
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE RUSSO-CAIA, MARIA GABRIELLA
CIAVATTINI, FILIPPO CECERE

Osservazioni sulla attività delle glicerofosfatasi durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca domestica* L.

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.2, p.
264-268.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_2_264_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Osservazioni sulla attività delle glicerofosfatasi durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di Musca domestica L.* (*). Nota di SALVATORE RUSSO-CAIA, MARIA GABRIELLA CIAVATTINI e FILIPPO CECERE, presentata (**) dal Socio G. COTRONEI.

In una precedente ricerca, eseguita in questo Istituto da Rimatori e Ciavattini (1960) ⁽¹⁾, è stato studiato il comportamento delle fenilfosfatasi acida e alcalina durante l'accrescimento larvale e la metamorfosi di *Musca domestica* L. Questa ricerca ha mostrato che l'attività enzimatica a pH 4,6 è presente per tutto il ciclo di sviluppo, e le sue modificazioni si mantengono entro limiti modesti; l'attività fosfatasica alcalina (pH 9,6) invece, molto forte nel periodo di intenso accrescimento delle larve, diminuisce in seguito e scompare quasi completamente durante la vita pupale.

Il significato che possono avere queste modificazioni nella metamorfosi è stato poi discusso (Russo-Caia, 1960) ⁽²⁾ in relazione a numerosi altri eventi biochimici che si verificano durante lo sviluppo post-embriale degli Insetti olometaboli.

Il comportamento della fenilfosfatasi alcalina è infatti simile a quello di altre idrolasi la cui attività praticamente scompare allorché, con la formazione del pupario, cessa tra l'altro ogni assunzione di alimenti dall'esterno; in questo caso si è portati a ritenere che si tratti di enzimi in qualche modo collegati con la funzione dell'apparato digerente, che durante la metamorfosi è inattivo e subisce una profonda riorganizzazione morfologica.

In favore di questa interpretazione stanno i risultati di alcune ricerche di Drilhon e Busnel (1945) ⁽³⁾; questi Autori, in uno studio comparativo compiuto su specie appartenenti a diversi ordini (Coleotteri, Ortotteri, Lepidotteri, Imenotteri) hanno potuto infatti distinguere due glicerofosfatasi, una alcalina presente in elevata concentrazione nella parte secretoria dell'intestino medio, ed una acida presente soprattutto nei tubuli di Malpighi.

Anche il comportamento della fosfatasi acida, che non mostra sensibili variazioni nel passaggio dalla vita larvale a quella pupale, potrebbe quindi essere considerato in rapporto ad una elettiva localizzazione dell'enzima nei tubuli di Malpighi, che durante la metamorfosi dei Ditteri subiscono minime trasformazioni e passano pressoché immutati all'immagine.

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia ed Anatomia comparata della Università di Camerino, con il contributo della Shell International Research.

(**) Nella seduta del 10 febbraio 1962.

(1) A. RIMATORI, M. G. CIAVATTINI, « Ric. Scient. », 30, 863 (1960).

(2) S. RUSSO-CAIA, « Ric. Scient. », 30, 1861 (1960).

(3) A. DRILHON, R. G. BUSNEL, « Bull. Soc. Chim. Biol. », 27, 415 (1945).

A proposito della localizzazione topografica della fosfatasi alcalina nei tessuti degli Insetti, sono anche da ricordare le ricerche istochimiche di Day (1949) ⁽⁴⁾; da esse risulta che pur essendo l'enzima generalmente presente nel tubo digerente, non sempre si può mettere in evidenza una sua elettiva localizzazione nell'intestino medio. Tra le specie in cui ciò è possibile vi è comunque un Dittero, la *Lucilia cuprina* Wied, nella quale la reazione è intensamente positiva nella larva, sembra aumentare nella pupa con la vacuolizzazione che si ha all'inizio della metamorfosi, ed è infine assente nell'adulto.

