

## Temporäre Prägung und ihre Reproduzierbarkeit. Die Reaktion von *Drosophila melanogaster* auf Mangeldiät sowie auf Zufütterung von Thymidin

ELISABETH WOLF

Bayerische Landesanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau, Würzburg (BRD)

### On the Reproducibility of Transitory Effects.

### The Response of *Drosophila melanogaster* to a Deficient Diet and to Feeding with Thymidine

**Summary.** Administration of products from resistant grape-vines has been reported to lead to transitory abnormal effects in chickens. The induced abnormalities gradually disappear in later generations. In order to determine whether comparable effects could be obtained in other organisms, *Drosophila melanogaster* were fed 1) on a nutritionally deficient diet lacking yeast and 2) on a diet containing different concentrations of thymidine, a substance known to have mutagenic and teratogenic effects.

In the first series, flies that had developed under normal conditions were placed on the deficient medium for oviposition. These normal flies reacted to the yeast-free deficient diet with a marked reduction in the rate of eggs laid within 48–72 hours after mating. A further reduction in egg-laying rate was observed in  $F_1$  flies, raised on the deficient medium and kept under the same conditions for oviposition.

$F_1$ -males and females, grown on the deficient medium, but transferred to standard medium for egg-laying, showed some degree of rehabilitation with regard to laying-rate within 48–72 hours after mating. However, the number of eggs laid remained significantly below that of the controls.

Significantly lower egg rates were also found in  $F_2$ -flies raised on normal food that were descendants of  $P_1$ -flies raised on a deficient diet, but whose  $F_1$ -parents had been raised on normal food.

However, if the total number of progeny from these flies was determined instead of the rate of oviposition within 48–72 hours after mating, the low egg rates turned out as a relative rather than an absolute effect. Judged by the number of individuals obtained, complete rehabilitation had taken place, experimental and control values being of the same order. The progeny of treated parents, however, even if raised on the standard diet showed a developmental delay of about 48 hours as compared to the controls. Differences between daily numbers of progeny produced by treated as compared to that of untreated parents, remained significant throughout the entire period of hatching.

In a second series of experiments flies developing on food containing thymidine showed a great variety of abnormalities, sublethals and lethals. The frequency in the latter two categories increased markedly with increasing thymidine concentrations.

In  $F_1$  lethals and sublethals were significantly more frequent among females than among males. Consequently the sex ratio of surviving adults was shifted considerably in favor of males.

Further generations ( $F_2$ – $F_6$ ) were reared on normal food and checked for mutagenic and/or teratogenic after-effects. As a rule selection for  $F_1$  anomalies was not successful. Regardless of the parental phenotype selected in  $F_1$ , a number (non-significant) of sporadic aberrations re-appeared, representing practically the whole array of abnormalities found in  $F_1$  adults. Hardly any abnormal flies were found among the controls.

In one case the frequency of one of the wing anomalies could be temporarily increased by selection.

Another wing anomaly turned out to be a true recessive mutation, its manifestation depending on at least one dominant gene.

The results support the hypothesis that transitory effects, followed by rehabilitation, are reproducible. Their relationship to comparable cases that have been reported is discussed.

### Einleitung

Versuche, bei denen die Wirkung eines Stoffes oder auch das Fehlen essentieller Substanzen im tierischen Organismus geprüft wird, erschöpfen sich zumeist in der Darstellung der Effekte bei der unmittelbar behandelten Generation. Eine Reihe von Beobachtungen an Hühnern nach dem Ersatz des ihnen normalerweise gebotenen Trinkwassers durch Produkte spezifisch resistenter Reben-Arthybriden lassen indessen auch die Prüfung unbehandelter Nachzuchten bedeutsam erscheinen (Breider 1968). Neben der direkten Beeinflussung der Tiere durch die Versuchs-

tränken (Breider *et al.* zit. 1967) zeigten sich bei der wieder normal gehaltenen  $F_1$  aus solchen Behandlungsserien auch indirekte Einwirkungen als Folge der  $P_1$ -Behandlung. Angesichts der unterschiedlichen Verhältnisse, unter denen sich beide Einflüsse realisierten, die einmal auf ein voll ausdifferenziertes Organsystem trafen ( $P_1$ ), wenn es sich um erwachsene Hühner (und Hähne) sowie um einen direkten Effekt handelte und die im anderen Fall in indirekter Wirkung die Embryonalentwicklung der  $P_1$ -Abkömmlinge ab ovo beeinträchtigten, waren habituell unterschiedliche Resultate zu erwarten. Diese Er-

wartung bestätigte sich. Wurde durch die Direktwirkung in den meisten Fällen das Lebersystem angegriffen, so führten die indirekt über die Eier wirkenden Einflüsse in der  $F_1$  zu Mißbildungen an Ständern und Federn. Diese Einwirkungen hielten, wenn auch nach der Zahl der betroffenen Individuen und in der Signifikanz ihrer Häufigkeit rückläufig, mindestens bis zur  $F_3$  weiterhin an. Dabei war das Zustandekommen der Aberrationen weitgehend unabhängig von der normalen oder anomalen Beschaffenheit der betr. Eltern (Breider und Wolf 1971; im Druck).

In der Literatur finden sich vergleichbare Angaben über Nachwirkungen bei Cowley und Griesel (1966), die bei ihren Versuchen mit Ratten feststellen konnten, daß die Haltung der Tiere einer Generation unter Proteinmangel bei den Behandelten einen Effekt setzte, dessen Abklingen mehr als eine Nachzuchtgeneration unter wieder normalen Futterbedingungen erforderte.

Wenn es sich bei den geschilderten modifikativen und reversiblen Erscheinungen um ein allgemeines Phänomen handelt, müßten sich entsprechende Befunde auch bei anderen Organismen reproduzieren lassen.

Zu diesem Zweck liefen zwei Versuchsserien mit *Drosophila melanogaster*, bei denen sich die Tiere einer Generation ( $P_1$ ) unter veränderten Ernährungsbedingungen fortpflanzten und ihre Abkömmlinge ( $F_1$ ) unter eben diesen Bedingungen aufwuchsen, während die von der  $F_2$  ab mehrere Generationen lang beobachteten Nachzuchten wieder Standardfutter erhielten. Dabei handelte es sich einmal um eine Mangeldiät, hier um ein hefefreies Substrat, und im anderen Fall um ein sonst normales Futter, dem das von Parkash (1967) für *Drosophila* als Mutagen und Teratogen beschriebene Thymidin in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben worden war.

