DISS. B 1191

BENCZE GÁBOR

Az imágó korongok fejlődésében gátolt mutáns Drosophila törzsek előállitása és előzetes jellemzése.

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szeged 1974.

TARTALOM JEGYZÉK.

		oldal
Bevezetés.		1
Irodalmi áttekintés		2
1.	Imágó korongok mint fejlődés-biológiai rendszer.	2
1.1	Az imágó korongok fejlődése az embrióban és a lárvális élet folyamán.	2
1.3	A jellegzetes kutikula mintázat kialakulása. A determináció és transzdetermináció fogalma.	8
1.4	A rovar hormonok szerepe az imágó korongok fejlődésében.	1o
2.	Az imágó korongok fejlődését érintő fontosabb mutációk.	12
3.	Az általunk izolált mutánsokkal szemben támasztott követelmények.	16
Kisérletes rész.		17
4.	Alkalmazott módszerek.	17
4.1	Mutagenezis és a mutánsok izolálása.	17
4.2	A letális periódus megállapitása.	19
4.3	Az imágó korongok alakjának vizsgálata.	2o
4.4	Az evaginációs képesség megállapitása in vitro.	21
4.5	A mutáció autonómiájának vizsgálata.	22
5.	Eredmények.	24

		oldal
5.1	A mutagenezis eredménye.	24
5.2	A mutáns törzsek csoportositása és jellemzése.	24
6.	Az eredmények megbeszélése.	28
6.1	Az alkalmazott módszerek kritikai értékelése.	29
6.11	Morfológiai vizsgálatok.	29
6.12	In vitro evaginació.	3o
6.13	Transzplantáció.	31
6.2	A mutáció feltételezhető hatása alapján várható mutáns fenotipusok.	34
6.3	A mutáció feltételezhető hatása az általunk izolált törzsekben.	36
Összefoglalás.		38
Irodalom jegyzék.		4o
Függelék.		

B E V E Z E T É S .

A fejlődés-biológia alapvető problémái a sejt differenciálódás, a sejtek szövetekké és szervekké rendeződése, valamint a szövetek és szervek integrálódása egy működőképes szervezetté. A fenti problémák tanulmányozásának alapvető feltétele egy megfelelő kisérleti rendszer kiválasztása. A Drosophila melanogaster fejlődő imágó korongjai alkalmas rendszernek látszanak a fenti kérdések megválaszolására. Az imágó korongok a teljes átalakulással fejlődő rovarok felnőtt epidermális strukturáinak kezdeményei. A Drosophilánál a teljes epidermis a korongokból alakul ki. A korongok őssejtjei az embrionális élet elején különülnek el és a lárvában lassan növekednek. Bábozódáskor a korongok alakja gyorsan megváltozik és kialakulnak belőlük az epidermális strukturák. Ez a markáns fejlődési folyamat lejátszódik in vitro is, és hozzáférhető a biokémiai és genetikai vizsgálatok számára.

Az SzBK rovargenetikai csoportjában ennek a folyamatnak a vizsgálatát tüztük ki célul. Jelen értekezés tárgya ennek a munkának egy része. Célunk az volt, hogy a Drosophila melanogaster olyan törzseit izoláljuk, ahol ez a fejlődési folyamat öröklődően megváltozott. Dolgozatomban ilyen mutánsok előállitásáról és jellemzéséről számolok be.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS.

1. IMÁGÓ KORONGOK MINT FEJLŐDÉS-BIOLÓGIAI RENDSZER.

A fejlődés-biológiának azt az irányzatát, amely a Drosophila imágó korongjaiban lezajló fejlődés vizsgálatát tűzte ki céljául, Ernst HADORN és tanitványainak munkássága alapozta meg. Az ő kutatásaik eredményeként gyült össze annyi ismeret és módszer, hogy ma erről az objektumról, mint a fejlődés folyamatának vizsgálatára igen alkalmas kisérleti rendszerről beszélhetünk. Mivel munkánk célja az imágó korongok fejlődésének öröklődő megváltoztatása, szükséges, hogy röviden áttekintsük az imágó korongok normális fejlődésmenetét.

1.1 Az imágó korongok fejlődése az embrióban és a lárvális élet folyamán.

A Dipterák és Hymenopterák teljes felnőtt epidermisze olyan kezdeményekből alakul ki, amelyek az embrióban különülnek el és megtalálhatók a fejlődő lárvában is, a felnőtt epidermális képletek azonban csak a bábban alakulnak ki belőlük. Ezek a kezdemények a szervezettségnek különböző fokát érhetik el. Legjellegzetesebb formáik az imágó korongok. Ezek 4o-2oo mikron átmérőjü, csepp alaku, üvegesen áttetsző és egyszerü strukturával rendelkező szervek. Belőlük alakulnak ki a szem és antenna, a szárny, a billér, a lábak, a szájszervek és a genitáliák. Közülük három pár a fejrégióban található /labiális-, clypeo-labrális-, szem-antenna korong/. Mindhárom torszelvényben találunk egy pár ventrális és egy pár dorzális korongot /hume-

rus-, szárny-, I., II., III. pár láb-, billér korong/, egy korong pedig az utolsó abdominális szelvényben található /genitális korong/. A kezdemények másik formája a hisztoblasztok csoportja. Ez lehet egészen laza sejtcsoport, de állhat szorosabban elhelyezkedő sejtekből is, amelyeket egy nem sejtes szerkezetü membrán vesz körül.

E rövid áttekintést a továbbiakban csak az imágó korongokra korlátozzuk.

Az imágó korongok először a késői embrióban mutathatók ki hisztológiai metszeteken. Ektodermális eredetüek. A leendő imágó korong helyén az ektodermális sejtek élénken osztódnak, míg a környező sejtek kromoszómái politeniszálódnak. /Bautz 1971./ A lárvális sejtektől ekkor már alakjukban is eltérő, kisebb, imaginális sejtek alkotta korong az embriogenezis végén elválik az embrionális epidermisztől és betüremkedik a testüregbe.

Egyes becslések szerint mintegy 2-4o sejt különül el egyszerre és alkotja az imágó korong kezdeti sejtkészletét. /Garcia-Bellido és Merriam 1969; Ripoll 1972./ Fontos az, hogy nem egy "ősesejt" van és számuk a különböző imágó korongok esetében más, de általában tizes nagyságrendü.

A lárvális élet során az imágó korong sejtjeinek száma megsokszorozódik. Ez minden bizonnyal a kezdetben elkülönült őssejtek folyamatos osztódásának kö-

szönhető. Ez azt jelenti, hogy a szervkezdemény az őssejteknek a lárválís sejtektől való elkülönülése után megtartja autonómiáját és növekedéséhez nem járul hozzá utólagos sejtvándorlás /Garcia-Bellido és Merriam 1969; Ursprung 1959./

A sejtosztódás üteméről az imágó korongokban a lárválís élet folyamán nem alakult ki egységes kép. A szem-antenna korong térfogat- és sejtszám-változásának vizsgálata alapján korábban ugy tünt, hogy a korong kezdetben logaritmikusan növekszik, de fejlődésének üteme az utolsó lárva stádium második felére lelassul /Chevais 1944; Becker 1957./ Ujabb adatok szerint, amelyeket a különböző koru lárvákban röntgen-indukált mitotikus crossing-over által kiváltott mozaikfoltok vizsgálatával nyertek, a növekedés üteme a különböző korongokban nem egyforma. A szárny-korong egyenletesen növekszik az egész lárválís élet folyamán, mig az abdominális hisztoblasztok osztódása csak a báboződás után indul meg és bennük a sejtciklus hossza mindössze két-három óra. /Garcia-Bellido és Merriam 1971. a. b; Bryant 1971./

A korongok végső formájának kialakulásában a következő tényezőknek van szerepe:

a./ Regionális különbségek a mitotikus aktivitásban. Ilyen különbségeket találtak a szárnylemez anteriorális és poszteriorális vége /Garcia-Bellido és Merriam 1971.a./ valamint a szem anteriorális és poszteriorális része között. /Becker 1957./

b./ Regionális különbségek a mitotikus orsó tengelyének orientációjában. Kimutatták például, hogy a mitotikus orsó tengelye általában párhuzamos az illető szerv hossztengelyével a szárny, az első pár láb és az antenna korongok esetében. /Bryant 1971; Garcia-Bellido és Merriam 1971.a; Bryant és Schneiderman 1969; Postlethwait és Schneiderman 1971./

c./ Sejt- és szövet migráció. Jól példázza ezt a him Drosophila első pár lábán található sörte kefe /sex comb/ helyzetváltoztatása a fejlődés folyamán. A leendő sörtekefe sejtjei keresztben helyezkednek el a him Drosophila lábkezdeményében. A sejtsor a fejlődés folyamán derékszögben elfordul és végül hosszában rendeződik el. /Tokunaga 1962./

d./ Jellegzetes sejthalál mintázat. Annak ellenére, hogy a fejlődő imágó korongban a sejtek száma rohamosan nő, bizonyos meghatározott, az adott korongra jellemző területeken jelentős sejtelhalás is van. Ezt megfelelő festéssel ki lehet mutatni. Az így nyert "sejthalál mintázat" jellegzetes volta utal ennek a jelenségnek a morfogenetikai szerepére. /D. Fristrom 1968, 1969, 1972; Spreij 1971./

1.2 <u>Az imágó korongok differenciálódása a bábban.</u>

A harmadik stádiumos 24 C^{o}-on nevelt lárva a 96. órában bebáboződik. A bábban a lárvális szervek nagy része feloldódik a hisztolizis során, kivéve a Malpighi edényeket és a központi idegrendszert. Ugyanakkor a különböző imaginális szövetkezdemények-

ből kialakulnak az imágó szervei. /Bodenstein 1950./ Mindezt megelőzi az állat belső hormonális környezetének változása, nevezetesen a juvenil hormon szintje lecsökken, az ekdizon szintje pedig megemelkedik. /Doane 1973; Borst és mtsai. 1974./

Az imágó korongokban leáll a sejtosztódás. A korongok további fejlődésében két folyamatot különithetünk el. Az első az evaginációó. Ennek során a korongok középső része kesztyüujj-szerüen kitüremkedik. Ugy is mondhatjuk, hogy az embrióban kialakult zsákszerü betüremkedés az evaginációó során kifordul és megnyulik. Ez sejt-alakváltozás és átrendeződés utján megy végbe, sejtosztódás nem szükséges hozzá. Az evaginációó még a bábozódás előtt elkezdődik és a pupárium kialakulása utáni 4-6. órára fejeződik be. A folyamat végére a szervkezdemény megközelitően felveszi a felnőtt szerv alakját.

