

Sulla presenza di alcuni metaboliti del triptofano, pterine ed altre sostanze U.V. fluorescenti o colorate in ceppi di *Musca domestica* L. normali e mutanti per il colore dell'occhio

Si conoscono fino ad ora 21 mutazioni, corrispondenti ad 11 *loci*, che modificano il colore dell'occhio di *Musca domestica* L.

Il comportamento genetico di tali mutanti è stato studiato da numerosi autori: tuttavia, le conoscenze sulla presenza delle sostanze che determinano la colorazione dell'occhio, sui precursori di queste o sugli enzimi che ne effettuano il metabolismo sono ancora frammentarie. Il mutante *green* è privo dei metaboliti che seguono il triptofano nella catena che porta alla formazione degli ommocromi e il triptofano stesso è presente in quantità quattro volte maggiore di quella rinvenuta nei ceppi normali (WARD e HAMMEN, 1957).

Il mutante *ocra* non metabolizza la chinurenina in 3-idrossichinurenina (COLOMBO e PINAMONTI, 1967; LAUDANI e GRIGOLO, 1968).

Nei mutanti *carmine* e *pink* (LAUDANI e GRIGOLO, 1968) e nei mutanti *yellow* e *white*³ (COLOMBO e PINAMONTI, 1967; LAUDANI e GRIGOLO, 1968) si notano gli stessi precursori degli ommocromi che sono presenti nei ceppi normali.

I mutanti *yellow* e *white*³ non sintetizzano però ommocromi che invece sono prodotti dai mutanti *carmine* e *pink*. Inoltre, indagini istochimiche (MOSCONI BERNARDINI, 1967) e biochimiche tuttora in corso hanno permesso di porre in evidenza quantità diverse e diversa localizzazione degli ommocromi nei mutanti *carmine* e *pink* rispetto ai ceppi con colorazione normale dell'occhio.

Nulla si conosce sull'identità, sul controllo genetico e sul metabolismo delle pterine di *Musca domestica* L. E' stata invece evidenziata (BOWNESS e WOLKEN, 1959) una sostanza gialla al visibile, fotolabile, U.V. fluorescente, con caratteristiche fisico-chimiche tali da non consentire la sua collocazione tra i gruppi di pigmenti già conosciuti per gli insetti.

Lo scopo di questo lavoro è di delineare il comportamento dei metaboliti del triptofano e di sostanze U.V. fluorescenti o colorate durante l'intero stadio pupale e nell'insetto adulto di *Musca domestica* L.

MATERIALE

Si sono usate eopupe (Eo), pupe di 1, 2, 3, 4, 5 giorni (P₁, P₂, P₃, P₄, P₅) e adulti di 3 giorni (A₃) senza distinzione di sesso.

La datazione del materiale è stata fatta raccogliendo le eopupe e ponendole entro capsule Petri in incubatore a +27° C.

Esse sono state prelevate in egual numero esattamente ogni 24 ore per gli esperimenti. Gli adulti sono stati mantenuti a soli acqua e zucchero alla temperatura di circa +20° C.

Nonostante il parziale digiuno, gli individui erano, al momento del prelievo, attivi ed in buone condizioni.

Cepi usati:

Normali:

