

MARGHERITA TURCHETTO\* - ANGELO DAL BELIN PERUFFO\*\* - ENZO MORETTO \*  
GABRIELLA TAMINO \*

PATTERNS PROTEICI E ISOENZIMATICI IN RHAGOLETIS CERASI L.  
(DIPTERA, TEPHRITIDAE) DURANTE L'ONTOGENESI

La mosca europea del ciliegio, Rhagoletis cerasi, presenta una diapausa biologica obbligata durante lo stadio di pupa. Tale diapausa rappresenta un adattamento evolutivo che rende questi ditteri, come altri insetti delle regioni temperate, in grado di sincronizzarsi con la maturazione della pianta ospite. Le condizioni ambientali sfavorevoli vengono così superate dalle pupe racchiuse in un pupario nel suolo e solo al ritorno della primavera si ha la comparsa degli adulti. La diapausa è un fenomeno complesso in cui si possono distinguere due periodi: diapausa vera o eudiapausa e post-diapausa. Secondo molti Autori (Tauber et al., 1982; Vankirk & Aliniaze, 1982) durante la diapausa è bloccata la morfogenesi, che riprende solo con l'avvento della post-diapausa fino allo sfarfallamento della forma adulta.

I meccanismi di sblocco della diapausa e i fattori che influenzano il passaggio alla post-diapausa non sono ancora del tutto noti, anche se si tende a dare molta importanza alle variazioni di temperatura e del fotoperiodo (Raisch & Chwala, 1979; Mansingh, 1971) e, in parte anche al grado di umidità. Ancora meno conosciuti sono i profondi cambiamenti morfogenetici e metabolici che avvengono nel corso dell'ontogenesi e in particolare durante la metamorfosi degli insetti olometaboli. Ci è sembrato perciò interessante studiare il corredo proteico della mosca del ciliegio durante gli stadi di diapausa e post-diapausa della pupa. E' inoltre stata studiata l'attività enzimatica della leucina amino peptidasi e i relativi patterns isoenzimatici.

MATERIALI E METODI

Sono state usate 2000 pupe di Rhagoletis cerasi L. provenienti dall'allevamento su Lonicera xylosteum del Fruit Fly Laboratory, Wädenswil, Svizzera.

(\*) Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via Loredan n.10,  
- 35131 Padova (I)

(\*\*) Istituto di Chimica Agraria e Industrie Agrarie, Università di Padova,  
Via Gradenigo 6 - 35131 Padova (I).

Le pupe sono state mantenute per tutta la diapausa a +4°C, come suggerito da Von Haisch (1975) al buio e con umidità relativa di 80 ± 5%. Durante questo periodo sono state prelevate ogni 15 giorni 60 pupe per studiare i patterns proteici ed enzimatici nel corso della diapausa.

Dopo 7 mesi dall'inizio dell'esperimento le restanti pupe sono state poste a temperatura ambiente e fotoperiodo naturale. Dopo 22 giorni sono cominciati ad emergere i primi adulti. Durante il periodo di post-diapausa venivano prelevate ogni due giorni 60 pupe e gli adulti, prelevati giornalmente, furono riuniti in pools di 60 individui ciascuno. I pools, sia di pupe che di adulti, venivano conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

Per la preparazione degli estratti proteici i pools sono stati trattati con tampone Tris-citrato 50 mM, pH 7.5, contenente saccarosio 17%, in rapporto di 25 µl di tampone per mg. Dopo triturazione e agitazione su Vortex, gli estratti venivano chiarificati centrifugando a 8000 g per 10 minuti. La riduzione dei campioni veniva effettuata, dopo aver aggiunto a 100 µl di estratto 50 µl di una soluzione acquosa contenente il 7.5% di sodio dodecil solfato e il 7.5% di mercaptoetanolo, a 37°C per una notte.