### Material und Methode

Die in beiden Versuchsreihen verwendete *Drosophila* stammte aus einer *D. melanogaster*-Zucht des „Berlin wild“-Stammes und wurde freundlicherweise vom Institut für Genetik der FU Berlin zur Verfügung gestellt.

Im Versuch mit dem Mangelsubstrat erhielten die Tiere einen sonst normal zusammengesetzten Futterbrei, dem in den Behandlungsreihen der Hefezusatz fehlte. Die Kontrollen wurden auf dem Standard-Substrat gehalten, dem eine Aufschwemmung mit autoklavierter Hefe beigegeben worden war. Die beiden Versuchsserien gestatteten entweder die Auswertung der Legerate während der ersten 48–72 Std. nach dem Ansatz oder die Ermittlung der Zahl der Imagines. In dem Versuch, der zur Auswertung der Legerate diente, entsprach die Anordnung der bei Wolf und Reuther (1959) beschriebenen: Von dem hier gewichtsgleich in

Petrischalen ausgegossenen hefehaltigen bzw. -freien Futter wurden jeweils 3 mit Futterröhrchen gleichen Durchmessers ausgestanzte Plättchen je einem 3–6 Std. alten Pärchen zur Ablage geboten. Die Plättchen befanden sich dabei in einer Petrischale, die mit Hilfe eines umgedrehten Trichters geschlossen wurde, in dessen Hals ein lockerer Wattebausch die nötige Luftzufuhr gestattete. Am Ende der jeweiligen Expositionszeiten wurden dann die Eizahlen bei Versuch und Kontrolle bestimmt. Handelte es sich um die Auswertung der Individuenzahl, so erhielten Fliegenpärchen in den üblichen Zuchtröhrchen jeweils zwei der ausgestanzten Futterplättchen von unbeheften bzw. beheften Medien zur Ablage.

Der Versuch mit Thymidin-Zufütterung lief in Röhrchen mit je 5 ♀♀ und 5 ♂♂, die am selben Tag gesammelt worden waren. Die Tiere erhielten das Thymidin im Standardnährboden (mit autoklavierter Hefe) in Konzentrationen von 4 mg, 8 mg, 12 mg und 16 mg. Die Prozedur verlief im einzelnen in der von Parkash (1967) angegebenen Weise, die entsprechend der Fragestellung hier etwas abgewandelt war. Gewichtsgleichen Anteilen des Nährbodens (100 g) wurden, in Petrischalen ausgegossen, 250 mg, 500 mg, 750 mg und 1000 mg gründlich beigemischt. Jeweils 2 mittels Versuchsrohrchen ausgestanzte Futterteile zu je 8 g bildeten dann den Nährboden eines Versuchsrohrchens. Den Kontrollen stand das gleiche Grundfutter zur Verfügung, das in derselben Weise ausgegossen und ausgestanzt worden war. Die Versuche liefen mit der schwächsten Konzentration (4 mg) in einer, mit den Konzentrationen 8 mg und 12 mg in drei und mit 16 mg in zwei Serien. Die in Pärchenzuchten weiter vermehrten Tiere aus Versuch und Kontrolle wurden 3–6 Generationen lang beobachtet. — Die Zuchttemperatur lag bei 24,5–26 °C.

### Ergebnisse

#### I. Versuche mit Hefe-Mangeldiät

Die Auswertung bei temporärer Exposition der Tiere betraf die Eiablage ( $F_1$ ) der unmittelbar unter dem Einfluß der Diät stehenden  $P_1$ . Die Ergebnisse dieser Auszählung sind in Tab. 1 zusammengestellt. Es zeigte sich, daß der Hefemangel bei den Eltern zu einem starken Rückgang der weiblichen Legerate während der Expositionszeit (72 Std.) führte. In den Mangelkulturen wurden nur noch 38,6% der Kontroll-

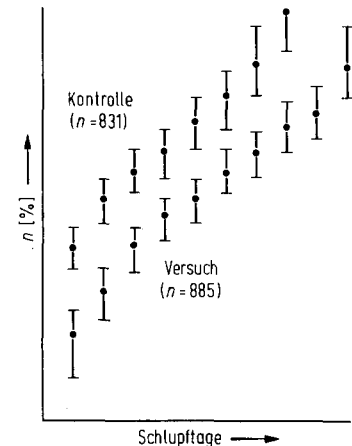
Tabelle 1. Einwirkung von Hefemangel auf die Ei-Rate von *Drosophila melanogaster* — ♀♀ während der ersten Legetage ( $F_1$ – $F_3$ )

Behandlung und Generation	n	Ansätze	Dauer der Ablage (Std.)	Eier			$\chi^2$	P
				n	je ♀	%		
$P_1$ $F_1$ $F_2$ $F_3$								
+ —	12			766	63,8	38,6	44,8994	
+ +	6			991	165,2	100,0	—	
			72					0,0005
+ — —	10			277	27,7	14,9	63,0288	
+ — +	13			1374	105,7	56,9	22,0103	
+ + +	8			1462	185,8	100,0	—	
			48					0,0005
+ — + +	12			482	40,2	73,1	13,8050	
+ + + +	6			330	55,0	100,0	—	

Tabelle 2. Einfluß von Hefemangel in der  $F_1$ -Generation auf die Zahl der geschlüpften Individuen und der zahlenmäßige Ausgleich des Effekts in der normal gehaltenen  $F_2$

Behandlung und Generation (+ = mit, - = ohne Hefe)			Ansatz $n$ Pärchen	Imagines				$\chi^2$	$P$
$P_1$	$F_1$	$F_2$		♀♀	♂♂	insgesamt	% je ♀		
+	-	-	22	171	173	344	9,4	61,22	0,0005
+	-	+	5	516	369	885	106,5	0,205	0,70
+	+	+	5	448	383	831	100	-	-

Abb. 1. Tägliche Schlupfraten in der  $F_2$  von *D. melanogaster* nach  $P_1$ -Eiablage und  $F_1$ -Entwicklung in hefefreiem Medium



werte an  $F_1$ -Eiern erzielt. Erstreckte sich die Versuchsdauer auch noch auf die unter Hefemangel aufgewachsene  $F_1$ , dann ging die Eizahl in der  $F_2$  während der ersten 3 Tage nach dem Ansatz sogar auf 15% der normalen Legeleistung zurück.