In numerose ricerche (Løvtrup, 1955, 1958 ⁽⁵⁾; Moog, 1958, 1959, 1961) ⁽⁶⁾, alcune delle quali compiute nel nostro Istituto (De Cesaris Coromaldi, 1955 ⁽⁷⁾; Urbani e Bellini, 1961 ⁽⁸⁾; Russo-Caia, 1962 ⁽⁹⁾), si è potuto mettere in evidenza che spesso durante i fenomeni di sviluppo glicerico e fenilfosfatasi mostrano differenze di comportamento; per questa ragione abbiamo voluto compiere uno studio delle attività fosfatasiche acida e alcalina durante lo sviluppo post-embriionale di *Musca domestica* usando come substrato il β -glicerofosfato di sodio. In questa Nota esponiamo i risultati ottenuti.

* * *

Le nostre osservazioni sono state compiute su un ceppo di *Musca domestica* L. mantenuto in laboratorio con modalità di allevamento già esposte in precedenti lavori. Anche i criteri con i quali si è fatta la seriazione degli stadi di sviluppo sono i consueti, adottati in tutte le altre ricerche sulla metamorfosi: le larve cioè sono ordinate in base al peso (di 10 individui), le pupe in base al tempo trascorso dalla formazione del pupario.

Gli omogenati sono stati preparati in acqua bidistillata (in vetro) a 2°C, generalmente partendo da 10 individui dello stesso stadio, nella proporzione di 5 mg di materiale per ml di H₂O.

Su questi omogenati si è determinata l'attività glicerosfataseica con un metodo basato sul dosaggio, secondo Fiske e Subbarow, del fosforo liberato dalla idrolisi enzimatica del substrato (β -glicerofosfato di sodio Sigma all'1%). I dettagli tecnici di questo metodo sono illustrati in un lavoro di De Cesaris Coromaldi e Urbani Mistruzzi (1959) ⁽¹⁰⁾; nelle presenti ricerche comun-

(4) M. F. DAY, « Austral. J. Sci. Res. », ser. B, 2, 31 (1949).

(5) S. LØVTRUP, « C. R. Lab. Carlsberg », sér. chim. 29, 261 (1955); ID., « Acta Embryol. Morphol. Exp. », 2, 54 (1958).

(6) F. MOOG, *Enzymes: Formation and Growth*, in *Symp. on Embr. Nutr.*, Chicago Univ. Press (1958); ID., *The Adaptation of Alkaline and Acid Phosphatases in Development*, in: *Cell, Organism and Milieu*, The Ronald Press Co. (1959); ID., « Developmental Biol. », 3, 153 (1961).

(7) L. DE CESARIS COROMALDI, « Ric. Scient. », 25, 2323 (1955).

(8) E. URBANI, L. BELLINI, « Rend. Ist. Sci. Camerino », 2, 284 (1961).

(9) S. RUSSO-CAIA, « Acta Embryol. Morphol. Exp. », in stampa (1962).

(10) L. DE CESARIS COROMALDI, L. URBANI MISTRUZZI, « Rend. Sci. Ist. Lomb. », B 93, 163 (1959).

que, dopo alcune prove preliminari, la miscela enzima-substrato è stata posta ad incubare a 39°C per 60' con tampone Veronal a pH 4,6 e 9,6, e la colorimetria è stata fatta al Photoelectron (Bausch e Lomb) a 600 m μ . Naturalmente anche tutte le soluzioni dei reagenti sono state preparate con H₂O bidistillata in vetro.

I risultati ottenuti, espressi in Estinzioni ottiche, sono riportati nel grafico; in esso, per semplicità, ogni punto rappresenta la media dei valori di tutti i dosaggi compiuti su individui appartenenti ad una stessa classe (l'ampiezza di ogni classe è di 25 mg per le larve, di 10 ore per le pupe).

