

Dufterlernen bei Larven der Taufliege *Drosophila*

Ein Leitfaden

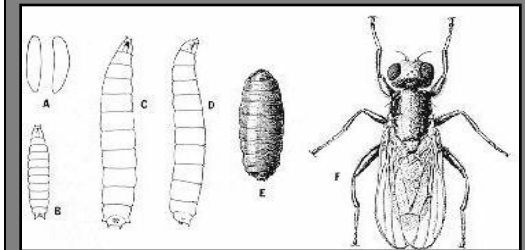
Jeannette Thum, Birgit Michels, Bertram Gerber
Universität Würzburg

Hintergrund

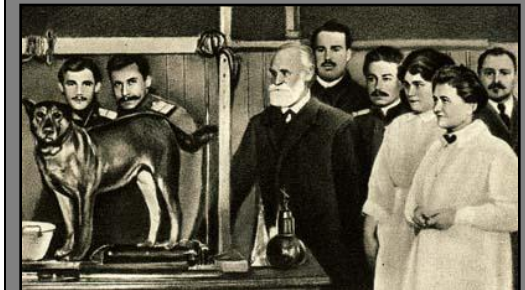
Zu dem Themenkreis „Bau und Funktionsweise von Nervenzellen und Gehirn“, „Sinnesorgane“ und „Genetik“ bietet der Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie an der Universität Würzburg, gemeinsam mit dem „Bio-Logisch“-Programm der Robert-Bosch Stiftung ein experimentelles Projekt anhand der Larven der Taufliege *Drosophila* an.

Der Versuch eignet sich einerseits um das assoziative Lernen direkt beobachtbar zu machen, sowie um in Grundlagen der Funktion des Nervensystems einzuführen. Da die Taufliege *Drosophila* das Paradeobjekt der tierischen Genetik ist, besteht die Möglichkeit an interessante Aspekte der klassischen und modernen Genetik heranzuführen.

Der Versuch beschäftigt sich mit dem Geruchslernen. Die etwa 4 Millimeter großen Tiere laufen auf einer tortengussartigen Oberfläche herum, und zwar erstaunlich schnell (ca. 2 mm pro Sekunde). Der „Tortenguss“ befindet sich in einer Plastikschiene. Zum Lernen wird den Tieren zunächst auf einer zuckerhaltigen Schale ein Duft präsentiert. Während sich die Larven vollfressen, nehmen sie den Geruch wahr; dann werden sie auf eine fade Schale gebracht und einem anderen Duft ausgesetzt. Nachdem man diese Prozedur drei Mal wiederholt hat, kommen sie in eine Testschale und können zwischen den beiden Düften auf den beiden Seiten wählen. Wenn die Larven etwas gelernt haben, wandern sie zu dem Geruch, der vorher auf der zuckrigen Schale zu riechen war. Das ist eine klassische Konditionierung, wie sie Pawlow mit seinen Hunden durchgeführt hat.



Lebensstadien bei *Drosophila*:
Ei, Larvenstadien, Puppe, Imago



Hund, Pawlow, Mitarbeiter

Materialien

Agarose, Fructose (FRU), Wasser, n-Amylacetat (AM), 1-Octanol (OCT), Paraffin

Große Petrischalen (15 mm Höhe, Durchmesser 92 mm), kleine Petrischalen (60 mm Durchmesser), 2 Rührfische, PET-Spritzflasche, 2 Mikrowellen-geeignete Gefäßflaschen mit Verschluss (Beschriftung: PUR bzw. FRU), Wassergefäß, Stoppuhr, Pinsel, Spatel, 2 gebogene Pinzetten (Beschriftung: AM bzw. OCT), Eppendorf-Gefäß, Schere, Mülleimer, Spültücher

Magnetrührer, Waage, Mikrowelle, 100 µl-Pipette, 1000 µl-Pipette, Pipettenspitzen (Größe: 5-200 µl und 100-1000 µl), Vortexgerät

n-Amylacetat, Paraffin

VWR International

Hilpertstr. 20A

64295 Darmstadt

www.vwr.com

Tel: 06151 / 3972-0

1-Octanol

Sigma-Aldrich Chemie

Eschenstraße 5

82024 Taufkirchen

www.sigma-aldrich.com

Tel: 0800-51 55 000

Agarose, Fructose

Fa. Roth

Schoemperlenstraße 3-5

76185 Karlsruhe

www.carlroth.de

Tel: 0800 / 5699 000

Laborgeräte

Fa. Hartenstein

Estenfelder Straße 74

97078 Würzburg

www.laborversand.de

Tel: 0931 / 245 22

Auf Anfrage können von der Universität Würzburg gestellt werden:

Perforierte Deckel für die großen Petrischalen, Duftcontainer aus Teflon, 5 Tage alte Larven der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Zehn Referatsthemen „Klassische Konditionierung von Taufliegenlarven“

Film zum Experiment (Bayrischer Rundfunk, Faszination Wissen)

Sicherheitsdatenblätter

Fliegenhaltung an der Universität Würzburg

Drosophila-Fliegen werden in Kulturflaschen mit Futterbrei gezüchtet, und zwar bei 25 °C, 60%-70% relative Luftfeuchtigkeit, und einem 14/10 h Licht/Dunkel-Rhythmus. An der Universität Würzburg steht dafür eine spezielle Klimakammer zur Verfügung, im Prinzip kann die Fliegenhaltung aber ohne weiteres auch auf einem Fensterbrett erfolgen. Der Futterbrei enthält im wesentlichen Maismehl, Agar-agar, Haushaltszucker, Trockenhefe und Wasser und ist zuweilen mit Antibiotika versetzt, um Bakterien- bzw. Pilzwachstum zu verhindern.

Jeden Tag werden die Fliegen in ein neues Futterglas mit Futterbrei umgesetzt (in etwa immer um die gleiche Uhrzeit) und mit dem aktuellen Datum beschriftet. Dann können sie 24 Stunden lang in das Futterglas Eier ablegen, ehe sie am nächsten Tag erneut in ein frisches Futterglas mit Futterbrei überführt werden.

Nach der Eiablage dauert die Larvenphase ca. sechs Tage, darauf folgt eine ca. viertägige Puppenruhe, erst dann schlüpft die erwachsene Fliege, die sich nach ein bis zwei Tagen erneut fortpflanzt.

Für den Versuch werden 5 Tage alte Larven (90 bis 122 h nach Eiablage) verwendet. Da nur Larven getestet werden sollen, die sich noch im Fress- und noch nicht im Wanderungsstadium (und also schon nahezu im Puppenstadium) befinden, sollen keine Larven gesammelt werden, die bereits die Glaswand emporkriechen (schwarzer Pfeil), sondern nur Larven, die noch im Futterbrei sind (weißer Pfeil).



Klimakammer Universität Würzburg



Fliegenlarven in der Kulturflasche

Herstellung der Trainings- und Testplatten I

Pro 2er Gruppe von Experimentatoren (für 2 Experimentier-Durchgänge):
14 große Petrischalen, 2 g Agarose, 36 g Fructose, 200 ml dest. Wasser

Außerdem:

Waage, Mikrowelle, 2 Gefäßflaschen mit Verschluss (Beschriftung: PUR bzw. FRU), PET-Spritzflasche, Magnetrührer,
2 Rührfische, Spültücher

Die folgende Anleitung bezieht sich auf die Herstellung von 100 ml Agaroselösung und 100 ml Fructoselösung.
Mit 100 ml Lösung können ca. 10 Petrischalen gegossen werden, so wie es für eine 2er Gruppe von Experimentatoren vorgesehen ist.

Zunächst werden die Petrischalen auf einer Arbeitsfläche ausgelegt und alle benötigten Materialien bereitgestellt.