L'elettroforesi su gel di acrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE) è stata condotta secondo il metodo di Laemmli (1970) usando la cella elettroforetica MINI-SLAB-CELL della BIO-RAD (Richmond, California). La colorazione proteica veniva effettuata con Coomassie R 250, come riportato da Koenig *et al.* (1970). Per la separazione degli enzimi veniva usato lo stesso modo, omettendo il detergente: gli isoenzimi venivano evidenziati con il metodo di Loukas & Pontikis (1979).

L'attività della LAP veniva determinata usando come substrato L-leucina-p-nitroanilide, secondo il metodo di Pfleiderer (1970). Una unità di enzima è definita come la quantità di enzima che libera una micro-mole di p-nitroanilide per minuto a 37°C.

## RISULTATI

In fig. 1 sono riportati i profili proteici di otto pools di pupe durante la diapausa. Ogni profilo è costituito da circa 30 subunità proteiche, di cui le più rappresentate quantitativamente sono di peso molecolare compreso tra 66 e 92 Kda. Dall'esame di tutti i 14 pools di pupe in diapausa è emerso che i patterns proteici rimangono sostanzialmente identici e uguali ai patterns delle pupe prima della conservazione a 4°C e delle pupe in seconda diapausa.

In fig. 2 sono riportati i patterns proteici di due pools di pupe in diapausa (canali 1 e 2), di cinque pools di pupe in post-diapausa (canali 3-7 e precisamente al 2°, 12°, 26°, 28°, 30° giorno dall'inizio della post-diapausa) e infine un pool di adulti (canale 8). Come si può notare i passaggi diapausa/post-diapausa/adulto comportano delle modifiche nei patterns proteici. Si assiste anzitutto a una diminuzione delle quantità relative delle subunità proteiche comprese tra 66 e 92 Kda (indicate con A in fig. 2) nel passaggio da diapausa a post-diapausa ad adulto.

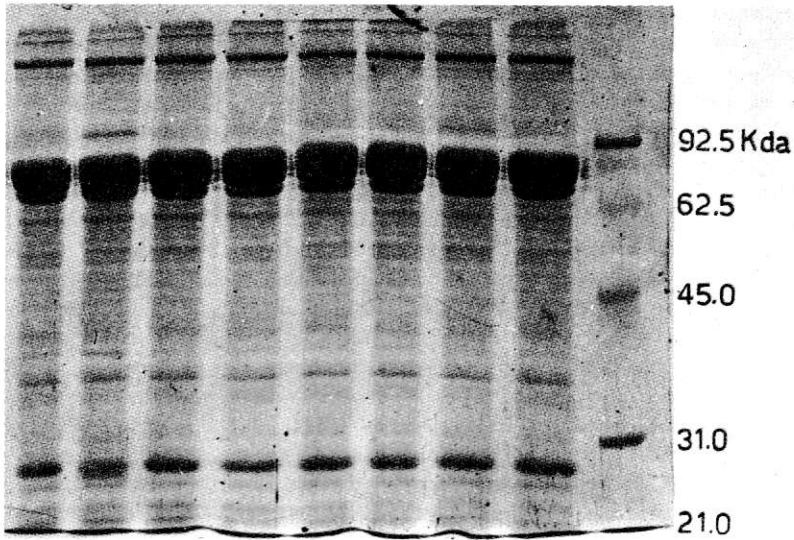


Fig. 1 - Patterns elettroforetici in SDS-PAGE delle proteine delle pupe durante la diapausa.

