Zeitschrift: Mitteilungen der aargauischen Naturforschenden Gesellschaft

Herausgeber: Aargauische Naturforschende Gesellschaft

Band: 30 (1983)

Artikel: Die Entwicklung der bisexuellen Anlage der Genitalien und Analien, untersucht an verschiedenen Geschlechtsmutanten der Taufliege Drosophila melanogaster

Autor: Ehrensperger, Peter Christoph

Kapitel: 2: Material und Methoden

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-172723

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 13.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

3) Sind die verschiedenen für die Geschlechtsdifferenzierung verantwortlichen Gene schon bei der Morphogenese der Genitalscheibe wirksam? Wenn ja, erlauben morphologisch erkennbare Merkmale an der Genitalscheibe Aussagen über den Zeitpunkt ihrer Wirkung?
4) Kann ein dreidimensionaler Anlageplan der intersexuellen Genitalscheibe die Organisation der Terminalien in drei Hauptprimordien bestätigen, und entspricht der intersexuelle Anlageplan der Superposition der bekannten Anlagepläne der weiblichen und männlichen Genitalscheibe?

2. Material und Methoden

2.1. Die untersuchten Genotypen

In dieser Arbeit untersuchte ich alle Larvenstadien, z. T. auch Puppenstadien und Imagines der Genotypen *XY; +/+* (= normales ♂), *XX; +/+* (= normales ♀), *XY; dsx/dsx, XX; dsx/dsx* und *XX; ix/ix* (= intersexuelle Tiere = ⚥), *XX; tra/tra* und *XX; tra-2/tra-2* (= Pseudomännchen = p♂). Die entsprechenden Phänotypen sind in Kap. 3.1 beschrieben. Um die richtigen Larven aus einer Zucht heraussortieren zu können, wurden die interessierenden Gene mit geeigneten Larvenmarkern gekoppelt: die homozygoten *dsx* (3-48.1)-bzw. *tra* (3-45)-Tiere mit der Mutation p^p (3-56), die homozygoten *ix* (2-60.5)- und *tra-2* (2-70)-Tiere mit den Mutationen *cn* (2-57.2) und *bw* (2-104.5). Die benützten Mutationen lassen im homozygoten Zustand Larven mit farblosen statt gelb gefärbten Malpighischen Gefäßen entstehen. Genotypisch weibliche *XX* (y/y^+)- und männliche *XY* (y)-Larven waren stets an den schwarzen oder gelblich gefärbten Mundhaken unterscheidbar. Die für meine Untersuchungen vorgesehenen Larven konnte ich demnach aus den Nachkommen folgender vier Kreuzungen heraussuchen:

a) XX; dsx/dsx- und XY; dsx/dsx-Larven:
♀ y/y; dsx p^p/TM6, Ubx × ♂ y^+/Y; dsx p^p/TM6, Ubx

b) XX; ix/ix-Larven:
♀ y/y; pr cn ix bw/SM5, Cy × ♂ y^+/Y; pr cn ix bw/SM5, Cy

c) XX; tra/tra-Larven
♀ y/y; tra p^p/TM6, Ubx × ♂ y^+/Y; tra p^p/TM6, Ubx

d) XX; tra-2/tra-2-Larven:
♀ y/y; pr cn tra-2 bw/SM5, Cy × ♂ y^+/Y; pr cn tra-2 bw/SM5, Cy

Eine genaue Beschreibung des Allels *tra-2* ist bei Watanabe (1975), die aller andern erwähnten Mutationen in Lindsley und Grell (1968) zu finden. Das Alter der Larven wird stets in Stunden (h) nach Eiablage, das Alter der Puppen in Stunden (h) nach Pupariumsbildung angegeben. Ihre Zucht erfolgte auf Standardfutter (Mais, Zucker, Agar, Hefe und Nipagin) bei 25 °C.

