
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARISA LEONARDI CIGADA, FIORENZA LARIA DE
BERNARDI

Ricerche sulle sintesi che avvengono durante le metamorfosi del *Bombyx mori*

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.3, p. 370–376.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_3_370_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/>

Zoologia. — *Ricerche sulle sintesi che avvengono durante le metamorfosi del Bombyx mori* (*). Nota di MARISA LEONARDI CIGADA e FIORENZA LARIA DE BERNARDI, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — We have carried out by the salting-out method, a study on the differences of the protein fractions during the larval and pupal stage of *Bombyx mori*. We tried to find a relationship between these data and the differences in the ribosomes as studied with the analytical ultracentrifuge and sucrose gradients.

The salting-out diagrams of the unfertilized egg and the embryo, show only one peak at 65% ammonium sulphate saturation; when hatched and during the larval stages, the diagrams show 2 peaks at 50 and 75% of saturation (fig. 1). After spinning the cocoon a third peak at 65% of saturation appears, which remains during the entire pupal stage. In the female pupa of 336 hours, a peak appears at 30% of saturation; this peak, which is present also in the female moth (fig. 2), seems to be related to the growth of the eggs, since it is lacking in the male (fig. 3).

With the analytical ultracentrifuge (fig. 5), one observes in the last stage of the larva a polysome peak which rapidly decreases until it disappears after metamorphosis. The ribosomes decrease quantitatively in the young pupa and increase again towards the end of the pupal stage, becoming more pronounced in the female moth. Beginning with the second larval stage the presence of a 16 S fraction can be noted in both sexes. This fraction is always abundant in the female but it decreases considerably in the male before the adult emerges. The fact, that the ribosomes and polysomes are present in relatively high concentration shortly before the appearance of the 65% peak, suggests that the ribosomes are active in the synthesis of this fraction.

In precedenti ricerche sono state studiate le variazioni delle frazioni proteiche durante lo sviluppo embrionale del *Bombyx mori* (Cigada Leonardi, 1956). Abbiamo ora continuato lo studio prendendo in esame lo sviluppo postembrionale e pupale, fino allo sfarfallamento.

Gli studi condotti sull'emolinfa di varie specie di Lepidotteri hanno permesso di osservare che, nell'ultimo stadio della vita larvale, l'intensa attività dei corpi grassi porta alla formazione di nuove proteine sia nel *Bombyx* (Wyatt e coll., 1956; Shigematsu, 1958) che in cecropia (Telfer e Williams, 1953). Laufer (1960), col metodo dell'elettroforesi identifica due maggiori componenti proteici nell'emolinfa della larva di cecropia e quattro nella pupa in diapausa; nella femmina adulta inoltre evidenzia una banda caratteristica che è presente anche nelle uova e nell'embrione.

Gli studi sul comportamento degli acidi nucleici durante le metamorfosi degli Insetti non sono numerosi: Niemierko e coll. (1956) hanno trovato una diminuzione rapida del contenuto totale di acidi nucleici nella larva di *Bombyx* poco prima della filatura del bozzolo e nella pupa che si appresta a metamorfosare. Lavori più recenti hanno cercato di mettere in evidenza un preciso

(*) Ricerche eseguite nel Laboratorio di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(**) Nella seduta del 13 marzo 1971.

rapporto tra sintesi di RNA e sviluppo morfologico: Barth e coll. (1964) riscontrano un aumento di RNA all'inizio dello sviluppo visibile della pupa che pensano si possa ricondurre alle sintesi di ribosomi in atto per il differenziamento degli organi in *Anthaerea pernyi*. Price (1965) ha osservato un andamento ciclico nella sintesi di RNA durante la vita larvale di *Calliphora erythrocephala*, con un massimo al secondo giorno dell'intervallo tra due mute successive. Anche per i Saturniidi, Berry e coll. (1967), hanno osservato un andamento simile: l'incorporazione di uridina tritiata presenta un massimo al quarto, quinto giorno del ciclo intermutale, poco prima cioè che venga fabbricata la nuova chitina. Uno studio sui ribosomi delle uova di insetti è stato condotto da Gadallah e coll. (1970) su *Musca domestica*. Sulla stessa specie Russo Caia (1960) ha osservato una elevata concentrazione di RNA in periodi che precedono immediatamente un'attiva sintesi di proteine.