Dann wird eine 1%ige Agaroselösung hergestellt: Man gibt 100 ml dest. Wasser in eine Gefäßflasche, wiegt 1g Agarose ab und schüttet diese in die Gefäßflasche, die anschließend locker verschlossen und geschüttelt wird.



Petrischalen, Agarose, Fructose

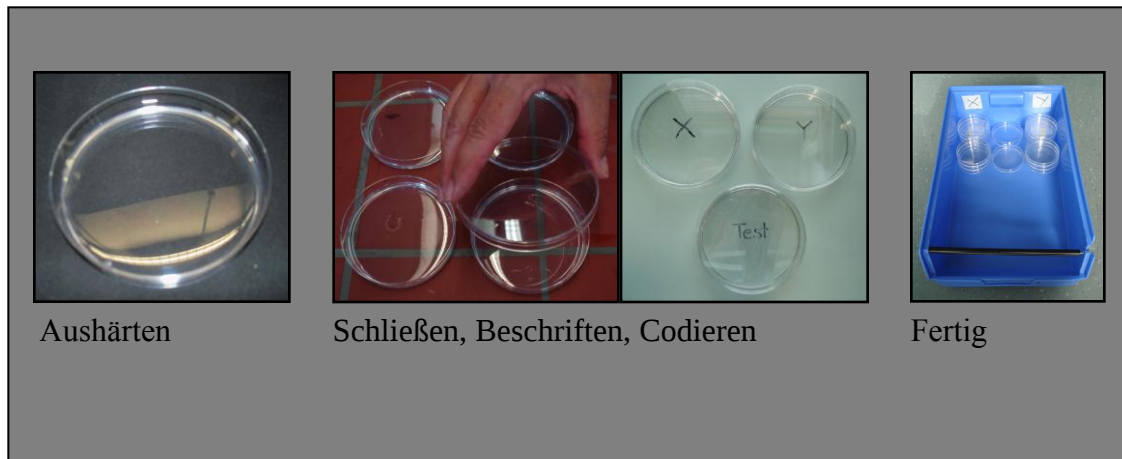
Wasser einfüllen, Agarose wiegen, Agarose einfüllen

Herstellung der Trainings- und Testplatten II

Die Agaroselösung wird in der Mikrowelle 2-3 Minuten bei mittlerer Hitze zum Sieden gebracht. Das Erhitzen soll unterbrochen werden, wenn die Lösung zu sprudeln beginnt. Die heiße Lösung wird **mit Tuch** aus der Mikrowelle genommen. Sind ungelöste Reste oder Schlieren zu sehen, wird weiter erhitzt. Sofern die Lösung klar ist, gibt man den Rührfisch hinzu (**Spritzgefahr: Siedepunktverzug**) und lässt die Lösung 5-10 Minuten abkühlen. Danach wird eine Schicht von ca. 3mm Agaroselösung in die Petrischalen gegossen.

Zusätzlicher Arbeitsschritt für die Belohnungspetrischalen: 36 g Fructose wird abgewogen und vor dem Rühren der Agaroselösung zugegeben. Auch die Fructose sollte gut aufgelöst sein, so dass eine klare Lösung entsteht (ggf. länger rühren).

Die fertigen Petrischalen lässt man ca. 10 Minuten aushärten und schließt dann den Deckel, um Austrocknung zu vermeiden. Die Petrischalen werden beschriftet, um eine Verwechslung zu verhindern. Sollen die Experimente blind durchgeführt werden, muss man die Petrischalen in Abwesenheit der Experimentatoren codiert als X bzw. Y beschriften. Die Petrischalen bleiben bis zur Benutzung am nächsten Tag in einer Box bei Raumtemperatur - möglichst aber nicht bei offenem Fenster oder auf der Heizung (sonst Bildung von Kondenswasser).



Befüllen der Duftcontainer I

Pro 2er Gruppe von Experimentatoren:

2 kleine Petrischalen, 2 gebogene Pinzetten (Beschriftung: AM bzw. OCT), 8 Duftcontainer

Eppendorf-Gefäß, kleine Pipette mit 100 µl Volumen, große Pipette mit 1000 µl Volumen, kleine und große Pipettenspitzen (Volumen 5-200 µl bzw. 100-1000 µl), Vortexgerät, Schere, Mülleimer

Paraffin, n-Amylacetat (AM), 1-Octanol (OCT)



Achtung!

Befüllung der Duftcontainer im Abzug

Einzelne Pipettenspitzen immer nur für je eine Duftsorte verwenden

Petrischalendeckel und -boden mit Duftbezeichnung und Namen beschriften

AM- und OCT-Vorratsflaschen unter Lichtverschluss aufbewahren

Pipettenspitzen nicht mit den Fingern berühren, sondern mit der Pipette aufnehmen

Pinzetten immer nur für je eine Duftsorte verwenden



Befüllen der Duftcontainer II

Als Düfte werden unverdünntes 1-Octanol (OCT) und 1:50 in Paraffinöl verdünntes n-Amylacetat (AM) verwendet.

Zur Verdünnung des n-Amylacetats muss man, wegen der hohen Viskosität des Paraffinöls, einen Trick anwenden: Man schneidet ein Stück der großen Pipettenspitze ab und nimmt sie mit der großen Pipette auf. Anschließend stellt man die Pipette auf 490 μ l ein, nimmt 490 μ l Paraffin auf und pipettiert in ein Eppendorf-Gefäß ab. Die benutzte Pipettenspitze wird in den Müll "abgeknipst".



Grosse Spitze abschneiden... und aufnehmen



490 μ l



Paraffin aufnehmen... und abpipettieren



Spitze in den Müll

Zur Entnahme von 10 μ l n-Amylacetat nimmt man mit der kleinen Pipette eine kleine Pipettenspitze auf und stellt die Pipette auf 10 μ l ein. Dann entnimmt man 10 μ l n-Amylacetat, pipettiert es in das mit Paraffin gefüllte Eppendorf-Gefäß ab und mischt durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren. Nach dem "Abknipsen" der benutzten Pipettenspitze wird das Eppendorf-Gefäß verschlossen und das Gemisch für ca. 30 Sekunden mit dem Vortexgerät geschüttelt.



Spitze aufnehmen 10 μ l



AM aufnehmen... und abpipettieren



Spitze in den Müll



Schließen!



Schütteln!

Befüllen der Duftcontainer III

Es werden je 4 AM-befüllte und 4 OCT-befüllte Duftcontainer gebraucht.

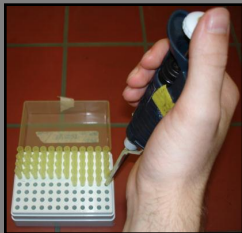
Zuerst platziert man je vier geöffnete Container in die mit AM bzw. OCT beschrifteten kleinen Petrischalen. Dann nimmt man mit der kleinen Pipette, eingestellt auf 10 µl, eine kleine Pipettenspitze auf, entnimmt 10 µl verdünntes AM aus dem Eppendorf-Gefäß und pipettiert es in den ersten AM-Container. Entsprechend werden die drei restlichen AM-Container befüllt. Wenn alle AM-Container befüllt sind, wird die Pipettenspitze in den Müll "abgeknipst" und die Duftcontainer und die Petrischale verschlossen, damit die Düfte sich nicht verflüchtigen.

Dann nimmt man eine **frische Pipettenspitze** auf, entnimmt jeweils 10 µl OCT aus der OCT-Flasche und befüllt die vier OCT-Container; auch hier wird dann die Pipettenspitze entsorgt, und die Deckel der Container und der Petrischale geschlossen.