Wurden  $F_1$ -Tiere, die bei Mangeldiät aufgewachsen waren, ihrerseits zur Eiablage wieder unter normalen Futterbedingungen gehalten, so stieg ihre Legerate gegenüber der bei Hefemangel erzielten während der ersten 72 Std. zwar deutlich an, erreichte jedoch mit nur 57% erst etwa die Hälfte des Vergleichswertes. Erhielten diese normal aufgezogenen  $F_2$ -Tiere in der nächsten Generation erneut normale Futterbedingungen, so zeichnete sich (nach 48 Std.) mit weiterhin steigender Ei-Rate (73%) zwar ein weiterer Ausgleich zwischen Versuch und Kontrolle ab, aber der in der  $P_1$  gesetzte Effekt war noch immer nicht völlig abgeklungen. Die sämtlichen Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollwerten waren signifikant. Die Beobachtungen beruhten auf 47 Versuchs- und 20 Kontrollansätzen mit  $n = 2899$  bzw.  $n = 2983$  Eiern.

Wie die parallel angestellten Versuche zur Ermittlung der Individuenzahl in den  $F_2$ -Kulturen aus Behandlungsserien ergaben, bei denen die Fliegen diesmal in den üblichen Zuchtröhrchen abgelegt hatten, handelte es sich bei der zuvor gefundenen Herabsetzung der Eizahl nicht um einen absoluten Rückgang in der Eiproduktion. Die Zahl der  $F_1$ -Individuen hatte zwar in dem hefefreien Medium mit weniger als 10% der Normalwerte außerordentlich niedrig gelegen, aber dieselben bei Mangeldiät aufgewachsenen  $F_1$ -Tiere entwickelten ihrerseits in der nächstfolgenden Generation unter normalen Ernährungsbedingungen und gemessen an der Zahl der von ihnen produzierten Individuen wieder ihre volle Fertilität. Dennoch blieb aber der Einfluß einer in der  $P_1$  wirksamen Behandlung weiterhin nachweisbar, denn die zahlenmäßig gleich große Ausbeute in Versuch und Kontrolle war dadurch zustande gekommen, daß entsprechend der für die  $F_1$  bereits beschriebenen und hier ebenfalls beibehaltenen verzögerten Eiablage,

das Schlüpfen der  $F_2$ -Tiere nach allgemein verzögertem Schlupfbeginn um zwei Zähltag, also um 48 Std. länger anhielt. Diese Effekte lassen sich der Abb. 1 sowie Tab. 2 entnehmen. Bei  $n = 885$  bzw. 831 Individuen in Versuch und Kontrolle erforderten die Versuchsröhrchen zwei Auswertungen mehr bis zum Schlupfende in dieser Generation. Die Mangeldiät hatte sich demnach in ihrer Nachwirkung auf eine herabgesetzte Entwicklungsgeschwindigkeit beschränkt. Ob außer der  $F_2$ -Eireifung und -ablage auch noch die Larvenstadien und/oder die Puppenruhe in Mitleidenschaft gezogen waren, kann hier nicht entschieden werden. Jedenfalls blieb die täglich bestimmte prozentuale Ausbeute in Versuch und Kontrolle die gesamte Auswertungszeit über signifikant verschieden.

## II. Versuche mit Thymidin-Zufütterung

Die Versuche, in welchen der Einfluß verschiedener Thymidin-Konzentrationen zu prüfen war, liefen nur mit Zuchtröhrchen.

Die Auszählung der geschlüpften  $F_1$ -Tiere begann bei den Kontrollen am 11. Tag nach dem Ansatz, in den Versuchsgruppen mit einem Schlupfverzug von 48–72 Std., der vermutlich über direkte Störungen der Entwicklungsabläufe durch das Nucleosid zustande kam, jedoch in seinen Voraussetzungen hier nicht näher analysiert werden konnte. Insgesamt wurden aus 132 Zuchten  $n = 11004$  Versuchs- und  $n = 4546$  Kontrolltiere lebend ausgewertet.

In allen  $F_1$ -Serien mit dem Thymidinsubstrat traten bei vergleichsweise nicht signifikant verminderter Fertilität ( $\chi^2 = 9,7699$ ;  $P < 0,005$ ) neben normalen Individuen Anomalien in vielfältigen Ausprägungen auf, deren Zahl praktisch mit der Dosis anstieg und zwischen 4,9% (4 mg) und 12,7% (12 mg) bzw. 11,4% (16 mg) lag. Der Vergleichswert in den Kontrollen betrug 0,5%. Weder der Ausprägungsgrad der einzelnen Aberrationen noch ihr Auftreten hingen von bestimmten Konzentrationsbedingungen ab.

Hauptsächlich waren die Flügel von den anomalen Ausprägungen betroffen. Neben den nicht näher zu

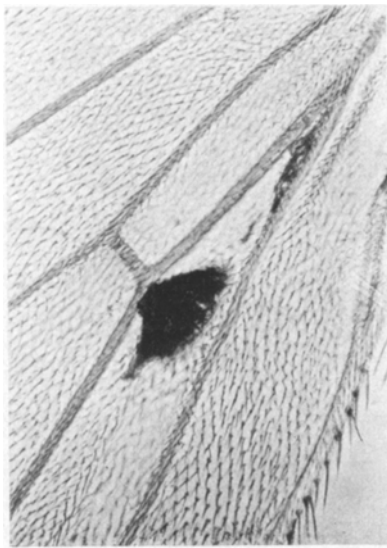


Abb. 2. Detail aus einem *D. melanogaster*-Flügel mit dunklen Ablagerungen bei einem ♀ aus der Thymidin-Serie (16 mg)

spezifizierenden schlecht entfalteten Formen, die im Typ gelegentlich auch bei der Kontrolle zu finden waren, traten in den Versuchsserien Aberrationen wie „blistered“ (blasig), „plexus“ (Aderverschmelzungen), „short wing“ (kurzer Flügel), „nicked/notched“ (verschieden starke distale Einkerbungen) und „jaunty“ (gerollt) auf. Dazu fanden sich Tiere mit „Dakelbeinen“ und abnormem Abdomen, wie sie phänotypisch sämtlich aus dem Inventar der genetisch analysierten klassischen *Drosophila*-Phänotypen bekannt sind. In einigen Fällen fanden sich gut proportionierte Zwergformen neben Tieren mit sehr dunklen, unregelmäßigen und nicht homogenen Ablagerungen in Flügeln (Abb. 2), Beinen oder auch im Körper (meist im Abdomen). Einige wenige Intersexe vervollständigen das durchaus uneinheitliche Bild.

