

the head in order to cover the animal entirely (fig. 2f-i). The fins have no function in burrowing, neither in Sepioids nor in *Sepia*.

In *Sepietta*, the mean length of time of the second phase is greater than that of the first phase; in *Sepioida*, it is less. In *Sepietta* particularly, the second phase seems to play a certain role of expression. The burrowing activity manifests itself in accordance with an evidently specific excitability.

In several experiments, the reactions to differences in the substratum (sand with varying particle size) were studied.

LITERATUR

- JAECKEL, S. G. A. 1958. *Cephalopoden*, in: Tierwelt der Nord- und Ostsee. IX b 3: 479-723. Leipzig.
- LEVY, F. 1912. *Ueber die Copula von Sepioida atlantica d'Orb.* Zool. Anz. 39: 284-290.
- NAEF, A. 1923. *Die Cephalopoden*, in: Fauna Flora Golf. Neapel, 35. Monogr. (I) 1 Berlin.
- RACOVITZA, E. G. 1894. *Notes de Biologie. III. Moeurs et reproduction de la Rossia. macrosoma (D. Ch.).* Arch. Zool. expér. gén. (3) 2: 491-539.

Nº 32. P. S. Chen und R. Bühler. — Isolierung und Funktion des Sexpeptids bei *Drosophila melanogaster*.¹ (Mit 3 Textabbildungen)

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich.

In einer früheren Arbeit haben wir ein Peptid in den Paragonien von adulten Männchen von *Drosophila melanogaster* lokalisiert (CHEN und DIEM, 1961). Nach seiner papierchromatographischen Beweglichkeit und Aminosäurezusammensetzung entspricht dieses Peptid sehr wahrscheinlich dem Sexpeptid, welches von FOX (1956a, b) in Extrakten der ganzen Fliegen gefunden wurde. GARCIA-BELLIDO

¹ Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützungen durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

(1964) zeigte, dass Transplantation von Paragonien in virginelle Weibchen einen starken Anstieg der Fekundität bewirkt. Ein ähnlicher Anstieg der Fekundität wurde beobachtet bei Injektion des Paragoniensekretes. Die Resultate von GARCIA-BELLIDO wurden bestätigt durch LEAHY (1966) und MERLE (1969). Es muss nun gezeigt werden, dass das Sexpeptid wirklich das aktive Prinzip für die Stimulation der Eiablage ist. Um diesen Punkt zu klären, isolierten wir das Peptid aus einer grossen Anzahl Männchen von *Drosophila* mit Hilfe der präparativen Ionenaustausch-Chromatographie. Getestet wurde die reine Substanz, indem wir sie in virginelle Weibchen injizierten.

MATERIAL UND METHODE

Als Untersuchungsmaterial dienten 8-tägige adulte Fliegen des Wildtyps (Sevelen) von *Drosophila melanogaster*. Ca. 0,2 bis 5 gr. Fliegen wurden entweder in 80% Methanol oder 5% Trichloressigsäure homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde die überstehende Lösung durch Ausschütteln mit Chloroform oder Aether und Chloroform gereinigt und bis zur Trockne eingedickt. Die Trockensubstanz wurde in bidestilliertes Wasser oder 0,1 *n* HCl aufgenommen. Die Auftrennung der in den Extrakten enthaltenen ninhydrinpositiven Substanzen geschah mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie, gemäss den Angaben von SPACKMAN et al. (1958). Einzelheiten zur Identifikation und quantitativen Bestimmung der verschiedenen Aminosäuren finden sich bei CHEN und HANIMANN (1965). Mittels des „Stream Dividing Systems“ konnte ein Teil des Eluats nach Elution aus der präparativen Harzsäule in einem Fraktionskollektor gesammelt werden. Jede Fraktion wurde auf dem Chromatogramm automatisch markiert, damit man sofort feststellen konnte, in welchem Tubus sich das Sexpeptid befand. Die Fraktionen mit dem Sexpeptid wurden mit Hochspannungselektrophorese bei pH 1,5 (8% HCOOH) und 2100 Volt entsalzt (siehe CHEN et al. 1968).