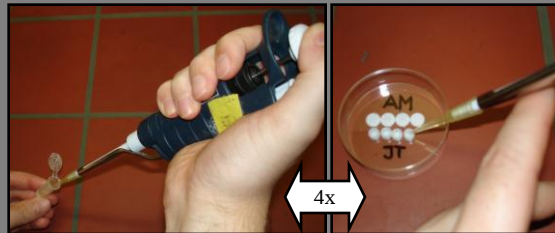


Platzierung der Duftcontainer

AM



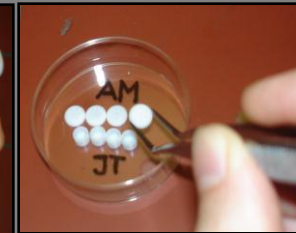
Spitze aufnehmen



AM aufnehmen... und in Container füllen



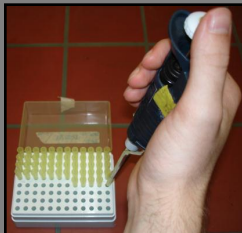
Spitze in den Müll



Container und Petrischale schließen



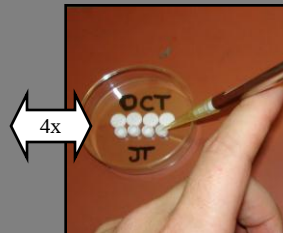
OCT



Frische! Spitze



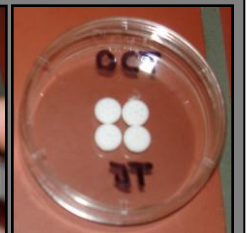
OCT aufnehmen... und in Container füllen



Spitze in den Müll



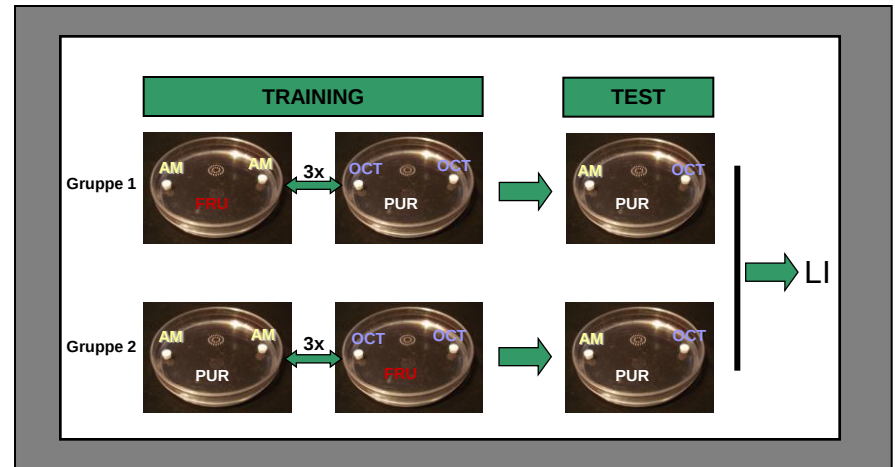
Container und Petrischale schließen



Das Experiment: Prinzip und allgemeine Information

Die Larven werden je einer von zwei reziproken Trainingsregimes unterzogen und dann getestet. Der Gruppe 1 wird im Training AM mit der Futterbelohnung (Fructose: FRU) präsentiert, während OCT alleine präsentiert wird (AM+/OCT), Gruppe 2 wird reziprok trainiert (AM/OCT+). Im Test wird dann untersucht, ob die Larven beider Gruppen in einer Wahlsituation AM oder OCT den Vorzug geben.

Um Reihenfolgeeffekte auszuschließen, wird in der Hälfte der Fälle mit dem belohnten Durchgang begonnen (AM+/OCT bzw. OCT+/AM), in der anderen Hälfte der Fälle mit dem unbelohnten Durchgang (OCT/AM+ bzw. AM /OCT+).



Ein Trainings- und Testdurchlauf benötigt bei geübten Experimentatoren 60 Minuten

Es sollen vermieden werden:

Lange Durchlüftungen im Winter, denn Fliegenlarven sind wechselwarm und Kälte könnte störend wirken

Einseitige Belichtung, es sollte also Licht gleichmäßig von vorne oder hinten zur Arbeitsstation fallen

Heftige Schüttelbewegungen des Arbeitstisches

Intensive Gerüche außerhalb des Experiments (Essen, Parfüm)

Für jeden Durchgang wird eine neue Trainings-Petrischale benutzt, da die Tiere in der Agarose Löcher mit den Mundhaken hinterlassen; würde man keine frischen Petrischalen verwenden, würden sich die Larven allzu häufig bei diesen Rissen eingraben.

Das Experiment: Material und Vorbereitung

Pro 2er Gruppe von Experimentatoren:

Für Training: 6 Agarose-Petrischalen, 6 Fructose-Petrischalen, 2 perforierte Deckel

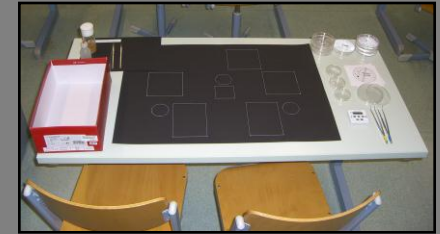
Für Test zusätzlich: 2 Agarose-Petrischalen, 1 perforierter Deckel

Je 4 AM- und 4 OCT-Duftcontainer

1 Stoppuhr, 2 gebogene Pinzetten (Beschriftung: AM bzw. OCT), 2 Pinsel (Größe 00 und 01), Leere Petrischale, Spatel, Spültücher, Wassergefäß, Wasser, Mülleimer

Unterlage mit vorgezeichneten Standorten für die Petrischalen, Testunterlage

Datenzettel, Schilder "X", "Y", "Test", 5 Tage alte *Drosophila melanogaster* Larven

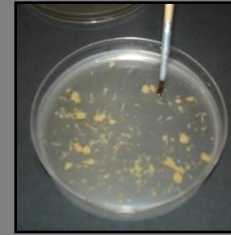


Arbeitsstation mit Material

Für das Entnehmen und Waschen der Larven entfernt man den Stopfen vom Kulturglas, entnimmt eine Spatelspitze Futterbrei mit Larven und überführt sie in eine Petrischale mit Wasser. Dort werden die Larven durch leichtes Rühren gewaschen. Dann werden mit dem Pinsel (Größe 00) ca. 30 Larven "herausgefischt" und in einer leeren Petrischale gesammelt.



Ein Löffelchen Larvenbrei...



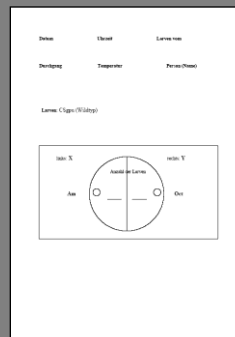
... leicht rühren...



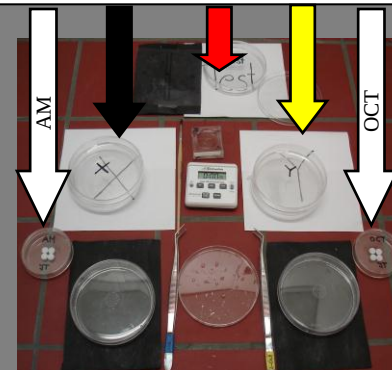
... Larven herausfischen und sammeln



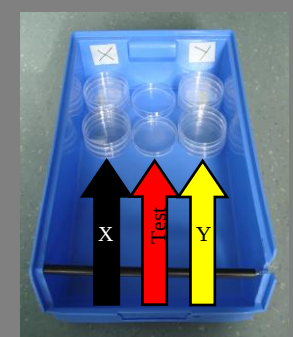
Das Datenblatt, die Schilder mit der Kennzeichnung "X", "Y", und "Test", die codierten Petrischalen und die befüllten Duftcontainer werden wie im Datenblatt dargestellt angeordnet. Dann werden die Trainings-Petrischalen für den 1. Lerndurchgang auf die schwarzen Trainingsfelder gestellt.



