

Vorversuche zu genetischen Experimenten mit drei verschiedenen Stämmen von Brachionus plicatilis M. (Rotatoria)

Agnes RUTTNER-KOLISKO

Anlaß und Ziel der Arbeit

Die Kulturen von Brachionus plicatilis, die seit mehr als 15 Jahren in unserem Labor gehalten werden, haben seit längerer Zeit die Fähigkeit zur Bildung von Dauereiern verloren, obwohl in einigen Subkulturen miktische (Sexual-) Weibchen und Männchen auftreten. Dieser offenbar erbliche Defekt wurde zum Anlaß genommen, um frühere genetische Versuche mit Rotatorien (RUTTNER-KOLISKO 1968, 1969) wieder aufzunehmen. Ziel der Untersuchung ist zunächst, durch Einkreuzung von Stämmen mit normaler sexueller Fortpflanzung festzustellen, ob der Erbdefekt des Lunzer Stammes auf "male sterility" oder auf einen physiologischen Defekt der miktischen Weibchen zurückzuführen ist. Nach Klärung dieser Frage soll versucht werden, mit Hilfe dieser genetischen Markierung durch weitere Kreuzungsexperimente neue Fakten zum bisher unzureichend bekannten und anscheinend unorthodoxen Erbgang der Rotatorien beizutragen (siehe BIRKY 1965, 1967, KING 1980).

Methodik

Kreuzungsexperimente mit Rotatorien stoßen aus verschiedenen Gründen auf große methodische Schwierigkeiten und erfordern dementsprechend viel Zeit, Geduld und vor allem Glück. Das dürfte vermutlich auch der Grund sein, warum bisher so wenig Literatur auf diesem für die gesamte Biologie der Gruppe so wichtigen, aber auch für allgemein genetische Fragen interessanten Gebiet besteht.

1. Amiktische (parthenogenetische) und miktische (sexuelle) Weibchen sind morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden, sondern erst in adultem Zustand durch Größe und Zahl der angehefteten Eier zu identifizieren. (Bestehende Unterschiede im Feinbau sind für Arbeiten mit lebenden Tieren unbrauchbar.)

2. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß nur ganz junge miktische Weibchen erfolgreich begattet werden können, bei der Gattung *Brachionus* etwa innerhalb der ersten 24 Lebensstunden.

3. Rädertier-Männchen (Zwergmännchen ohne Nahrungsaufnahme) sind nicht ganz so kurzlebig wie allgemein angenommen wird; in unseren Kulturen leben *Brachionus-plicatilis*-Männchen bis zu vier Tage. Es ist aber nicht bekannt, ob die Männchen während ihres ganzen Lebens begattungsfähig sind oder ob sie ihren gesamten Spermavorrat bei einer einzigen, ersten Kopulation verbrauchen. Die große Schwimmaktivität und die ständigen Versuche, mit allen begegnenden Objekten (junge und adulte Weibchen, andere Männchen, Detrituspartikel) zu kopulieren, bleiben jedenfalls während des ganzen Lebens erhalten.

4. Dauereier brauchen für ihre Entwicklung eine Latenzzeit und einen Umweltstimulus, scheinen aber auch einem gewissen physiologischen Rhythmus zu unterliegen. Verschiedene Entwicklungsauslöser (Temperatur, Austrocknung, Konzentration des Mediums) werden für verschiedene Arten, aber auch für dieselbe Art, von verschiedenen Autoren angegeben. In unseren Kulturen war zu beobachten, daß von etwa gleich alten, unter gleichbleibenden Bedingungen aufbewahrten Dauereiern von Zeit zu Zeit eine größere Anzahl schlüpfte, in der Zwischenzeit jedoch gar keine. Trotz einer Fülle von Beobachtungen fehlt eine exakte Untersuchung der physiologischen Schlüpfmechanismen noch vollständig.

Aus den angeführten Tatsachen ergeben sich die Schwierigkeiten einer Versuchsanordnung, die tragfähige Schlüsse zuläßt. Um sicherzustellen, daß frisch geschlüpfte miktische Weibchen mit begattungsfähigen Männchen des einzukreuzenden Stammes in Kontakt kommen können, wird in jedem Versuch von einigen adulten amiktischen Weibchen (am ♀) des einen und einigen adulten miktischen Weibchen (m ♀) des anderen Stammes ausgegangen, die in einer Embryoschale zusammengebracht werden. Zur Verfügung stehen uns: ein normal fertiler Stamm aus Boulder, Colorado (im folgenden als Stamm E bezeichnet), ein ebenso normaler Stamm (S) aus Oban, Schottland, sowie unser steriler Stamm (L) aus Lunz. Aussicht auf Erfolg haben Kreuzungen nur dann, wenn beide Stämme eine hohe miktische Rate aufweisen, die zu Beginn des Versuches durch Auszählen einer möglichst großen Zahl adulter Tiere festgestellt wird. Das Kreuzungsgefäß wird nun täglich kontrolliert und die produzierten jungen Weibchen des einen Stammes zusammen mit

einer großen Zahl von Männchen des anderen Stammes in einer anderen Schale bis zum Adultstadium aufbewahrt. Mit dieser Versuchsanordnung wird erreicht, daß einerseits die juvenilen Weibchen von Geburt an ausreichend mit kopulationsfähigen Männchen des Kreuzungspartners versorgt sind, und andererseits wird vermieden, daß in dem ursprünglichen Kreuzungsgefäß unbefruchtete miktische Weibchen zur parthenogenetischen Produktion stammeseigener Männchen übergehen und so das Experiment verfälschen. Aus demselben Grund müssen in den Nachzuchtgefäßen alle Tiere entfernt werden, sobald sie sich durch ihr erstes Ei als miktisch oder amiktisch erwiesen haben. Die Versuche werden durchwegs bei 15°C durchgeführt, da bei dieser Temperatur zwischen Auftreten und Schlüpfen eines Eies ein Zeitraum von 2-3 Tagen liegt, wodurch ein genügend großer Beobachtungsspielraum gegeben ist. Weibchen, die befruchtet sind, werden separiert und die produzierten Dauereier (D) für weitere genetische Experimente aufbewahrt. Da die 3 Stämme sich morphologisch nicht unterscheiden, muß das verwendete Glasmaterial (Schalen, Pipetten 17) sorgfältig bezeichnet und getrennt werden, um eine Vermischung der Stämme mit Sicherheit auszuschließen. Für die verlässliche Betreuung der Stammkulturen bin ich Frau Josefa AIGNER sehr zu Dank verpflichtet.

Bisher vorliegende Ergebnisse

Die bisher durchgeführten Kreuzungsversuche sind in den Tabellen I-III zusammengestellt; im folgenden werden die dabei gemachten Erfahrungen und Fehlschläge diskutiert.

Mit dem Lunzer Stamm wurden 6 Versuche durchgeführt, davon verliefen 3 ohne miktische Nachkommen, das mit E ♂ produzierte L-Dauerei war nicht voll entwickelt (Vers. Nr. 2), in Versuch 6 ist die Befruchtung des E ♀ durch L ♂ nicht zweifelsfrei

sichergestellt und der negative Verlauf des Vers. 3 kann auf die geringe Zahl der zur Verfügung stehenden miktischen Weibchen ebenso zurückzuführen sein, wie auf Sterilität der L ♂. Obwohl noch keineswegs gesichert, scheinen diese Resultate aber eher auf einen Defekt der Weibchen als auf Sterilität der Männchen des L-Stammes hinzuweisen.

Kreuzungen zwischen dem Lunzer Stamm L und dem schottischen Stamm S stehen noch aus, lassen aber mit Sicherheit weitere Resultate hinsichtlich der Ursachen der Sterilität des L-Stammes erwarten.

Inzwischen haben wir jedoch auf anderem Wege Hinweise über die Art des in diesem Stamm auftretenden Defektes: elektronenmikroskopische Schnittbilder der L ♂* zeigen im Hoden typische Geißelquerschnitte, was auf normal ausgebildete, funktionsfähige Spermien schließen läßt; damit stimmt das Ergebnis von Versuch 6 überein. Andererseits zeigen manche Weibchen des L-Stammes einen immer größer und dunkler werdenden Dotterstock (Beobachtung in Einzelkulturen) und produzieren schließlich ein dauerei-ähnliches Gebilde, dem aber die typische doppelte Eischale fehlt; dem entspricht das Ergebnis von Versuch 2.

Ein unerwartetes Resultat zeitigten die Kreuzungen der beiden in sich voll sexuellen Stämme E und S (15 Versuche); eine Befruchtung ist offenbar nur in einer Richtung möglich, während die reziproke Kreuzung steril bleibt. Das positive Resultat der Kreuzung E ♀ x S ♂ steht außer Frage, nicht nur wegen des Versuches Nr. 21, bei dem über 100 junge Weibchen zur Verfügung standen, von denen ein Drittel miktisch war und 10 Dauereier produzierte, sondern vor allem auch wegen der Dauereibildung in den sehr ungünstigen Fällen (Nr. 12 u. 19), in denen nur 1-2 miktische Tiere vorhanden waren.

* Für die Durchführung der elekt-mikr. Aufnahmen bin ich Fr. Dr. T. KLEPAL, Zool. Inst., Univ. Wien, sehr zu Dank verpflichtet.

Im Gegensatz dazu verlief die reziproke Kreuzung $S \varphi \times E \sigma$ in allen 9 Fällen negativ, obwohl die Chance einer Befruchtung z.T. wesentlich größer war (Vers. 10 u. 13) als im umgekehrten Fall. Trotzdem kann dieses Resultat wegen der zumeist geringen Zahl der Versuchstiere oder der niedrigen miktischen Rate nicht als gesichert angesehen werden.

Aus allen 21 Kreuzungsversuchen insgesamt können folgende gemeinsame Ergebnisse abgelesen werden::

1. alle Kreuzungen mit einer miktischen Ausgangsrate von 30% oder weniger verliefen ohne Ergebnis;
2. ebenso waren alle Versuche ergebnislos, bei denen die Nachkommenzahl 20 nicht überschritt;
3. die miktische Rate der Nachkommen kann sich im Verlauf eines länger dauernden Versuches gegenüber der Ausgangsrate grundlegend ändern und dadurch auch ein zahlenmäßig ausreichendes Ergebnis unbrauchbar machen (Vers. Nr. 20);
4. nur bei konstanter miktischer Rate und hoher Nachkommenzahl kann auch ein negatives Resultat als tragfähig angesehen werden.

In künftigen Experimenten muß daher eine große Zahl von Nachkommen (>100) innerhalb einer möglichst kurzen Zeit (2-3 Tage) und ausgehend von einer miktischen Rate von mindestens 50% erreicht werden, um schlüssige Resultate sicherzustellen.

Abschließend ist in einem einfachen Übersichts-Schema, das keiner weiteren Erläuterung bedarf, das Ergebnis der bis jetzt durchgeführten Versuche zusammengefaßt.

Cross	L♂	E♂	S♂
L♀	—	+ : 1 - : 3	0
E♀	+ : 1 - : 1	+	+ : 4 - : 0
S♀	0	+ : 0 - : 9	+

Summary

Preliminary crossing experiments with 3 different strains of *Brachionus plicatilis* (Rotatoria).

The purpose of the project is to assess the causes of sexual sterility in a laboratory strain of *Brachionus plicatilis* (L) and to use this genetical factor for outbreeding experiments with sexually normal strains (E) and (S) of the same species.

Genetical experiments with rotifers meet with some serious difficulties: juvenile amictic and mictic females are undistinguishable from each other, successful mating occurs with very young animals only, and developing mechanisms of resting eggs are not yet fully understood. Experimental conditions to overcome those drawbacks are described.

The experiments carried out so far are listed in Tab. I-III. They yielded no unambiguous results about the sterility of strain L, but suggest a female defect rather than male sterility; electron microscopic pictures support this suggestion. Crosses between strain E and S were fertile in one direction only (E ♀ x S ♂); the reciprocal crosses yielded no resting eggs. An overall schema of the experiments concludes the report.

Tab. I.

Experiment No.	1	2	3	4	5	6	7
Start	12.11.80.	15.11.80.	15.11.80.	20.11.80.	24.11.80.	7.12.80.	24.1.81.
Crossing	L♀ x E♂	L♀ x E♂	E♀ x L♂	L♀ x E♂	L♀ x L♂	E♀ x L♂	S♀ x E♂
Initial mictic rate(%)	?(low)	50	?(high)	?(low)	?(low)	40	50
Total offspring (n)	36	32	11	12	10	9	12
Amictic offspring(am)	27	25	7	11	10	4	4
Mictic offspring (m)	0	6	4	0	0	2	4
Sex of offsp.unknown	9	1	0	1	0	3	4
Resting eggs	0	(1)	0	0	0	(2)	0
Offspring ratio(m/am)	0	0.24	0.57	0	0	0.50	1.00
Result	-	(+)	-	-	-	(+)	-
Comments	no mictic females	mating observed resting egg lacks double shell	mating observed offspring number too low	no mictic females	no mictic females	presence of E♂ in the mating dish possible	clear negative result

Tab.II.

Experiment No.	8	9	10	11	12	13	14
Start	24.1.81.	26.1.81.	26.1.81.	27.1.81.	27.1.81.	10.2.81.	10.2.81.
Crossing	E♀ x S♂	E♀ x S♂	S♀ x E♂	S♀ x E♂	E♀ x S♂	S♀ x E♂	E♀ x S♂
Initial mictic rate(%)	50	60	40	40	60	30	?
Total offspring (n)	6	15	25	35	21	23	25
Amictic offspring(am)	1	9	18	30	20	15	20
Mictic offspring (m)	0	1	6	4	1	8	4
Sex of offsp.unknown	5	5	1	1	0	0	1
Resting eggs	0	0	0	0	2	0	4
Offspring ratio(m/am)	0	0.11	0.33	0.13	0.05	0.53	0.20
Result	-	-	-	-	+	-	+
Comments	number of offspring too low,no mictic females	only one mictic female	clear negative result	clear negative result	clear positive result	clear negative result	clear positive result

Tab. III.

Experiment No.	15	16	17	18	19	20	21	
Start	23.2.81.	1.3.81.	29.4.81.	29.4.81.	29.4.81.	23.5.81.	23.5.81.	
Crossing	S♀ x E♂	S♀ x E♂	S♀ x E♂	S♀ x E♂	E♀ x S♂	S♀ x E♂	E♀ x S♂	
Initial mictic rate(%)	50	20	30	?	?	30	40	
Total offspring (n)	23	20	19	19	29	95	108	
Amictic offspring(am)	15	12	18	19	12	75	66	
Mictic offspring (m)	4	0	0	0	2	2	22	
Sex of offsp.unknown	4	8	1	0	9	18	20	
Resting eggs	0	0	0	0	1	0	10	
Offspring ratio(m/am)	0.27	0	0	0	0.12	0.03	0.30	
Result	-	-	-	-	+	-	+	
Comments	clear negative result	no mictic females	no mictic females	initial mictic rate obviously too low	resting egg not fully developed	decrease of mictic rate during experiment	clear positive result	

Literatur

- BIRKY, C.W. (1965): J. Exp. Zool. 158, 349 - 356
-- (1967): J. Exp. Zool. 164, 105 - 116
KING, C.E. (1980): Evolution and Ecology of Zooplankton Communities. Univ. Press Havover. p. 315 - 328
RUTTNER-KOLISKO, A. (1968): Verh. Dt. Zool. Ges. 1968, 205 - 210
-- (1969): Arch. Hydrobiol. 65, 397 - 412

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Jahresbericht der Biologischen Station Lunz](#)

Jahr/Year: 1981

Band/Volume: [1980_004](#)

Autor(en)/Author(s): Ruttner-Kollisko Agnes

Artikel/Article: [Vorversuch zu genetischen Experimenten mit drei verschiedenen Stämmen von *Brachionus plicatilis* M. \(Rotatoria\). 195-204](#)