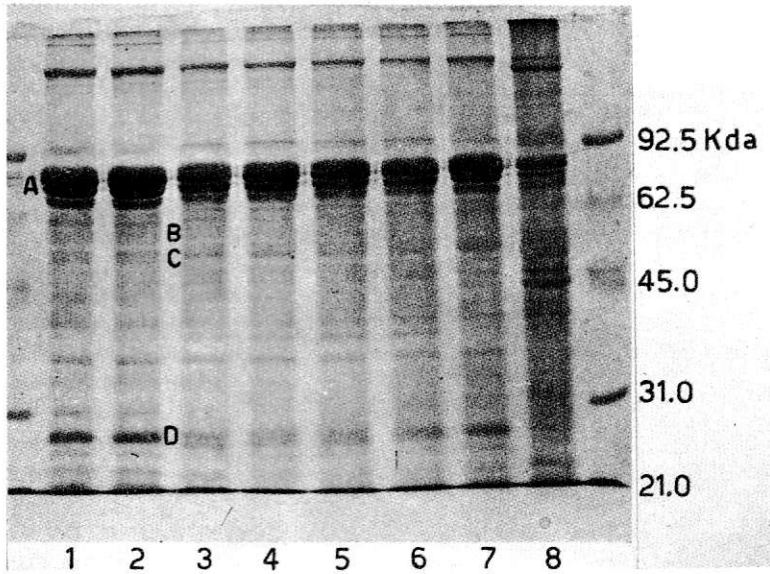


Fig. 2 - Patterns proteici in SDS-PAGE di pupe in diapausa (canali 1 e 2), pupe in post-diapausa (canali 3-7) ed adulti (canali 8).

Inoltre in post-diapausa compaiono subunità che non erano presenti in diapausa (B in fig. 2) e ne scompaiono altre (C in fig. 2). In fig. 2 si può anche notare che la subunità D si sdoppia in tutti i pools raccolti in post-diapausa ad eccezione degli ultimi due. Nei patterns degli adulti sono riscontrabili, oltre a quelle già menzionate, numerose altre differenze.

I pools di pupari danno un pattern proteico molto simile a quello delle pupe, ma molto debolmente colorato.

In fig. 3 è riportato l'andamento dell'attività della LAP: come si può osservare essa risulta molto bassa durante la diapausa, mentre aumenta in post-diapausa, fino a raggiungere un massimo, che coincide con il 26° giorno. Si deve qui ricordare che gli sfarfallamenti hanno avuto inizio il 22° giorno.

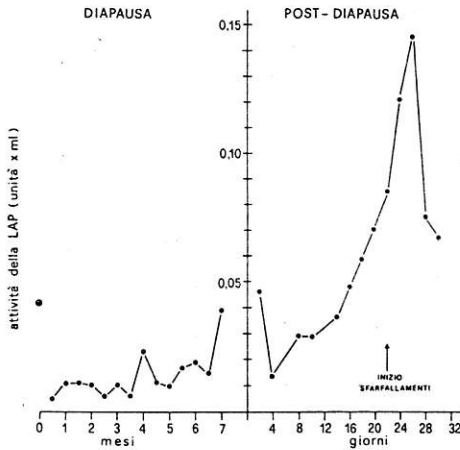


Fig. 3 - Attività (unità per ml di estratto) della leucina amino-peptidasi durante l'ontogenesi di *R. cerasi*.

- Attività delle pupe prima della conservazione a +4°C. ●
- Attività delle pupe nel II° anno di diapausa. □
- Attività degli adulti. ○

La fig. 4 riporta i patterns isoenzimatici della LAP di due pools di pupe in diapausa (canali 1 e 2), di cinque pupe in post-diapausa, scelti come in precedenza (canali 3-7) e di un pool di adulti (canale 8).

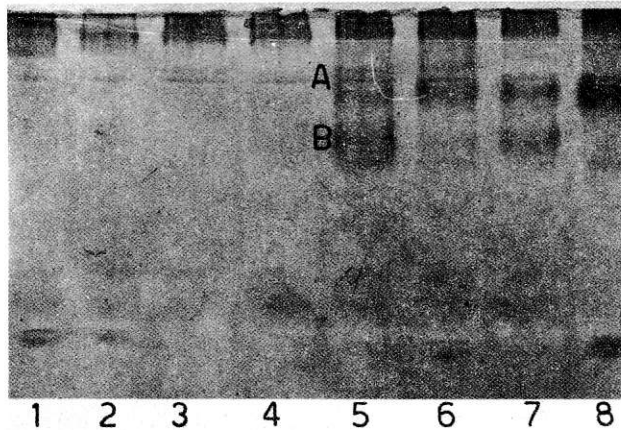


Fig. 4 - Patterns isoenzimatici della LAP di pupe in diapausa (1-2), pupe in post-diapausa (3-7) e adulti (8).