Sono stati utilizzati esemplari di *Bombyx mori*, poliibrido Antelao, per gli esperimenti su larve di V^a età, pupe e adulti. Per gli stadi di uova in diapausa, baco neonato e larve di II^a età sono stati utilizzati esemplari del poliibrido Isonzo. Gli animali venivano allevati in laboratorio ad una temperatura di circa 25°C; le larve erano alimentate con foglie di gelso e, appena terminata la filatura, venivano private del bozzolo.

Quando gli animali raggiungevano lo stadio di sviluppo desiderato venivano raccolti in quantità opportuna: in parte venivano utilizzati subito per l'estrazione dei ribosomi, in parte venivano liofilizzati previo congelamento a circa -70°C. Le larve venivano tenute a digiuno 24 ore prima di essere utilizzate, le pupe venivano raccolte ogni 48 ore.

Per il salting-out si seguì il metodo descritto in Ranzi e coll. (1965) a cui si rimanda per la costruzione dei grafici.

L'estrazione dei ribosomi fu condotta sul materiale fresco con il metodo di Brown e Caston (1962) leggermente modificato. Un omogenato in tampone Tris 0,01 M, pH 7,4 contenente 0,001 M MgCl₂ e 10⁻³ M mercaptoetanolo veniva centrifugato 20 minuti in centrifuga Servall a 12000 g per 2 volte; al supernatante si aggiungeva DOC alla concentrazione dello 0,5% e si ricentrifugava in Servall per 10 minuti. Il supernatante veniva centrifugato in ultracentrifuga Spinco 105000 g per 2 ore. Il culotto veniva sospeso in 2 ml di tampone Tris e centrifugato in centrifuga Servall per 20 minuti. 0,5 ml della sospensione di ribosomi, dopo lettura allo spettrofotometro, venivano stratificati su gradiente lineare di saccarosio 15%-30% e centrifugati in Spinco SW 25 a 90.000 g per 210 minuti. Si procedeva poi alla raccolta ed analisi del gradiente mediante il frazionatore ISCO munito di analizzatore ultravioletto a 254 nm.

Contemporaneamente si procedeva all'analisi della sospensione ribosomale in ultracentrifuga analitica Spinco E. Le analisi furono condotte in cella Standard 12 mm 4° sector alla velocità di 42040 r.p.m. e alla temperatura di circa 20°C. Le fotografie venivano scattate con il sistema ottico Philpot-Svensson ad intervalli regolari di 2'. Sono state condotte due serie di analisi della sospensione dei ribosomi: nella prima serie ci si è serviti di un numero costante di animali (quattro per le femmine, sei per i maschi) durante tutto lo sviluppo larvale e pupale; nella seconda serie, invece, si stratificava sul gradiente una quantità di RNA sempre uguale.

Il diagramma si salting-out ottenuto da uova in diapausa presenta una sola punta al 65% di saturazione di ammonio solfato. Nello stadio successivamente preso in esame, cioè di baco neonato, si osservano due punte, a 50 e 75% di saturazione di ammonio solfato. Nelle larve di seconda e di quinta età la configurazione del diagramma si mantiene simile; la punta a 50% si accentua col procedere della vita larvale (fig. 1).