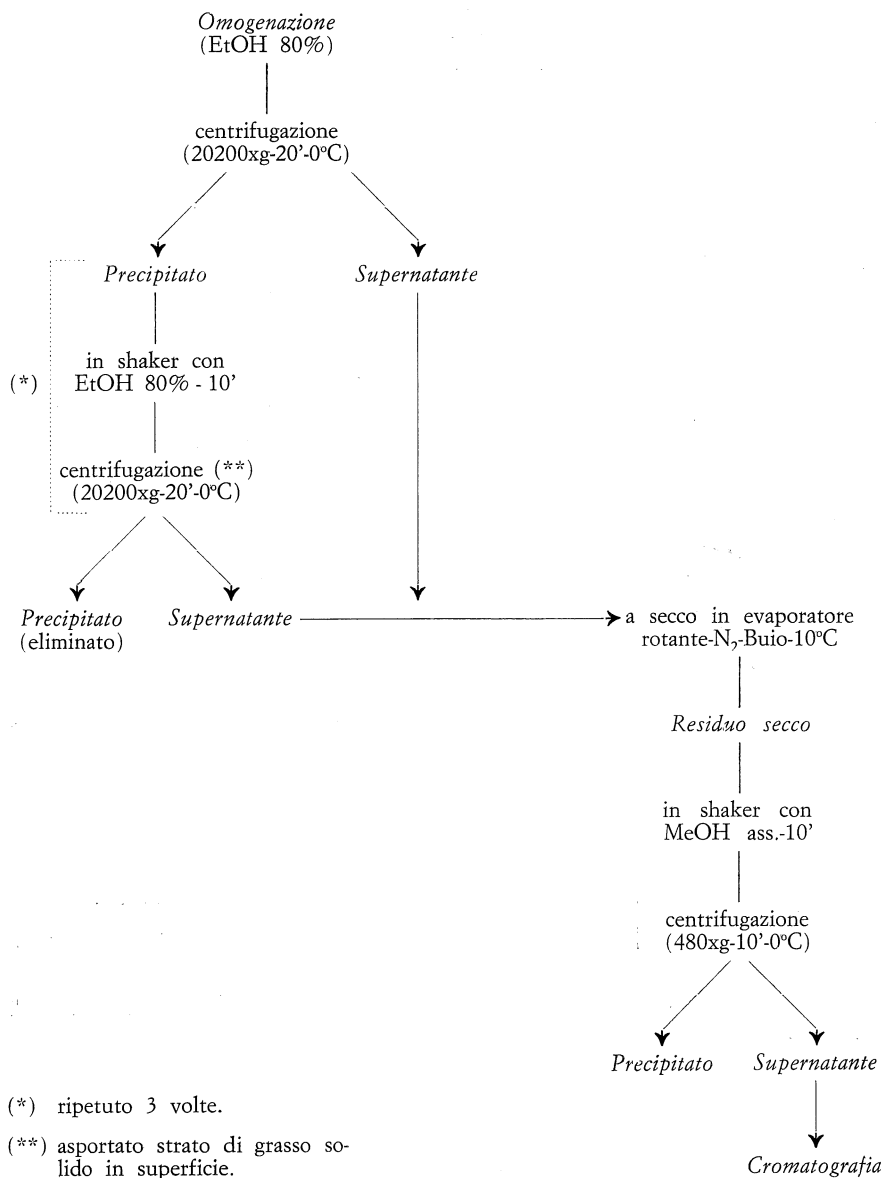
- | | |
|------------------------------------|---|
| WHO/IN/ <i>Musca domestica</i> /1: | sensibile al DDT, dieldrin e insetticidi organofosforati; |
| Cooper | : sensibile alle piretrine; |
| F | : caratterizzato da una notevole resistenza alla siccità; |
| Lab-1 | : resistente al DDT e al DDT+sinergici. |

Mutanti:

- | | |
|---|---|
| <i>carmine</i> (cm) | : HIROYOSHI (1960): 5° gruppo di concatenazione; occhi composti color rubino scuro, semitrasparenti: s'iscuriscono con l'età; |
| <i>green</i> (ge) | : ZINGRONE e coll. (1959): 2° gruppo di concatenazione; occhi composti color giallo-verde pallido; |
| <i>ocra</i> | : MILANI (1964): 4° gruppo di concatenazione; colore degli occhi tendente al giallo: non autonomo; |
| <i>yellow eyes</i> (ye) | : MILANI (1967): 6° gruppo di concatenazione; colore degli occhi simile a quello dei mutanti <i>ocra</i> e <i>green</i> ; |
| <i>pink</i> | : FRANCO (dati non pubblicati) comparso nel ceppo <i>yellow</i> ; comportamento ereditario non ancora analizzato; |
| <i>white</i> ³ (w ₃) | : TSUKAMOTO e coll. (1961): 2° gruppo di concatenazione; occhi bianchi. |

METODI

a) Metodo di estrazione e trattamento del campione.



b) *Metodo cromatografico.*

La separazione delle sostanze è stata effettuata mediante cromatografia ascendente in strato sottile di cellulosa ⁽¹⁾ (TLC) e lo sviluppo del cromatogramma è stato eseguito in soluzione acquosa di KCl 20% (p/v). L'estratto grezzo (400 µl), contenente le sostanze provenienti da 30 individui, è stato apportato in linea continua lungo un lato della lastra (20 x 20 cm). Lo strato di cellulosa (500 µ) era stato precedentemente inciso lungo tre lati della lastra con un solco continuo posto ad 1 cm dal bordo. La linea lungo la quale si apponeva l'estratto occupava, da un'incisura all'altra, il quarto lato. Con tale accorgimento si otteneva una migrazione delle sostanze più omogenea e di conseguenza una migliore separazione delle stesse.

La TLC e l'uso di una soluzione acquosa di KCl come solvente consentono un'ottima separazione, non solo dei metaboliti del triptofano, ma anche delle altre sostanze colorate o fluorescenti prese in considerazione.