Tutti i pools di pupe in diapausa si sono rivelati identici a quelli di fig. 4. Nelle pupe in post-diapausa si è osservata al 14° giorno l'insorgenza dell'isoenzima indicato con B in fig. 4 e al 24° giorno è comparso l'isoenzima indicato con A. Nei pools di pupe raccolte alla fine dello sfarfallamento gli isoenzimi A e B non sono più evidenziabili. Tutti i pools di adulti saggianti hanno dato lo stesso pattern enzimatico (canale 8), che è diverso da quello delle pupe, in quanto mancante sicuramente dell'isoenzima B.

#### DISCUSSIONE

Da quanto emerge dai risultati si può dedurre che durante la diapausa il corredo proteico delle pupe della Rhagoletis cerasi non subisce praticamente variazioni. L'attività della leucina amino-peptidasi rimane bassa durante tutto il periodo, anche se verso gli ultimi mesi si può rilevare una sua tendenza all'aumento. Si può osservare come al settimo mese di diapausa l'attività della LAP si avvicini al valore che essa presentava prima che le pupe fossero poste a 4°C (fig. 3).

Nella post-diapausa i patterns proteici risultano diversi da quelli riscontrabili nella diapausa. Essi tuttavia risultano alquanto costanti durante tutto il periodo, in particolare anche dopo lo sfarfallamento degli adulti. L'attività della leucina amino-peptidasi subisce invece delle notevoli variazioni. Al 26° giorno di post-diapausa essa risulta tre volte più grande rispetto al valore iniziale. Il calo nell'attività enzimatica che si osserva dal 28° giorno è probabilmente dovuto all'aumento percentuale nei pools delle pupe che non sfarfalleranno. Questa ipotesi è suffragata dall'osservazione che le pupe in secondo anno di diapausa presentano un'attività enzimatica dello stesso ordine di grandezza di quella presentata dai due ultimi pools in cui era in atto lo sfarfallamento. È interessante notare come compaiano delle nuove forme isoenzimatiche della leucina amino-peptidasi poco prima dell'inizio dello sfarfallamento, come esse si manifestano in maniera marcata durante tale periodo e come infine scompaiano nelle pupe in seconda diapausa.

Le variazioni osservabili nei patterns proteici delle pupe avvengono contemporaneamente all'insorgenza di queste nuove forme isoenzimatiche, per cui si può dedurre che i due fenomeni sono strettamente correlati. A questo proposito anche Katzenellenbogen & Kafatos (1971a, 1971b) misero in evidenza nel moulting fluid di pupe di Lepidotteri diverse proteasi in forma inattiva, che vengono attivate solo poco prima dell'emergenza.

Da quanto osservato si può ipotizzare che il passaggio da pupa ad adulto in Rhagoletis cerasi comporti più una redistribuzione di subunità proteiche già preesistenti nelle pupe che una loro sintesi ex novo e che tale redistribuzione sia mediata da enzimi proteolitici. Questa ipotesi è in accordo con le conclusioni tratte da Loughton e West (1965) e Chen & Levenbook (1966) dallo studio delle variazioni di concentrazione proteica nell'emolinfa di insetti olometaboli durante la metamorfosi. Essi osservarono infatti che proteine già preesistenti vengono veicolate dall'emolinfa e servono come fonte principale per la costruzione delle proteine tissutali dell'adulto.