Datenblatt



Anordnung der Materialien



Das Experiment: Training

Es wird exemplarisch die Durchführung für AM+/OCT dargestellt: Die Petrischalen werden mit gelochten Deckeln geschlossen. Dann werden zwei Duftcontainer mit AM auf eine X-Trainingsplatte gestellt, gegenüberliegend und ca. 7 mm vom Rand entfernt. Mit einem Pinsel (Größe 01) werden die Larven in die Mitte der X-Trainings-Petrischale überführt, der gelochte Deckel wieder auf die Petrischale gesetzt und die Stoppuhr gedrückt. Nach 4 Minuten werden zwei mit OCT gefüllte Duftcontainer auf eine Y-Trainings-Petrischale gestellt. Sind 5 Minuten abgelaufen, werden die Larven auf die Y-Trainings-Petrischale überführt; die Y-Trainings-Petrischale wird mit einem perforierten Deckel geschlossen und die Stoppuhr gestartet. Derweil werden die nicht mehr gebrauchten AM-Duftcontainer in die kleine AM-Petrischale zurückgestellt, die benutzte X-Trainings-Petrischale verworfen und die nächste X-Trainings-Petrischale bereitgestellt. Der 2. und 3. Trainingsdurchgang verläuft analog.

Es werden immer alle Larven umgesetzt, die sich nicht in den Untergrund eingegraben haben, d.h. auch Tiere, die sich am Deckel der Petrischale oder auf den Duftcontainern befinden.



Ausgangszustand



AM auf X



Larven zu AM-X



Deckel 'drauf und:



Start!



Bis 3:59 und:



OCT auf Y!



Bis 5:00 und:



Larven zu OCT-Y!



Deckel 'drauf
und...



Start!



AM zurückstellen



Bis 3:59 und:



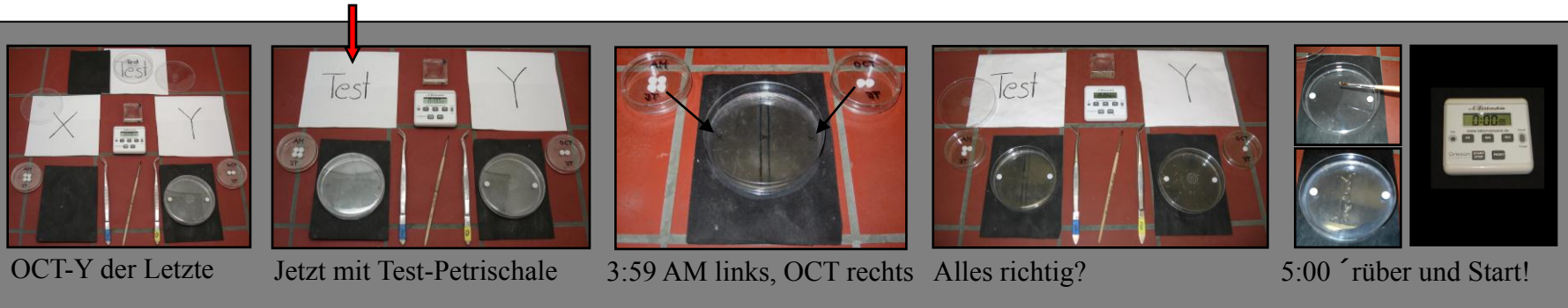
AM auf X!

2. und 3. Trainingsdurchgang: analog

Das Experiment: Test

Sobald die Larven auf der dritten OCT-Y-Trainings-Petrishale sind, wird die Test-Petrishale und die Testunterlage genommen. Nach 4 Minuten wird ein AM-Duftcontainer auf die linke Seite und ein OCT-Duftcontainer auf die rechte Seite der Test-Petrishale platziert (es sind dann in der kleinen AM-Petrishale noch 3 und in der kleinen OCT-Petrishale noch 1 Duftcontainer: Kontrolle!). Nach 5 Minuten werden die Tiere von der dritten Y-Trainings-Petrishale auf die Test-Petrishale umgesetzt. Dabei sollen die Larven entlang der Mittellinie platziert werden. Die Test-Petrishale wird mit dem gelochten Deckel geschlossen, die Startuhr gedrückt und die beiden OCT-Duftcontainer aus der dritten Y-Trainings-Petrishale werden in die kleine OCT-Petrishale zurückgestellt.

Nach 3 Minuten wird ausgezählt, wie viele Tiere sich auf der AM-Seite bzw. auf der OCT-Seite befinden und die entsprechenden Zahlen in das Datenblatt eingetragen. Die Tiere (in der Regel nicht mehr als 10 %), die während des Tests an den Deckel der Petrishale kriechen, werden nicht gewertet. Die Duftcontainer werden zurückgestellt und die Testplatte mit den Larven in den Mülleimer entsorgt. Anschließend erfolgt das reziproke Training mit einer nächsten Gruppe von Larven, die genau gleich behandelt werden, nur dass die Belohnung mit der OCT-Gabe erfolgt und nicht mit AM.



Auswertung

Zunächst berechnet man bei beiden Gruppen die Präferenz für AM:

$$\text{PREF AM}_{\text{AM+}/\text{OCT}} = (\text{Tiere bei AM} - \text{Tiere bei OCT}) / \text{Gesamtzahl der Tiere} \quad (= \text{PREF AM}_{\text{OCT}/\text{AM+}})$$

$$\text{PREF AM}_{\text{AM}/\text{OCT+}} = (\text{Tiere bei AM} - \text{Tiere bei OCT}) / \text{Gesamtzahl der Tiere} \quad (= \text{PREF AM}_{\text{OCT+}/\text{AM}})$$

Es ergeben sich Werte zwischen -1 und +1:

-1:= alle Tiere sind auf der OCT-Seite

0:= gleich viele Tiere auf beiden Seiten

+1:= alle Tiere sind auf der AM-Seite

Dann berechnet man den Lernindex (LI) als den Unterschied in den Präferenzwerten beider Gruppen. Damit man positive Werte erhält, wenn die Fructose wirklich als Belohnung wirkt, zieht man den Präferenzwert der AM/OCT+ trainierten Gruppe immer von dem Präferenzwert der AM+/OCT trainierten Gruppe ab - und nicht umgekehrt. Damit die Werte für den Lernindex sich in den Grenzen von 1 bis -1 bewegen, teilt man diese Differenz durch 2:

$$\text{LI} = (\text{PREF AM}_{\text{AM+}/\text{OCT}} - \text{PREF AM}_{\text{AM}/\text{OCT+}}) / 2$$

-1:= Aversives Lernen, d.h. die Larven sind zu dem nicht mit FRU gemeinsam präsentierten Duft gelaufen

0:= Kein Lernen

+1:= Appetitives Lernen, d.h. die Larven sind zu dem mit FRU gemeinsam präsentierten Duft gelaufen

Alle PREF_{AM} - und alle LI-Werte werden tabelliert und für eine sogenannte Box-Whisker Darstellung des Medians und der 10, 25, 75, und 90 % Quantile verwendet werden. Zur statistischen Auswertung soll ein sogenannter Einstichproben-Vorzeichentest (engl.: One-sample Sign Test) mit Fehlerwahrscheinlichkeit 5 % angewendet werden. Typischerweise werden ca. 8- 15 LI Werte benötigt, um statistisch absicherbare Ergebnisse zu erhalten.

Datenblätter

Die Datenblätter können zur Dokumentation der Ergebnisse verwendet werden.

Dabei benötigt man 1 Datenblatt für einen Lerndurchgang.