Il grado di risoluzione ottenuto nei cromatogrammi è tale da poter individuare con sicurezza le diverse sostanze: tuttavia, le bande di alcuni metaboliti sono in stretto contatto le une con le altre: per questa ragione, mentre alcune sostanze possono essere asportate ed eluite per la determinazione quantitativa, per altre invece è necessaria una seconda cromatografia in solvente adeguato.

La riproducibilità dei valori di R_f è mediocre per sostanze con valori maggiori di 80-85.

Lo sviluppo dei cromatogrammi è avvenuto a +2° C, al buio; essi si sono considerati completamente sviluppati 20 minuti dopo che il solvente era giunto all'estremità superiore della lastra; si otteneva in tal modo una ulteriore migliore separazione e distribuzione delle sostanze.

c) *Rivelazione della sostanza.*

I precursori degli ommocromi sono stati individuati in base ai valori di R_f, alla colorazione in luce visibile, alla fluorescenza (254 e 366 mµ) ed alle colorazioni assunte con i reagenti specifici.

L'identità di ogni sostanza è stata inoltre controllata con l'uso di standards ⁽²⁾.

(1) Cellulosepulver MN 300 (Macherey, Nagel & Co.).

(2) Forniti dalla ditta Calbiochem (A grade).

Nei casi dubbi la sostanza è stata asportata dal cromatogramma ed eluita: si sono determinati quindi, in opportune condizioni di pH, lo spettro di assorbimento ed i massimi di emissione in fluorescenza. I dati sono stati paragonati a quelli ottenuti da uno standard cromatografato ed eluito come il campione in esame.

La Tab. 1 riporta i colori assunti dalle sostanze nelle diverse condizioni sperimentali.

Le altre sostanze U.V. fluorescenti (non metaboliti del triptofano) sono state caratterizzate in base ai valori di R_f , al colore in luce visibile ed alla fluorescenza in U.V.

RISULTATI

Nella fig. 1 è riportata la presenza del triptofano e dei suoi metaboliti ed inoltre delle sostanze colorate od U.V. fluorescenti non metaboliti del triptofano identificati con le tecniche descritte. Tali sostanze presentano nell'ambito dello stesso ceppo e tra ceppi diversi possibili variazioni della ampiezza della banda.

Poichè lo spessore della banda cromatografica è, entro certi limiti ben definiti per ciascuna sostanza, proporzionale alla concentrazione della sostanza stessa per unità di superficie (SEHER, 1961; STAHL, 1961; WALDI, 1962), è stato possibile paragonare le variazioni relative della medesima sostanza nei cromatogrammi ottenuti.

Il paragonare l'ampiezza delle bande (e quindi la quantità delle sostanze) di estratti di individui in diversi momenti di sviluppo potrebbe teoricamente indurre in errore, poichè i pesi del materiale grezzo omogeneato negli stadi pupali e negli adulti non si equivalgono ⁽³⁾. Tuttavia pare che questo fattore non abbia azione perturbatrice poichè le valutazioni spettrofotometriche di alcuni metaboliti (GRIGOLO, 1967) forniscono dati congruenti con l'ampiezza delle bande.

Non abbiamo creduto opportuno riportare anche le variazioni della ampiezza delle bande cromatografiche, date le difficoltà tecniche di rappresentare graficamente le notevoli variazioni quantitative delle sostanze prese in esame.

La quantità di triptofano si mantiene pressochè costante nei ceppi a colorazione normale dell'occhio, nei mutanti *cm*, *pink*, *ye* e *w*³; nel *ge* la sostanza si accumula ed è presente in quantità maggiore nelle pupe

(3) Gli omogenati sono stati effettuati su di un numero costante di insetti.

TABELLA 1 - Colorazioni del triptofano e di alcuni suoi metaboliti.
Mezzo adsorbente: cellulosa MN 300 (Macherey, Nagel & Co.)

Metaboliti	luce visibile	U.V.		ninidrina piridina 80°C x 20'	Ehrlich	Van Urk	ac. sulfanilico	Prochazka + U.V. 254 m μ
		254 m μ	366 m μ					
triptofano	—	viola	viola	viola ** porpora	porpora **	verde-blu **	—	(●) giallo
chinurenina	—	blu-cielo	blu-cielo	rosso ** mattone	arancione ***	giallo ** bruno	—	blu-verde
3-OH chinurenina	giallo	giallo verde	giallo verde	giallo * cupo	giallo * bruno	arancione *	rosso *** porpora	verde-blu
ac. chinurenico	—	verde chiaro	verde chiaro	—	—	—	—	verde-blu
ac. xanturenico	—	blu-viola	blu-viola	—	—	—	rosso *** bruno	blu-cielo
ac. antranilico	giallo	blu scuro	blu	—	giallo ***	giallo *	giallo brillante	giallo verde
ac. 3-OH antranilico	giallo scuro	blu scuro	blu	—	giallo ** bruno	giallo ** bruno	bruno **	verde giallo

Colorazione: * lenta
 ** veloce
 *** immediata

(●) giallo arancione a luce visibile.

che non negli adulti; nell'*ocra* la quantità di triptofano diminuisce nei primi stadi pupali e quindi non subisce ulteriori variazioni.