Rimane infine da sottolineare che i patterns proteici delle pupe rimangono praticamente identici durante tutta la post-diapausa e sono molto diversi da quelli imaginali, non si notano in altri termini nelle pupe differenze tra prima e dopo l'inizio degli sfarfallamenti. Questo porterebbe a pensare che in R. cerasi la metamorfosi sia un processo estremamente rapido e che avvenga immediatamente prima dell'osservazione del fenomeno.

#### RIASSUNTO

Si sono osservate variazioni nei patterns proteici delle pupe di Rhagoletis cerasi tra diapausa, post-diapausa e adulti.

In post-diapausa si assiste alla comparsa di alcuni isoenzimi della LAP non osservabili in diapausa.

Si ipotizza un collegamento tra variazioni dei patterns proteici e attività proteolitica.

#### SUMMARY

Variations were observed in protein patterns for Rhagoletis cerasi pupae in diapause, post-diapause and at adult emergence. Some LAP isoenzymes appear in the post-diapause which had not been observed at the one-year or two-year diapause. It is thought that there is a direct link between variations in protein patterns and proteolytic activity.

Key words : Rhagoletis cerasi, diapause, electrophoresis, proteins, isoenzymes.

#### AUTORI CITATI

- CHEN P.S. and LEVENBOOK L. (1966)-Studies on the haemolymph proteins of the blowfly Phormia regina. I. Changes in ontogenetic patterns. J. Insect. Physiol., 12: 1595-1609.
- HAISCH Von A. (1975) -Zur Puppendiapause der Kirschenfliege, Rhagoletis cerasi L. I. Beeinflussung der diapausierenden Puppen durch unterschiedliche Temperaturen und verschieden lange Kälteexpositionen. Z. ang. Ent., 79: 1-11.
- HAISCH A. and CHWALA D. (1979) - Über den Einfluss wechselnder Temperaturen auf den Diapause-Ablauf der Europäischen Kirschfruchtfliege, Rhagoletis cerasi (Diptera: Trypetidae). Entomologia Generalis, 5: 231, 239.
- KATZENELLENBOGEN B.S. and KAFATOS F.C. (1971a) - Proteinases of silkmoth moulting fluid: physical and catalytic properties. J. Insect Physiol. 17: 775-800.

- KATZENELLENBOGEN B.S. and KAFATOS F.C. (1971b) - Inactive proteinases in silkmoth moulting gel. J. Insect. Physiol., 17: 823-832.
- KOENIG R., STEGEMANN H., FRANCKSEN H. and PAUL H.L. (1970) - Protein subunits in the potato virus X group. Determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis. Biochem. Biophys. Acta, 207: 184-189.
- LAEMMLI U.K. (1970) - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- LOUKAS M. and PONTIKIS C.A. (1979) - Problem isozyme polymorphism in types of Pistacia vera and related species as an aid in taxonomy. J. Hort. Sci., 54: 95-102.
- LOUGHTON B.G. and WEST A.S. (1965) - The development and distribution of haemolymph proteins in Lepidoptera. J. Insect. Physiol., 11: 919-932.
- MANSINGH A (1971) - Physiological classification on Dormancies in insects. Can. Ent., 103: 983-1009.
- PFLEIDERER G. (1970) - Particle band aminopeptidase from pig kidney. Methods in Enzymology. S.P. Colowick & N.D. Kaplan (Eds.), Vol. 19, pp. 514-521, Academic Press, New York & London.
- TAUBER M.J., TAUBER C.A., NECHOLS J.R. and HELGESEN R.G. (1982) - A new role for temperature in Insect dormancy: cold maintains diapause in temperate zone Diptera. Science, 218: 690-691.
- VANKIRK J.R. and ALINIAZEE M.T. (1982) Diapause development in western cherry fruit fly, Rhagoletis indifferens Curran (Diptera, Tephritidae). Z. ang. Ent., 93: 440-445.