A másik folyamat a differenciálódás, amelynek során a kialakult szervkezdemény felületén kitin rakódik le és kialakulnak a jellegzetes kitin strukturák. A két folyamat ilyen éles elkülönitése azért látszik jogosnak, mert egyik sem tételezi fel a másikat, hanem bizonyos körülmények között egymástól függetlenül is lezajlanak. Nevezetesen a harmadik stádiumos lárvákba beültetett korong belsejében a gazdaállat metamorfózisa után kialakulnak a kitin strukturák anélkül, hogy az evaginációó lejátszódna. /Ephrussi és Beadle 1936./

A korongok morfogenezise alatt a korongot alkotó egyrétegű epidermisz sejtjei is megváltoznak. A kezdetben oszlopos sejtek az evaginációs során kuboidális alakot vesznek fel. Megváltozik a sejtek ultrastruktúrája is. Kezdetben embrionális jellegűek. Átmérőjük kicsi, kb. 5μ. Viszonylag nagy magot és magvacskát, kevés citoplazmát, kevéssé fejlett endoplazmatikus retikulumot és főleg sok szabad riboszómát tartalmaznak. A metamorfózis során kialakul a durva endoplazmás retikulum és a Golgi apparátus, a citoplazma szemcsézetté válik. A sejtek között speciális kapcsolatok jönnek létre. /Poodry és Schneiderman 197o./ A sörteképző sejtek kromoszómái politenizálódnak és puff-aktivitást mutatnak. /Lees és Waddington 1942./

Ugyanilyen változások következnek be a korongok in vitro evaginációja során, ekdizon jelenlétében. /Robb 1969; Mandaron 1971./ Részletesen l. I.4.pont alatt./

Miután a korongokból csak epidermális strukturák alakulnak ki, vitatott az ideg és mezodermális szövetek eredete a felnőtt szervekben. Jelenleg valószínűnek látszik, hogy a késői harmadik stádiumos lárvák imágó korongjai már tartalmazzák a leendő izom-sejteket. /Ursprung 1972; Poodry és Schneiderman 197o./ Az izomzat teljes kifejlődéséhez azonban szükséges a mozgató idegvégződések jelenléte is. /Bhaskaran és Sivasubramanian 1969./ Az érző idegek valószínűleg perifériás eredetűek és a korongtól a központi idegrendszer felé nőnek. /Wigglesworth 1965./

1.3 A jellegzetes kutikula mintázat kialakulása. A determináció és transz-determináció fogalma.

A felnőtt Drosophila testfelületén igen változatos képződményeket találunk. Mintegy 100 különböző strukturát ismerünk, amelyek elhelyezkedésében bekövetkező minden kis változás jól látható. Már régen végeztek olyan vizsgálatokat, ahol a korongok mechanikus sértésével vagy darabolásával próbálták a strukturák normális kialakulását megzavarni. /Geigy 1931./ Az ilyen vizsgálatok kimutatták a korongok mozaikos jellegét abban az értelemben, hogy a korongok egyes sejtjei már igen korán magukban hordják a belőlük majdan kialakuló kitin struktura programját. Egy bizonyos terület sértésével el lehetett érni, hogy a kialakult kutikulán a sértett területnek megfelelő struktura hiányozzon. Ha korongok darabjait lárvába transzplantálták, akkor a fragmentumból kialakultak azok a strukturák, amelyekre az "be volt programozva". Disszociált és reaggregált sejteket gazdaállatban felnevelve azt tapasztalták, hogy az egyes sejtek környezetüktől függetlenül, autonóm módon létrehozzák a megfelelő strukturákat. /Vogt 1946; Hadorn és mtsai. 1949./

Ez a sejt szintig is követhető meghatározottság lehetővé tette, hogy az egyes korongokon feltérképezzék a strukturák kezdeményeinek elhelyezkedését. Így készültek el az un. "sorstérképek" /fate map./ /Nöthiger és Schubiger 1966./

Azt a folyamatot, amelynek eredményeként egy sejt vagy sejtcsoport fejlődési lehetősége beszűkül ugy,

hogy belőle a fejlődés egy pontján tul már csak bizonyos szervek vagy strukturák képződhetnek, determinációnak nevezzük. Az egyes sejtek determinált állapotának meghatározására a következő kritériumok szolgálnak: /Gehring és Nöthiger 1973./

I. A sejt izoláltan vagy más sejtektől körülvéve is képes autonóm módon differenciálódni.

II. Sejt aggregátumokban a sejt asszociál az azonos hisztotipusu sejtekkel és szegregálódik az idegen hisztotipusuaktól.

III. A sejt képes determinált állapotát átadni utódainak a sejtosztódás során.

Indukált mitotikus crossing-over segitségével tanulmányozható a sejtek fejlődési potenciáljának időbeli változása. Ilyen vizsgálatokból tudjuk, hogy a determináció időben lejátszódó folyamat, mely lépésről-lépésre szükiti a sejtek fejlődési potenciálját.

Az imágó korongok folyamatos in vivo kulturáiban megfigyelték, hogy az adott korongra jellemző eutotipikus strukturákon kivül néha megjelentek más korongokra jellemző, allotipikus strukturák is, azaz a sejtek programja megváltozott. Ezt a jelenséget nevezik transzdeterminációnak. /Schläpfer 1963; Hadorn 1963./ A morfogenezisben résztvevő gének kifejeződésének és regulációjának megértése szempontjából a transzdetermináció nagyon érdekes jelenség, mechanizmusáról ma még keveset tudunk. /A kérdés részletesebb összefoglalását l. Gehring és Nöthiger 1973./

1.4 A rovar hormonok szerepe az imágó korongok fejlődésében.

Korábban már említettük, hogy a bábban lejátszódó folyamatokat a hormonális környezet változása előzi meg. Jelenlegi tudásunk szerint elsősorban a vedlési hormon vagy ekdizon és a juvenil hormon szabályozza az átalakulást. Előbbi a dipterák gyürü mirigyének nagy laterális sejtjeiben termelődik,/Vogt 1943./ míg a mediális részen, amely megfelel más roveroknál a corpus allatumnak, a juvenil hormon termelődik. Sokáig tisztázatlan volt, hogy a Drosophila gyürü mirigyében pontosan melyik ekdizon hatásu szteroid képződik. Legujabb adatok szerint radioimmun módszer segitségével sikerült meghatározni, hogy az aktiv hormon a β-ekdizon. /Borst és mtsai. 1974./ Az ekdizon sokféle fiziológiai hatása között a mi szempontunkból különösen érdekes, hogy in vitro tenyésztett Drosophila sejteken alakváltozást idéz elő /Courgeon 1972./ és hatással van a nyálmirigy kromoszómák puff mintázatára. /Ashburner 1972./ A vedlési hormon jelenléte szükséges az imágó korongok evaginációjához in vitro /Mandaron 1971; Fristrom és mtsai. 1973./ és differenciálódásához in vivo /Hadorn 1963/.

Ujabban sikerült megmérni a β-ekdizon mennyiségek változását in vivo. A harmadik stádiumos lárvában a hormonszint alacsony. A lárva stádium végén az ekdizon mennyisége hirtelen megháromszorozódik /0.1 µg/g friss suly/. Hasonló mennyiség /0.1 µg/ml/ szükséges

a tömegizolált korongok teljes evaginációjának kiváltásához. A bábban az ekdizon mennyisége tovább nő. Az imágóban a hormonszint ismét alacsony és megegyezik a harmadik stádiumos lárváéval. /Borst és mtsai 1974./

A Dipterák természetes juvenil hormonjának kémiai összetétele még nem ismert. Az un. cecropia juvenil hormon azonban, amely a Lepidopterák egyik természetes hormonja, a Drosophila esetében is fejt ki morfogenetikai hatást és gátolja az imágó korongok evaginációját in vitro. /Chihara és mtsai 1974./

Az a tény, hogy a korongok differenciálódása lejátszódik in vitro és megfelelő módszer áll rendelkezésre a korongok tömeges izolálására, lehetővé tette, hogy megkezdjék az ekdizon hatás molekuláris mechanizmusának feltárását.

Az ekdizon hatása a DNS szintézisre nem látszik jelentősnek, bár az irodalmi adatok igen ellentmondóak. /Részletesebben l. Fristrom 1972./

Az ekdizonnak az RNS szintézisre gyakorolt hatásáról rendelkezésre álló adatokat a következőkben foglalhatnánk össze: az ekdizon serkenti az RNS szintézist. A hormon beadását gyorsan követi a 28 S és 18 S riboszómális RNS frakciók szintézisének fokozódása. A legerősebb hatást a β-ekdizon váltja ki. Ugyancsak meggyorsul a 38 S rRNS átalakulása 28 és 18 S rRNS-sé. Az ujonnan szintetizált RNS megnövekedett hibridizációs képessége arra utal, hogy esetleg a korongokra jellemző uj RNS-féleségek is keletkeznek. /Chihara és mtsai 1974./

Az ekdizonnak valószinüleg két kötőhelye van, az egyik specifikus, a másik nem. A specifikus kötőhely a magban van. /Yund és mtsai. 1974./

Az ekdizon serkenti a fehérje szintézist is,, /Fristrom 1972./ Sikerült bizonyitani azt is, hogy az ujonnan keletkező fehérje a korongokban szintetizálódik és nem a hemolimfából származik. /Ursprung és mtsai. 197o./ A tömeg-izolált korongokban szintén nő a fehérje szintézis ekdizon hatására. Az alkalmazott módszerekkel nem találtak jelentős különbséget a korábban keletkezett és a hormon hatására szintetizált fehérjefóleségek között /Fristrom 1972./ A hormon hatására először az RNS szintézis indul meg és csak bizonyos idő elmultával követi azt a fehérje szintézis. Ez arra utal, hogy a hormon elsődleges hatását nem a fehérje szintézisre gyakorolja.

2. AZ IMÁGÓ KORONGOK FEJLŐDÉSÉT ÉRINTŐ FONTOSABB MUTÁCIÓK.

Az eddigiekben megpróbáltuk az irodalmi adatok alapján röviden összefoglalni a Drosophila melanogaster imágó korongjainak fejlődésmenetét.

Számos olyan mutáció ismert, amely megzavarja ezt a fejlődést. Az ilyen mutációk tanulmányozása nagyon fontos. Segitségükkel az imágó korongok fejlődésének bonyolult folyamatát elemeire bonthatjuk.

Minden eddig ismert morfológiai mutáció érinti bizonyos értelemben a korongok fejlődését, hiszen a

felnőtt Drosophila egész kitin felszine a korongokból jön létre. Nem biztos azonban, hogy a mutáció elsődleges hatása magukra a korongokra irányul. Ilyenkor a korong maga változatlan és normális környezetbe ültetve normálisan fejlődik. Az ilyen mutációt a korong szempontjából nem tekintjük autonómnak, szemben a korongot elsődlegesen érintő autonóm mutációval.

Vannak olyan mutációk, amelyek közvetlenül a determináció folyamatát érintik. Ennek eredményeként a felnőtt állat valamely szerve helyett, ugyanott valamilyen homológ szerv fejlődik ki, pl. az antenna helyén tarzális szegmentumok. Az ilyen un. homeotikus mutációk segitségével lehetőség nyilhat a determináció folyamatának tanulmányozására.

A genetikai megközelités másik igéretes területe a kondicionált mutációk, ezen belül a hőérzékeny letálisok tanulmányozása. A fentiekre vonatkozó részletes összefoglalás található J.A. Postlethwait és H. A. Schneiderman cikkében. /J.A. Postlethwait és H. A. Schneiderman 1973./

Részletesebben szeretnénk foglalkozni a recesszív letális mutációk izolálására tett eddigi kisérletekkel, hiszen munkánk is ezt az utat követi.

