

acrocentrici, in numero di 30, suddivisibili in 15 coppie di omologhi di lunghezza gradualmente decrescente tra le varie coppie (Figura 2).

Nei Pipidi africani e in *P. pipa* la metafase meiotica (I) della linea maschile presenta bivalenti muniti di 2 soli chiasmi di regola terminali (MORESCALCHI<sup>5</sup>; WICKBOM<sup>4</sup>; figura 4; la Figura 3 del presente lavoro); *P. parva* presenta invece bivalenti muniti per lo più di un solo chiasma, il quale spesso è in posizione procentrica (Figura 4).

*P. parva* è dunque carilogicamente assai primitiva, in quanto possiede cromosomi esclusivamente acrocentrici: se le osservazioni di WICKBOM su *P. pipa* fossero confer-

mate, il cariotipo di questa specie si potrebbe forse far derivare da quello di *parva* per fusioni centriche di alcune coppie di acrocentrici. Per i caratteri della meiosi della linea maschile, *P. parva* sembra differire alquanto dai Pipidi africani e da *P. pipa*<sup>6</sup>.

**Summary.** The karyotype of the African Pipid *Hymenochirus boettgeri* ( $2n = 24$ , all meta- or submetacentric chromosomes) is different from the one of the African Pipid *Xenopus laevis* ( $2n = 36$ ). The karyotype of the American Pipid *Pipa* (*Protopipa*) *parva* ( $2n = 30$ , all acrocentric chromosomes) is very primitive and different from the karyotypes of the African Pipids and from that of *Pipa pipa*; the male meiotic chromosomes of *P. parva*, usually with 1 procentric chiasma, show a clear difference from the male bivalents of the other Pipids, all with 2 terminal chiasmata.

A. MORESCALCHI

Istituto di Istologia ed Embriologia  
dell'Università di Napoli (Italia), 26 Luglio 1967.

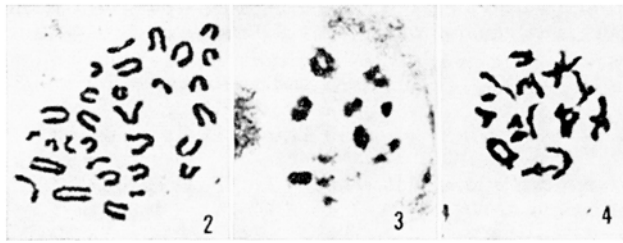


Fig. 2. Metafase intestinale di un ♂ di *Pipa* (*Protopipa*) *parva*.

Fig. 3. Metafase meiotica (I) di un ♂ di *H. boettgeri*.

Fig. 4. Metafase meiotica (I) di un ♂ di *P. parva*.

<sup>5</sup> A. MORESCALCHI, Riv. Biol. 19, 3 (1966).

<sup>6</sup> Ricerca effettuata con un contributo del C.N.R. (Impresa di Genetica).

## Nachweis einer durch symbiontische Mikroorganismen bewirkten Sterinsynthese in künstlich ernährten Aphiden (Homoptera, Rhynchotha, Insecta)

*Neomyzus circumflexus* Bckt. wurde über bisher 10 Generationen an einem vollsynthetischen Medium definierter Zusammensetzung gezüchtet<sup>1</sup>. Die 11. Generation entwickelt sich normal weiter, und zur Zeit spricht nichts gegen die Möglichkeit, diesen Siebröhrensauger getrennt von der Wirtspflanze über unendlich viele Generationen hinweg künstlich zu ernähren. Die Virgines der 1. Generation sind ebenso gross und fertil wie an *Vicia faba* gehaltene Tiere. Das Gewicht der Virgines der 2. Generation ist um 10%, ihre Fertilität um 15% reduziert; beides bleibt aber in den folgenden Generationen konstant. Mit ähnlichen Ergebnissen wird *Aphis fabae* Scop. zur Zeit in der 4. Generation künstlich ernährt.