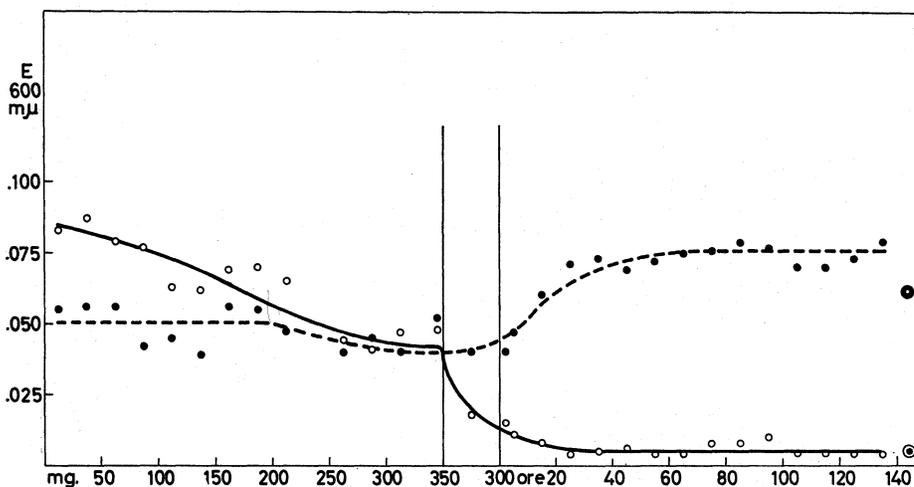


Fig. 1.

Attività glicerosolfatase acidica (linea tratteggiata) e alcalina (linea continua) durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca domestica* L. In ordinate, le attività enzimatiche espresse in Estinzioni ottiche a 600 m μ ; in ascisse, gli stadi di sviluppo ordinati in base al peso (di 10 individui) per le larve, in base alle ore trascorse dall'impupamento, per le pupe. La prima linea verticale indica la fine dell'accrescimento larvale, la seconda la formazione del pupario; i simboli all'estrema destra i valori nelle immagini.

Una attività della glicerosolfatase acidica (linea tratteggiata) è presente fin dai primi stadi considerati, cioè nelle larve del peso di circa 2 mg, e si mantiene invariata durante tutto lo sviluppo larvale. Una tendenza all'aumento si osserva solo con l'inizio della metamorfosi, fino alla 30^a ora circa di vita pupale; i valori raggiunti in questo stadio non si modificano poi nel successivo sviluppo e si osservano anche nell'immagine, poco dopo la schiusa. Si tratta quindi, nel complesso, di modificazioni modeste.

L'attività glicerosolfatase alcalina (linea continua) ha invece un andamento molto diverso. Anch'essa è presente fin dai primi stadi considerati; tende, però a diminuire durante lo sviluppo larvale, e la diminuzione si accentua soprattutto nella pre-metamorfosi, in quel periodo cioè nel quale la larva cessa di alimentarsi, e che nel grafico è indicato fra due linee verticali. Con la formazione del pupario l'attività enzimatica diminuisce ulteriormente,

ed alla 24^a ora di vita pupale è praticamente inesistente. Anche nelle immagini subito dopo la schiusura l'attività enzimatica è assente, o presente ad un livello estremamente ridotto.

Il grafico mostra chiaramente il diverso comportamento dei due enzimi nella vita pupale; le curve di attività enzimatica, quasi sovrapposte nell'ultimo periodo di accrescimento larvale, divergono infatti completamente allorché cessa la assunzione di alimenti ed hanno inizio le profonde trasformazioni della metamorfosi.

* * *

I risultati delle presenti ricerche mostrano che durante lo sviluppo post-embriionale di *Musca domestica* l'andamento generale delle attività glicero-fosfatasiche è simile a quello già osservato per le fenilfosfatasi: in ambedue i casi infatti gli enzimi « acidi » mostrano oscillazioni relativamente modeste mentre l'attività delle fosfatasi alcaline, elevata nel periodo di accrescimento larvale, tende poi a diminuire e scompare durante la metamorfosi.

Anche in questo caso quindi, come per le fenilfosfatasi, si può pensare che l'attività dell'enzima con *optimum* alcalino sia soprattutto in rapporto con il funzionamento dell'apparato digerente; il comportamento della fosfatasi acida è invece di più complessa interpretazione. In generale, una elevata attività fosfataseica acida in assenza dell'enzima alcalino sta ad indicare (Moog, 1959)⁽⁶⁾ una serie di modificazioni del metabolismo intermedio dei carboidrati; queste modificazioni sono state messe in rapporto, negli Insetti, con il differenziamento funzionale che rende l'immagine atta al volo (Rockstein, 1957, 1959)⁽¹¹⁾.

Indipendentemente da queste considerazioni, più ampiamente sviluppate in precedenti lavori (Russo-Caia, 1960⁽¹²⁾; 1960⁽²⁾), e da quelle sulla localizzazione delle fosfatasi nei diversi tessuti degli Insetti, occorre ancora ricordare che numerosissime ricerche, compiute su Vertebrati ed Invertebrati, hanno messo in rilievo una generica importanza delle fosfatasi nei fenomeni dell'accrescimento, della morfogenesi, del differenziamento.