Mivel a korongoknak nincs szerepe a lárvák fejlődésében, remélhető, hogy az olyan mutánsok között, amelyek lárvális korban normálisan fejlődnek, de a harmadik stádium végén vagy korai báb állapotban elpusztul-

nak, találhatók lesznek olyanok, ahol a korongok fejlődése abnormális. Az ilyen mutánsok kiválasztása nem könnyü, mert még nem áll rendelkezésre megfelelő szelekciós rendszer.

A fenti céllal először Shearn és munkatársai indukáltak nagyszámu harmadik kromosszómás letálist. /Shearn és mtsai. 1971./ A tesztelt 3167 kromoszóna között 134 letálist találtak, amelyek a kritikus időszakban pusztulnak el. Ezek közül 63 esetben a korongok alakja és fejlődési képessége rendellenességet mutatott. A mutánsok 7 csoportba voltak oszthatók:

1. Korong nélküliek.
2. Néhány korong hiányzik.
3. A korongok alakja normális, de azok fejlődésképtelenek.
4. Néhány korong hiányzik, a többi fejlődésképtelen.
5. A korongok kicsik.
6. Néhány korong kicsi, a többi alakra normális, de fejlődésképtelen.
7. Homeotikus mutánsok.

Érdekes, hogy a mutáció hatása nem feltétlenül terjedt ki minden korongra egyformán.

Stewart és munkatársai /Stewart és mtsai. 1972./ X kromosszómás letálisokat kerestek és azokat a törzseket vizsgálták közülük, ahol a korongok in vitro tenyészetben nem evaginálták β-ekdizon hatására. Hogy

minimálisra csökkentsék a pleiotróp hatásokat, igen szigoru követelményeket támasztottak a lárvák életképességével szemben. Ilyen megszoritások után a tesztelt 4294 kromoszóma közül 26 törzset találtak alkalmasnak. Ezek közül az egyik hőérzékeny volt.

A mutánsok további vizsgálata alapján a következő kategóriákba sorolták őket /Murphy 1974./:

1. Degenerált korongok. Az ilyen mutáció minden esetben autonómnak mutatkozott.
2. Kis korongok. Az ilyenek alakja normális, de mérete kicsi volt.
3. Normális alaku korongok, amelyek fejlődésképtelenek. Ez a rendellenesség az esetek többségében nem autonóm, de volt közöttük autonóm is.
4. Nagy korongok. Egy ilyen törzset találtak, amely autonómnak mutatkozott.

A mutáció autonómiája minden esetben együtt járt a fokozott sejt-elhalással. Azok a törzsek, ahol a mutáció autonóm volt, egy esetben sem jutottak tul a bábvedlésen. A nem autonóm mutánsok mindegyike képezett pupáriumot és a legtöbb tuljutott a bábvedlésen.

Az eredeti hipotetikus elképzelésnek egyik mutáns sem felelt meg, azaz nem találtak "hormon receptor mutánst". A normális alaku, de autonóm mutáns korongot tartalmazó lárvák a kései harmadik stádiumban elpusztultak. A szerző elképzelhetőnek tartja, hogy a letalitást maga a β-ekdizon váltotta ki másodlagosan.

3. AZ ÁLTALUNK IZOLÁLT MUTÁNSOKKAL SZEMBEN TÁMASZTOTT KÖVETELMÉNYEK.

Munkánk célja az volt, hogy olyan mutánsokat izoláljunk, amelyek embrionális és lárvális fejlődése szabályos, de nem képesek imágóvá differenciálódni, mert a mutáció következtében az imágó korongjaik rendellenesek. Az ilyen állatoknak normálisan kell fejlődniük egészen addig, amig a harmadik lárva stádium végén az ekdizon hatására megindulna az imágó korongjaik fejlődése. Nem sokkal ezután azonban el kell pusztulniuk az imágó korongjaikat ért mutáció következtében.

Munkánk során alapvetően Stewart és munkatársainak eljárását követtük. /Stewart és mtsai. 1972./ Mutagén kezelés után olyan X kromoszómás letális mutánsokat kerestünk, amelyek letális periódusa a kései harmadik lárva stádiumra vagy a prepupális időszakra esik. Hogy csökkentsük az esetleges pleiotróp hatás lehetőségét, figyelmünket elsősorban azokra a törzsekre irányitottuk, amelyeknél a mutáns lárvák életképessége nem különbözött lényegesen a vad tipusu lárvákétól.

Értekezésünk tárgya a mutációk indukálása, a megfelelő mutáns törzsek kiválogatása és előzetes jellemzése.

K I S É R L E T E S R É S Z

4. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK.

4.1. Mutagenezis és a mutánsok izolálása.

A mutációkat 0.025 %-os etil-metán-szulfonát /EMS/ oldat segitségével váltottuk ki. A mutáns törzseket a Muller - 5 módszerrel szelektáltuk. Ez a módszer az X kromoszómán keletkezett letális mutációk kiválogatására alkalmas.

A mutagenezis menete a következő volt. Olyan him egyedeket kezeltünk, amelyek X kromoszómájukon y, w, cv és sn^3 recesszív marker mutációkat hordozták. /A mutánsok leirását l. Lindsley és Grell 1968./ 50 db. y w cv sn^3 himet 0.025 M EMS oldattal átitatott szürőpapirt tartalmazó fiolába tettünk. 24 óra mulva a himeket különkülön friss táptalajra tettük és 3-3 szüz Muller-5-ös /M-5/ nősténnyel kereszteztük. Egy nap mulva a nőstényeket friss táptalajra tettük petézni, a himek pedig uj nőstényeket kaptak. Ezt igy folytattuk mindaddig, amig a hinek nemzőképesek voltak. A keresztezésből származó F_1 nemzedék minden nőstény egyede egy-egy független, mutagénnel kezelt kromoszómát tartalmazott. Ezért a kikelő szüz nőstényeket egymástól elkülönitve, 2-3 M-5-ös himmel kereszteztük. Az F_2 nemzedék átvizsgálása után csak azokat a törzseket tartottuk meg, amelyek nem tartalmaztak y w cv sn^3 himeket. Az összes keresztezéseket 25 C^o-on végeztük. Az állatokat közönséges mazsola, melasz, kukoricaliszt, élesztő és agar tartalmu táptalajon neveltük.

A fenti kereszteződéseket a következőkben foglalhatjuk össze:

1. M-5 ♀♀ × EMS kezelt y w cv sn^3 ♂♂
2. y w cv sn^3 / M-5 ♀ × M-5 ♂♂
3. a. y w cv sn 1 ♂♂ Ez a kategória letális. Azokat a fiolákat, ahol megjelentek y w cv sn^3 hímek - kidobtuk
   b. M-5 / y w cv sn 1 ♀♀
   c. M-5 / M-5 ♀♀
   d. M-5 ♂♂

Minden nemzedékben a, b és c kategóriákat tartottuk meg. A mutáns izolálásakor és a kapott törzs fenntartása során a M-5-ös kromoszóma a balanszer szerepét töltötte be. Mivel három inverziót és egy duplikációt tartalmaz /Lindsay és Grell 1968./ megakadályozza, hogy a letális mutáció rekombináció utján elváljon a markerektől. A rekombináció gátlása nem teljes és igy néha a törzsekben rekombinánsok jelentek meg. Ezért a M-5 kromoszómát később kicseréltük a Binsn balanszer kromoszómával. Ez a hatásosabb rekombináció gátláson kivül még egy előnnyel járt. Nevezetesen a Binsn kromoszómán a sn génnek olyan allélje található, amelyik a sn^3-al keresztezve életképes, de homozigóta állapotban sterilis utódokat eredményez. Igy szükségtelenné vált a generációnkénti szelektálás. A törzsfenntartás sémája a következő volt

1. Binsn / y w cv sn^3 1♀♀ × Binsn ♂♂
2. a. Binsn / y w cv sn^3 1♀♀ heterozigóta
   b. Binsn / Binsn ♀♀ sterilis
   c. Binsn ♂♂
   d. y w cv sn^3 1 ♂♂ letális

Minden nemzedékben tehát csak a, és c kereszteződhetnek egymással. A továbbiakban leirt vizsgálatokat a hemizigota ♂ lárvákon végeztük.

4.2 A letális periódus megállapitása.

A mutagenezis során kapott törzsek közül ki kellett válogatni azokat, amelyek késői harmadik stádiumban vagy a pupárium képződés utáni 12 órán belül /prepupa/ pusztulnak el. Az általunk használt markerek közül a yellow jól felismerhető a lárván is. A yellow lárvák szájszervei és sertéi sárgák, mig a vad tipusnál a sertók és a szájszervek feketék. Feltételeinknek tehát csak azok a törzsek feleltek meg, amelyeknek 96 órás vagy annál fiatalabb tenyészetében találtunk yellow lárvákat. Ezért a 96 órás tenyészetekből vizzel kimosott lárvákat átvizsgáltuk és azokat a törzseket, ahol 25 lárva között nem volt yellow, eldobtuk. A megmaradt törzsekből kiválogatott yellow lárvákat uj táptalajra tettük és egy nap mulva ismét átvizsgáltuk őket. Az átvizsgálás alapján a törzseket a következő osztályokba soroltuk:

a. Késői harmadik stádiumos letális. Ide soroltuk azokat a törzseket, ahol az állatok pupárium képzés nélkül pusztultak el.

b. Korai báb letális. Ide soroltuk azokat, ahol pupárium képződött, de az állatok még prepupális korban elpusztultak. Ez arról volt felismerhető, hogy a fej régió még nem evertált és a lábak és szárnyak még nem voltak láthatók.

c. Késői báb letális. Ide soroltuk azokat a törzseket, ahol a fej régió valamint a lábak és szárnyak már kialakultak.

A további vizsgálatok céljaira csak az első két kategóriába sorolt törzseket tartottuk meg.

4.3 Az imágó korongok alakjának vizsgálata.

Az imágó korongok alaktani vizsgálatával csak azt akartuk megállapitani, hogy az adott mutáns korongjai nem szenvedtek-e szembetünő alakváltozást. E célból az állatokat felboncoltuk és az imágó korongokat mikroszkóp alatt összehasonlitottuk a normális korongokkal.

A boncolás menete a következő volt. A megfelelő lárvát vájt tárgylemezre tettük. Annyi Ringer oldatot /Ephrussi és Beadle 1936./ cseppentettünk rá, amennyi teljesen elfedte. Egy éles tü és órás csipesz segitségével a lárvát két részre téptük. Ezután a csipesz hegyét a lárva anteriorális részébe bujtatva azt kimerevitettük, közben a tüvel a feji végén alkalmazott nyomással a lárvát kesztyüujj-szerüen kiforditottuk. Az igy jól láthatóvá és hozzáférhetővé vált korongokat vékony wolfram tüvel lemetszettük.