Insgesamt gibt es 4 mögliche Anordnungen des Versuchs (Zuordnung der X- bzw. Y-Petrischalen zu den Düften, Reihenfolge), und somit auch 4 unterschiedliche Datenblätter.

Des weiteren können in diese Datenblätter zusätzliche Informationen über den Hintergrund des Versuchs eingetragen werden, wie Datum, Uhrzeit, Temperatur...

Datenblatt Typ 1 AM-X, OCT-Y

Datum:

Uhrzeit:

Larven vom:

Durchgang:

Temperatur:

Person (Name):

Larven: CSgpu (Wildtyp)

Trainingsgeschichte:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit AM

Larven auf Y-Petrischale mit OCT

2. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit AM

Larven auf Y-Petrischale mit OCT

3. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit AM

Larven auf Y-Petrischale mit OCT

Testdurchgang: Larven auf Test-Petrischale mit

Duft AM (links) und Duft OCT (rechts)

Anzahl der Larven

AM

OCT

PREF AM_{AM-X/OCT-Y} = (Tiere bei AM - Tiere bei OCT) / Gesamtzahl der Tiere

Datenblatt Typ 2 OCT-X, AM-Y

Datum:

Uhrzeit:

Larven vom:

Durchgang:

Temperatur:

Person (Name):

Larven: CSgpu (Wildtyp)

Trainingsgeschichte:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit OCT

Larven auf Y-Petrischale mit AM

2. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit OCT

Larven auf Y-Petrischale mit AM

3. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit OCT

Larven auf Y-Petrischale mit AM

Testdurchgang: Larven auf Test-Petrischale mit

Duft OCT (links) und Duft AM (rechts)

Anzahl der Larven

OCT

AM

PREF AM_{OCT-X/AM-Y} = (Tiere bei AM - Tiere bei OCT) / Gesamtzahl der Tiere

LI = (PREF AM_{AM-X/OCT-Y} - PREF AM_{OCT-X/AM-Y}) / 2 =

Datenblattt Typ 3 AM-Y, OCT-X

Datum: Uhrzeit: Larven vom:

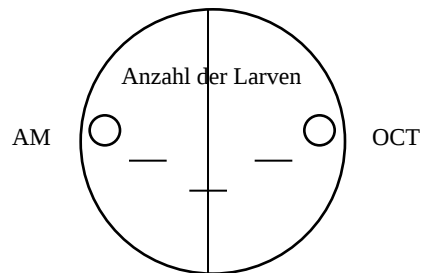
Durchgang: Temperatur: Person (Name):

Larven: CSgpu (Wildtyp)

Trainingsgeschichte:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit AM
Larven auf X-Petrischale mit OCT
2. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit AM
Larven auf X-Petrischale mit OCT
3. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit AM
Larven auf X-Petrischale mit OCT

Testdurchgang: Larven auf Test-Petrischale mit
Duft AM (links) und Duft OCT (rechts)



$$\text{PREF AM}_{\text{AM-Y/OCT-X}} = (\text{Tiere bei AM} - \text{Tiere bei OCT}) / \text{Gesamtzahl der Tiere}$$

Datenblattt Typ 4 OCT-Y, AM-X

Datum: Uhrzeit: Larven vom:

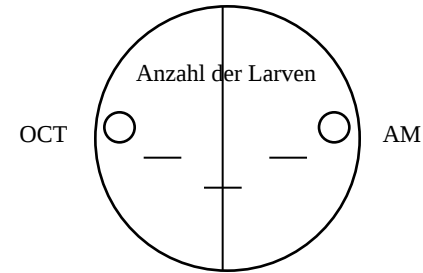
Durchgang: Temperatur: Person (Name):

Larven: CSgpu (Wildtyp)

Trainingsgeschichte:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit OCT
Larven auf X-Petrischale mit AM
2. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit OCT
Larven auf X-Petrischale mit AM
3. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit OCT
Larven auf X-Petrischale mit AM

Testdurchgang: Larven auf Test-Petrischale mit
Duft OCT (links) und Duft AM (rechts)



$$\text{PREF AM}_{\text{OCT-Y/AM-X}} = (\text{Tiere bei AM} - \text{Tiere bei OCT}) / \text{Gesamtzahl der Tiere}$$

$$LI = (\text{PREF AM}_{\text{OCT-Y/AM-X}} - \text{PREF AM}_{\text{AM-Y/OCT-X}}) / 2 =$$

Arbeitsblätter

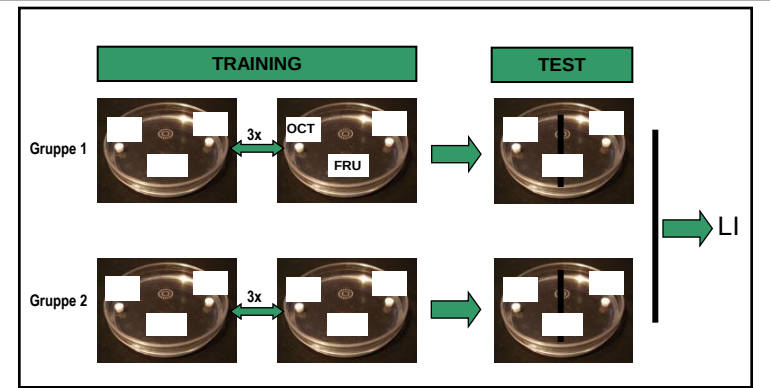
Die Arbeitsblätter können in der Schule oder an der Hochschule verwendet werden, um den Hintergrund des Versuches darzustellen oder zu vertiefen.

Eine Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

1. Fragen zur Versuchsdurchführung:

- a) Komplettiere das Schema der Versuchsdurchführung und schreibe stichpunktartig die Reihenfolge der Trainingsdurchgänge und des Testdurchgangs für beide Gruppen auf! Welche andere Reihenfolge wäre für die Gruppe 2 möglich?



Trainingsgeschichte:

Gruppe 1:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit AM
Larven auf X-Petrischale mit OCT
2. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit AM
Larven auf X-Petrischale mit OCT
3. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrischale mit AM
Larven auf X-Petrischale mit OCT

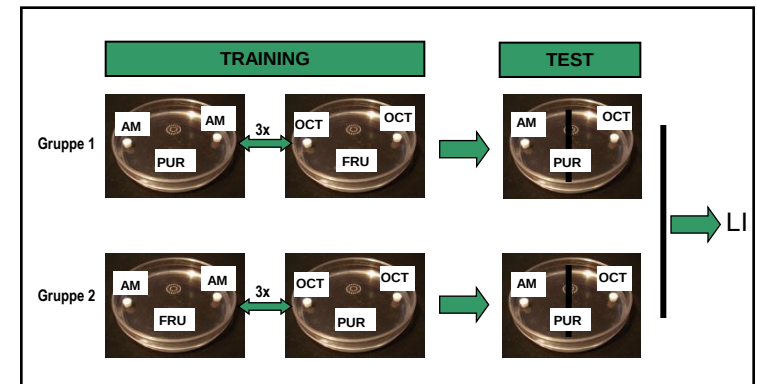
Testdurchgang: Larven auf Test-Petrischale mit:
Duft AM (links) und Duft OCT (rechts)

Gruppe 2:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit AM
Larven auf Y-Petrischale mit OCT
2. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit AM
Larven auf Y-Petrischale mit OCT
3. Trainingsdurchgang: Larven auf X-Petrischale mit AM
Larven auf Y-Petrischale mit OCT

Testdurchgang: Larven auf Test-Petrischale mit:
Duft AM (links) und Duft OCT (rechts)

Mit der 1. Möglichkeit für Gruppe 2



Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliedenlarven

1. Fragen zur Versuchsdurchführung:

Trainingsgeschichte:

Gruppe 1:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrishale mit AM
Larven auf X-Petrishale mit OCT
2. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrishale mit AM
Larven auf X-Petrishale mit OCT
3. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrishale mit AM
Larven auf X-Petrishale mit OCT

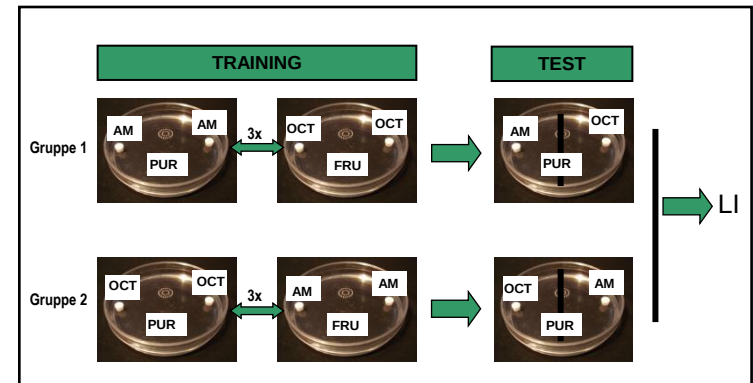
Testdurchgang: Larven auf Test-Petrishale mit:
Duft AM (links) und Duft OCT (rechts)

Gruppe 2:

1. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrishale mit OCT
Larven auf X-Petrishale mit AM
2. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrishale mit OCT
Larven auf X-Petrishale mit AM
3. Trainingsdurchgang: Larven auf Y-Petrishale mit OCT
Larven auf X-Petrishale mit AM

Testdurchgang: Larven auf Test-Petrishale mit:
Duft OCT (links) und Duft AM (rechts)

Mit einer zweiten Möglichkeit für Gruppe 2:



b) Inwieweit könnten folgende Faktoren bei der Versuchsdurchführung bzw. der Seitenpräferenzen eine Rolle spielen?

Fenster:

Larven bevorzugen die Dunkelheit im Gegensatz zu den adulten Tieren, die die Helligkeit bevorzugen, und könnten deshalb eine Tendenz zeigen, zu der Seite zu laufen, die dem Fenster abgewandt ist.

Heizung:

Die Versuchsdurchführung sollte nicht direkt auf bzw. neben der Heizung stattfinden, da dies Einfluss auf die gegossenen Petrischalen haben könnte (Austrocknung und Entstehen von Rissen in den Petrischalen) bzw. die Larven die Wärme spüren und zur warmen Seite laufen könnten.

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliiegenlarven

2.1. Fragen zur Berechnung der Amylacetat-Präferenz und des Lernindex:

- a) Wie lautet die Formel für die Berechnung der Amylacetat-Präferenz für die Gruppe 1 und die Gruppe 2?

$\text{PREF AM}_{\text{AM+}/\text{OCT}} = (\text{Tiere bei AM} - \text{Tiere bei OCT}) / \text{Gesamtzahl der Tiere} (= \text{PREF AM}_{\text{OCT}/\text{AM+}})$

$\text{PREF AM}_{\text{AM}/\text{OCT+}} = (\text{Tiere bei AM} - \text{Tiere bei OCT}) / \text{Gesamtzahl der Tiere} (= \text{PREF AM}_{\text{OCT+}/\text{AM}})$

- b) Welche Minimal und Maximalwerte sind für die Amylacetat-Präferenz möglich und wie müssen die Larven (Annahme: 30 Stück) demzufolge in der Testsituation verteilt sein?

-1: Alle 30 Larven befinden sich auf der Seite des Duftes OCT

+1: Alle 30 Larven befinden sich auf der Seite des Duftes AM

- c) Was bedeuten positive Werte und was negative Werte für die Amylacetat-Präferenz?

Negative Werte: Die Larven bevorzugen Octanol gegenüber Amylacetat

Positive Werte: Die Larven bevorzugen Amylacetat gegenüber Octanol

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliiegenlarven

2.2. Fragen zur Berechnung der Amylacetat-Präferenz und des Lernindex:

d) Wie lautet die Formel für die Berechnung des Lernindex?

$$LI = (\text{PREF AM}_{\text{AM+}/\text{OCT}} - \text{PREF AM}_{\text{AM}/\text{OCT+}}) / 2$$

Differenz der Amylacetat-Präferenzen für die Gruppe der AM-belohnten Tiere minus der Amylacetat-Präferenzen für die Gruppe der OCT belohnten Tiere

e) Aus welchen möglichen Kombinationen (Duft und Belohnung) lässt sich der Lernindex berechnen?

	1. Möglichkeit:	2. Möglichkeit:	3. Möglichkeit:	4. Möglichkeit:
Gruppe 1:	AM+ / OCT	AM+ / OCT	OCT / AM+	OCT / AM+
Gruppe 2:	OCT+ / AM	AM / OCT+	OCT+ / AM	AM / OCT+

f) Welche Minimal- und Maximalwerte sind für den Lernindex möglich und was für eine These lässt sich anhand des berechneten Lernindex festhalten?

-1:= Aversives Lernen, d.h. die Larven sind zu dem nicht mit FRU gemeinsam präsentierten Duft gelaufen

0:= Kein Lernen

+1:= Appetitives Lernen, d.h. die Larven sind zu dem mit FRU gemeinsam präsentierten Duft gelaufen

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

3.1. Beobachtung der Larven:

- a) Beschreibe die Bewegungen der Larven! Laufen die Larven Kurven oder Zick-Zack Linien?

Welche Winkel der Änderung treten auf (lässt sich anhand der Spuren in der Agarose beobachten)?

Die Larven „haken“ sich mit ihren Mundhaken (am Kopf) in die Agarose und ziehen daraufhin ihren Hinterkörper nach vorne. Anschließend strecken sie die Kopfseite nach vorne und suchen erneut Halt in der Agarose mit den Mundhaken, um sich wieder nach vorne zu ziehen; diese Bewegungen gehen mit wurmartigen, peristaltischen Kontraktionen der gesamten Körperwand einher. Die Larven machen kaum je runde / kreisförmige Bewegungen, sondern in der Regel Zick-Zack-Linien. Es treten bevorzugt ge“quantelte“ Winkel der Größe 45, 90, 180 Grad auf.

- b) Welche Körperteile verwenden die Larven für die Fortbewegung?

Mundhaken, Körperwand

- c) Schätze die Größe und das Gewicht der Tiere ab!

Breite, Länge, Durchmesser: 1 mm, 4 mm, 0.5 mm Gewicht: ca. 2 mg

Abschätzung des Gewichts: $V = l \times b \times h = 4 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm} = 2 \text{ mm}^3$

vgl. 1 l Wasser umfasst ein Volumen von 1 dm^3 und wiegt 1 kg (Teilung durch 10^6)

→ 1 mm^3 entspricht einem Gewicht von 1 mg bzw. 2 mm^3 entspricht einem Gewicht von 2 mg

- d) Wie reagieren die Larven auf ein „Anklopfen“ der Petrischale? Wie reagieren sie auf An- oder Abschalten des Lichtes?

Laufen sie, wenn man die Petrischale schief hält, nach oben oder nach unten?

Die Larven zucken zusammen, sowohl auf Anklopfen wie auf plötzliches An- oder Abschalten des Lichtes. Die Larven laufen in der Regel nach unten, anders als die adulten Fliegen, die sich bevorzugt nach oben orientieren.

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

3.2. Beobachtung der Larven:

- e) Glaubst du, dass die Larven selbst entscheiden, wohin sie laufen?

Erscheint dir das Verhalten der Larven eher als Reaktion (ggf. auf was?), oder als Aktion (ggf. mit welchem Ziel)?

Diskutieren lassen.

- f) Fertige eine kurze Skizze einer Larve und einer typischen Bewegungsfolge an!