Purtroppo però le incertezze sul preciso significato biologico di questi enzimi limitano assai spesso la possibilità di stabilire un rapporto tra le loro modificazioni ed un determinato evento morfologico; anche nella metamorfosi non è per il momento possibile identificare una relazione tra l'attività delle fosfatasi ed i fenomeni di istolisi, istogenesi e differenziamento.

Molte delle osservazioni compiute sugli Insetti sono state già esaminate nei precedenti lavori. Ricorderemo qui tuttavia le ricerche di Rockstein e

(11) M. ROCKSTEIN, « Ann. Rev. Entomol. », 2, 19 (1957); ID., « Smithsonian Misc. Coll. », 137, 263 (1959).

(12) S. RUSSO-CAIA, « Acta Embryol. Morphol. Exp. », 3, 286 (1960).

coll. (1951⁽¹³⁾, 1956⁽¹³⁾, 1957⁽¹¹⁾, 1959⁽¹¹⁾), nelle quali sono state considerate le caratteristiche di questi enzimi e le modificazioni che si osservano nell'adulto, e le osservazioni di Alexander e coll. (1958)⁽¹⁴⁾. Questi Autori hanno seguito il comportamento delle fenilfosfatasi durante l'intero ciclo di sviluppo di *Musca domestica*, ottenendo risultati con i quali concordano quelli di Rimatori e Ciavattini; essi hanno anche messo in evidenza una più elevata attività della fosfatasi acida (non della alcalina) nelle femmine, ed hanno studiato la diversità tra ceppi sensibili e resistenti al DDT, concludendo però che il sistema degli enzimi fosfatasi non sembra interessato nel fenomeno della resistenza.

Relativamente al fenomeno fondamentale dello sviluppo post-embriionale, cioè al passaggio dalla vita larvale a quella pupale, tra glicero e fenilfosfatasi vi è quindi una sostanziale identità di comportamento, nel senso che solo gli enzimi con *optimum* alcalino mostrano una modificazione critica della loro attività.

Tra glicero e fenilfosfatasi alcalina vi è però una differenza quantitativa nella entità di questo fenomeno, in quanto la diminuzione di attività fenilfosfatasica è molto più notevole, a causa dei valori relativamente assai più forti delle piccole larve. Naturalmente questo riferimento va fatto non soltanto istituendo un paragone tra i valori assoluti di attività glicero e fenilfosfatasica, ma considerando ciascuna di queste attività in relazione a quella che contemporaneamente si osserva, a pH acido, sullo stesso substrato.

Nella introduzione a questa Nota si è detto che spesso durante i fenomeni di sviluppo si osservano curve di attività glicero e fenilfosfatasica non sovrapponibili; si tratta generalmente di sfalsamenti nel tempo o di variazioni non concordanti del rapporto, per ogni substrato, tra l'attività acida e quella alcalina.

Dalle presenti ricerche risulta che questo fenomeno si osserva anche nello sviluppo post-embriionale di *Musca domestica*.

Numerose ricerche riguardanti questo aspetto del differenziamento biochimico sono state recentemente esaminate da uno di noi (Russo-Caia, 1962)⁽⁹⁾; da esse si può trarre la conclusione (valida soprattutto per la fosfatasi alcalina) che la « attività fosfatasica » di un tessuto embrionale è in genere la risultante di un complesso variabile di attività enzimatiche che non sono specifiche in senso stretto, ma mostrano tuttavia nei vari momenti dello sviluppo una diversa affinità per l'uno o l'altro substrato.

(13) M. ROCKSTEIN, P. W. HERRON, « J. Cell. Comp. Physiol. », 38, 451 (1951); M. ROCKSTEIN, « Bull. Brooklyn Entomol. Soc. », 51, 8 (1956).

(14) B. H. ALEXANDER, R. J. BARKER, F. H. BABERS, « J. Econ. Entomol. », 51, 211 (1958); R. J. BARKER, B. H. ALEXANDER, « Ann. Entomol. Soc. Amer. », 51, 255 (1958).