2.2. Fragmentation der Genitalscheiben und Transplantation

a) Die Genitalscheiben wurden in steriler Insekten-Ringerlösung aus verpuppungsreifen *y/y⁺; dsx/dsx*- und *y/Y; dsx/dsx*-Larven (120 ± 2 h alt) seziert und mit zwei zuvor in heißer Natriumnitritschmelze gespitzten Wolframnadeln in 10 genau definierte Fragmente zerlegt (vgl. Abb. 12). Anschließend wurde jedes Genitalscheibenfragment in eine genetisch anders markierte (entweder *y* oder *e mwh*) Beinscheibe eingepackt (Nöthiger, 1964; Ehrensperger, 1972), die sozusagen als Transportmittel diente und eine größere Überlebensrate der z. T. sehr kleinen Genitalscheibenteile ermöglichte. Zuletzt transplantierte ich jedes dieser Genitalscheiben-Beinscheiben-Pakete in eine verpuppungsreife Wirtslarve nach der von Ephrussi und Beadle (1936) und Ursprung (1967) beschriebenen Technik, um sie so der Metamorphose des Wirtstieres zu unterwerfen. Da wegen ihrer großen morphologischen Variabilität stets 5–10 Genitalscheiben herausseziert und dann eine symmetrische Scheibe mit einer mehr oder weniger großen W-Zone* für die Fragmentation ausgewählt wurde, blieben die Imaginalscheibengewebe bis zur Transplantation des letzten Genitalscheibenfragments etwa vier Stunden lang in der Ringerlösung. Zur Kontrolle transplantierte ich gleich alte *dsx/dsx*-Ganzscheiben.

b) Die Genitalscheiben aus verpuppungsreifen *XX; ix/ix*-Larven (120 ± 2 h alt) zerlegte ich entweder in Anterior- und Posteriorhälften oder sagittal in Lateral- und Mittelstücke. In einem dritten Experiment wurden aus der homozygoten *ix*-Genitalscheibe die W-Zone ektomiert und die komplementären Teile (W-Zone und Rest) durch Transplantation getrennt der Metamorphose unterworfen. Als Kontrollexperiment wurden wiederum verpuppungsreife Ganzscheiben (*XX; ix/ix*) transplantiert.

Die Wirtstiere waren stets 119 ± 1 h alte, meist weibliche Larven des Wildstammes Sevelen. Sie wurden bei allen Fragmentationsexperimenten stets einzeln in Tuben gehalten, damit wenn nötig die Differenzierung von Komplementärstücken verfolgt werden konnte. Alle Instrumente und Glaswaren wurden vor Gebrauch während 2 Stunden bei 140 °C trocken sterilisiert.

2.3. Präparation und Auswertung der Transplantate

Aus den geschlüpften Wirtsfliegen wurden total 497 metamorphosierte Implantate in Ringerlösung herauspräpariert und – wenn Weichteile gebildet worden waren – während 15–20 Minuten in 70 % Alkohol fixiert, dann 15 Minuten lang in 3 % Hämalaunlösung und für 30 Sekunden in alkoholischer Eosinlösung gefärbt. Anschließend wurden sie für 5–10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und auf einem Objektträger in einen Tropfen Faurescher Lösung übergeführt. Hier wurden sie mit zwei Wolframnadeln vom sie häufig bedeckenden Fettkörper

* W-Zone = weibliche Zone = «Wurst»: Ehrensperger, 1972; entspricht heute dem weiblichen Genitalprimordium: Epper, 1981; Epper und Nöthiger, 1982.

befreit, die Chitinblasen geöffnet und ausgebreitet und zuletzt unter einem Deckglas in Faurescher Lösung eingeschlossen. Bei einer ersten mikroskopischen Untersuchung stellte ich die qualitativen Differenzierungsleistungen der Transplantate fest (Frequenzwerte). In einer zweiten, quantitativen Auswertung bestimmte ich bei den Hartteilen die Anzahl der gebildeten Borsten (gerundetes Mittel aus 3 Zählungen). Mit einem Meßokular wurde ferner die größte Länge der einzelnen Weichteil-Organe gemessen und diesen die in Tabelle 1 angegebenen Werte zugeordnet. Demnach erhielt ein +/+-Ganzscheibentransplantat mit vollständigen inneren Genitalien (ohne Enddarm) 10 Punkte. Um die qualitativen und quantitativen Entwicklungsleistungen der Genitalscheibenfragmente in einem Wert ausdrücken zu können, berechnete ich analog zu meiner früheren Methode (Ehrensperger, 1972) einen sog. Entwicklungswert q:

$$q = \frac{\bar{x}}{\bar{X}} \cdot f$$

q = Entwicklungswert
$\bar{x}$ = mittlere quantitative Entwicklungsleistung eines Genitalscheibenfragments für ein bestimmtes Element des Genitalapparates (Borstenzahl oder Wert aus Tab. 1)
$\bar{X}$ = mittlere quantitative Entwicklungsleistung einer Ganzscheibe für dasselbe Element (Kontrollexperiment)
f = Frequenz (in %), mit der ein Fragment ein Element gebildet hat