Riech- Schmeckorgane Atemspirakel



Mundhaken

QuickTime™ and a
TIFF (Uncompressed) decompressor
are needed to see this picture.

Speicheldrüse

Gehirn

Tracheen

Magen

Fettkörper

Ovar

Darm

Bewegungsfolge
einer Larve:

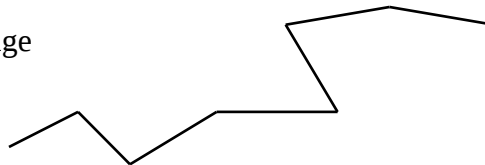


Abb.:
Demerenc und Kaufmann
Drosophila Guide 1972
The Carnegie Institution
Washington DC

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliiegenlarven

4.1. Entwicklung der Larven:

- a) Beschreibe und skizziere den Lebenszyklus von *Drosophila*, einschließlich der ungefähren Dauer der Entwicklungsstadien bei Raumtemperatur! Markiere den Zeitpunkt, an dem die Larven für das Experiment aus dem Futterglas genommen werden!

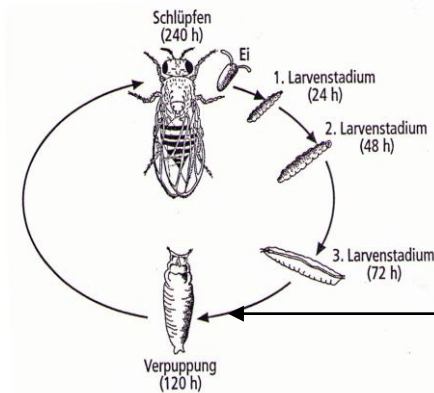


Abb.:
Seyffert
Lehrbuch der Genetik, 2. Auflage 2003
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg

5 Tage alte Larven
(im Fress- und nicht im Wanderungsstadium)

- b) Welches Entwicklungsstadium folgt auf das Larvenstadium, welches geht dem Larvenstadium voraus?
Nach Larvenstadium: Puppenstadium
Vor Larvenstadium: Ei
- c) Was bedeutet „holometabole“ und was „hemimetabole“ Entwicklung der Insekten? Nenne je ein Beispiel!
Holometabole Entwicklung (vollständige Metamorphose): Ei → Larve → Puppe → Adult / Imago (Schmetterling, *Drosophila*)
Hemimetabole Entwicklung (unvollständige Metamorphose): Ei → Larve → Adult / Imago (Heuschrecke, Schabe, Termiten)
- d) Was ist bei den meisten Arten die Funktion der Larve und was die Funktion des adulten Tieres?
Larve: Spezialisierung auf Nahrungsaufnahme und Wachstum („Fressmaschine“)
Adult: Spezialisierung auf Fortpflanzung und Ausbreitung

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

4.2. Entwicklung der Larven:

- e) Bei welcher Temperatur beobachtet man eine optimale Entwicklung der Larven?

25° C (→ Haltung der Fliegen in einem 25° C Raum)

Aktives Leben: 14-30° C (BIUZ 2/07: *Drosophila* zum 100. Jubiläum)

- f) Beschreibe den natürlichen Lebensraum der Larven!

Larven der Tau- / Fruchtfliege findet man häufig in den oberflächlichen Schichten verrottender Früchte.

- g) Aus was setzt sich der Nährboden zusammen? (BIUZ 2/07: *Drosophila* zum 100. Jubiläum)

Leitungswasser, Maisgrieß, Haushaltszucker, Agar-Agar-Pulver, Bierhefe-Pulver, Milchsäure, als Antibiotikum: Nipagin, Ethanol

- h) Beschreibe die Riech- und Schmeckbahnen im Gehirn der Larve!

Die Riechbahnen (blau) verlaufen oberhalb des Schlundes in das Gehirn. Die erste Verschaltungsstation sind die antennalen Loben (LAL). Von dort verschalten die Projektionsneurone einerseits in die Pilzkörper (bestehend aus Calyx und PD), den Ort der Duft-Futter-Gedächtnisse, und von dort ins laterale Horn (LH) und ggf. in motorische Zentren (gestrichelt); andererseits verschalten sie direkt in das laterale Horn. Duftverhalten kann so einerseits indirekt gemäß dem Gelernten via dem Pilzkörper gesteuert werden, und andererseits direkt reflexartig über das laterale Horn ausgelöst werden. Die verschiedenen Schmeckbahnen (braun) dagegen verlaufen unterhalb des Schlundes und steuern direkt reflexartig das Fressverhalten. Die „Brücke“ zwischen Riech- und Schmeckbahnen wird durch Oktopamin-ausschüttende Neuronen (nicht gezeichnet) hergestellt, sodass die Pilzkörper das „Belohnungs“signal erhalten.

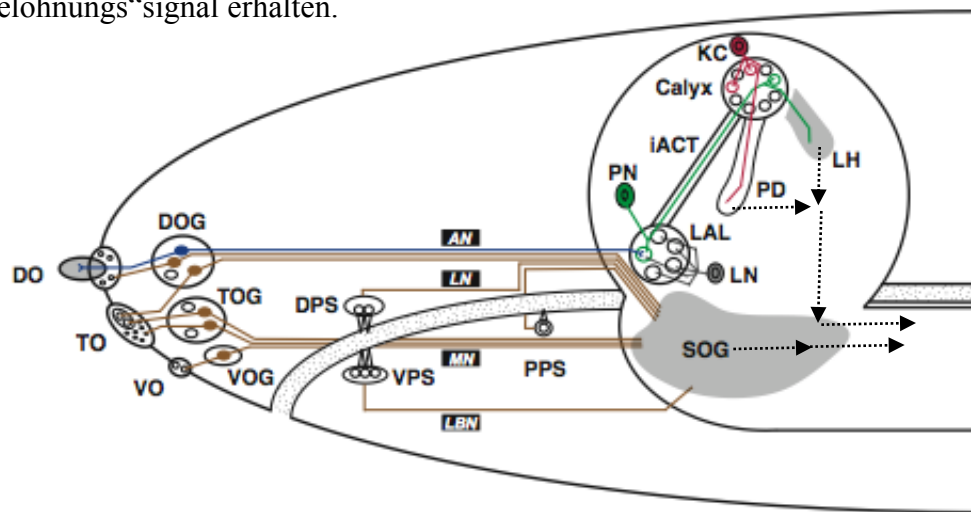


Abb.:

Gerber et al.

Riechen, Schmecken, Lernen

Neuroforum 03/07

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

5.1. Adulte Tiere:

- a) Beschreibe den natürlichen Lebensraum der Fliegen!

Adulte Frucht- / Taufliegen findet man häufig auf Honig, Obst...

- b) Wie ist der Körper eines adulten Tieres aufgebaut (beschriftete Skizze)!

Kopf mit Facettenaugen, Ocellen, Fühler, Mundwerkzeuge

Brust mit 3 Beinpaaren, 1 Flügelpaar, Halteren (umgewandeltes hinteres Flügelpaar)

Hinterleib segmentiert

- c) Nenne Unterscheidungsmerkmale der Geschlechter bei adulten Tieren!

Kann man bei Larven das Geschlecht bestimmen?

Weibchen:

- insgesamt etwas größer als die Männchen
- Abdomen (mit 7 Segmenten) spitz zulaufend
- Segmente durch dunkle Bänderung deutlich voneinander abgesetzt

Männchen:

- abgerundetes Abdomen (mit nur 5 Segmenten) im hinteren Bereich dunkler □
- Bei stärkerer Vergrößerung ist am ersten Beinpaar ein „Geschlechtskamm“ zu erkennen

Für den Laien sind die Geschlechter der Larve nicht sicher unterscheidbar.