Mit steigendem Thymidingehalt hatte sich in der  $F_1$  das Geschlechtsverhältnis bei den lebend ausgezählten Individuen laufend zugunsten der ♂♂ verschoben: ausgehend von 100 ♀♀: 95 ♂♂ in den 13  $F_1$ -Kontrollen ( $n = 3840$ ), entfielen in der Serie mit 16 mg Thymidin ( $n = 519$ ) auf 100 ♀♀ am Ende 175 ♂♂ (Tab. 3).

Tabelle 3. Einfluß des Thymidins auf das Geschlechtsverhältnis bei behandelten lebend ausgezählten  $F_1$ -Tieren

Dosis in mg	n Ansätze	lebend geschlüpfte			
		n	♀♀	♂♂	n ♂♂ je 100 ♀♀
4	5	941	420	521	124,1
8	13	2013	905	1108	122,4
12	13	1295	514	781	151,9
16	8	519	189	330	174,6
Kontrolle	13	3840	1969	1871	95,0

Dieses abnorme Geschlechtsverhältnis unter den lebend ausgewerteten Tieren ließ sich jedoch weitestgehend regulieren, wenn man den ungewöhnlich hohen Anteil an steckengebliebenen oder kurz nach dem Schlupf gestorbenen  $F_1$ -Individuen, also die letalen und subletalen Typen mit berücksichtigte, der sich in allen Serien nach dem Ausschlämmen einzelner Kulturen (insgesamt 24) nach abgeschlossener Auszählung der lebend auswertbaren Tiere ergab (Tab. 4).

Tabelle 4. Geschlechtsverhältnis bei der Gesamtzahl definierter Individuen (lebender Imagines, Larven, Puppen und kurz nach dem Schlupf abgestorbener Tiere) in  $n = 24$  ausgeschlammten Kulturen aus den Thymidinserien

Dosis in mg	<sup>n</sup> An- sätze	Definierte					Undefinierte	
		<i>n</i>	♀♀	♂	♂♂	<sup>n</sup> ♂♂ je 100 ♀♀	<i>n</i>	%
4	2	404	205		173	84,4	26	6,4
8	5	1292	517		488	94,4	287	22,2
12	10	2378	889	3	872	98,1	614	25,8
16	4	1026	355		323	90,9	348	33,9
Kon- trolle	3	1064	511		502	98,2	51	4,8

Auf diese Weise kamen zu den von 21 Versuchsröhrchen bis dahin ausgezählten  $n = 1949$  noch weitere 3151 Individuen, also mehr als 60% der Gesamtausbeute, hinzu. Die Anteile an Abgestorbenen lagen in den einzelnen Gruppen proportional den gebotenen Thymidin-Konzentrationen zwischen 25,5% (4 mg) und 90,2% (12 mg) und in den Kontrollen bei 10,1%. Die stärkste Konzentration — 16 mg — führte zu 79,1% steckengebliebenen oder kurz nach dem Schlupf abgestorbenen Individuen.

Der signifikant größere Teil dieser nachträglich ausgewerteten Tiere war weiblichen Geschlechts (zwischen 13,6% und 27,2%; Kontrollen 2,8% aller Tiere) und gestattete so einen beträchtlichen Ausgleich des zuvor für die lebenden Imagines ermittelten Geschlechtsverhältnisses. Nach der Korrektur entfielen jetzt auf 100 ♀♀ zwischen 84,4 ♂♂ (4 mg) und 98,1 ♂♂ (12 mg) und in der Behandlungsgruppe mit 16 mg 90,9 ♂♂. Der Kontrollwert hatte sich entsprechend von 95,0 ♂♂ auf 98,2 ♂♂ je 100 ♀♀ verschoben.

Neben den ihrem Geschlecht nach zu identifizierenden blieb bei den ausgeschlammten Ansätzen ein nicht unbeträchtlicher Rest (6–34% im Versuch; 4,8% in der Kontrolle) an nicht einzuordnenden Individuen übrig, der im wesentlichen aus zerfallenen Tieren aller Entwicklungsstadien bestand (das Ausschlämmen erfolgte etwa 4 Wochen nach dem Ansatz).

Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß durch diese nicht einem Geschlecht zuzuordnenden Individuen das Verhältnis von ♀♀: ♂♂ erneut verschoben worden wäre, sind auch die zuvor korrigierten Werte nicht als definitiv zu betrachten.

Tabelle 5. Anteile lebender anomaler und nicht geschlüpfter Tiere an der Gesamtzahl aus Thymidinserien aus 24 ausgeschlammten  $F_1$ -Kulturen aller Thymidin-Behandlungsserien

Gruppe	n Kulturen	n lebend geschlüpft o. B.		n lebend geschlüpft anomal			n nicht geschlüpft				n ins- gesamt	Anteil leben- der anomaler und nicht geschlüpfter Tiere		$\chi^2$	P ≪
		♀	♂	♀	♀	♂	♀	♂	undef.	%		n	%		
4 mg	2	145	143	5		8	55	22	26	25,5	404	116	28,7	9,4	0,005
8 mg	5	188	285	42		52	287	151	287	53,3	1292	819	63,4	57,7	0,0005
12 mg	10	250	453	66	3	95	573	324	614	90,2	2378	1675	70,4	72,1	0,0005
16 mg	4	69	134	7		4	279	185	348	79,1	1026	823	80,2	95,1	0,0005
Kontrolle	3	478	474	3		2	30	26	51	10,1	1064	112	10,5	—	—

Durch die Berücksichtigung der steckengebliebenen und kurz nach dem Schlüpfen abgestorbenen Tiere, die den letalen und subletalen Thymidindosen zum Opfer gefallen waren, veränderte sich entsprechend auch der prozentuale Anteil an den Schäden insgesamt. Die nur für die ausgeschlammten 24 Kulturen geltenden Werte lagen damit zwischen 28,7% (4 mg) und 80,2% (16 mg Thymidin) und erreichten in den Kontrollen 10,5%. Die Differenzen zwischen Versuchs- und Kontrollwerten waren bis auf den nur zweifach gesicherten Unterschied bei der schwächsten Dosierung (4 mg  $P < 0,005$ ) alle signifikant (Tab. 5).