Für die Injektion wurde das entsalzte Peptid im Eksikkator über Phosphor-pentoxid und NaOH getrocknet und anschliessend in wenig Insekten-Ringer-Lösung (BODENSTEIN, 1946) aufgenommen und das pH auf 6-7 eingestellt. Von dieser Lösung wurde mit Hilfe einer Mikrospritze ca. 0,03 μ l in jedes Weibchen gespritzt. Bei den verschiedenen Serien entsprach die gespritzte Menge Peptid ca. 1/3 oder 1/15 einer Paragoniendrüse. Als Kontrollen dienten gleichaltrige Weibchen, gespritzt nur mit Ringerlösung, virginelle Weibchen ohne Injektion und befruchtete Weibchen. Die Fliegen wurden einzeln in kleinen Glastuben gehalten, die befruchteten Weibchen mit je zwei Männchen zusammen. Das Futter wurde auf einem Blechtellerchen täglich frisch in die Tuben gebracht. Ebenfalls täglich wurden die gelegten Eier jedes Weibchens während einer Zeitdauer von 14 Tagen gezählt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Sorgfältige Ueberprüfung des Chromatogramms ergab, dass bei den Männchen ein hoher Peak in der sauren Region zwischen Phosphoserin und Glycerophosphoäthanolamin erscheint. Dieser wurde nach ca. 100 Minuten (50 ml Eluat) bei pH 3,28 und 50° C aus der Harzsäule eluiert (Peak SP, bezeichnet durch einen

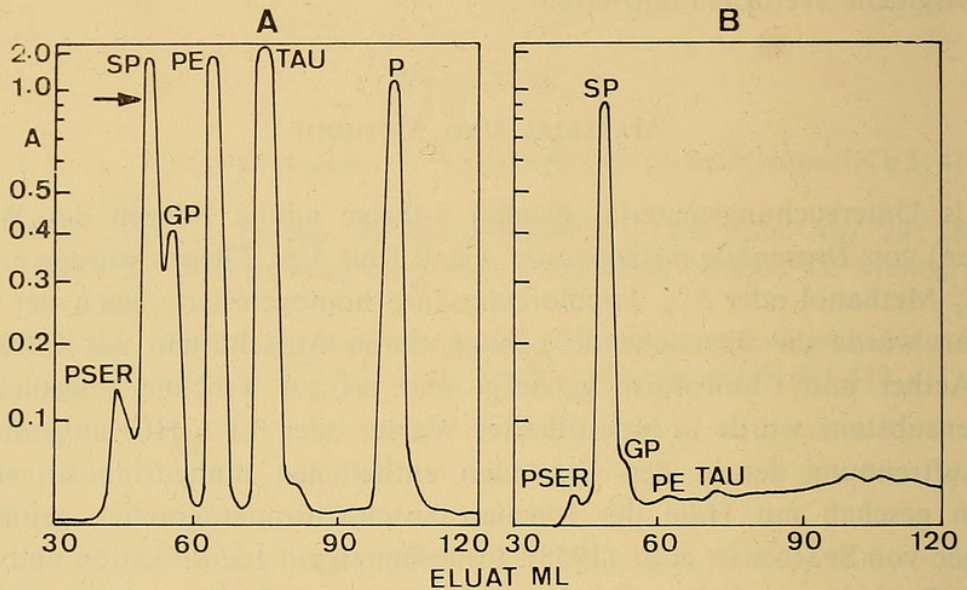


ABB. 1.

A. Chromatogramme der sauren ninhydrinpositiven Komponenten aus 8-tägigen Männchen von *Drosophila melanogaster* (Konzentration 0,15 gr Frischgewicht pro 1,5 ml). B. Chromatogramm eines methanolischen Extraktes von 230 Paragonienpaaren, herausgezielt aus 8-tägigen Männchen. Ordinate: Absorption bei 570 nm. Abszisse: Volumen des Eluates in ml. In beiden Diagrammen sind nur die ersten 120 ml Eluat aufgezeichnet. Das Sexpeptid (SP) ist durch einen Pfeil bezeichnet. PSER, Phosphoserin; GP, Glycerophosphoäthanolamin; PE, Phosphoäthanolamin; TAU, Taurin; P, ein weiteres Peptid.