Das verwendete Medium enthält keine Sterine, ebenso fehlen Fettsäuren und Fette. Der Zusatz von Cholesterin zum Medium beeinflusst weder Wachstum noch Reproduktion der daran ernährten Aphiden. Auch *Myzus persicae* Sulz. wurde an einem sterinfreien Medium ähnlicher Zusammensetzung sogar mindestens 20 Generationen lang gezüchtet<sup>2</sup>. Damit dürften Aphiden die ersten Insekten sein, für die experimentell bewiesen wurde, dass sie über zahlreiche Generationen ohne nennenswerte Beeinträchtigung von einer Sterinzufuhr mit der Nahrung völlig unabhängig sind. Bisher gilt als gesichert, dass Insekten im Gegensatz zu Säugetieren nicht in der Lage sind, Sterine zu synthetisieren<sup>3</sup>. Die einzige Ausnahme bildet *Ctenolepisma*<sup>4</sup>, jedoch ist in diesem Falle die Möglichkeit einer Cholesterinsynthese durch die Darmflora experimentell nicht ausgeschlossen worden. Solche Zusammenhänge wurden beispielsweise für *Blattella* nachgewiesen<sup>5</sup>.

Da festgestellt wurde, dass Aphiden auf Sterine in der Nahrung nicht angewiesen sind, sollte untersucht werden, ob in diesen Insekten eine Sterinsynthese nachweisbar ist. Weiterhin war gegebenenfalls zu prüfen, inwieweit die Symbionten der Aphiden daran beteiligt sind.

Das für die künstliche Ernährung von *N. circumflexus* verwendete Medium setzt sich wie folgt zusammen. L-Aminosäuren (in mg):  $\alpha$ -Alanin 100,  $\gamma$ -Aminobuttersäure 20, Arginin 400, Asparagin 300, Asparaginsäure 100, Cystein 50, Cystin 5, Glutamin 600, Glutaminsäure 200, Glycin 20, Histidin 200, Homoserin 800, Isoleucin 200, Leucin 200, Lysin (chlorid) 200, Methionin 100, Phenylalanin 100, Prolin 100, Serin 100, Threonin 200, Tryptophan 100, Tyrosin 20, Valin 200. Vitamine (in mg): Ascorbinsäure 100; Thiamin (dichlorid) 2,5; Riboflavin 5,0; Nicotinsäure 10,0; Pyridoxol (hydrochlorid) 2,5; Folsäure 1,0; Biotin 0,1; Na-pantothenat 5,0. meso-Inosit 50,0. Cholinchlorid 50,0. Salze (in mg):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  500;  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  200;  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  2,228;  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

<sup>1</sup> P. EHRHARDT, Z. vergl. Physiol., im Druck.

<sup>2</sup> R. H. DADD und T. E. MITTLER, Experientia 22, 832 (1966).

<sup>3</sup> D. GILMOUR, *The Biochemistry of Insects* (Acad. Press, New York 1961); R. B. CLAYTON, J. Lipid Res. 5, 3 (1964).

<sup>4</sup> R. B. CLAYTON, A. M. EDWARDS und K. BLOCH, Nature 193, 1125 (1962).

<sup>5</sup> R. B. CLAYTON, J. biol. Chem. 235, 3421 (1960).

0,268;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  0,793;  $\text{ZnCl}_2$  0,396;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  3,115. Saccharose (in g): 20.

Die Substanzen wurden mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und mit KOH auf pH 7,1 eingestellt. Nach Passieren eines Bakterienfilters wurde das Medium unter sterilen Bedingungen zwischen zwei Parafilmmembranen eingeschlossen<sup>6,7</sup>. Die Versuchstiere waren an den jeden 2. Tag erneuerten Medien geboren und ständig daran gehalten worden. Sie konnten also keine anderen als darin enthaltene Substanzen aufnehmen.