Aus Gründen der Vollständigkeit sei noch darauf hingewiesen, daß unter den nachträglich ausgezählten Individuen, an denen Puppenstadien einen entscheidenden Anteil besaßen, in den Gruppen mit höheren Thymidin-Konzentrationen ebenfalls eine Reihe von Anomalien zu beobachten waren, deren Zahl nur bei der 16 mg-Dosis offensichtlich zugunsten stärkerer letaler Störungen auf frühen Entwicklungsstadien niedriger lag. Neben 22 Weißbäugigen (20 ♀♀, 2 ♂♂) fielen besonders die als „kopflös“ registrierten Puppen auf, bei denen Thorax mit Beinen und Flügeln sowie das Abdomen noch angelegt sein konnten, anstelle des Kopfes mit den häufig stark reduzierten Augen im Extremfall nur ein Höcker mit den Resten der larvalen Mundwerkzeuge getreten war. „Kopflös“ dieses Typus oder doch tote Individuen mit sehr

kleinem Kopf fanden sich in allen Serien mit höherem Thymidingehalt  $6 \times$  bei ♀♀ und  $12 \times$  bei ♂♂.

**Die Nachzuchten:**  $F_2$  bis  $F_6$ . Da die Versuche in erster Linie dazu dienen sollten, die Frage der sogenannten temporären Prägung, des modifikativen Erhaltenbleibens von nicht-erblichen Veränderungen, zu klären, wie sie mit abklingender Tendenz als Folgen einer einmaligen Behandlung von Tieren einer Generation auch in deren Nachzuchten auftreten können, wurden aus den Kulturen der Thymidin-Behandlungsserien möglichst viele Pärchenzuchten angesetzt. Die auf diese Weise weiter vermehrten Tiere waren, von einer Rückkreuzung abgesehen, entweder Geschwister oder stammten aus Parallelzuchten innerhalb gleicher Behandlungsgruppen. In praktisch jedem Fall wiesen die Eltern der Nachzuchten aus den Versuchsserien nach Möglichkeit beide oder doch einer von ihnen irgendeine Anomalie auf. Waren beide Eltern abnorm, so handelte es sich häufig um den gleichen Phänotypus.

Lebensfähigkeit und Fortpflanzung der Tiere waren in den Nachzuchten in unterschiedlichem Maß beeinträchtigt. Die Ausfälle lagen in der  $F_2$ , beispielsweise, bei etwa 30% aller Ansätze und gingen offenbar ebenso oft zulasten der ♀♀ wie der ♂♂. Auch die Legerate variierte z. T. erheblich (Tab. 6). Fälle echter Sterilität fielen dabei nicht auf. Das Geschlechtsverhältnis der ausschließlich lebend ausge-

Tabelle 6. Sporadisches Auftreten von  $F_1$ -Anomalien in unbehandelten Nachzuchten aus Thymidinserien und temporäre Signifikanz eines Merkmals mit nachfolgender Rehabilitation

Generation	n An- sätze	n lebend gewertet		Anomalien																$\chi^2_c$	P ≦				
				Flügel		Tho- rax		Augen		Beine		Abdo- men		Zwerg- wuchs		n Anomale insgesamt									
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂			n	%		
		♀	♂	n	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀			♂	n	%	
Ver- such	F <sub>1</sub>	12	790	972	1762	34	34	14	3	9	8	8	2	20	9	1	4	2	86	2	60	148	8,4	5,60	0,025
	F <sub>2</sub>	21	717	679	1396	7	8					1	2	4	2	1		2	13	2	12	27	1,9	0,07	—
	F <sub>3</sub>	9	174	167	341	4	11												4		11	15	4,4	1,75	0,20
	F <sub>4</sub>	5	271	251	522	43	64				1	2		2	2			1	48	1	66	115	22,0	21,03	0,0005
	F <sub>5</sub>	6	381	332	713	1	28						1		1	1		1	2	1	30	33	4,6	1,93	0,20
	F <sub>6</sub>	7	277	280	557	7	3										2	1	7	1	5	13	2,3	0,23	0,70
Kon- trolle	F <sub>1-3</sub>	21	2330	2216	4546	15	7							1					16		7	23	0,5	—	—

werteten Individuen aus den Nachzuchten bewegte sich innerhalb normaler Schwankungsbereiche.

In der  $F_2$  traten in den normal gehaltenen Nachzuchten aller Versuchsgruppen wiederum Anomalien der bereits bekannten Ausprägungen auf, deren Zahl jedoch gegenüber der  $F_1$  mit Werten zwischen 1,7% (12 mg) und 7,0% (16 mg) überall zurückgegangen war, aber immer noch — allerdings nicht signifikant — etwas höher lag als bei den Nachzuchten aus den Kontrollen (0,5%).