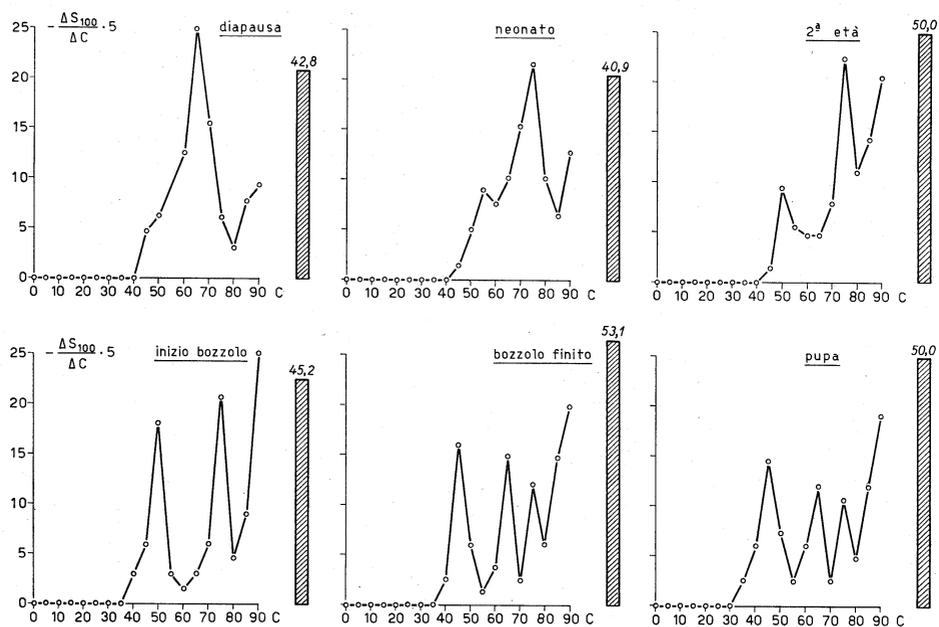


Fig. 1. - Diagrammi di salting-out di vari stadi di sviluppo embrionale e larvale di *Bombyx mori*.

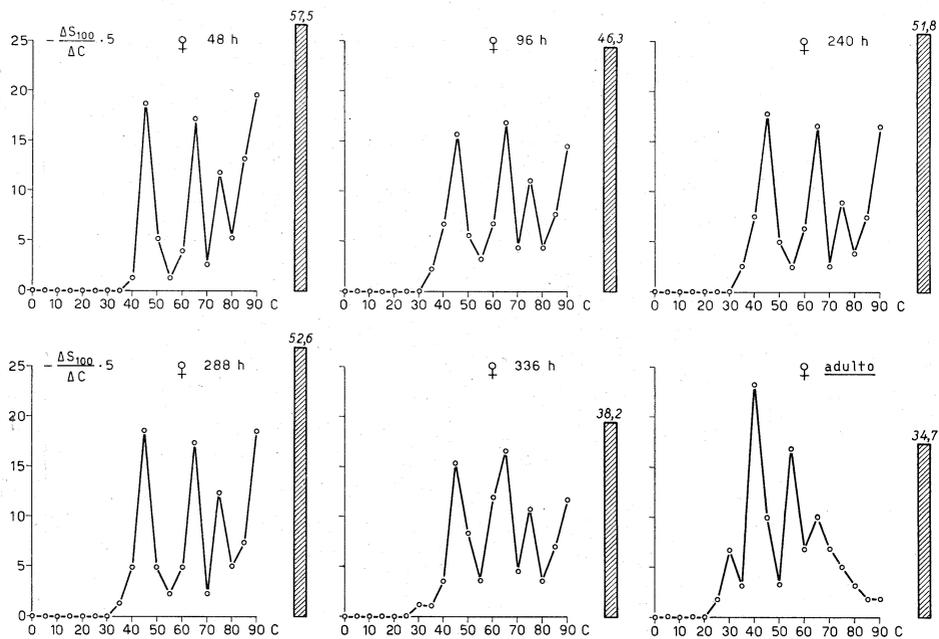


Fig. 2. - Diagrammi di salting-out di pupe e adulto femmina di *Bombyx mori*. L'età delle pupe è calcolata in ore a partire dalla muta di impupamento.