Bestimmt wurde zunächst der Steringehalt von *N. circumflexus* nach künstlicher Ernährung, und zwar in Virgines der 1. bis 8. Generation, jeweils 2–5 Tage nach der Imaginalhäutung. Die Extraktion der Sterine, die Trennung der Sterinfraktionen an Aluminiumoxid (Woelm) und ihre quantitative Bestimmung mittels der Tschugaeff-Reaktion wurde nach SCHÖN und GEY<sup>8</sup> durchgeführt. Die im Mikromaßstab ausgeführte Kolorimetrie ermöglichte eine sichere Bestimmung der Sterine bis zu 0,1 µg. Der Steringehalt ist auf Cholesterin bezogen, mit dem die Eichkurve ermittelt wurde.

Der Gesamtsteringehalt der Virgines (bestimmt pro Generation in je 2 Proben von 40–60 Virgines, entsprechend 25–40 mg) beträgt in 8 aufeinanderfolgenden Generationen jeweils 0,15; 0,13; 0,19; 0,21; 0,14; 0,18; 0,16 und 0,20 µg/mg Lebendgewicht, der Anteil veresteter Sterine entsprechend 32, 37, 29, 41, 45, 35, 25 und 33%. Dies zeigt, dass in künstlich ernährten Aphiden Sterine quantitativ erfassbar sind und der Steringehalt über 8 Generationen hinweg annähernd konstant bleibt. Damit wird eine Sterinsynthese in Aphiden sehr wahrscheinlich gemacht. Selbst bei Annahme einer Übertragung minimaler Sterinreserven von den Muttertieren auf die künstlich ernährten Nachkommen lässt sich der gleichbleibende Steringehalt in den 7 folgenden Generationen nicht erklären. Ausserdem wurde nachgewiesen, dass der Steringehalt in Larven der 1. Generation ansteigt von 0,08 µg im 2., auf 0,12 µg im 3., bis zu 0,16 µg (jeweils/mg Körpergewicht) im 4. Stadium. Mit gleicher Methode wurde der Steringehalt an *V. faba* saugender, 2–5 Tage alter Virgines ermittelt. Er betrug in 4 Proben 0,23; 0,31; 0,26 und 0,25 µg/mg Lebendgewicht und liegt somit nur wenig höher als bei künstlich ernährten Aphiden gleichen Alters. Eine genaue Identifizierung der quantitativ bestimmten Sterine wurde nicht durchgeführt; auf Grund dünnsschichtchromatographischer Trennungen an Kieselgel G mit Aceton-Chloroform-Gemischen und verschiedenen Anfärbungen<sup>9</sup> erscheint aber gesichert, dass Cholesterin den Hauptbestandteil der Sterinfraktion stellt.

Um den direkten Nachweis einer Sterinsynthese in Aphiden zu führen, wurde untersucht, ob  $\text{C}^{14}$ -Acetat in die Sterinfraktion eingebaut wird. Junglarven von *N. circumflexus* und *Acyrtosiphon pisum* Harr. wurden bis zum adulten Stadium (7–8 Tage) am Medium gehalten, dem Natriumacetat-1- $\text{C}^{14}$  (25 µg/ml Medium) zugesetzt war. Je 50–60 Virgines wurden nach obengenannter Methode extrahiert, die Sterinfraktionen an Aluminiumoxidsäulen abgetrennt und diese nach Vereinigung der freien und veresterten Sterine an Kieselgel-G-Schichten dünnsschichtchromatographisch mit Chloroform:Aceton (9:1) aufgetrennt und anschliessend Autoradiographien hergestellt. Zum Vergleich wurde reines Cholesterin-4- $\text{C}^{14}$  neben den Extrakten aufgetragen. Sowohl in den aus *N. circumflexus* als auch aus *A. pisum* gewonnenen Extrakten liessen sich ein markiertes freies Sterin und markierte Sterinester nachweisen. Dabei handelt es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um Cholesterin und dessen Ester, wie auf Grund des Verhaltens an Kieselgel-Schichten und gegenüber spezifischen Anfärbungen<sup>9</sup> gefolgert werden kann. Damit ist bewiesen, dass in beiden Aphidenarten

unter den Bedingungen der künstlichen Ernährung Sterine synthetisiert werden können.