Megvizsgáltuk azt is, hogyan változott a korongok sejthalál mintázata. E célból a korongokat Spreij módszere szerint festettük meg. /Spreij 1971./ A kiboncolt korongokat tárgylemezre tettük és 1,6 x 10^{-6} M akridin oranzs festéket tartalmazó Drosophila Ringert cseppentettünk rájuk. Öt perc elmultával a korongokat Ringer-

rel öblitettük, lefedtük és fluoreszcenciás mikroszkóp alatt megvizsgáltuk. /Leitz, HBO 200 W lámpa, BG 12 és OG 1-es szürők, 6o x -os nagyitás./ A vizsgálatokat láb és szárny korongokon végeztük, összehasonlitásként vad tipusu lárvákból nyert korongok szolgáltak. /1.sz.foto./

4.4 Az evaginációs képesség megállapitása in vitro.

Szinkron tenyészetből vett 96 órás lárvák első és második pár láb korongját a fent leirt módon kiboncoltuk. A boncolást vájt tárgylemezen egy csepp Robb médiumban végeztük./Robb 1969./ A kipreparált korongokat párosával 0,5 cm átmérőjü és ugyanilyen mély plasztik edénykébe raktuk 100 µl Robb médiumba. Az edénykéket párakamrába tettük 25 C°-on. Minden kisérletben legalább 20 párhuzamos tenyészetet inditottunk. A felébe 1 γ/ml β-ekdizont tettünk, a többit ekdizon nélkül kontrollként használtuk. A kulturázás kezdetén meghatároztuk a korongok evagináltságának fokát. Ezt egy tapasztalati skálával történt összehasonlitás alapján tettük. A skálán a nem evaginált korongot 0-val, a teljesen evaginált korongot pedig 10-zel jelöltük. Az összehasonlitás fénymikroszkóp alatt 100 x -os nagyitás mellett történt. /2.sz.foto/ Csak olyan tenyészetet használtunk, ahol a korongok fejlettsége induláskor még nem érte el a 2-es fokozatot. 16 óra mulva a tenyészeteket ismét átvizsgáltuk és a korongokat a tapasztalati skála alapján mért evaginació fokával jellemeztük. Csak azokat a kisérleteket értékeltük, ahol az ekdizon-nélküli kontroll a kisérlet során nem evaginált.

4.5 A mutáció autonómiájának vizsgálata.

A mutáció autonómiájának eldöntésére a mutáns lárvából kiboncolt korongokat vad tipusu harmadik stádiumos lárvákba ültettük. A transzplantálást az Ephrussi és Beadle által kifejlesztett eljáráshoz hasonlóan végeztük. /Ursprung 1967./

Donorként a mutáns törzsek 96 órás lárvái szolgáltak. A gazdaállatok vad tipusu 75-8o órás Oregon R lárvák voltak. A donor és a gazda lárvák egyaránt 2 órás időtartamon belül szinkron petéztetett populációból származtak.

A megfelelő koru mutáns lárvákból egy csepp Ringerben kiboncoltuk a korongokat és wolfram tüvel több darabra vágtuk. Ezzel párhuzamosan a gazdaállatokat is kimostuk a táptalajból. 7o %-os etanollal leöblitettük, majd a lárvák felületéről szürőpapir segitségével minden nedvességet eltávolitottunk. Ezután egyszerre mintegy lo-2o száraz lárvát tárgylemezre téve éterrel elaltattunk, vigyázva, hogy két percnél tovább ne maradjanak az étergőzben. Altatás után az állatokra egy-egy csepp Ringert cseppentettünk, amitől azok elernyedtek. Miután szürőpapirral a Ringert eltávolitottuk, a lárvák enyhén a tárgylemezhez tapadtak.

A transzplantálást egy vékonyra huzott kapilláris tü segitségével végeztük. A tüt a következő módon készitettük: 1 mm átmérőjü üvegcsőből mikrolángon kapillárist huztunk. A kapillárist egy fémtü segitségével

ugy törtük el, hogy a vége injekciós tü hegyéhez legyen hasonló. Vigyáztunk, hogy a törés egyenletes legyen minden csorbulat nélkül. Ezután mikroláng segitségével a tü hegye mögött kis szükületet képeztünk ki. A megfelelő tüt egy fémcsőbe fogtuk, amelyet 50 cm hosszu és 3 mm átmérőjü müanyag cső segitségével egy mikroinjekciós fecskendővel egyesitettünk.

Az imágó korong darabot a lehető legkevesebb folyadékkal felszivtuk a tübe, egészen a szükületig. Ezután a tüt érintőlegesen a gazda lárva bőre alá szurtuk. A szurást dorso-laterálisan ejtettük az állat posteriorális harmadánál. A korong darabot minimális folyadék mennyiséggel a lárva testüregébe juttattuk. A transzplantálás után a lárvákat Ringerrel megnedvesitettük és friss táptalajra helyeztük.

A kikelő légy potrohából kiboncolt transzplantátumot kiteritve tárgylemezre tettük és Faure oldatban lefedtük.

Azt a törzset tekintettük autonómnak, ahol legalább öt sikeres átültetés után sem találtunk kifejlődött transzplantátumot. A differenciálódást akkor tekintettük teljesnek, ha a transzplantátumon kifejlődtek a megfelelő kitin strukturák. /3-6.sz.foto/

5. EREDMÉNYEK.

5.1 A mutagenezis eredménye.

A mutagénnel kezelt ötven him közül tizenöt a páros tenyészetben nem adott utódot. A többi him utódaiból összesen 1956 önálló páros tenyészetet inditottunk, tehát ennyi független kromoszómát tudtunk megvizsgálni. Ebből 288 tenyészetben nem találtunk utódot. A többi 1668 törzs közül 869 bizonyult letálisnak. A letális törzsek közül 31 volt olyan, amelynek letális periódusa a 96. és a 106. óra közé esett. Elgondolásunk szerint közöttük kell keresnünk a feltételezett korong mutánsokat. Munkánk során tehát ezt a 31 törzset jellemeztük. A mutagenezis eredményét az 1.sz. táblázat foglalja össze.

5.2 A mutáns törzsek csoportositása és jellemzése.

A mutagenezis után a megfelelő letális periódus alapján 31 törzset választottunk ki. A további vizsgálatok azt kivánták eldönteni, hogy a 31 törzs közül melyek azok, amelyek valóban korong mutánsok. Alábbiakban mind a 31 törzset jellemezzük. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért csoportokba osztottuk őket. A csoportositás elsődleges szempontja a korongok morfológiai jellege volt, pusztán azért, mert ez a legbiztosabb szempont és a hasonló tárgyu dolgozatok is igy csoportositanak. Másodsorban a korongok in vitro evaginációs képességét vettük tekintetbe. A vizsgálatok adatait a könnyebb kezelhetőség érdekében fénylyukkártyán tároltuk.

Az első csoportba soroltuk azokat a törzseket, amelyek egyedeiben a 96 órás korongok mérete normális és képesek evaginálni in vitro.

A következő törzsek tartoznak ide: 24/8, 29/1, 1/12, 2/2, 3/3, 28/2, 42/1, 46/3, 52/3, 29/3, 32/5.

Ezeknek a mutánsoknak a korongjai morfológiailag és funkcionálisan is épnek látszanak. Két törzs kivételével /28/2 és 32/5/, nem volt kimutatható fokozott sejtpusztulás. A 32/5 törzs esetében a transzplantációs vizsgálatok részleges autonómiára utalnak. Nyolc sikeres transzplantálás során egy differenciálódott transzplantátumot sikerült találni, de ebben sem fejlődtek ki rendesen a kitin-strukturák. /3.a-b.sz.foto./ A 32/5 törzs korongjai torzan evaginálták. Az első csoportba sorolt mutánsok mind képeznek pupáriumot.

A második csoportba azokat a törzseket soroltuk, amelyekben a 96 órás lárvák korongjainak a mérete normális, de nem képesek evaginálni in vitro.

Ide tartoznak a következő törzsek: 5/5, 7/4, 34/6, 35/4, 4/3, 7/6, 32/6, 49/1.

Az 5/5, 7/4, 34/6 és 35/4 törzsek kései harmadik lárva stádiumos letálisak, mig a 4/3, 7/6, 32/6 és 49/1 törzsek korai báb állapotban pusztulnak el. Ezeknél a mutánsoknál a korongok már egyértelmüen károsodtak a mutáció következtében. Bár a korongok alaktanilag normálisak, funkcionálisan müködésképtelenek. Egy-

értelmében erre mutat az in vitro evaginációra való képtelenség és a fokozott sejt-elhalás. A pupáriumot sem képző törzsek közül kettő is részlegesen autonómnak mutatkozott. A 7/4 törzs esetében 12 sikeres transzplantáció során csak egy esetben sikerült implantátumot találni, amelyen azonban a kitin-strukturák hiányosak voltak. /4.sz.foto./ A 35/4 törzs esetében 6 sikeres transzplantáció során egy rendellenesen differenciálódott transzplantátumot találtunk.

A harmadik csoportot alkotó törzsek 96 órás korongjai kisebbek a normálisnál és nem képesek evaginálni in vitro.

A 38/5, 41/3, 1/5, 6/4, 1o/3 és 9/1 törzsek tartoznak ide.

A 38/5 és 41/3 törzsekben a lárváknak egy része nem bábozódik be, de nem is pusztul el a bábozódás szokásos időpontjában. Azok a lárvák, amelyek bebábozódnak, a prepupális korban elpusztulnak. A 38/5 törzs érdekes tulajdonsága, hogy a 96 órás lárvákban gyakorlatilag nincs zsirtest, a lárvák üvegszerüen áttetszőek. Az 1/5 és 6/4 törzsek prepupális letálisak. A 1o/3 törzs egyes egyedei megérik a késői báb stádiumot is, a 9/1 törzs egyedei pedig egységesen a késői báb stádiumban pusztulnak el. Ezeknél a törzseknél a mutáció már egyaránt érinti a korongok alakját és funkcióját is. A korongok minden esetben kisebbek a normálisnál. Méretük az egyes törzseknél azonban különböző. Míg a 38/5 törzsben a korongok mérete nem sokkal kisebb a normá-

lisnál, az 1/5 törzs korongjai olyan kicsik, hogy velük sem a Spreij festés, sem a transzplantálás nem volt elvégezhető.

A 38/5, 6/4 és 10/3 törzsek korongjaiban Spreij festéssel fokozott sejtpusztulás volt kimutatható. Az autonómia szempontjából vizsgált négy törzs egyike sem volt autonóm. /5-6.sz.fotó./

A negyedik csoportba három olyan törzset soroltunk, amelyek 96 órás lárváiban nem találtunk imágó korongokat.

Ez a három törzs a 11/6, 43/4 és 52/4.

A 11/6 törzs harmadik lárva stádiumos letális. A 43/4 törzs egyedei nem bábozódnak be, hanem lárva állapotban legalább két hétig tulélik a bábozódás szokásos időpontját. Az 52/4 törzs hasonló a 43/4-hez, azzal a különbséggel, hogy az állatok egy része bebábozódik és prepupális állapotban pusztul el.

Három törzsben / 53/2, 31/3 és 38/3/, a yellow lárvák aránya a tenyészetekben 1% alatt volt. Ezért ennél a három törzsnél csak a letális periódust állapitottuk meg. Az 53/2 törzs egyedei késői harmadik lárva stádiumban, a 31/3 törzs egyedei késői harmadik lárva stádiumban vagy prepupális korban, a 38/3 törzs egyedei pedig a prepupális időszakban pusztulnak el.

