
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIUSEPPE COLOMBO, SILVANO PINAMONTI

Metaboliti del triptofano «via Chinurenina» in *Schistocerca gregaria* Försk durante lo sviluppo embrionale

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.5, p. 728–731.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_5_728_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. — *Metaboliti del triptofano «via Chinurenina» in Schistocerca gregaria Försk durante lo sviluppo embrionale* ^(*). Nota di GIUSEPPE COLOMBO e SILVANO PINAMONTI, presentata ^(**) dal Corrisp. L. MUSAJO.

Nel 1950 Goodwin e Srisukh [1] dimostrarono che in *Locusta migratoria migratorioides* R. e F. in *Schistocerca gregaria* Försk viene sintetizzato già negli embrioni, a partire da circa metà del periodo di incubazione, un pigmento chiamato da questi Autori insettorubina. L'insettorubina secondo Butenandt[2] è una miscela di ommocromi.

Gli ommocromi, sostanze coloranti diffuse in molte specie di insetti, sono stati studiati da Butenandt e coll. [3] che sono riusciti ad identificarne alcuni come: la Xantommatina, la Rodommatina, l'Ommatina D e l'Ommatina. Tutte queste quattro sostanze e gli altri ommocromi appartengono al gruppo dei fenossazzoni ed hanno anche un caratteristico comportamento ossido-riduttivo. Recentemente Linzen [4] ha studiato il pigmento degli occhi e del tegumento in *Schistocerca gregaria* Försk: negli occhi ha trovato delle piccole quantità di Xantommatina, mentre nel tegumento ha potuto solo dimostrare che i pigmenti presenti appartengono al gruppo degli ommocromi. Noi siamo riusciti ad isolare della xantommatina anche dal tegumento di *Schistocerca gregaria* Försk [5].

La genesi degli ommocromi, che derivano dal triptofano via chinurenina e 3-ossichinurenina, è stata studiata anche da un punto di vista genetico e biochimico in *Drosophila*, *Ephesia kühniella* e *Bombyx mori* (cfr. Ziegler) [6].

In questa Nota riportiamo i risultati della ricerca dei metaboliti del triptofano: chinurenina, 3-ossichinurenina, acido chinurenico ed acido xanturenico estratti da embrioni a diversi stadi di sviluppo di un ceppo pigmentato e di un ceppo albino di *Schistocerca gregaria* Försk.

MATERIALE E METODO.

I ceppi di *S. gregaria* Försk ci sono stati inviati dall'Anti Locust Research Centre di London e sono stati allevati nel nostro laboratorio. Le uova, deposte in tubi di sabbia, sono state incubate a 30° C. In queste condizioni si ha la schiusa delle neanidi in 14 giorni circa.

(*) Istituto di Istologia ed Embriologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Perugia, Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R. Gli Autori desiderano ringraziare i proff. L. Musajo e C. A. Benassi dell'Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Padova per i suggerimenti e per l'interesse dimostrato a queste ricerche.

(**) Nella seduta dell'8 maggio 1965.

Sono stati analizzati i seguenti campioni: uova di 12 ore, di 3, 6, 10, 12, 14 giorni di incubazione e neanidi appena schiuse. Il peso fresco per ogni campione analizzato variava da 3 a 5 gr. Il numero delle uova variava da 100 a 300.

Le uova di ciascun campione erano omogeneizzate con «mix-blender» e poi con Potter semiautomatico in differenti volumi di una soluzione etanolica di acido picrico 0,01 %. Dopo centrifugazione l'estratto etanol-picrico era tirato a secco sotto vuoto a temperatura ambiente ed il residuo era ripreso in pochi ml di una soluzione di tampone di piridina 0,1 M ed acido formico a pH 2,1. Tale soluzione veniva posta su colonna (330 × 9 mm) di Amberlite C.G. 120 (37-47 μ) attivata precedentemente secondo il metodo di Hirs e coll. [7]. La colonna, mantenuta ad una temperatura costante di 30°C, era eluita con un tampone piridina 0,1 M ed acido formico a pH 2,5 e poi con tampone piridina 0,3 M ed acido formico a pH 5,6 secondo il metodo di Benassi e coll. [8]. Con questo metodo i metaboliti si raccolgono in frazioni separate; le frazioni contenenti quasi esclusivamente un solo metabolita erano portate a secco sotto vuoto ad una temperatura di 30°C e poi riprese con 3 ml di metanolo. Di tali soluzioni sono stati fatti cromatogrammi bidimensionali usando come primo eluente una miscela di butanolo, acido acetico e acqua distillata (4 : 1 : 5) e come secondo eluente acqua distillata.

I singoli metaboliti erano identificati sui cromatogrammi in base all'Rf ed alla loro caratteristica fluorescenza alla luce di Wood. Le macchie così identificate erano eluite ed i composti determinati spettrofotometricamente secondo vari metodi consigliati da Coppini e coll. [9]. I risultati sono riportati in μ g per gr. di materiale fresco.

RISULTATI E CONCLUSIONI.

I risultati delle analisi sono riuniti nelle Tabelle I a ed I b.