Pfeil in Abb. 1 A). Verschiedene Tatsachen lassen darauf schliessen, dass dieser Peak das Sexpeptid anzeigt. Der Peak befindet sich sehr nahe bei Tyrosin-O-phosphat. Wie aber frühere Untersuchungen zeigten, ist die Konzentration dieses Phosphatesters in Adultstadien sehr gering (CHEN und HANIMANN, 1965, MITCHELL und LUNAN, 1964). Bis jetzt wurden keine registrierbaren Mengen davon in den Fraktionen, die das Sexpeptid enthalten, gefunden. Weiter wurden bis jetzt keine sexuellen Unterschiede im Gehalt von Tyrosin-O-phosphat bei adulten *Drosophila*-Fliegen nachgewiesen. Man kann also Tyrosin-O-phosphat nicht mit dem Sexpeptid verwechseln.

Nachprüfung mit zweidimensionaler Papierchromatographie ergab, dass die entsalzte Probe an dieselbe Stelle wandert wie das Sexpeptid (siehe Fox et al., 1959, CHEN und DIEM, 1961). Einen weiteren Beweis dafür, dass der Peak das Sexpeptid anzeigt, gibt die Auftrennung eines Extraktes, der nur aus Paragoniendrüsen hergestellt wurde. Dazu wurden 230 Paragonienpaare aus adulten Männchen herausseziert und mit Methanol extrahiert. Auf dem Chromatogramm (Abb. 1 B)

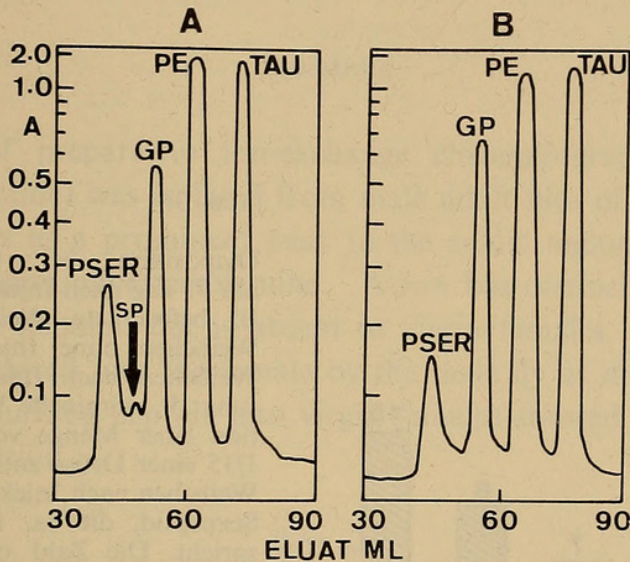


ABB. 2.

Vergleich der Chromatogramme zwischen
befruchteten (A) und virginellen (B) Weibchen
In beiden Diagrammen sind nur die ersten 90 ml
Eluat aufgezeichnet.
Für weitere Erläuterungen siehe Text in Abbildung 1.

kann man nur einen einzigen grossen Peak erkennen. Dieser Peak erscheint an genau derselben Stelle wie das Sexpeptid auf dem Chromatogramm ganzer Männchen. Wie sich aus der Höhe des Peaks berechnen lässt, stimmt die Menge des Sexpeptids, die in den Paragonien allein enthalten ist, ziemlich genau mit derjenigen aus den ganzen Männchen überein. Das beweist, dass das Sexpeptid nur in den Paragonien gebildet wird.

Ein weiterer interessanter Punkt ist das Vorhandensein eines sehr niederen aber scharf abgegrenzten Peaks an derselben Stelle wie das Sexpeptid auf dem Chromatogramm von befruchteten Weibchen (Abb. 2 A). Untersucht man aber virginelle Weibchen, so findet man dort keinen Peak, im Gegensatz zu Proben aus befruchteten Weibchen (Abb. 2 B). Dies deutet darauf hin, dass das Sexpeptid während der Kopulation von den Männchen in die Weibchen übertragen wird.