A törzsek jellemzésének összefoglalását 1. a 2. sz. táblázatban.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.

A Drosophila melanogaster teljes átalakulása során az imágó korongok jelentős változáson mennek keresztül. A korongok először megváltoztatják alakjukat, majd meghatározott mintázatu kutikulát választanak ki. Ezt a folyamatot hormon inditja el. Munkánk során olyan mutánsokat kerestünk, amelyek a korongok átalakulásának folyamatában károsodtak és ez a károsodás az állat pusztulásához vezet. Ezeket a mutánsokat olyan törzsek között kerestük, amelyeknek mutáns allélt hemizigóta állapotban hordozó him egyedei éppen abban az időben pusztulnak el, amikor ez a folyamat végbemegy. Az imágó korongokat károsító mutációra a korongok alakjának és funkcionális épségének vizsgálatából következtettünk.

A korongok alakját fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Ezt a pusztuló szövetrészek kimutatására alkalmas Spreij festéssel egészitettük ki. A korongok funkcionális állapotát az in vitro evaginációs képességgel jellemeztük.

A károsodás elsődleges helye lehet magában a korong szövetben, de lehet a szervezet egyéb szöveteiben is. Ez utóbbi esetben a korongok normális fejlődését a mutáció által megzavart lárvális vagy pupális környezet gátolja. Ez a mutáció autonómiájának kérdése, aminek eldöntését a transzplantációs vizsgálatok szolgálták.

Nézzük meg, mennyiben alkalmasak a fenti vizsgálatok a felvetett kérdések megválaszolására.

6.1 Az alkalmazott módszerek kritikai értékelése.

6.11 Morfológiai vizsgálatok.

A 96 órás lárvák láb- és szárny korongjainak alakja és mérete alapján a törzseket három csoportba osztottuk. A 31 törzsből 19-ben a korongok alakja normális volt. Fénymikroszkóp segitségével a korongok alakjának meghatározása természetesen kissé szubjektiv. Ezért a fontosabb törzseknél a későbbiekben el kell végezni a lárvák szövettani vizsgálatát is sorozatmetszetek alapján. A normális alaku korongokban is figyeltünk meg fokozott sejtpusztulást. A 19 törzs közül 11 korongjai evaginálták in vitro, 8 törzs korongjai pedig nem. Ez utóbbiaknál a sejtpusztulás együttetüen fokozott volt. Valószinü, hogy a sorozatmetszetek és az elektronmikroszkópos vizsgálat segitségével további alaktani elváltozásokat fogunk találni. 6 törzset soroltunk a "kis korongu" kategóriába. A további vizsgálatoknak kell eldönteniük, hogy a méretbeli különbség oka a korongok fejletlensége vagy másodlagos degenerációja. Ez utóbbira gondolhatunk annál a három törzsnél, ahol a sejtpusztulás fokozott.

Három mutánsban nem találtunk korongokat. Szövettani vizsgálatokkal kell azonban eldöntenünk, hogy itt valóban a korongszövet teljes hiányáról van-e szó. Murphy a Stewart és munkatársai által izolált hasonló mutánsok szövettani vizsgálata során minden esetben talált korong szövetet. Ő a korong szövet csaknem teljes hiányát másodlagos degenerációnak tulajdonitotta.

/Murphy 1974./ Ha a korong hiányát előidéző mutáció nem lenne autonóm, akkor az embriót vad tipusu gazdába ültetve, a korongok esetleg felnevelhetők lennének. A továbbiakban ilyen vizsgálatokat is tervezünk. Murphy a hasonló mutánsokat gynander-teszt alapján mind autonómnak találta.

6.12 In vitro evaginació.

A korongok funkcionális épségének jellemzésére az in vitro evaginációs képességüket vizsgáltuk. Ez azonban nagyon leszükitett értelmezése a korongok funkcionális épségének. A korongok funkciójához tartozik ugyanis a normális kutikula kiválasztása is. Sajnos, ez a folyamat ma még nem vizsgálható rutinszerüen mesterséges táptalajban. A transzplantáció során viszont csak a kutikula kiválasztása történik meg és az evaginació nem. Vizsgálatunk tehát azt mutatja ki, hogy a korongok jól meghatározott közegben /Robb-féle táptalaj/ képesek-e az átalakulás első lépésére. A teljes funkcionális épséget az jelenti, ha a vad gazdába ültetett evaginálni képes korong normális kutikulát választ ki. Az in vitro evaginációra képes 11 törzs közül 5 törzset vizsgáltunk a kutikulaképzés szempontjából és eddig csak egy törzset találtunk, ahol a kutikulaképzés hiányos volt / 32/5 /. Emnél a törzsnél a sejtpusztulás is nagyobb mérvü volt. Tehát az in vitro evaginációra való képesség többnyire együtt járt a kutikulaképzésre való képességgel. A 14 in vitro nem evaginálo törzsből 12-t vizsgáltunk a kutikulaképzés szempont-

jából és csak két olyan törzset találtunk, ahol a kutikulaképzés hiányos volt, de a sérült funkciót itt éppen az evaginácio hiánya jelenti.

Igy tehát az in vitro evaginációs képességet használhatjuk a korongok funkcionális épségének vizsgálatára.

6.13 Transzplantáció.

A transzplantációs vizsgálatok elsődleges célja a mutáció autonómiájának eldöntése volt. Az autonómia lényege az, hogy a vizsgált szerv mutáns fenotipusa vad tipusu környezetben is kifejezésre jut. A mutáns szövetet kétféleképpen lehet vad tipusu környezetbe juttatni. Egyik lehetőség a transzplantáció, amelynek során a mutáns szövetet vad tipusu gazda szervezetébe ültetjük. Másik lehetőség, hogy olyan genetikailag mozaik egyedet hozunk létre, amelyben a mutáns és vad szövetek együtt fejlődnek. A mozaikosság kiváltására több módszer ismert. Lényegük, hogy a heterozigóta embrióban az első néhány mitózis során különböző módszerekkel X kromoszóma vesztést indukálunk. A kromoszóma vesztés után olyan szervezet fejlődik ki, amelyben az XX /vad fenotipusu/ és XO /mutáns fenotipusu/ szövetek keverten fordulnak elő. Utóbbiak megfelelő markerekkel láthatóvá tehetők a felnőtt Drosophila testfelszinén. A mozaik foltok csak akkor alakulhatnak ki, ha a mutáció nem autonóm. Mindkét módszernek vannak előnyei és hátrányai is. Tekintsük át röviden, melyek ezek.

A transzplantációs módszer technikailag körülményes. A nehézségeket fokozza, hogy a gazdaállatok túlélése mutáns szövetek átültetése esetén kicsi. Munkánk során a túlélés 2o % körül volt, ami egyezik mások eredményeivel is. /Murphy, személyes közlés./

A transzplantáció jellegzetessége, hogy a korongok az átültetés pillanatáig, tehát csaknem teljes lárvális életük során, mutáns környezetben fejlődnek. Nem biztos, hogy ezután vad környezetbe kerülve a korongok azonnal kompetenssé válnak. /Ez vonatkozik az in vitro evaginációs vizsgálatokra is./ Más szóval a transzplantációval megállapitott autonómia nem fogható fel ugy, mint a korongok abszolut tulajdonsága, hanem függ a korongok korától és állapotától. Ezért az autonómia részletesebb tanulmányozására többféle vizsgálatot tervezünk. Az egyiket "gyógyitási kisérlet"-nek nevezzük. Lényege az, hogy mielőtt a korongot az átalakuló lárva gazdába ültetnénk, vagy mesterséges táptalajra helyeznénk evaginálltatni, egy ideig vad tipusu felnőtt nőstény potrohában neveljük, ilyen módon időt adva a korongnak, hogy hormon válaszra képessé váljon. Egy másik kisérlet abban különbözik az előbbitől, hogy mig a korong a nőstény potrohában fejlődik, a nősténynek adott többszöri β-ekdizon injekcióval a hormon szintet magasan tartjuk.

Ha az autonómiát mozaik technikával vizsgáljuk, az alapvető különbség az, hogy a mutáns szövet kialakulásának pillanatától, tehát a kromoszómavesztés pillanatától meghatározott tipusu környezetben fejlődik.

Hogy ez a környezet milyen mértékben vad vagy mutáns, egyedenként változik. Előnye a módszernek, hogy vannak mutánsok, amelyek csak mozaik technikával vizsgálhatók. /Pl. korong hiányos mutánsok/. Hátránya, hogy a korongokon kivül a fejlődő lárvának vannak más mutáns részei is. Ha a letális mutáció autonóm ezekre a szövetekre, akkor elképzelhető, hogy ez a lárva pusztulásához vezet és nem fogunk mozaikos felnőtteket találni. Ha például egy mutáns autonóm a pupáriumképzés hiányára, de a korong fejlődésére nem, akkor az eredmény megtévesztő lehet. A pupáriumképzés hiányára autonóm mutánst pedig találtak a Stewart és munkatársai által izolált mutánsok között is. /Fristrom, személyes közlés./ Ennek ellenére a mozaik teszt értékes adatokkal járulhat majd hozzá mutánsaink jellemzéséhez.

A mutáció autonómiája szempontjából 17 törzset vizsgáltunk meg. Ezek közül 3 bizonyult részlegesen autonómnak /32/5, 7/4 és 35/4 /, 14 pedig nem volt autonóm. Mindhárom részlegesen autonóm törzs korongjai normális alakuak voltak. A 32/5 törzs korongjai in vitro evaginálták, de a sejtpusztulás ennek ellenére fokozott volt. Ez a törzs képezett pupáriumot, sőt egyes egyedei tuljutottak a pupális vedlésen is. A másik két törzs egyedei nem képeztek pupáriumot.

A Stewart által izolált mutánsok vizsgálata során Murphy azt találta, hogy a letális mutáció autonómiája és a fokozott sejtpusztulás korrelálnak egymással. Az általunk talált három részlegesen autonóm mutánsnál

valóban fokozott a sejtpusztulás, azonban tiz további törzset találtunk, amelyeknél a sejtpusztulás fokozott, ugyanakkor a mutáció nem autonóm. A Murphy által vizsgált törzsek esetében az autonóm mutánsok letális periódusa általában korábbra volt tehető, mint a nem autonóm mutánsoké. A fokozott sejtpusztulás szintén korai letalitással járt együtt. Ez utóbbival kapcsolatban a mi mutánsaink szolgáltatnak néhány ellenpéldát. Ilyen a 32/5 törzs, amely részlegesen autonóm, és a sejtelhalás is fokozott, ugyanakkor a lárvák képesek bebábozódni, sőt egyesek a pupális vedlést is túlélik. Lezajlik a pupális vedlés a 10/3 és 9/1 törzseknél is.