2.4. Herstellung von histologischen Schnittserien und Genitalscheibenmodellen

Zur genauen anatomischen Untersuchung der Genitalscheiben wurden total 290 Larvenhinterhälften aller Larvenstadien und der unter 2.1. erwähnten Genotypen in Paraplast (Ehrensperger, 1970) bzw. Epon-812 (Eichenberger-Glinz, 1979; Epper, 1980) eingebettet und anschließend mit einem Jung-Mikrotom 5μ bzw. mit dem Reichert-Ultramikrotom 2.5μ dünne Schnitte hergestellt. Für die spätere genaue Orientierung bei der Einbettung im Eponblock wurden die Genitalscheiben älterer Stadien (72 h, 96 h, 120 h) aus den in Insekten-Ringerlösung umgestülpten Larven herausseziert und durch tropfenweise Zugabe kalter Fixationslösung langsam vorfixiert. Die Genitalscheiben jüngerer Stadien (48 h, 54 h, 60 h, 66 h) hingegen wurden durch Injektion kalter Fixierlösung in zuvor mit Ätherdampf während 60 Sekunden narkotisierte Larven *in situ* vorfixiert. 5–10 Minuten später wurden die Larven mit einer Mikroschere halbiert und in die Fixierlösung (2.5 % Glutaraldehyd in 0.05 M Na-Cacodylat-Puffer, pH 7.4, 4 % Sucroselösung enthaltend) übergeführt. Die nun folgende Fixation während 1½–2 h erfolgte bei 4 °C. Anschließend wurden die Gewebe 1–2 h lang im Na-Cacodylat-Puffer gewaschen und über Nacht bei 4 °C darin belassen. Die Nachfixierung für die Epon-Einbet-

tung erfolgte in 1 % OsO_4 (in Na-Cacodylat-Puffer/Sucrose) während 1 h bei 4 °C und anschließend für 1–2 h bei Raumtemperatur. Die Epon-Schnittserien wurden ungefärbt auf einem Objektträger mit einigen Tropfen Epon und einem Deckglas zum Dauerpräparat eingeschlossen. Die mikroskopische Analyse erfolgte dann im Phasenkontrastmikroskop. Die Paraplast-Schnittserien hingegen färbte ich nach der von Burck (1969) angegebenen Technik mit Hämalaun und Eosin und schloß sie in Malinol unter dem Deckglas ein. Aus zwei vollständigen Schnittserien stellte ich analog zu meiner Rekonstruktionsarbeit (Ehrensperger, 1970) ein 1000fach vergrößertes *dsx*/*dsx*- und ein *ix*/*ix*-Genitalscheibenmodell her.

2.5. Bestimmung der Zellzahl in der Genitalscheibe

Zunächst wurden die Durchmesser von je 10 verschiedenen Zellkernen der Genitalscheibe aller Larvenstadien sowie deren Nucleoli fotografisch ausgemessen. Von total 70 ausgemessenen Kernen ergab sich ein Durchschnitt von $4.9 \pm 0.7\,\mu$, für deren Nucleoli ein Durchschnitt von $2.3 \pm 0.5\,\mu$. Die relativ große Variabilität (Nuclei 2.5–7.1 μ und Nucleoli 1–4.8 μ) ist einerseits auf die Zellteilungstätigkeit (Madhavan und Schneiderman, 1977), andererseits aber auch auf die Lage der Schnittebene durch die rundlich-ovalen Zellkerne zurückzuführen. Die Nucleoli zeigen jedoch ganz verschiedene Formen: klein und rund, oval bis länglich, sogar hantelförmig gekrümmt oder gestreckt, in der Mitte oder ganz am Rande des Nucleus liegend. Sie wurden daher in den 2.5 μ-Schnittserien relativ häufig einmal, oder teilweise sogar zweimal angeschnitten und waren so in ein bis zwei oder eventuell in drei aufeinanderfolgenden Schnitten noch festzustellen. Im Phasenkontrastmikroskop konnte man deutlich hellere, d. h. Nucleolus-Randstücke, und dunkle, d. h. ganze oder nur wenig angeschnittene Nucleoli, erkennen (vgl. Abb. 23, 25 und 26). Die Annahme, daß durchschnittlich 2.3 μ große Nucleoli in 2.5 μ-Schnittserien praktisch immer angeschnitten werden und man bei der Zählung aller sichtbaren Nucleoli eine um den Faktor 2 zu große Nucleolus- und damit Zellzahl erhält, hat sich bestätigt: In je 10 aufeinanderfolgenden 2.5 μ-Schnitten von verschiedenen Larvenstadien wurden alle Nucleoli sowie nur die dunklen Nucleoli allein gezählt. Dabei zeigte sich, daß letztere, also ganze oder nur wenig angeschnittene Nucleoli bei fünf ausgezählten 10er-Schnittserien nur 45.1–55.7 % (Durchschnitt der 5 Serien = 49.98 %) aller ausgezählten Nucleoli ausmachten. Deswegen zählte ich für die Zellzahlbestimmung bei den 2.5 μ-Schnittserien alle im Phasenkontrastmikroskop sichtbaren Nucleoli und halbierte das erhaltene Resultat. Die derart ermittelte Anzahl Zellen einer ganzen Genitalscheibe stimmte z. T. recht gut mit der Anzahl der in den 5 μ-Schnittserien festgestellten Zellkerne überein (z. B. 120 h alte männliche Genitalscheibe: 2.5 μ-Schnittserie mit 8916 Nucleoli und 5 μ-Schnittserie mit 8978 Nuclei). Die durchschnittlich 4.9 μ großen Kerne wurden in den 5 μ-Schnitten zwar auch meistens halbiert oder angeschnitten, doch erscheinen in den relativ kleinen Genitalscheibenzellen die Kerne sehr kompakt aneinander gelagert (Abb. 23). So können zwei übereinanderliegende,