Il contenuto in chinurenina decresce dalle Eo agli A₃ nei ceppi normali, nei *cm* e nei *pink*; si mantiene pressochè costante negli *ye*; accenna ad aumentare nei *w*³. Nel mutante *ocra*, dove il metabolita si accumula, esso aumenta dalle Eo agli A₃.

L'acido chinurenico presenta leggere variazioni nel periodo pupale in tutti i ceppi ed è presente in grande quantità nell'*ocra*.

La 3-idrossi chinurenina non subisce apprezzabili variazioni nel periodo pupale degli individui ad occhi normali; diminuisce invece nell'adulto. Nei mutanti *cm*, *pink*, *ye* la sostanza subisce leggere variazioni nel corso dei vari stadi di sviluppo. In *w*³ essa aumenta progressivamente dalle Eo agli A₃.

Le variazioni del contenuto in ac. antranilico e 3-idrossi antranilico paiono trascurabili in tutti i ceppi che possiedono questi metaboliti.

L'ac. xanturenico aumenta costantemente dalle Eo agli A₃ nei ceppi normali, in *cm*, *pink*, *ye* e *w*³.

Le sostanze colorate od U.V. fluorescenti, non metaboliti del triptofano, presentano distribuzione diversa nei mutanti considerati e saranno trattate a partire da quelle con Rf minore. Nei ceppi normali e nei mutanti *cm* e *pink* si evidenzia una sostanza fluorescente in verde (p). In tali ceppi ed inoltre in *ye*, *ge* ed *ocra* si nota un'altra sostanza fluorescente in blu chiaro (i) la cui comparsa è tardiva in *pink*. Negli A₃ del mutante *ge* si nota una sostanza (m) fluorescente in giallo verde. La sostanza (c) assente solo in *ocra* e *w*³ compare tardivamente nei ceppi ad occhi normali e in *ge*. La sostanza (l) fluorescente in verde blu si nota solo nelle P₄ e P₅ del ceppo *ge*. Gli A₃ dei ceppi normali e dei mutanti *ye* e *ge* evidenziano una sostanza (b) fluorescente in giallo arancio.

Tutti i ceppi e tutti gli stadi considerati, ad eccezione delle Eo, delle P₁ e degli A₃ di *w*³, possiedono la sostanza (a) gialla al visibile e fluorescente in giallo, probabilmente la stessa evidenziata da BOWNESS e WOLKEN (1959). Questa sostanza a Rf molto vicino a quello di un'altra sostanza (h) fluorescente in viola è sempre presente negli A₃ dei ceppi normali, dei *cm*, *pink*, *ye* e *w*³. La quantità di (a) diminuisce negli adulti dei ceppi a colorazione intensa dell'occhio (normali, *cm*, *pink*); aumenta progressivamente dalle Eo agli A₃ in *ye* e *ocra*; si trova in quantità molto elevata nelle pupe e negli adulti di *ge* che hanno una colorazione dell'occhio notevolmente chiara. Inoltre, la sostanza (a) è maggiore negli adulti dei mutanti *cm*, *pink* e *ye* di quella dei ceppi normali.

Un andamento inverso presenta la sostanza (h).

In tutti gli stadi del ceppo *ge* è presente una sostanza a fluorescenza blu (n) con valore di Rf uguale a quello della chinurenina.

Si evidenziano inoltre nei ceppi esaminati due sostanze (e) e (g) U.V. assorbenti, ninidrin-positivi, probabilmente α -aminoacidi.

RIASSUNTO

Con cromatografia su strato sottile si è posta in evidenza la presenza di alcuni precursori degli ommocromi in individui di 4 ceppi normali (WHO/IN/*Musca domestica*/1; Cooper; F; Lab-1) e di 6 mutanti (*cm*, *ge*, *ocra*, *ye*, *pink*, *w*³) per il colore dell'occhio di *Musca domestica* L.

Nelle mosche normali e nei imutanti *cm*, *pink*, *ye* e *w*³ si sono posti in evidenza triptofano, chinurenina, 3-idrossichinurenina, acido xanturenico e acido chinurenico.