Nelle uova dei due ceppi la chinurenina è sempre presente fino dalla deposizione ed aumenta di poco alla fine dello sviluppo embrionale; non vi sono grandi differenze tra il ceppo pigmentato e quello albino.

La 3-ossichinurenina, nella serie di uova esaminate non è stata mai trovata fino allo stadio di 6 giorni, mentre si è trovata, e in quantità maggiore della chinurenina, in uova al 10° giorno d'incubazione.

Gli embrioni dopo questo periodo d'incubazione si trovano agli stadi XIX e XX secondo le tavole di sviluppo di Shulov e Pener [10]. A questi stadi inizia la pigmentazione degli occhi, perciò la presenza della 3-ossichinurenina sembrerebbe legata alla sintesi degli ommocromi. Butenandt [11] ha infatti dimostrato con esperienze *in vitro*, per via sintetica e per via enzimatica, che la xantomatina deriva dalla condensazione ossidativa di due molecole di 3-ossichinurenina.

Dai nostri dati, la 3-ossichinurenina risulta presente sia nel ceppo albino, in cui non vi sono ommocromi, che in quello pigmentato; evidentemente nel

TABELLA I.

*Metaboliti del triptofano in uova del ceppo pigmentato di Schistocerca gregaria.*I valori sono espressi in μ gr. per gr. di peso fresco.

	TEMPO DI INCUBAZIONE							
	12 ore	3 g.	6 g.	10 g.	12 g.	14 g.	16 g.	appena schiuse (*)
Chinurenina	tracce	0,5	0,5	0,7	1,3	1,6	0,8	1,5
3 OH-chinurenina	—	—	—	2,6	11,3	24,9	23,4	19,7
Acido chinurenico	—	—	—	0,5	tracce	2,9	0,7	3,3
Acido xanturenico	—	—	—	—	—	0,4	0,2	1,3

(†) Il campione è andato perduto.

(*) I valori si riferiscono alle analisi di due campioni diversi di uova.

TABELLA II.

*Metaboliti del triptofano in uova del ceppo albino di Schistocerca gregaria.*I valori sono espressi in μ gr. per gr. di peso fresco.

	TEMPO DI INCUBAZIONE							
	12 ore	3 g.	6 g.	10 g.	12 g.	14 g.	16 g.	appena schiuse (*)
Chinurenina	tracce	0,6	0,5	0,7	0,9	0,5	1,1	2,6
3 OH-chinurenina	—	—	—	2,6	2,9	9,2	17,7	10,1
Acido chinurenico	—	—	—	—	—	0,2	2	1,3
Acido xanturenico	—	—	—	—	—	0,1	1	2,8

(*) I valori si riferiscono alle analisi di due campioni diversi di uova.

ceppo albino il blocco della sintesi degli ommocromi deve trovarsi in una tappa successiva alla formazione della 3-ossichinurenina e prima della sintesi della xantommatina.

L'acido chinurenico è presente nel ceppo pigmentato al 10° giorno di incubazione e nel ceppo albino solo alla fine dello sviluppo. L'acido xanturenico compare in entrambi i ceppi alla fine dello sviluppo embrionale.

Non sono stati invece trovati, e neppure nei nostri esperimenti fatti su stadi post-embrionali, né l'acido antranilico, libero o coniugato, né l'acido 3-ossiantranilico.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] T. W. GOODWIN and S. SRISUKH, «Biochem. J.», 47, 549-554 (1950).
- [2] A. BUTENANDT, «Angew Chem.», 69, 16-23 (1957).
- [3] A. BUTENANDT, E. BIEKERT and KOGA NAOFUMI, «Angew Chem.», 321, 258-275 (1960).
- [4] B. LINZEN, *Biochem. Simp. XVII Int. Kongress für rein u. Angew Chemie*, München (1959).
- [5] Nostri dati non ancora pubblicati.
- [6] I. ZIEGLER, «Advances in genetics», 10, 349-363 (1961).
- [7] C. H. W. HIRS, S. MOORE and W. H. STEIN, «J. Biol. Chem.», 195, 669-683.
- [8] C. A. BENASSI, F. M. VERONESE e A. DE ANTONI, «Atti Ist. Veneto Sci. Lett. Art.», 122, 201-217.
- [9] D. COPPINI, C. A. BENASSI, e M. MONTORSI, «Clinical Chem.», 5, 391-401 (1959).
- [10] A. SHULOV e M. P. PENER, «Anti-Locust Bulletin», 41 (1963).
- [11] A. BUTENANDT, E. BIEKERT, und B. LINZEN «Z. Physiol. Chemie Hope Seylers», 305, 284-289 (1956).

SUMMARY. — By ion-exchange column chromatography, the tryptophan metabolites have been determined in eggs, at different time of incubation, of a pigmented strain and an albino strain of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera).

In both strains kynurenine was found in freshly laid eggs and in later stages until hatching. From the 10th days of incubation 3-hydroxykynurenine was present, increased notably at the hatching (the 14th day) in the pigmented strain and in a lesser extent in the albino animals. Kynurenic and xanthurenic acids appeared in small amounts at the end of embryonic development; no other tryptophan metabolite seemed to occur.

The results were discussed in relation to the ommochrome synthesis.