Um die Wirkung des Sexseptides auf die Fekundität zu testen, wurde das gereinigte Peptid in ein- bis zweitägige unbefruchtete Weibchen gespritzt. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Man erkennt einen 2- bis 3-fachen Anstieg der Zahl gelegter Eier, verglichen mit der Eizahl virgineller, ungespritzter Weibchen. Der Stimulationseffekt scheint konzentrationsabhängig zu sein. Weiterhin zeigt sich, dass eine einzige Injektion genügt, um die Fekundität

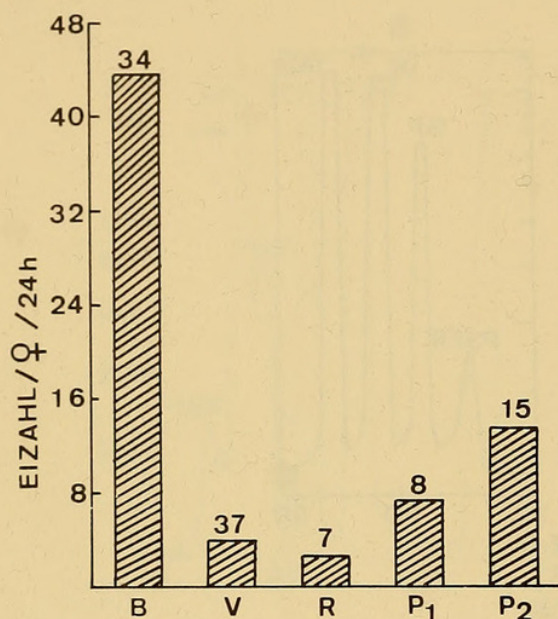


ABB. 3.

Oviposition bei *Drosophila*-Weibchen am 9. Tag nach Injektion des Sexseptides. B, befruchtete Weibchen; V, virginelle Weibchen ohne Injektion; R, virginelle Weibchen nach Injektion mit Ringerlösung; P₁, virginelle Weibchen nach Injektion einer Menge von Sexseptid, die ca. 1/15 einer Drüse entspricht; P₂, virginelle Weibchen nach Injektion einer Menge von Sexseptid, die ca. 1/3 einer Drüse entspricht. Die Zahl oberhalb jeder Säule bedeutet die Anzahl der untersuchten Weibchen.

während der ganzen Legezeit auf einem hohen Niveau zu halten. Die Injektion von reiner Salzlösung zeigt keinen stimulierenden Effekt auf die Fekundität.

Somit haben wir nachgewiesen, dass die Injektion eines einzigen Peptides aus den Paragondiendrüsen denselben Effekt hat wie Injektion von Rohextrakten oder Transplantation ganzer Drüsen. Allerdings war der stimulierende Effekt bei der Injektion des reinen Peptides kleiner als derjenige bei den Transplantationsversuchen. Dies ist aber verständlich, da die sekretorische Tätigkeit der transplantierten Drüsen im Wirt andauert, während hier jede Fliege nur eine einmalige Peptiddosis erhielt. Vorderhand bleibt der Mechanismus der Stimulation noch unklar. Unsere weiteren Untersuchungen über den Turnover, die Synthese sowie die genetische Kontrolle des vorliegenden Peptids sind noch im Gang.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der präparativen Ionenaustausch-Chromatographie wurde die Paragonsubstanz (Sexseptid) aus adulten Männchen von *Drosophila melano-*

gaster isoliert. Sie erscheint als ein deutlich abgetrennter Peak in der sauren Region, zwischen Phosphoserin und Glycerophosphoäthanolamin. An derselben Stelle erscheint bei befruchteten Weibchen auch ein zwar kleiner, aber gut abgegrenzter Peak, der bei unbefruchteten Weibchen fehlt. Dies deutet darauf hin, dass die Substanz bei der Kopulation vom Männchen auf das Weibchen übertragen wird. Injektion des isolierten und gereinigten Peptids in unbefruchtete Weibchen bewirkte einen 2 bis 3-fachen Anstieg der Eiablage.