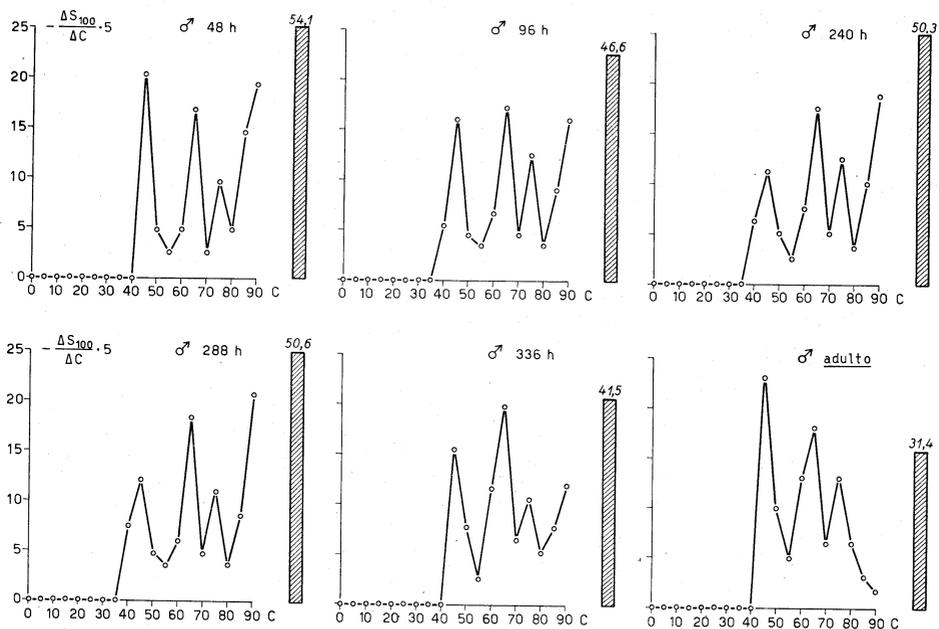


Fig. 3. - Diagrammi di salting-out di pupe e adulto maschio di *Bombyx mori*.

Il diagramma della larva che ha terminato la filatura del bozzolo presenta tre punte, al 45, 65 e 75 % di saturazione che si mantengono per tutta la durata della vita pupale (figg. 1, 2, 3). Mentre nella prima metà della vita pupale non si rilevano differenze sostanziali tra i diagrammi di precipitazione

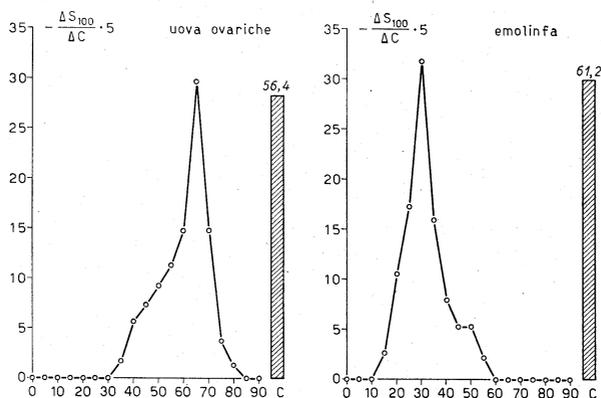


Fig. 4. - Diagrammi di salting-out di uova ovariche ed emolinfia estratta da pupe di 336 ore.

dei due sessi, nella pupa femmina, prossima alla metamorfosi, compare una nuova punta, al 30 % di saturazione che è presente, ed in maggior quantità anche nella femmina adulta (fig. 2). Tale punta è completamente assente nel diagramma del maschio (fig. 3): questo fatto induce a pensare che si tratti di una frazione della emolinfia connessa con la formazione delle uova. Il

diagramma ottenuto dalle sole uova isolate dal corpo della pupa di 336 ore ha una punta prevalente, costituita da materiale che precipita al 65 % di saturazione; il diagramma ottenuto invece dall'emolinfa della femmina allo stesso stadio mostra una punta al 30 % di saturazione (fig. 4).

La colonna tratteggiata esprime la percentuale del materiale in soluzione che non precipita al 90 % di saturazione di ammonio solfato.

Da questi valori si vede che la frazione solubile tende ad aumentare dalla schiusa a 48 ore dopo l'impupamento. Vi è poi una diminuzione, quindi un lieve costante aumento fino a 288 ore. Poco prima dello sfarfallamento la frazione solubile incomincia a diminuire nettamente fino a raggiungere valori molto bassi nell'insetto perfetto. Non si riscontrano differenze di rilievo tra i due sessi.