La catena metabolica degli ommocromi è interrotta a livelli diversi nei mutanti *ge* e *ocra*: *ge* è l'unico in cui si ritrovi il solo triptofano; in *ocra* si pongono in evidenza chinurenina e acido chinurenico.

Varie sostanze U.V. fluorescenti (non metaboliti del triptofano) sono state caratterizzate in base ai valori di Rf, al colore in luce visibile ed alla fluorescenza in U.V.: alcune di queste appartengono certamente al gruppo delle pterine. Il numero di tali sostanze è estremamente ridotto solo nel mutante *w*³.

Una sostanza gialla al visibile, con fluorescenza gialla, è stata evidenziata in tutti gli stadi dei ceppi presi in esame, eccezion fatta per il *w*³; questo è un altro indice di una profonda differenza metabolica di questo mutante rispetto agli altri analizzati.

SUMMARY

Several ommochrome precursors in adult houseflies have been detected applying cellulose thin-layer chromatography to full-body extracts from flies of four normal (WHO/IN/*Musca domestica*/1; Cooper; F; Lab-1) and six eye colour mutant strains (*cm*; *ge*; *ocra*; *ye*; *pink*; *w*³).

Tryptophan, kynurenine, 3-hydroxykynurenine, xanthurenic and kynurenic acid have been found in normal flies and in the mutants *cm*, *pink*, *ye* and *w*³.

In the last one the amount of xanthurenic acid is small. The metabolic chain ending with ommochromes is interrupted at different points in the mutants *ge* and *ocra*. In *ge* flies only tryptophan has been found; *ocra* flies have both kynurenine and kynurenic acid.

Several U.V. fluorescent substances, unrelated to tryptophan, have been characterized by their Rf values and colours both in visible and U.V. lights.

The number of such substances is reduced only in *w*³ flies. A substance which does not belong to the pigments so far described for all other insects has been found in all strains of the housefly which have been examined, with the exception of *w*³ adults.

BIBLIOGRAFIA

- BOWNESS, J. M. and WOLKEN, J. J., 1959. - A light-sensitive yellow pigment from the house-fly. *J. gen. Physiol.*, 42: 779-792.
- COLOMBO, G. e PINAMONTI, S., 1967. - Analisi biochimica di alcuni mutanti di *Musca domestica* L. *Atti Ass. genet. ital.*, XII: 341-344.
- GRIGOLO, A., 1967. - Determinazione quantitativa di alcuni metaboliti del triptofano in ceppi normali e mutandi per il colore degli occhi di *Musca domestica* L. *Boll. Zool.*, XXXVI: 125.

- HIROYOSHI, T., 1960. - Some new mutants and linkage groups of the house fly. *J. econ. Ent.*, 53: 985-990.
- LAUDANI, U. and GRIGOLO, A., 1968. - Ommochrome precursors and U.V. fluorescent substances in eye colour mutants of *Musca domestica* L. (In press).
- MILANI, R., 1954. - Genetic aspects of the development of resistance to chemical insecticides. (In: 1st International Symposium on the Control of the Insect Vectors of Disease). *Rc. Ist. sup. Sanità*, Supl.: 253-274.
- MILANI, R., 1967. - The genetics of *Musca domestica* L. and of other Muscoid flies. In: WRIGHT, J. W. and PAL, R. Genetics of Insect Vectors of Disease: 315-369). Elsevier Publ. Co.
- MOSCONI BERNARDINI, P., 1967. - Esame istochimico e fluorimicroscopico dell'occhio normale e mutante di *Musca domestica* L. *Boll. Zool.*, XXXVI: 147.
- SEHER A., 1961. - Analysis of mixtures of tocopherols with thin layer chromatography. *Mikrochim. Acta*, 2: 308-313.
- STAHL E., 1961. - Thin-layer chromatography; chromatographie sur couches minces. *Z. analyt. Chem.*, 181: 303-312.
- TSUKAMOTO, M., BABA, Y. and HIRAGA, S., 1961. - Mutations and linkage groups in Japanese strains of the house fly. *Jap. J. Genet.*, 36: 168-174.
- WALDI, D., 1962. - Visual comparison of spot areas. *Arch. Pharm.*, 295: 125-128.
- WARD, C. L. and HAMMEN, C.S., 1957. - New mutation affecting tryptophan-derived eye pigments in three species of insects. *Evolutio*, Lancaster, 11: 60-64.
- ZINGRONE, L. D., BRUCE, W. H. and DECKER, G. C., 1959. - A mating study of the female house fly. *J. econ. Ent.*, 52: 236.