angeschnittene Zellkerne in einem Schnitt tatsächlich nur einmal und nicht doppelt gezählt werden. Diese derart ermittelten Zellzahlen (z. B. Tab. 6: 96 h alte männliche Genitalscheibe: 5876 Zellen) stimmen auch gut mit der Zellzahl von 5850 in der 98 h alten (Jungi, 1967) oder mit der von Fels *et al.* (1967) durch Dissoziationsmethode festgestellten Zellzahl von 5500 in der 100 h alten männlichen Genitalscheibe überein.

2.6. REM-Aufnahmen

Für eine bessere Untersuchung der äußeren und inneren Morphologie habe ich für das Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) die Genitalscheiben verpuppungsreifer *XX; +/+-, XY; +/+-, XY; dsx/dsx-* und *XX; ix/ix*-Larven präpariert. Die in Insekten-Ringerlösung umgestülpten Larvenhinterhälften wurden durch tropfenweise Zugabe der kalten Fixierlösung (siehe Kap. 2.4.) während 2–5 Minuten langsam und dann für eine Stunde bei 4 °C fixiert. Der Postfixation mit 1 % OsO_4 folgte die nach Reinhardt *et al.* (1977) modifizierte Behandlung mit Thiocarbohydrazid, dann die schrittweise Dehydrierung bis zu 100 % Aceton und schließlich das Trocknen der Gewebe mit der CO_2-Kritisch-Punkt-Methode. Zuletzt erhielten sie in einer Sputter-Anlage (Balzers) eine ca. 15 nm dünne Goldschicht. Nach den ersten äußeren Aufnahmen im REM-Cambridge S-4 (REM-Labor, Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich) trennte ich die Genitalscheiben vom Larvengewebe vorsichtig ab und klebte sie auf ein Scotch-Band auf. Um das Lumen der Genitalscheiben freizulegen, wurde die dünne, dorsale Zellschicht, also die Anlage der Analia (Ehrensperger, 1972; Littlefield und Bryant, 1979a; Epper, 1980, 1981), mit zwei Wolframnadeln stückweise abgebrochen und entfernt. Jetzt konnten nach einer zweiten Goldbeschichtung auch die inneren Teile der Genitalscheiben im REM fotografiert werden.

2.7. Präparation für Entwicklungsbeobachtungen in situ

Es wurden homozygote *dsx-* und *ix*-Puppen verschiedenen Alters in Ringerlösung seziert und die Genitalprimordien herauspräpariert. Diese zeichnete ich unter dem Stereomikroskop bei 100facher Vergrößerung ab. Der Zeitpunkt Null, also der Beginn der Pupariumsbildung, war das Stadium der «weißen Vorpuppe». Es wurde zwischen 117 und 125 h nach Eiablage erreicht. Ferner wurden die Genitalscheiben und Gonadenanlagen aus verpuppungsreifen *XX; tra/tra-* und *XX; tra-2/tra-2*-Larven herausseziert, in einem Tropfen Ringerlösung im Mikroskop fotografiert und mit der Camera lucida gezeichnet und ausgemessen.