In den weiteren Generationen ( $n = 59$ ;  $F_3$ – $F_6$ -Einzelzuchten) erhielt sich die in der  $F_2$  beobachtete Tendenz zur Normalisierung. Auffallend war dabei, daß zwar die Häufigkeit der Anomalien insgesamt abnahm, die auftretenden Aberrationstypen jedoch den in der  $F_1$  gefundenen durchaus entsprachen, eine Erscheinung, die als qualitative Nachwirkung gedeutet werden könnte. Stellvertretend für das Verhalten in allen Serien sei auch in diesem Zusammenhang auf Tab. 6 verwiesen. Jedenfalls waren die  $n = 4546$  Kontrollen mit 0,5% an Anomalien mit Ausnahme einiger Individuen mit unspezifisch schlecht entfalteten Flügeln sowie 1 ♀ mit abnormem Abdomen frei von solchen Aberrationen. In die gleiche Richtung wiesen auch die vergeblichen Selektionsversuche bei den jeweiligen Eltern: Ohne Rücksicht auf deren Phänotypen waren in den betr. Nachzuchten immer wieder beliebige Anomalien anzutreffen. Zwei Ausnahmen von diesem Verhalten betrafen Generationsfolgen, in denen bevorzugt jeweils eine Flügel-Anomalie auftrat, „kurzer Flügel“ im einen und „jaunty“ (aufgerollt) im anderen Fall.

**Kurzer Flügel.** Hatte sich in den meisten Fällen die Selektion zugunsten einzelner Aberrationstypen als erfolglos erwiesen, so ließ sich die Häufigkeit der in  $F_1$  und  $F_2$  vereinzelt, in  $F_3$  bei einer von zwei Zuchten mit zusammen  $n = 75$  Individuen 11 × aufgetretenen kurzflügeligen Form in der  $F_4$  (4 Zuchten;  $n = 522$ ) signifikant auf 18,2% steigern. Die Gesamtrate aller Anomalien lag hier bei 22,0%. In der  $F_5$  mit 6 Zuchten ( $n = 713$ ) ging der Anteil kurzflügeliger Individuen indessen trotz anhaltender Selektion wieder eklatant zurück auf 3,4% (Anomalien insgesamt: 4,6%). Von den Eltern dieser 713  $F_5$ -Tiere aus 6 Zuchten waren 3 × beide Teile kurzflügelig gewesen, einmal hatte nur das ♀ und 2 × jeweils das ♂ die Anomalie besessen. Der vorübergehend erhöhte Anteil an Kurzflügeligen erwies sich damit nicht als genetisch determinierte Änderung. Die vorstehenden Befunde sind in Tab. 6 zusammengestellt.

**jaunty.** Im anderen Fall — „jaunty“ — ließ sich die aberrante Flügelhaltung in 4  $F_2$ -Zuchten bei 15,4% der Tiere ( $n = 279$ ) signifikant erhalten ( $\chi^2 = 13,679$ ;  $P < 0,0005$ ) und durch weitere Selektion in 6  $F_3$ -Zuchten ( $n = 406$ ) auf 37,9%, ferner in 2  $F_4$ -Zuchten ( $n = 284$ ) auf 73,9% steigern. Die als „jaunty“ bezeichnete anomale Flügelhaltung hatte sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit als erblich fixierte, wenn auch offensichtlich nicht als autonome

Änderung erwiesen. Ein genetischer Vergleich der „jaunty“-Mutante mit ihrem klassischen Vorbild unterblieb. Im vorliegenden Fall ließen sich die Penetranzverhältnisse der Aberration mit Hilfe eines gleichzeitig wirksamen Verstärker-Gens nach Art der von Goldschmidt (1937) beschriebenen Dominigene erklären. Dieses könnte sowohl bereits unauffällig im Ausgangsmaterial vorhanden gewesen als auch zusätzlich durch Mutation entstanden sein. Eine Steigerung der Penetranz durch erhöhte Temperatur, wie sie bei dem klassischen jaunty-Gen möglich ist, kommt im vorliegenden Fall nicht in Frage.

### Diskussion

Die in den Versuchen mit *Drosophila* beobachteten temporären Prägungen, die sich über das Keimbahnplasma, auf Grund der Erfahrungen bei Hühnern offenbar vorwiegend, wenn nicht ausschließlich, über das der ♀♀ auswirkten, sind eher phänomenologisch zu beschreiben als kausal zu deuten. Erste Hinweise gestatten hier vielleicht die Art und Weise, in der sich solche Effekte manifestieren und die eine gewisse Zuordnung der entstandenen Beeinträchtigungen erlauben. Unter diesem Aspekt ist die Reaktion von *Drosophila* auf das Mangelsubstrat mit verlangsamter Entwicklung als Folge eines Eingriffs in quantitativ lenkbare Abläufe zu verstehen. So erweisen sich die bei Hefemangel auftretenden Entwicklungsverzögerungen, seien es die durch das langsame Reifen der Eier als Direktwirkung hervorgerufenen, seien es die verzögerten larvalen und pupalen Abläufe, die bereits eine indirekte Beeinflussung darstellen, nach Normalisierung der Nahrung als graduell umkehrbar. Eine ähnliche nur schrittweise reparable Wirkung erzielten Cowley und Griesel (1966) bei ihren unter Proteinmangel gehaltenen Ratten, deren normal aufgewachsene Nachzucht eine Verzögerung von Wachstum, Entwicklung und Lernfähigkeit erkennen ließen, Störungen, die ebenfalls nicht durch die Haltung einer einzigen Generation unter wieder normalisierten Futterbedingungen abklangen. Vergleichbare Beobachtungen an *Phryne* ergaben sich ebenso bei herabgesetzter Zuchttemperatur in einer (oder mehr als einer) Generation, die eine weiterhin verlangsamte Entwicklung in einer wieder unter normalen Temperaturbedingungen aufwachsenden nach sich zog (B. E. Wolf; mdl. Mitt.).

Es hat demnach den Anschein, als liefen hier quantitativ reduzierte Lebensäußerungen auf Grund von Mangelernährung in normaler Zuchttemperatur und die durch niedrige Temperaturen abgebremste Ausnutzung einer vollwertigen Nahrungsquelle über ein ähnliches, wenn nicht über das gleiche Steuerungssystem. Von dieser simplifizierenden Interpretation seien komplexe Manifestationen wie die Lernfähigkeit (= Intelligenz) von Ratten ausgenommen, obwohl sich, durch die Beobachtungen von Cowley und Griesel belegt, das Phänomen der quantitativen Reduktion hier ebenfalls realisierte.