Um zu prüfen, ob die Symbionten der Aphiden daran beteiligt sind, wurde das Verhalten von  $\text{C}^{14}$ -Acetat in Symbionten-freien Aphiden untersucht. Beide Aphidenspezies wurden für 21 Tage an Medien gehalten, denen 0,01% Chlortetracyclin und in den letzten 7 Tagen ausserdem Natriumacetat-1- $\text{C}^{14}$  zugesetzt worden war, und zwar in der gleichen Konzentration wie den nicht unter Antibioticeinfluss stehenden Kontrolltieren. Chlortetracyclinapplikation bewirkt bei Aphiden Elimination ihrer Symbionten, leicht erhöhte Mortalität, Verzögerung der Larvalentwicklung und Sterilität der Adulten<sup>10</sup>. Bei *N. circumflexus* liess sich nach Antibioticumzufuhr keine, bei *A. pisum* nur eine sehr minimale Einlagerung von Radioaktivität in die Sterinfraktion feststellen. Letzteres könnte durch eine noch nicht vollständige Ausschaltung der Symbionten bedingt sein. Die Befunde deuten sehr stark auf eine Beteiligung der Mikroorganismen bei der Cholesterinsynthese hin.

Es kann daraus nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse bei normal ernährten, an Pflanzen saugenden Aphiden geschlossen werden. Im Honigtau von *Myzus persicae* (an *Brassica campestris*) wurden Sterine festgestellt<sup>11</sup>. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese aus der Pflanze aufgenommen werden, da beispielsweise insbesondere in jungen Bohnenpflanzen ein Sterintransport im Phloem nachgewiesen werden konnte<sup>12</sup>. Ob dies generell zutrifft und Sterine den Siebröhrensaugern in genügender Menge von der Wirtspflanze geliefert werden, bleibt vorerst noch ungewiss. Fest steht, dass Aphiden ohne Sterinzufuhr mit der Nahrung über zahlreiche Generationen ohne Ausfallserscheinungen gezüchtet werden können und unter diesen Bedingungen und unter Beteiligung ihrer Symbionten Cholesterin zu synthetisieren vermögen<sup>13</sup>.

**Summary.** Up to now the aphid, *Neomyzus circumflexus* Bckt., has been reared on a synthetic, sterile diet for 11 successive generations. The culture is still going. The defined diet contains no sterol or any other lipid. Nevertheless the sterol content of the artificially fed aphids remains constant over 8 generations. Ingestion of sodium acetate-1- $\text{C}^{14}$  with the diet by the aphids leads to the appearance of a labelled sterol in the tissues of the insects. Incorporation of radioactivity into sterols was not found in aphids free of symbionts.

P. EHRHARDT

Institut für Angewandte Zoologie der Universität  
Bonn (Deutschland), 3. Juli 1967.

<sup>6</sup> T. E. MITTLER und R. H. DADD, *Nature* 195, 404 (1962).

<sup>7</sup> R. H. DADD, D. L. KRIEGER und T. E. MITTLER, *J. Insect Physiol.* 13, 249 (1967).

<sup>8</sup> H. SCHÖN und F. GEY, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 303, 81 (1956).

<sup>9</sup> E. STAHL, *Dünnsschichtchromatographie* (Springer Verlag, Berlin 1962).

<sup>10</sup> P. EHRHARDT und H. SCHMUTTERER, *Z. Morph. Ökol. Tiere* 56, 1 (1966).

<sup>11</sup> F. E. STRONG, *Nature* 205, 1242 (1965).

<sup>12</sup> O. BIDDULPH und R. CORY, *Plant Physiol.* 40, 119 (1965).

<sup>13</sup> Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Frau U. SCHLAUSS sei für technische Hilfe gedankt.