6.2 A mutáció feltételezhető hatása alapján várható mutáns fenotipusok.

Mivel a korongok fejlődése hormon indukált folyamat, számolnunk kell a hormontermelés esetleges zavaraival. Ha kizárjuk azt a lehetőséget, hogy az ekdizon máshol szintetizálódik a lárvális vedléskor és máshol a bábozódáskor, akkor a hormonnak elegendő mennyiségben kell rendelkezésre állnia a lárvális vedlésekhez, de kevésnek kell lennie a bábozódáshoz. Ez elvileg lehetséges, mert több hormon szükséges a bábozódás, mint a lárvális vedlés kiváltásához. Az ilyen "hormon mutáns", bár korongjai nem mutatnának sem alaki, sem funkcionális elváltozást és képesek lennének differenciálódni vad tipusu környezetben, nem tudna bábozódni.

A hormon hatás második lépése a hormon kötődése egy receptor-fehérjéhez. Ilyen ekdizon-receptorfehérje komplexet nem régen mutattak ki. /Yund, idézi Murphy 1974./ Egy feltételezett receptor mutáns korongjai normális alakuak, de funkcionálisan működésképtelenek lennének. Hasonló fenotipusa lenne azoknak a mutánsoknak, amelyeknél a hormon hatás valamilyen további lépése károsodott a korongokban.

A megfelelő kompetens korongok kialakulásához egészséges lárvális környezet szükséges és a fejlődő korong szöveteknek is genetikailag épnek kell lenniük, hogy a megfelelő lárvális környezetben normálisan fejlődjenek. Bármelyik feltétel nincs kielégitve, a korongok valószinüleg alaktani elváltozást szenvednek. Elképzelhető, hogy a korongok ki sem alakulnak, vagy kialakulnak, de fejlődésük visszamarad és a bábozódás idejére még nem kompetensek. Az ilyen mutáció egyaránt lehet autonóm és nem autonóm. Ha a mutáció nem autonóm, ez transzplantációval csak akkor mutatható ki, ha a korongnak a gazdaállatban van ideje elnyernie a kompetenciáját. Ellenkező esetben a mutáció autonómnak fog mutatkozni. Elképzelhető, hogy ha ilyen korongot a differenciáltatás előtt megfelelő ideig felnőtt gazdában nevelünk, idővel kompetenssé válhat.

Nagy a valószinüsége az olyan mutációnak, amely a hormon válasz másodlagos lépéseit szabályozó géneket érinti. Az ilyen mutáció hatása nagyon sokféle lehet és nehéz előre megjósolni, hogy milyen változást okoz

az imágó korongokban. Meg kell jegyeznünk, hogy a mutáció elsődleges hatásának feltárását erősen megnehezitik az esetleges pleiotrop hatás következtében fellépő jelenségek. Bár feltételeztük, hogy ha a yellow lárvák életképessége jó, akkor csökken a pleiotrop hatások valószinüsége, mégis az eukariótáknál nehéz elképzelni olyan mutációt, amelynek csak egyféle hatása lenne.

6.3 A mutáció feltételezhető hatása az általunk izolált törzsekben.

Mint emlitettük, egy olyan mutánsnak, amely a normálisnál kevesebb vagy kevésbé aktiv hormont termel, ideális esetben harmadik stádiumos letálisnak kell lennie teljesen ép, in vitro evaginálló nem autonóm korongokkal. Egy törzs rendelkezik e fenti jellemzőkkel, a 24/8. Természetesen ez csak annyit jelent, hogy az eddigi jellemzés nem zárta ki ennél a törzsnél, hogy a mutáció a hormontermelés zavarát okozta.

Ha a hormontermelés normális, de megváltozott a receptor fehérje, vagy a mutáció a hormon hatás olyan másodlagos lépését érinti, amelyhez valamilyen, csak a korongokban termelődő anyag szükséges, akkor a mutáns várható tulajdonságai a következők: normális alak, de az in vitro evaginációi hiányzik és a mutáció autonóm. Két ilyen törzsünk van, a 7/4. és a 35/4. Esetleg ide sorolható a 32/5 is.

A többi mutáns, ahol a mutáció nem autonóm, két csoportra osztható. Azok a törzsek, amelyek korongjait

alakilag és funkcionálisan épnek találtuk, valószinüleg nem korong mutánsok.

Azoknál a törzseknél, ahol a korongok morfológiája és funkciói károsodtak a mutáció következtében, a mutáció elsődlegesen nem a korong szövetre hat, és a korongokat a megváltozott lárvális környezet gátolja a fejlődésben, vagy éppen kárositja.

Meg kell még emlitenünk, hogy egyes mutáns törzsek idős lárváinak testüregében megfeketedett testecskéket figyeltünk meg. / 35/4, 43/4 és 32/5./ Ezek lehetnek esetleg a hemociták akkumulációi. Hasonló képződményeket találtak a Stewart által izolált egyik törzsben is. /Murphy 1974./

A számtalan felmerülő problémára a további vizsgálatoktól várunk választ. Terveink között legfontosabbak az autonómia vizsgálata mozaik technikával és a mutánsok térképezése.

Ö S S Z E F O G L A L Á S .

1./ Munkánk célja az volt, hogy az imágó korongok fejlődésében gátolt mutáns Drosophila melanogaster törzsek előállitásával lehetővé tegyük az imágó korongok fejlődésének tanulmányozását genetikai módszerekkel.

2./ A fenti cél érdekében kémiai mutagén segitségével a Drosophila melanogaster uj mutációit indukáltuk. A mutagén kezelés eredményeként 31 törzset különitettünk el, amelyek kromoszómájukon olyan recessziv letális mutációt hordoznak, amely a III. lárva stádium végén vagy korai bábként a mutációt hemizigóta állapotban hordozó him egyedek pusztulását okozza. A mutáció a mutáns törzsekben heterozigóta állapotban fenntartható és a hemizigóta szegregánsokban tanulmányozható.

3./ Az általunk izolált mutáns törzseket abból a szempontból jellemeztük, hogy a mutáció okozott-e valamilyen változást az imágó korongokban, és ha igen, akkor ez a változás autonóm tulajdonsága-e a korongoknak. E célból megvizsgáltuk a 96 órás lárvák korongjainak alakját, sejthalál mintázatát, in vitro evaginációs képességét és szerv átültetés segitségével a mutáció megnyilvánulását vad tipusu szöveti környezetben.

4./ A fenti vizsgálatok alapján a 31 törzsből 19-ben találtunk valamilyen elváltozást. Az elváltozások

összképe alapján előzetes feltételezéseket tehettünk arra vonatkozóan, hogy a mutáció a korongok fejlődésének milyen lépését érinthette.

Köszönetnyilvánitás.

Megköszönöm a MTA. Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete igazgatójának dr. Alföldi Lajosnak, hogy lehetővé tette az értekezés alapját képező kisérletek elvégzését és ösztönözte az értekezés összeállitását.

Köszönettel tartozom a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete Rovar-genetikai csoportja minden munkatársának és asszisztensének sokoldalu és nélkülözhetetlen segitségéért.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

Ashburner, M. /1972/. Puffing patterns in Drosophila melanogaster and related species. In "Developmental Studieson Giant Chromosomes" /W.Beerman ed./ Results and Problems in Cell Differenciation, Vol. 4. pp. 101-151. Springer-Verlag Berlin. New York.

Bautz, A.-M. /1971/. Chronologie de la mise en place de lhypoderme imaginal de labdomen de Calliphora erythrocephala Meigen. Arch. Zool. exp. gen. 112, 157-178.

Becker, H.J. /1957/. Über Röntgenmosaikflecken und Defektmutationen am Auge von Drosophila und die Entwicklungsphysiologie des Auges. Z. Vererb. - Lehre 88, 333-373.

Bhaskaran, G., Sivasubramanian, P. /1969/. Metamorphosis of imaginal discs /Musca domestica nebulo: Dipt. Muscidae/. J. Exper. Zool. 171, 385-396.

Bodenstein, D. /1950/. The postembryonic development of Drosophila. In Biology of Drosophila /Demerec. M.ed./ pp. 275-367. John Wiley, New York.

Borst, D.W. Bollenbacher, W.E., O Conner, J.D., King, D.S. és Fristrom, J.W. /1974/. Ecdysone levels during metamorphosis of Drosophila melanogaster. Közlésre benyujtva.

Bryant, P. J. /1971/. Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of Drosophila melanogaster. Devl. Biol. 26, 606-615.

Bryant, P. J., Schneiderman, H.A. /1969/. Cell lineage, growth and determination in the imaginal leg discs of Drosophila melanogaster. Devl. Biol. 20, 263-279.

Chevais S. /1944/. Déterminisme de la taille de l'oeil chez le mutant Bar de la Drosophile. Intervention d'une substance diffusible specifique. Bull. biol. france belg. 78, 71-110.

Chihara, C.J. Fristrom, J.W. /1974/. Effects and interactions of juvenile hormone and β-ecdysone on Drosophila imaginal discs cultured in vitro. Közlésre benyujtva.

Courgeon, A.-M. /1972/. Action of insect hormones at the cellular level. Morphological changes of a diploid cell line of Drosophila melanogaster, treated with ecdysone and several analogues in vitro. Exp. Cell. Res. 74, 327-336.

Doane, W.W. /1973/. Role of hormones in insect development. In Developmental Systems: Insects. /S.J. Counce and C.H. Waddington ed./ Vol 2. pp. 291-497. Acad.Press London and New York.

Ephrussi, B., Beadle, G. /1936/. A technique of transplantation for Drosophila. Amer.Naturalist 70, 218-225.

Fristrom, D. /1968/. Cellular degeneration in wing development of the mutant vestigial of Drosophila melanogaster. J. Cell. Biol. 39, 488-491.

Fristrom, D. /1969/. Cellular degeneration in the production of some mutant phenotypes in Drosophila melanogaster. Molec. Gen. Genet. 103, 363-379.

Fristrom, D. /1972/. Chemical modification of cell death in the Bar eye of Drosophila. Molec. Gen. Genet. 115, 10-18.

Fristrom, J.W. /1972/. The biochemistry of imaginal disc development. In "The Biology of Imaginal Discs". /H. Ursprung és R. Nöthiger ed./ Results and Problems in Cell Differenciation. Vol. 5, pp. 109-154. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York.

Fristrom, J.W., Logan, W.R. és Murphy C. /1973/. The synthetic and minimal culture requirements for evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster in vitro. Devl. Biol. 33, 441-456.

Garcia-Bellido, A.,Merriam, J.R.: Cell lineage of the imaginal discs in Drosophila gynandromorphs. J. Exptl. Zool. 170, 61-76 /1969/.

Garcia-Bellido, A., Merriam, J.R. /1971a/. Parameters of the wing imaginal disc development of Drosophila melanogaster. Devl. Biol. 24, 61-87.

Garcia-Bellido. A., Merriam, J.R. /1971b/. Clonal parameters of tergite development in Drosophila. Devl. Biol. 26, 264-276.

Gehring, W. és Nöthiger R. /1973/. In Developmental Systems: Insects /S.J. Counce and C.H. Waddington ed./ Vol. 2. pp. 211-290. Acad. Press London and New York.

Geigy, R. /1931/ Erzeugung rein imaginaler Defekte durch ultra-violette Eibestrahlung bei Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org. 125, 406-447.

