BUZZATI-TRAVERSO A. A., RECHNITZER A. B., 1953 - *Paper partition chromatography in taxonomic studies*. Science, London, 117 (3029), 58-59.
- CHAUVIN R., 1956 - *Physiologie de l'insecte*. Inst. Nat. Rech. Agr., Paris, 917 pp., 104 figg.
- DUCHATEAU G., FLORKIN M., SARLET H., 1952 - *Sur les acides aminés libres ou combinés sous forme non protéinique, du plasma sanguin de divers Insectes*. Arch. Int. Physiol., Liege, LX (41), 539-540.
- DUCHATEAU G., FLORKIN M., 1958 - *A survey of aminoacidemias with special reference to the high concentration of free aminoacids in insect hemolymph*. Arch. Int. Physiol. Bioch., Liège, LXVI (4), 573-591.
- EICHHORN O., 1958 - *Morphologische und papierschromatographische Untersuchungen zur Artentrennung in der Gattung Dreyfusia C. B. (Adelgidae)*. Zeit. angew. Ent., Berlin, 42 (3), 278-283.
- FLORKIN M., 1959 - *The free amino acids of insect hemolymph*. Proc. IVth Int. Congr. Bioch. 1958, XII, Bioch. of Insects, 63-77, 2 figg.
- KENNAUGH J. H., 1958 - *Amino acid metabolism, polyphenol production and the process of tanning in the cockroach Periplaneta americana*. Journ. Ins. Phys., Philadelphia, 2 (2), 97-107, 1 fig.
- KIRK R. L., MAIN A. R., BEYER F. G., 1954 - *The use of paper partition chromatography for taxonomic studies of land snails*. Bioch. Journ., Cambridge, 57, 440-442, 1 fig.
- LAMB K. P., 1959 - *Composition of the honeydew of the aphid Brevicoryne brassicae (L.) feeding on swedes (Brassica napobrassica DC)*. Journ. Insect Physiol., Philadelphia, 3 (1), pp. 1-13.
- LEWALLEN L. L., 1957 - *Paper chromatography studies of the Anopheles maculipennis complex in California (Diptera: Culicidae)*. Ann. Ent. Soc. America, Washington, 50 (6), 602-606.
- LEWALLEN L. L., 1958 - *Paper chromatography analysis of certain protein constituents from the House fly, Musca domestica L. (Diptera: Muscidae)*. Ann. Ent. Soc. America, Washington, 51 (2), 167-173.
- MALTAIS J. B., AUCLAIR J. L., 1952 - *Occurrence of amino acids in the honeydew of the crescent-marked lily aphid, Myzus circumflexus (Buck.)*. Canad. Journ. Zool., Ottawa, 30 (4), 191-193.
- PRATT J. J., 1950 - *A qualitative analysis of the free amino acids in insect blood*. Ann. Ent. Soc. America, Washington, 43 (4), 573-580.
- USSING H. H., 1945 - *Isolation of asparagin from the haemolymph of Melolontha larvae*. Nature, London, 155, 481.
- USSING H. H., 1946 - *Amino acids and related compounds in the haemolymph of Oryctes nasicornis and Melolontha vulgaris*. Acta Physiol. Scand., Stockholm, 11, 61-84, 2, figg.
- WIGGLESWORTH V. B., 1950 - *The principles of Insect physiology*. Methuen, London, Dutton, New York, 544 pp., 355 figg.