Gli estratti ribosomali sono stati esaminati all'ultracentrifuga analitica: il diagramma di sedimentazione del bacolino appena schiuso dall'uovo mostra

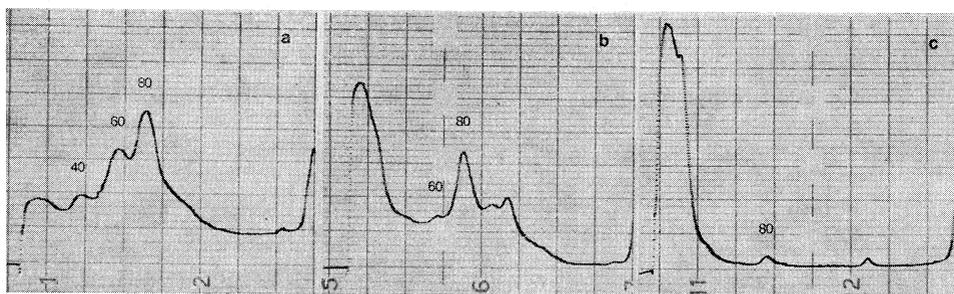


Fig. 5. - Diagrammi di sedimentazione su gradiente di saccarosio di ribosomi estratti da *Bombyx mori* agli stadi di a) larva di V^a età che inizia la filatura del bozzolo; b) larva che ha terminato la filatura del bozzolo; c) pupa appena metamorfosata. Tutti i diagrammi sono stati ottenuti stratificando sul gradiente la stessa quantità di ribosomi corrispondente ad una D. O. di 5 a 260 nm.

una piccola quantità di una frazione polisomica a coefficiente di sedimentazione circa 100 S, una ben evidente frazione corrispondente al monomero ed alcune frazioni più leggere, i cui coefficienti di sedimentazione corrispondono a quelli delle subunità ribosomali (60 e 40 S). Nella larva di quinta età, che inizia la filatura del bozzolo, sono ancora ben evidenti polisomi e ribosomi mentre assume particolare rilievo una frazione 16 S. Quando la larva ha terminato la filatura del bozzolo i polisomi diminuiscono molto fin quasi a scomparire nei diagrammi dopo la muta di impupamento; anche la frazione ribosomica va rapidamente diminuendo mentre la frazione 16 S si mantiene in concentrazioni elevate (Tav. I). Gli stessi fatti risultano dall'esame dei profili di assorbimento ottenuti con i gradienti di saccarosio (fig. 5).

I polisomi, nel corso dello sviluppo della pupa, non raggiungeranno più una concentrazione tale da essere chiaramente evidenziabili; la frazione ribosomica, invece, ricompare nei diagrammi poco prima della schiusa dell'insetto perfetto, nel momento cioè in cui l'istogenesi è particolarmente attiva.

Il diagramma dell'insetto adulto, appena metamorfosato, presenta differenze tra il maschio e la femmina: nel maschio la sola frazione ribosomica è appena evidente, mentre nella femmina, oltre ad una più elevata quantità di ribosomi, è sempre presente la frazione 16 S (Tav. I). Una diminuzione sia della frazione 16 S che della frazione ribosomica in rapporto alla metamorfosi si osserva nel maschio anche con l'esame dei profili di assorbimento ottenuti con gradienti di saccarosio.

Dai diagrammi di salting-out risulta evidente la comparsa di una punta a 65 % di saturazione durante la filatura del bozzolo, punta che si conserva in tutti gli stadi successivi. Durante la filatura del bozzolo, nei diagrammi di sedimentazione all'ultracentrifuga analitica, si vede nettissima la frazione polisomica. Questa frazione è ancora più evidente nei profili di sedimentazione su gradienti di saccarosio; nella figura è rappresentato un profilo quando ormai il bozzolo è finito e compare la frazione a 65 % di saturazione (fig. 5). D'altra parte l'antigene 7 che Telfer (1954) trova nell'emolinfa della femmina di *Platysamia cecropia* compare solo dopo la fine della filatura del bozzolo e si mantiene ad una concentrazione costante durante tutta la vita pupale.