Hadorn, E. /1963/. Differenzierungsleistungen wiederholt fragmentierter Teilstücke männlicher Genitalscheiben von Drosophila melanogaster nach Kultur in vivo. Devl. Biol. 7, 617-629.

Hadorn, E., Bertani, G., Gallera, J. /1949/. Regulationsfähigkeit und Feldorganisation der männlichen Genital-Imaginalscheibe von Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org. 144, 31-70.

Lees, A.D., Waddington, C.H. /1942/. The development of the bristles in normal and some mutant types of Drosophila melanogaster. Proc. Roy. Soc. B /Edinb./ 131, 87-110.

Lindsley, D. és Grell, E.H. /1968/. Genetic Variations of Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 627.

Mandaron, P. /1971/. Sur le mecanisme de l'evagination des disques imaginaux ches la Drosophile. Devl. Biol. 25, 585-605.

Murphy, C. /1974/. Cell Death and autonomous gene action in lethals affecting imaginal discs in Drosophila melanogaster. Közlésre benyujtva.

Nöthiger, R., Schubiger, G. /1966/. Developmental behavior of fragments of symmetrical and asymmetrical imaginal discs of Drosophila melanogaster /Diptera/. J. Embriol. exp. Morph. 16, 355-368.

Poodry, C.A., Schneiderman, H.A. /1970/. The ultrastructure of the developing leg of Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org. 166, 1-44.

Postlethwait, J.H., Schneiderman, H.A. /1971/. A clonal analysis of development in Drosophila melanogaster: morphogenesis, determination and growth in the wild-type antenna. Devl. Biol. 24, 477-519.

Postlethwait, J.A., Schneiderman, H.A. /1973/. Developmental genetics of Drosophila imaginal discs. Annu. Rev. Genet. 7, 381-433.

Ripoll, P. /1972/. The embrionic organisation of the imaginal wing disc of Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org. 169, 200-215.

Robb, J.A. /1969/. Maintenance of imaginal discs of Drosophila melanogaster in chemically defined media. J.Cell Biol. 41, 876-884.

Schläpfer, T. /1963/. Der Einfluss des adulten Wirtsmilieurs auf die Entwicklung von larvalen Augen-antennen-Imaginalscheiben von Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org. 154, 378-404.

Shearn, A., Rice, T., Garen, A., Gehring, W. /1971/. Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of Drosophila. Proc. nat. Acad. Sci. /Wash./ 68, 2594-2598.

Spreij, T.E. /1971/. Cell death during the development of the imaginal disks of Calliphora erythrocephala. Neth. J. Zool. 21, 221-264.

Stewart, M., Murphy, C., Fristrom, J.W. /1972/. The recovery and preliminary characterization of X chromosome mutants affecting imaginal discs of Drosophila melanogaster. Devl. Biol. 27, 71-83.

Tokunaga, C. /1962/. Cell lineage and differentiation on the male foreleg of Drosophila melanogaster. Devl. Biol. 4, 489-516.

Ursprung, H. /1959/. Fragmentierungs- und Bestrahlungsversuche zur Bestimmung von Determinationszustand und Anlageplan der Genitalscheiben von Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux'Arch. EntwMech. Org. 151, 504-558.

Ursprung, H. /1967/. In vivo culture of Drosophila imaginal discs. In "Methods in Developmental Biology" /Wilt, F.H. és Wessels, N.K.ed./ pp. 485-492. Thomas Y. Crowell Company New York.

Ursprung, H. /1972/. The fine structure of imaginal disks. In The Biology /H. Ursprung and R.nöthiger ed./ of Imaginal Disks.pp. 93-106. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York.

Ursprung, H., Sofer, W.H., Burroughs, N. /1970/. Ontogeny and tissue distribution of alcohol dehidrogenase in Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. Org. 164, 201-207.

Yund, M.A. és Fristrom, J.W. /1974/. Uptake and binding of β-ecdysone in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Közlésre benyujtva.

Vogt, M. /1943./ Aus Produktion und Bedeutung metamorphosefördernder Hormone während der Larvenentwicklung von Drosophila. Biol. Zbl. 63, 395-446.

Vogt, M. /1946/. Zur labilen Determination der Imaginalscheiben von Drosophila. II. Die Umwandlung präsumptiven Fühlergewebes in Beingewebe. Biol. Zbl. 65, 238-254.

Wigglesworth, V.B. /1965/. The Principles of Insect Physiology. Methuen, London.

Attila József Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

F Ü G G E L É K .

Attila József Tudományegyetem Központi Könyvtár
SZEGED

1. táblázat

A mutagenezis eredményének összefoglalása.

Kezelt himek száma	50
Utódot adott	45
Tesztelt nőstények /kromoszómák/ száma	1668
ebből - mortális	288
- nem letális	799
- letális	869
- késői lárva vagy korai báb letális	31

/ Lásd még 5.1 alatt. /

2. táblázat

A mutáns törzsek jellemzésének eredményei.

törzs	korongok mérete	in vitro evaginá-ció	sejt elhalás	auto-nómia	letális periódus
24/8	n	+	n	-	l-pp
29/1	n	+	n	na	pp
1/12	n	+	n	-	pp
2/2	n	+	n	na	pp
3/3	n	+	n	na	pp
42/1	n	+	n	-	pp
46/3	n	+	n	-	pp
28/2	n	+	f	na	pp
52/3	n	+	n	-	pp
32/5	n	+	f	r	pp-p
29/3	n	+	n	-	pp-p
5/5	n	Ø	f	na	l
7/4	n	Ø	f	r	l
34/6	n	Ø	f	na	l
35/4	n	Ø	f	r	l
4/3	n	Ø	f	na	pp
7/6	n	Ø	f	na	pp
32/6	n	Ø	f	na	pp
49/1	n	Ø	f	na	pp
38/5	k	Ø	n	-	l-pp
41/3	k	Ø	n	na	l-pp
1/5	k	Ø	-	-	pp
6/4	k	Ø	f	na	pp
10/3	k	Ø	f	na	pp-p
9/1	k	Ø	f	na	pp-p
11/6	Ø	-	-	-	l
43/4	Ø	-	-	-	l
52/4	Ø	-	-	-	l-pp
53/2	-	-	-	-	l
31/3	-	-	-	-	l-pp
38/3	-	-	-	-	pp

Rövidítések:

n = normális, k = kicsi, Ø = a vizsgálat eredménye negativ, + = a vizsgálat eredménye pozitiv, - = nem vizsgáltuk, f = fokozott, na = nem autonóm, r = részlegesen autonóm, l = lárválís, pp = prepupális, p = pupális. / Lásd még 5.2 alatt. /

1. fotó.

Spreij festéssel kimutatható sejthalál mintázat.
/ Részletesen lásd 4.3 alatt. /

A. Láb korong normális sejthalál mintázata.
B. Fokozott sejtelhalás láb korongban
/ 4/3-as törzs /.
C. Szárny korong normális sejthalál mintázata.
D. Fokozott sejtelhalás szárny korongban
/ 4/3-as törzs /.

A.

B.

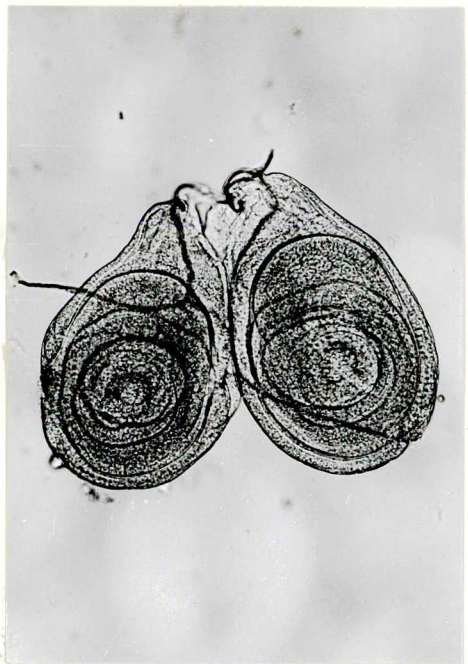
C.

D.

2. fotó.

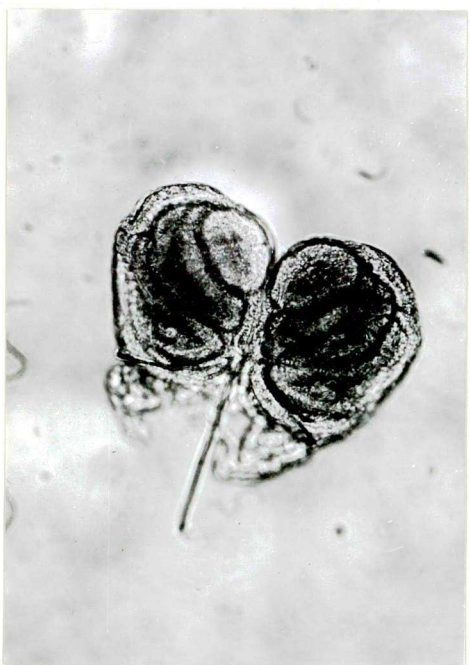
Láb korong in vitro evaginációjának fokozatai 0-tól 10-ig.

Kisérleteinkben ezt a képsort használtuk összehasonlitási alapként az evaginació fokának megállapitásához. / Lásd még 4.4 alatt. /

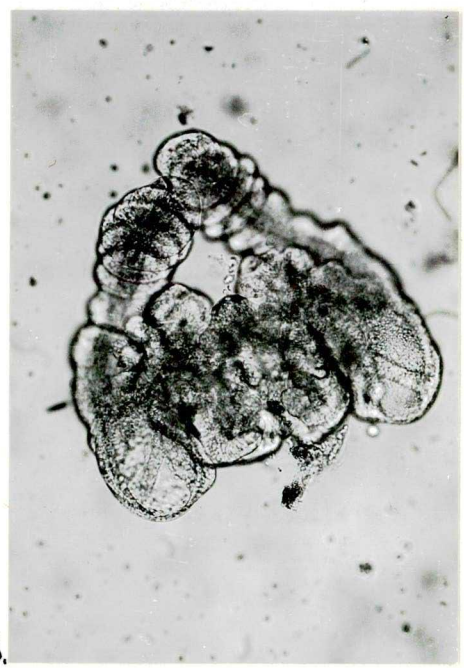


0.

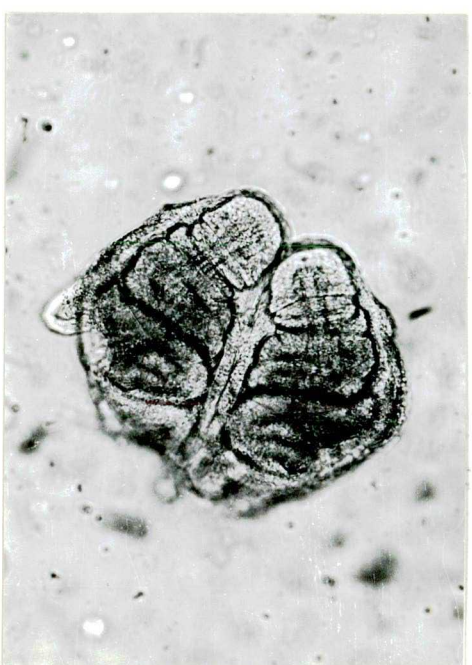
6.