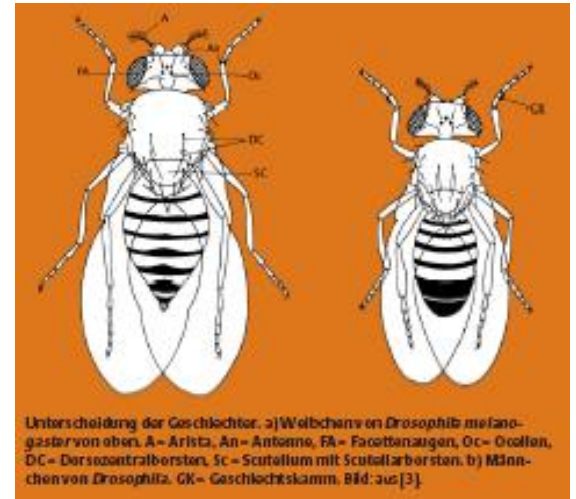


Abb.:

Drosophila zum 100. Jubiläum

Biologie in unserer Zeit, 2/07

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

5.2. Adulte Tiere:

- d) Wie könnte man testen, ob sich die adulten Fliegen an ihre Erfahrungen als Larve erinnern?

Die Larven werden nach dem Lernexperiment nicht entsorgt, sondern aufgehoben, so dass sie sich nach eine paar Tagen zu adulten Taufliegen entwickeln. In diesem Stadium werden diese Tiere dann erneut vor die Wahlsituation, auf der einen Seite der belohnte Duft und auf der anderen Seite der unbelohnte Duft, gestellt. Das heißt, das Training findet im Larvenstadium statt und die Testsituation im adulten Stadium. Nur wenn die adulten Tiere folglich zu dem zuvor im Larvenstadium belohnten Duft hinlaufen, kann davon ausgegangen werden, dass die adulten Fliegen sich an ihre Erfahrungen als Larve erinnern. Alternativ könnte man schauen, ob die dann adulten weiblichen Fliegen lieber in Gegenwart des vorher belohnten Duftes ihre Eier ablegen.

- e) Beschreibe die Riech- und Schmeckbahnen im Gehirn der adulten Fliege!

Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Gehirn der Larve und dem der adulten Fliegen?

Während der Metamorphose werden weite Teile des Nervensystems umgebaut. Unter Ignorierung von Ausnahmen kann man sagen, dass die Sinneszellen der Larve zugrunde gehen und durch neue Sinneszellen ersetzt werden. Die motorischen Neurone der Larve ziehen ihre Fortsätze von den degenerierenden Muskeln der Larve zurück und wachsen dann neu in die sich entwickelnden Muskeln der Fliege ein. Die Neurone des Gehirns verlieren also während der Metamorphose sowohl ihre Eingänge wie ihre Ausgänge. Dem entsprechend bilden die meisten Neurone des Gehirns ebenfalls ihre Fortsätze zurück und bilden dann am Ende der Metamorphose neue Verbindungen mit den Sinneszellen und den Motoneuronen sowie untereinander aus. Für alle drei Klassen von Neuronen (Sinneszellen, Gehirnzellen, motorische Neurone) werden während der Metamorphose zusätzliche, neue Neurone gebildet, sodass die Fliege ca. 10-fach mehr Nervenzellen besitzt als die Larve.

- f) Glaubst du, dass Fliegen schlafen müssen? Wie würdest du experimentell zeigen, dass Fliegen, bzw. Larven, tatsächlich schlafen?

Soweit man weiß, müssen alle Tiere schlafen. Wichtige Kriterien sind: reduzierte Bewegung, erhöhte Reaktionsschwelle auf Sinnesreize, „Nachholbedarf“ nach Schlafmangel, mehr Schlaf durch Histamine, weniger Schlaf durch Koffein, U-förmige Abhängigkeit des Schlafbedarfs vom Alter.

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

6. Nenne Vor- und Nachteile von *Drosophila melanogaster* als Labortier für die Wissenschaft!

Vorteile:

Kultur einfach und preisgünstig
Geringe Größe → Geringer Platzanspruch
Kurze Generationszeit
Viele Nachkommen
Grosse Zahl von leicht unterscheidbaren Mutanten
Detailliertes Wissen über Genetik
Einfaches Nervensystem

Nachteile:

Eine Fliege ist kein Mensch: Ähnlichkeiten zum Menschen bestehen auf der Ebene der Gene und der molekularen Funktion von Proteinen, aber nicht auf der Ebene von Gehirnbereichen (Fliegen haben keinen Kortex)

Stoffwechsel zum Teil beträchtlich anders, beispielsweise haben Fliegen keine erworbene Immunantwort; daher im Medikamententest nur sehr beschränkt von Nutzen

7.1. Theorie: Prinzip von Pawlow:

a) Was ist in diesem Experiment der unbedingte Reiz, der unbedingte Reflex, der bedingte Reiz und die bedingte Reaktion?

Unbedingter Reiz: Futter

Unbedingter Reflex: Fressen

Bedingter Reiz: Duft

Bedingte Reaktion: Hinlaufen zum Duft

b) Muss der unbedingte Reflex und die bedingte Reaktion immer dasselbe Verhalten sein?

Nein. Siehe a).

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliegenlarven

7.2. Theorie: Prinzip von Pawlow:

- c) Glaubst du, dass die Tiere alle möglichen bedingten Reize mit allen möglichen unbedingten Reizen verknüpfen können?

Nein; zwar können insbesondere Säuger sehr vieles lernen, aber beispielsweise haben Ratten Schwierigkeiten, eine Übelkeit mit einem Ton zu verbinden, sowie einen elektrischen Schock mit einem Geschmack. Dagegen funktionieren Ton-Schock-Assoziationen und Geschmack-Übelkeits-Assoziationen sehr gut („Garcia-effect“).

- d) Welche anderen als die Duft-Futter-Verknüpfung würdest du Larven zutrauen?

Was denkst du können erwachsene Fliegen lernen?

Larven können beispielsweise Licht- / Dunkelreize mit Futterbelohnung assoziieren. Erwachsenen Fliegen können Duft-Zucker-, und Duft-Schock-Assoziationen bilden, sowie visuelle Muster oder Farben mit Hitzebestrafung oder mit Bestrafung durch ein erdbebenartiges Wackeln des visuellen Umfeldes verbinden; auch können sie ihren Ort innerhalb einer streichholzschatel-großen Kammer mit Hitzebestrafung assoziieren. Schließlich können erwachsene Fliegen auch „operant“ lernen, dass sie bei Rechts- bzw. Linksdrehungen bestraft werden.

- e) Welche Rolle mögen die Konsequenzen des eigenen Verhaltens für die Larve spielen?

Warum laufen sie zum vorher belohnten Duft: des „guten“ Duftes wegen, oder um der Belohnung willen?

Diskutieren lassen; siehe Diskussion in Gerber et al., Neuroforum 2007 (Riechen, Schmecken, Lernen)

Arbeitsblatt zur Klassischen Konditionierung von Taufliiegenlarven

7.2. Theorie: Prinzip von Pawlow:

f) Glaubst du, dass es Tiere gibt, die nichts lernen können?

Diskutieren lassen.

g) Was versteht man unter „operantem“ Lernen?

Das Lernen anhand der Konsequenzen des eigenen Verhaltens. Es wird also eine Assoziation zwischen Verhalten und der Belohnung/ Bestrafung gebildet, und nicht wie bei der klassischen Konditionierung zwischen Reiz und Belohnung / Bestrafung.

(z.B.: Skinner Box)

h) Warum haben Tiere ein Gehirn, Pflanzen aber nicht?

Diskutieren lassen.

i) Was ist die biologische Funktion des Gehirns?

Die Steuerung des Verhaltens.