Nel diagramma di salting-out della pupa femmina di 336 ore compare una punta al 30 % di saturazione di ammonio solfato; questa stessa frazione esiste nella femmina adulta che porta le uova ormai pronte per essere deposte. Si può pensare che la comparsa della punta sia in rapporto con l'elaborazione delle proteine del tuorlo, che avviene nelle uova durante la seconda metà della vita pupale, utilizzando le proteine dell'emolinfa.

LAVORI CITATI

- BARTH R. H., BUNYARD P. P. e HAMILTON T. H. (1964) - *RNA metabolism in pupae of the oak Silkworm Antheraea pernyi: the effect of diapause, development and injury*, « Proc. Nat. Ac. Sc. », 52, 1572.
- BERRY S. J., KRISHNAKUMARAN A., OBERLANDER H. e SCHNEIDERMAN H. A. (1967) - *Effect of hormones and injury on RNA synthesis in Saturniid moths*, « J. Insect Physiol. », 13, 1511.
- BROWN D. D. e CASTON J. D. (1962) - *Biochemistry of Amphibian development*, « Dev. Biol. », 5, 412.
- CIGADA LEONARDI M. (1956) - *Le proteine di struttura nello sviluppo del Bombyx mori*, « Ist. Lombardo (Rend. Sc.) », 90, 573.
- GADALLAH A. I., KILGORE W. W. e PAINTER R. R. (1970) - *Isolation and identification of egg ribosomes of the housefly Musca domestica*, « J. Insect Physiol. », 16, 1245.
- LAUFER H. (1960) - *Blood proteins in Insect development*, « Ann. N. Y. Acad. Sc. », 89, 490.
- NIEMIERKO S., WLODAWER P. e WOJTCZAK A. (1956) - *Lipid and Phosphorus metabolism during growth of silkworm Bombyx mori*, « Acta Biol. exper. », 17, 255.
- PRICE G. M. (1965) - *Nucleic acids in the larva of the blowfly Calliphora erithrocephala*, « J. Insect Physiol. », 11, 869.
- RANZI S., PROTTI NECCHI M. e CITTERIO P. (1965) - *Impiego dei diagrammi di salting-out per lo studio della sistematica zoologica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. fis.) [8] », 38, 791.
- RUSSO CAIA S. (1960) - *Aspetti biochimici della metamorfosi degli Insetti. L'acido ribonucleico durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di Musca domestica L.*, « Rend. Acc. Naz. Lincei (Sc. fis.) [8] », 29, 215.

- SHIGEMATSU H. (1958) - *Synthesis of blood proteins by the fat body in Silkworm Bombyx mori*, « Nature », 182, 880.
- TELFER W. H. e WILLIAMS C. M. (1953) - *Immunological studies of Insect metamorphosis. I - Qualitative and quantitative description of the blood antigens of the cecropia Silkworm*, « J. Gen. Physiol. », 36, 389.
- TELFER W. H. (1954) - *Immunological studies of Insect metamorphosis. II - The role of sex-limited Blood Protein in egg formation by the cecropia Silkworm*, « J. Gen. Physiol. », 37, 539.
- WYATT G. R., LONGHEED T. e WYATT S. S. (1956) - *The chemistry of Insect Hemolymph. Organic components of the Hemolymph of silkworm Bombyx mori and two other species*, « J. Gen. Physiol. », 39, 853.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Diagrammi di sedimentazione all'ultracentrifuga analitica di sospensioni di ribosomi ottenute da *Bombyx mori* agli stadi di a) bacolino neonato; b) larva di V^a età che inizia la filatura del bozzolo; c) larva che ha terminato la filatura del bozzolo; d) pupa appena metamorfosata; e-k) pupa femmina all'età di 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 ore; l) adulto femmina; m-s) pupa maschio all'età di 48, 96, 144, 192, 240, 288, 336 ore; t) maschio adulto. Velocità 42040 r.p.m.; foto scattate 4' dopo il raggiungimento della velocità; temperatura 20° C ± 1° C; bar angle 55°.