Betreffen die unter Mangelbedingungen und bei niedrigen Temperaturen gefundenen Wirkungen eher eine Modulation genormter Abläufe noch im Rahmen einer adaptativ tragbaren Variationsbreite (wenn auch mehr oder weniger an deren Rand), so scheinen die durch Thymidin hervorgerufenen Effekte die somatische Substanz des Organismus selbst zu verändern. Wegen der Heterogenie der entstehenden phänotypischen Ausprägungen ergibt sich dabei das Bild zahlreicher stoffwechselabhängiger Alternativen im Verlauf des entwicklungsphysiologischen Geschehens, die ihrerseits als Ursache der auch in dieser Serie auftretenden Entwicklungsverzögerungen verantwortlich zu machen sein dürften. Daß die versuchsweise Selektion zugunsten einer spezifischen Anomalie im Regelfall nur wieder unspezifisch mit der Bildung aller nur möglicher phänotypischer Störungen beantwortet wird, schließt das Auftreten somatischer Mutationen durch Inkorporation des mutagenen Thymidins nicht aus. Falls es sich auch in den auf die Exposition folgenden normal gehaltenen Generationen um derartige somatische Veränderungen handelte, die auf Grund von plasmatischen, insonderheit von ooplasmatischen Abläufen während der Oogenese denkbar wären, müßte ein gewisses Vagabundieren der einmalig eingeführten Substanz im Plasma vorliegen, worüber jedoch noch keine Erhebungen bekannt geworden sind. Versuche mit markiertem Thymidin könnten hier weiterführen. Vielleicht gehören die allerdings vorwiegend in der  $F_1$  aus Behandlungsserien beobachteten, an praktisch allen Körperteilen der Fliegen auftretenden kleinen dunklen Ablagerungen hierher, die möglicherweise den somatischen Weg des Thymidins und bis zu einem gewissen Grad den seiner Elimination markieren.

Ungeklärt bleibt die hohe Ausfallrate der geschlüpften ♀♀ in den Thymidin-Behandlungsserien. Es wäre zu erwägen, ob die vergleichsweise umfangreichere Substanzbildung innerhalb des weiblichen Keimapparates, die gegenüber den Verhältnissen in den männlichen Geschlechtszellen einem erhöhten Thymidin-Einbau gleichkäme, bei Befruchtung solcher Eier mit einem X-Spermium, für das Kaplan (*et al.* 1964) eine nicht zufallsmäßige Häufigkeit des Thymidins angibt, die Ursache für die bevorzugte Schädigung weiblicher Frühstadien bildete. Dieser Gedanke gewinnt an Wahrscheinlichkeit angesichts der Beobachtung, daß der bei Hühnern gefundene Effekt hauptsächlich über das Ooplasma und die in der Nährschubstanz der Eier vorhandenen Stoffe zu laufen scheint, ohne daß hier indessen — vermutlich wegen der relativ geringen Konzentration der betr. Stoffe (Biostatica) — eines der Geschlechter bevorzugt geschädigt würde.

Ein dritter Modus der indirekten Beeinflussung scheint sich im Fall der temporären Prägung bei Hühnern zu präsentieren: Hier führte die Verabreichung von Weinen und Säften interspezifischer und gegen *Peronospora* resistenter Rebenherkünfte indirekt,

d. h. bei den unbehandelten Nachkommen aus Behandlungsserien, offenbar durch einen oder mehrere mit der Tränke eingeführte Stoffe zu ganz spezifischen Anomalien. Der Habitus der geschädigten Tiere vermittelt etwa das Bild, das sich bei Vitamin  $B_2$ -Mangel ergibt, so daß an die Möglichkeit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Blockierung innerhalb des speziell auf  $B_2$  ausgerichteten Vitaminstoffwechsels durch die betr. Biostatica zu denken wäre, eine Deutung, die bereits von Breider *et al.* (1965) erwogen worden ist. Ein versuchsweise sekundär möglicher Ausgleich in Form einer Zufütterung von Vitamin  $B_2$  an frisch geschlüpfte defekte Küken könnte vielleicht über die Stichhaltigkeit einer derartigen Erklärung mitentscheiden helfen.

Auch Mestizova (1967) sieht die Möglichkeit entsprechender kausaler Zusammenhänge zwischen der Katarakt-Bildung bei Ratten, die mit Heptachlor gefüttert worden waren und in deren unbehandelter  $F_1$  das gleiche Leiden noch während der Stillzeit aufgetreten war, und einer generell (hier offenbar durch das mit der Milch aufgenommene Heptachlor-eposid) gestörten Nutzung der in ausreichendem Maß gebotenen Vitamin-B-Quellen.

Im Hinblick auf eine temporäre Prägung mit stufenweisem Abbau des Effekts nach Beseitigung von dessen Ursache sind auch in der Natur einschlägige Beobachtungen gemacht worden. So beschreibt Autrum (1966) die mehrfach belegte Erscheinung, daß bei Erdmäusen (und an Laboratoriumsmäusen reproduzierbar) im Fall einer Übervölkerung nicht nur die unmittelbar betroffene Generation geschädigt ist und daß, wenn längst keine Übervölkerung mehr herrscht, die Nachkommen ( $F_2$ ,  $F_3$ ) im Wachstum vergleichsweise zurückbleiben.

Es scheint sich also bei dem Phänomen der modifikativen und reversiblen Prägung um eine verbreitete Reaktion nach Art der Dauermodifikation zu handeln, die sich einerseits in ihrer Ausprägung noch innerhalb der Grenzen physiologischer Variabilität hält, wie bei der veränderten Entwicklungsgeschwindigkeit von *Drosophila* durch Mangelbedingungen, und die andererseits, wie bei der Verfütterung des Nucleosids Thymidin, zu offenbar ungerichtetem Einbau der essentiellen Aminosäure in das Plasma und in somatische Kerne führen kann und die schließlich, wie im dritten Fall, nämlich der stofflichen Wirkung bestimmter Tränken bei Hühnern, möglicherweise einen Schwellenwert im Vitaminhaushalt nachhaltig verändert.

### Zusammenfassung

Um die bei Hühnern nach Verabreichung spezifischer Tränken beobachtete Erscheinung der temporären Prägung mit schrittweiser Rehabilitation in den folgenden Generationen auch bei einem anderen Organismus zu reproduzieren, wurde *Drosophila melanogaster* in einem Fall einer Mangeldiät ausgesetzt und erhielt in einer zweiten Versuchsserie mit dem Futter

eine Beimischung des Teratogens und Mutagens Thymidin in verschiedenen Konzentrationen.

Die hefelose Mangeldiät führte bei normal aufgewachsenen Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Ei-Rate während der ersten 48–72 Std. nach dem Ansatz. Dieser Effekt ließ sich durch das Beibehalten der Diät auch in der nächsten Generation weiterhin steigern.

In der aus einer Expositionsgeneration stammenden, wieder normal ernährten Nachzucht stieg die Legerate während der ersten Tage wieder etwas an, lag aber signifikant niedriger als der Vergleichswert.

Folgten zwei Generationen unter normalen Aufzuchtbedingungen auf eine unter Hefemangel aufgewachsene, so blieb die Legerate innerhalb der gleichen Beobachtungszeit weiterhin signifikant hinter der der Kontrolle zurück.

Wurden nach einer Generation bei Mangeldiät aufgewachsener Tiere in der jetzt wieder normal gehaltenen  $F_2$  statt der Eier zu Beginn der Ablage die Imagines bis zum Ende der Kulturdauer ausgewertet, so erwiesen sich die zuvor beobachteten Ei-Raten als das Ergebnis eines relativen, nicht eines absoluten Effekts: die Zahl der geschlüpften Individuen lag am Ende der Auszählung in Versuch und Kontrolle gleich hoch. Als Nachwirkung prägte sich hier jedoch eine gegenüber der Kontrolle um ca. 48 Std. verlangsamte Entwicklung der Kulturen insgesamt aus, die bei Versuch und Kontrolle eine Signifikanz zwischen den jeweils beiden prozentualen Anteilen an der täglichen Ausbeute ergab.

Nach Zufütterung von Thymidin fand sich in den Kulturen der unmittelbar betroffenen Generation neben vielfältigen Anomalien eine mit der Dosis stark ansteigende Rate an Letalen und Subletalen, in denen ihrerseits der Anteil der ♀♀ den der ♂♂ signifikant übertraf.

Entsprechend hatte sich bei den lebend ausgewerteten Tieren das Geschlechtsverhältnis stark zugunsten der ♂♂ verschoben.

In den wieder unter normalen Futterbedingungen aufwachsenden nachfolgenden Generationen ( $F_2$ – $F_6$ ) aller Behandlungsserien ließen sich die meisten der in der  $F_1$  aufgetretenen Aberrationen nicht selektieren. Bei nicht signifikanten Häufigkeiten, mit denen auch weiterhin Anomalien auftraten, blieb jedoch das Spektrum der in der  $F_1$  an fast allen Körperteilen beobachteten Veränderungen in späteren Generatio-

nen sporadisch und unabhängig von der phänotypischen Beschaffenheit der jeweiligen Eltern als offenbar unspezifische Störungen erhalten, während in der Kontrolle keine derartigen Aberrationen zu beobachten waren.

In einem Fall gelang es, die Häufigkeit einer Flügelanomalie durch Selektion vorübergehend und in einer Generation signifikant zu steigern. In einem weiteren Fall ließ sich die Zahl der Individuen mit einer anderen Flügelaberration, offenbar durch die gleichzeitige Wirkung eines (oder mehrerer) Dominogene auf eine echte rezessive Mutation, kontinuierlich erhöhen.

Die Ergebnisse werden vergleichbaren Befunden an Hühnern, Ratten und *Phryne* gegenübergestellt und die Voraussetzungen der reproduzierbaren temporären Prägung diskutiert.

#### Literatur

1. Autrum, H.: Tier und Mensch in der Masse. Jahresbuchbeilage zu „Die Natur“ 26–51 (1966). — 2. Breider, H.: Calidad y resistencia de la vid. Boletín no. 59 del Instituto Nacional de Investigaciones Agronomicas 289 to 307 (1968). — 3. Breider, H.: Qualité et Résistance. Rev. Horticultura et Viticulture, Numéro Spécial 7/8, 333 to 356, (1968). — 4. Breider, H.: Toxikologische Probleme in der Züchtung physiologisch resistenter Kulturpflanzen. Dtsch. Lebensmittelrundschau 67. Jgg., 67–78 (1971). — 5. Breider, H., Reuther, G., Wolf, E.: Untersuchungen zum Qualitätsproblem bei Rebenhybriden. Der Züchter 29, 317–334 (1959). — 6. Breider, H., Wolf, E., Schmitt, A.: Embryonalschäden nach Genuß von Hybridenweinen. Weinberg und Keller 12, 165–182 (1965). — 7. Breider, H., Wolf, E.: Über das Vorkommen von Biostatica in der Gattung *Vitis* und ihren Bastarden. Der Züchter 46, 366–379 (1967). — 8. Breider, H., Wolf, E.: Die Nachwirkung von Produkten resistenter, interspezifischer Reben-Arthybriden in unbehandelten Nachzuchtgenerationen (dargestellt in Versuchen mit Hühnern). TAG 1971 (im Druck). — 9. Cowley, J. J., Griesel, R. D.: The effect on growth and behaviour of rehabilitating first and second generation low protein rats. Animal Behav. 14, 506–517 (1966). — 10. Goldschmidt, R., Höner, E.: Gene and character, VI. Dominigenes and vg allelomorphs. Univ. of Calif. Publ. Zool. 41, 297–312 (1937). — 11. Kaplan, W. D., Gugler, H. D., Kidd, K. K., Thinderholt, V. E.: Nonrandom distribution of lethals induced by tritiated Thymidine in *Drosophila melanogaster*. Genetics 49, 701–714 (1964). — 12. Mestizova, M.: On reproduction studies and the occurrence of cataracts in rats after long-term feeding of the insecticide Heptachlor. Experientia 23, 42–43 (1967). — 13. Parkash, O.: Thymidine teratogenesis and mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Experientia 23, 859–861 (1967). — 14. Wolf, E., Reuther, G.: Das Futterwahlvermögen von *Drosophila* im Hinblick auf verschiedene Weinhefe-Populationen. Biol. Zbl. 78, 813–821 (1959).

Eingegangen am 1. April 1971

Angenommen durch H. Stubbe

Dr. Elisabeth Wolf

Bayerische Landesanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau

Residenzplatz 3

D-87 Würzburg 1 (Germany/BRD)