SUMMARY

By means of preparative ion-exchange chromatography the paragonial substance (sex peptide) was isolated from male adult flies of *Drosophila melanogaster*. It appears as a prominent peak in the acidic region between phosphoserine and glycerophosphoethanolamine. A low but distinct peak occurs in the position in mated females, but is absent in virgin females, indicating that this substance is introduced into the female by the male fly at mating. Injection of the isolated and purified peptide into virgin females showed a two- to threefold increase of oviposition.

RÉSUMÉ

La substance paragoniale (sex peptide) a été isolée par chromatographie par échange d'ions à partir d'adultes mâles de *Drosophila melanogaster*. Elle apparaît comme un sommet important dans la région acide entre la phosphoserine et la glycerophospho-ethanolamine. Un sommet moins élevé mais bien distinct apparaît dans la même position chez les femelles après copulation, mais manque chez les femelles vierges montrant que cette substance est introduite chez la femelle par le mâle au moment de l'accouplement. L'injection du peptide isolé et purifié chez les femelles vierges provoque une augmentation de la ponte du simple au double ou au triple.

LITERATUR

- BODENSTEIN, D. 1946. *Investigation on the locus of action of DDT in flies (Drosophila)*. Biol. Bull. Woods Hole 90: 148-157.
- CHEN, P. S. und C. DIEM. 1961. *A sex-specific ninhydrin-positive substance found in the paragonia of adult males of Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol. 7: 289-298.
- und F. HANIMANN. 1965. *Ionenaustauschchromatographische Untersuchungen über die freien Aminosäuren und Derivate während der Entwicklung von Drosophila melanogaster*. Z. Naturf. 20b: 307-312.

- CHEN, E. KUBLI und F. HANIMANN. 1968. *Auftrennung der freien ninhydrin-positiven Stoffe in Phormia und Drosophila mittels zwei-dimensionaler Hochspannungselektrophorese*. Rev. suisse Zool. 75: 509-523.
- FOX, A. S. 1956a. *Chromatographic differences between males and females in Drosophila melanogaster and role of X and Y chromosomes*. Physiol. Zool. 29: 288-298.
- 1956b. *Paper chromatographic studies of the effects of the lozenge pseudoalleles on free amino acids and peptides in Drosophila melanogaster*. Z. Vererbhre 87: 354-566.
- C. G. MEAD and I. L. MUNYON. 1959. *Sex peptide of Drosophila melanogaster*. Science, N.Y. 129: 1489-1490.
- GARCIA-BELLIDO, A. 1964. *Das Sekret der Paragonien als Stimulus der Fekundität bei Weibchen von Drosophila melanogaster*. Z. Naturf. 19b: 491-495.
- LEAHY, M. G. 1966. *Egg deposition in D. melanogaster increased by transplant of male paragonia*. Drosophila Information Service 41: 145-146.
- MERLE, J. 1969. *Nature des stimulation apportées par le mâle sur la physiologie des Drosophiles femelles*. Abst. Ist. European Drosophila Res. Conference, The Hague, Netherlands.
- MITCHELL, H. K. und K. D. LUNAN. 1964. *Tyrosine-O-phosphate in Drosophila*. Arch. Biochem. Biophys. 106: 219-222.
- SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN and S. MOORE. 1958. *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino-acids*. Analyt. Chem. 30: 1190-1206.
-



Chen, P. S. and Bühler, R. 1970. "Isolierung und Funktion des Sexpeptids bei *Drosophila melanogaster*." *Revue suisse de zoologie* 77, 548–554.

<https://doi.org/10.5962/bhl.part.75908>.

View This Item Online: <https://www.biodiversitylibrary.org/item/126814>

DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.part.75908>

Permalink: <https://www.biodiversitylibrary.org/partpdf/75908>

Holding Institution

Smithsonian Libraries and Archives

Sponsored by

Biodiversity Heritage Library

Copyright & Reuse

Copyright Status: In Copyright. Digitized with the permission of the rights holder.

Rights Holder: Muséum d'histoire naturelle - Ville de Genève

License: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

Rights: <https://www.biodiversitylibrary.org/permissions/>

This document was created from content at the **Biodiversity Heritage Library**, the world's largest open access digital library for biodiversity literature and archives. Visit BHL at <https://www.biodiversitylibrary.org>.