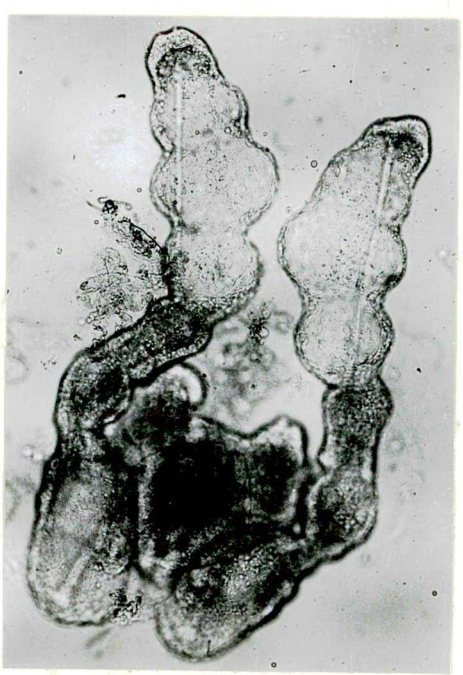
2.



8.



4.



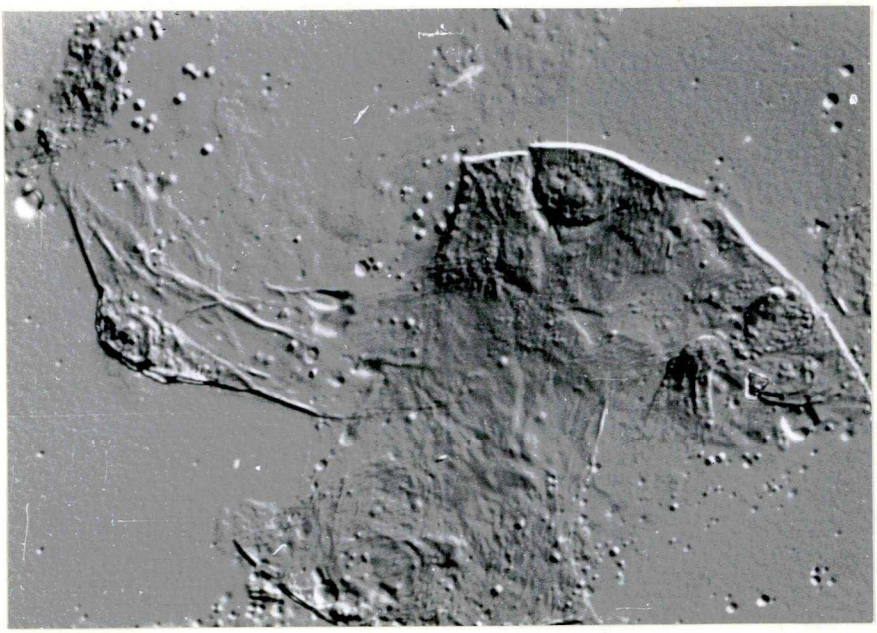
10

3. fotó.

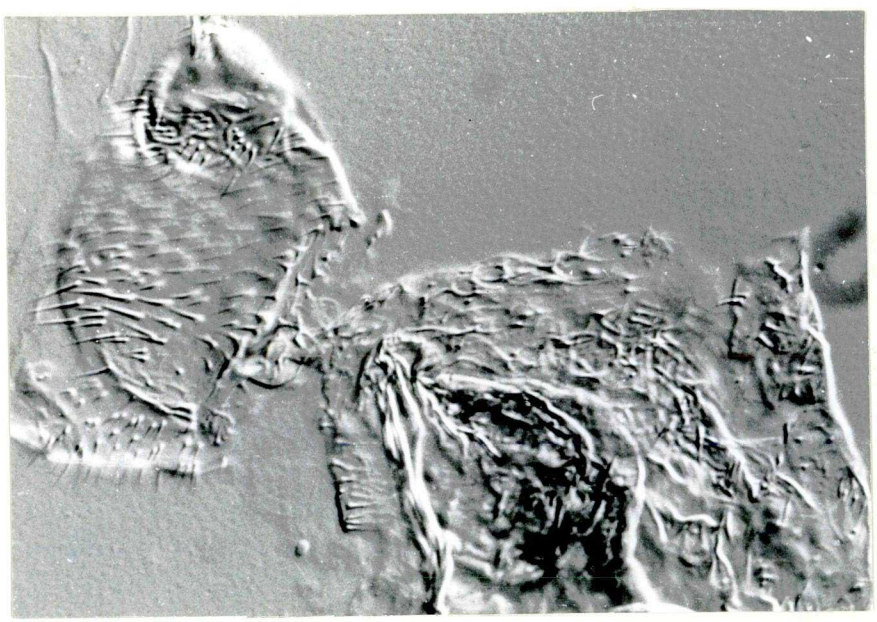
A 32/5-ös részlegesen autonóm mutáns törzs vad gazdába ültetett korongjai által kiválasztott kuti-kula. / Lásd még 5.2 alatt. /

A. Struktura nélküli kitin darab.

B. Láb strukturák.



A.



B.

4. fotó.

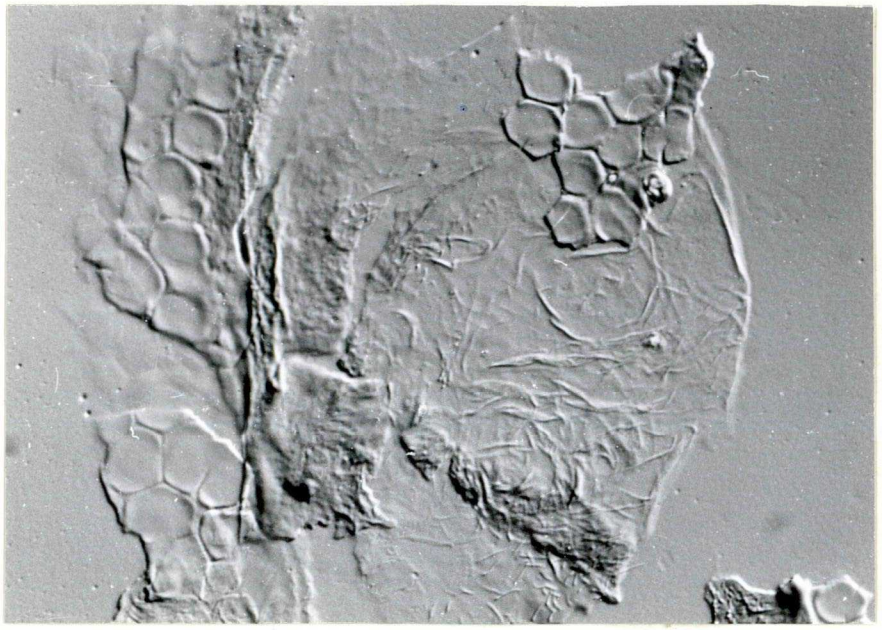
A 7/4-es részlegesen autonóm mutáns törzs vad gazdába ültetett láb korongja által kiválasztott struktura nélküli kutikula. / Lásd 5.2 alatt./

5. fotó.

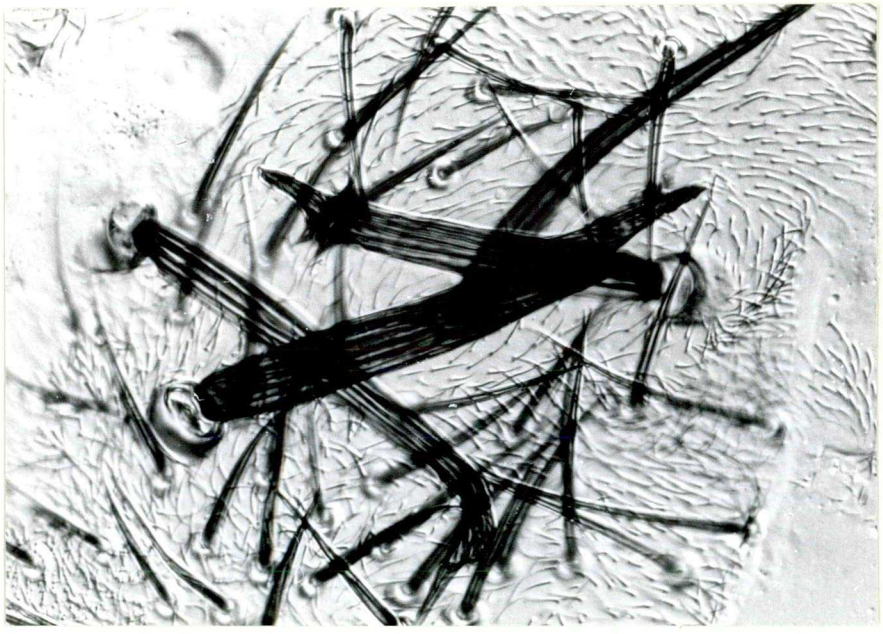
A 10/3-as nem autonóm mutáns törzs vad gazdába ültetett korongjai által kiválasztott kutikula.
/ Lásd 5.2 alatt. /

A. Szem strukturák.

B. Láb strukturák.



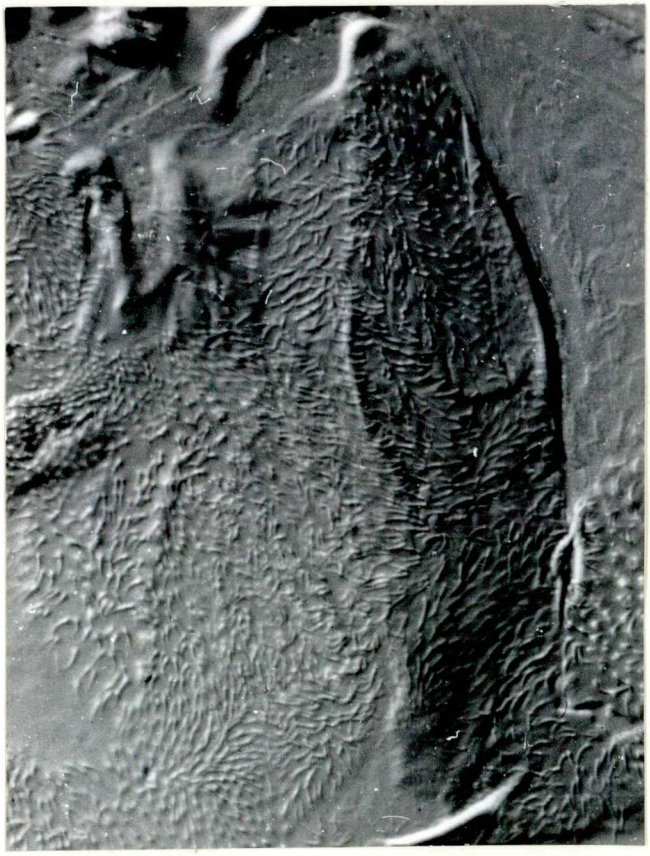
A.



B.

6. fotó.

A 3/3-as nem autonóm mutáns törzs vad gazdába ültetett korongja által kiválasztott billér struktúrák. / Lásd 5.2 alatt. /



József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED