

ZUR FEINSTRUKTUR DER REKTALEN TRACHEENKIEMEN VON ANISOPTEREN LIBELLENLARVEN. II. DAS REKTALE CHLORIDEPITHEL

W. WICHARD* und H. KOMNICK

Institut für Cytologie und Mikromorphologie, Universität Bonn,
Gartenstrasse 61a, D-53 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

und

Institut für Landwirtschaftliche Zoologie und Bienenkunde, Universität
Bonn, Melbweg 42, D-53 Bonn 1, Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen am 6. November 1973 / Angenommen am 10. Januar 1974

FINE STRUCTURE OF THE RECTAL TRACHEAL GILLS OF ANISOPTERAN DRAGONFLY LARVAE. II. THE CHLORIDE EPITHELIUM. The epithelial pads at the base of the rectal gill lamellae in *Aeshna cyanea* (Müller) larvae exhibit fine structural features characteristic of ion transporting epithelia. Histochemical demonstration of chloride reveals an accumulation of these ions within the cuticle and apical cytoplasm of the epithelia, which are consequently designated rectal chloride epithelia. Their functional involvement in osmotic hyperregulation is discussed.

EINLEITUNG

Die epitheliale Wand der rektalen Tracheenkiemen von Anisopterenlarven läßt sich in feinstruktureller Hinsicht deutlich in zwei differenzierte Epithelien unterscheiden. Der überwiegende Teil der lamellären Tracheenkiemen wird von dem respiratorischen Epithel bedeckt (WICHARD & KOMNICK, 1974); lediglich an der Basis der Lamellen ist ein rundliches Areal ausgespart, das von einem dickeren Epithel besetzt ist und aufgrund lichtmikroskopischer Studien als "basales Polster" bezeichnet wurde (SADONES, 1896; TILLYARD, 1917). Auf die salzabsorbierende Funktion dieses Epithels wies KOCH (1934) hin. Eine nach Zugabe von verdünnter Silbernitratlösung zum Medium auftretende Dunkelfärbung deutete Koch als Absorption und Reduktion von Silberionen. KROGH (1939)

* Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

schloß sich dieser Interpretation an und erwähnte auch eine Absorption anderer Kat- und Anionen. Die in dieser Mitteilung dargelegten histochemischen und elektronenmikroskopischen Befunde erhärten diese funktionelle Deutung und zeigen, daß die basalen Epithelien der rektalen Tracheenkiemen von Anisopterenlarven Transportepithelien sind, die strukturell und funktionell den abdominalen Chloridepithelien von Trichopterenlarven (WICHARD & KOMNICK, 1973a) und den rektalen Chloridepithelien von Zygopterenlarven (WICHARD & KOMNICK, 1974b) entsprechen und deshalb ebenfalls als rektale Chloridepithelien bezeichnet werden.

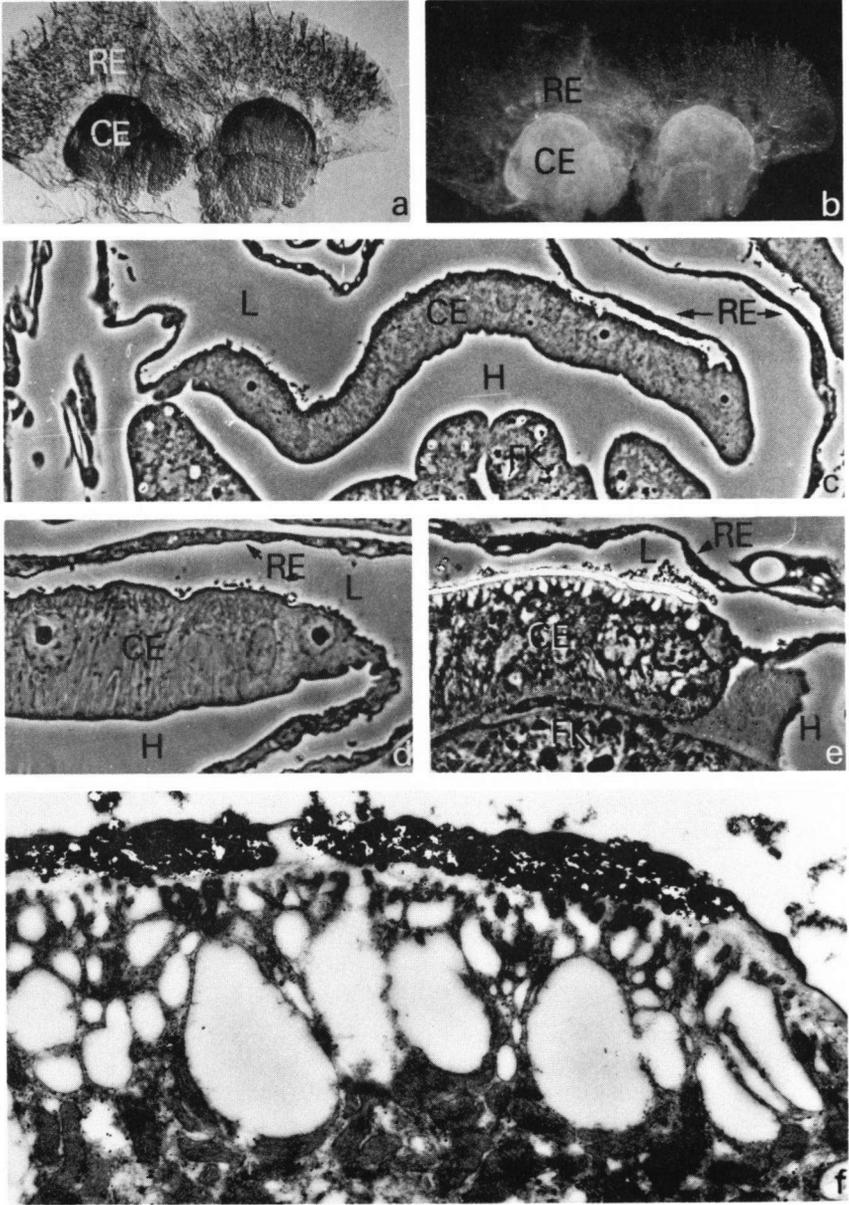
MATERIAL UND METHODE

Die rektalen Chloridepithelien von *Aeshna cyanea* (Müller) wurden für die elektronenmikroskopische Feinstrukturuntersuchung gemeinsam mit dem respiratorischen Epithel der Tracheenkiemen bearbeitet, so daß die Methodik aus der ersten Mitteilung zu ersehen ist (WICHARD & KOMNICK, 1974a).

Zur lichtmikroskopischen Darstellung der Chloridepithelien auf den Kiemenlamellen anhand von gefällttem Silberchlorid wurde mit 5% Glutaraldehyd in 0,1 N Silbernitrat und 1 N Salpetersäure fixiert, nach dem Auswaschen in 1 N Salpetersäure in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und über Xylol als Totalpräparat auf Objektträgern in Eukitt eingeschlossen. Während des gesamten Präparationsganges wurde eine Belichtung der Präparate soweit wie möglich vermieden.

Zum elektronenmikroskopischen Chloridnachweis wurde mit 2% OsO₄ und 1% Silberlactat in 0,1 M Cacodylat-Essigsäurepuffer bei pH 6,2 fixiert, während der Entwässerung durch ein Salpetersäurebad geführt (KOMNICK & BIER-THER, 1969) und in Styrol-Methacrylat (KUSHIDA, 1961) eingebettet. Von diesen Proben wurden Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie und Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Als Mikroskope dienen das WILD Stereomikroskop M 5, das Zeiss Photomikroskop mit Phasenkontrastausstattung und das Philips EM 200 Elektronenmikroskop.

Abb. 1. (a) Zwei rektale Kiemenlamellen von *Aeshna cyanea* nach Fixation mit 5% Glutaraldehyd in 0,1 N Silbernitrat und 1 N Salpetersäure. Aufnahme mit WILD Stereomikroskop M 5 bei Durchlichtbeleuchtung (25 x). – (b) Die selben Kiemenlamellen mit Auflichtbeleuchtung photographiert (25 x). – (c) Semidünner Querschnitt durch den proximalen Bereich der Kiemenlamellen, Osmiumtetroxid, Phasenkontrast (400 x). – (d) Stärkere Vergrößerung des Übergangsbereiches zwischen Chloridepithel und respiratorischem Epithel. Osmiumtetroxid, Phasenkontrast (1000 x). – (e) Semidünnschnitt eines Präparates nach Fixierung mit 2% OsO₄ und 1% Silberlactat. Der helle Streifen auf der luminalen Seite des Chloridepithels wird durch die Silberchloridniederschläge hervorgerufen. Phasenkontrast (1000 x). – (f) Ultradünnschnitt eines Präparates nach Fixation mit 2% OsO₄ und 1% Silberlactat im elektronenmikroskopischen Bild mit Silberchloridniederschlägen in der Cuti-



cula und im apikalen Cytoplasma eines Chloridepithels. Rechts im Bild befindet sich der Übergang zum respiratorischen Epithel (22000 \times). RE Respiratorisches Epithel, – CE Chloridepithel, – FE Fettkörper, – L Lumen der Kiemenkammer, – H Hämolympfraum.

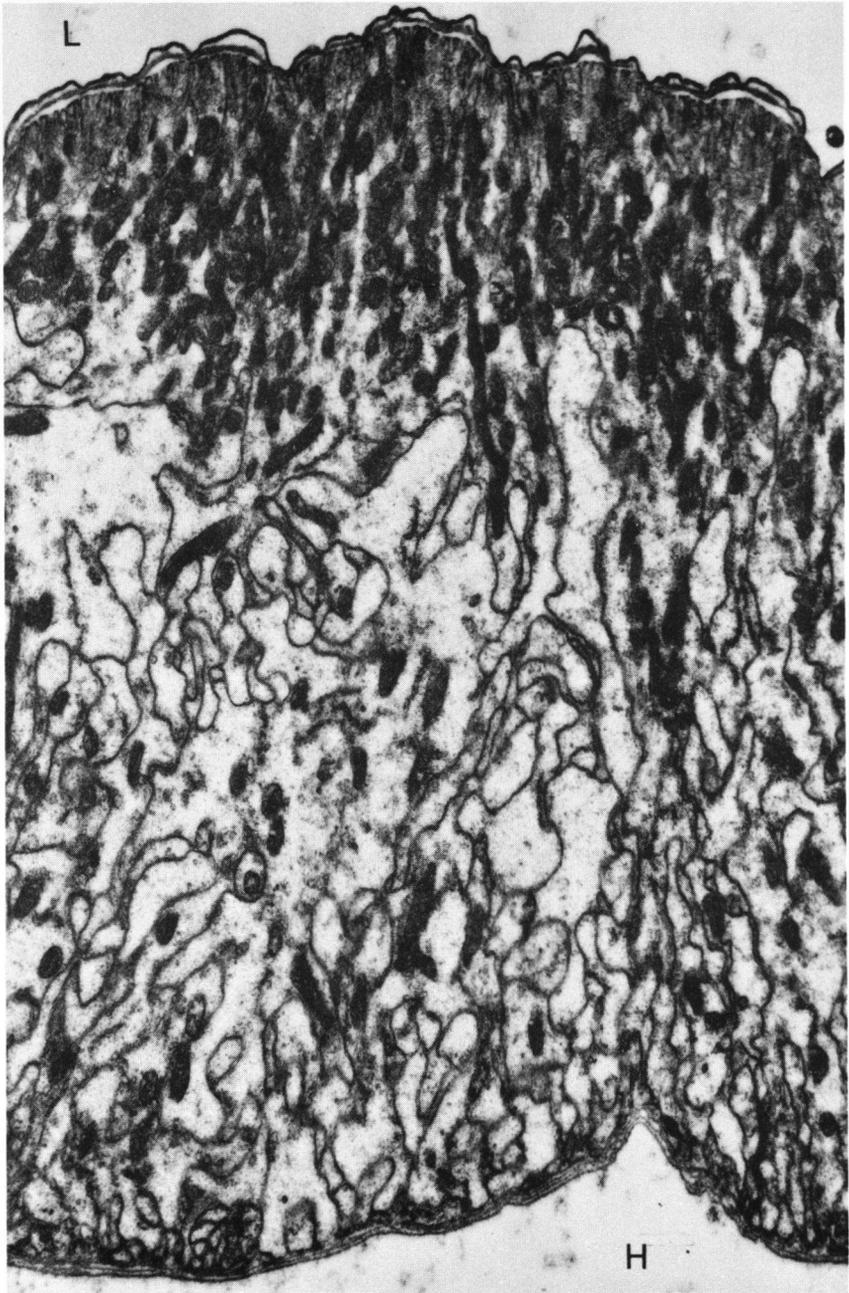
ERGEBNISSE

Histochemische Befunde

Die rektalen Kiemenlamellen von *Aeshna cyanea* zeigen nach Fixierung mit Glutaraldehyd in salpetersaurer Silbernitratlösung im proximalen Bereich die Chloridepithelien als rundliche Felder, die bei mikroskopischer Durchlichtbeleuchtung dunkel erscheinen (Abb. 1a) und entsprechende Bilder ergeben, wie sie auch von KROGH (1939) publiziert wurden. Bei Auflichtbeleuchtung erscheinen die Felder dagegen weiß (Abb. 1b), was für eine Fällung von in Salpetersäure unlöslichem Silberchlorid und nicht, wie KOCH (1934) vermutete, für eine Absorption und Reduktion von Silber spricht. Eine Dunkelfärbung durch Silberreduktion tritt nach unseren Beobachtungen erst auf, wenn die nach Silberchloridfällung zunächst weißen Felder ausreichend stark belichtet werden. Es handelt sich also, wie schon an anderen Objekten durch analytisch-chemische Methoden, Elektronenfeinbereichsbeugung und Röntgenmikroanalyse hinlänglich bewiesen, um einen spezifischen, histochemischen Nachweis von Chlorid (KOMNICK & BIERATHER, 1969; WICHARD & KOMNICK, 1971, 1973a, 1973b). Bei den dunklen Körnchen im respiratorischen Epithel (Abb. 1a) handelt es sich nicht um Silberchloridniederschläge, sondern um Pigmentgranula (WICHARD & KOMNICK, 1974a), die bei schräger Auflichtbeleuchtung infolge des Tyndall-Lichtes ebenfalls hell erscheinen (Abb. 1b).

In Schnittpräparaten sind die basalen Felder als dicke Epithelplatten von den dünnen respiratorischen Epithelien einwandfrei zu unterscheiden (Abb. 1c und d). Nach Fixation im Osmiumtetroxid/Silberlactat-Gemisch läßt sich der Silberchloridniederschlag spezifisch entlang der luminalen Oberfläche der Chloridepithelien orten; er erscheint im Hellfeld dunkel und im Phasenkontrast bei dünnen Schnitten ebenfalls dunkel, bei dickeren Schnitten infolge des Halo-Effektes dagegen hell (Abb. 1e). Die genaue Lokalisation zeigt das elektronenmikroskopische Bild (Abb. 1f). Die Silberchloridniederschläge liegen dicht gepackt in der Cuticula und der subcuticulären Schicht des Chloridepithels und enden abrupt an der Grenze zum respiratorischen Epithel. Außerdem befindet sich ein feinkörniger, locker verteilter Niederschlag im apikalen Cytoplasma. Diese histochemischen Befunde lassen sich in Übereinstimmung mit KOCH (1934) und KROGH (1939) dahingehend interpretieren, daß die Chloridepithelien aus dem äußeren Milieu, das durch die Ventilationsrhythmik im Rectum ständig erneuert wird, Chloride adsorbieren, wobei in der Cuticula offenbar ein Depot gebildet

Abb. 2. Elektronenmikroskopisches Querschnittsbild eines rektalen Chloridepithels von *Aeshna cyanea*. L Lumen der Kiemenkammer, – H Hämolympdraum. Osmiumtetroxid (12000 x).



wird. Von dort werden dann die Ionen durch die Epithelzellen in den Hämolympfraum transportiert. Demgemäß zeigt die feinstrukturelle Organisation der Chloridepithelien charakteristische Merkmale von ionentransportierenden Epithelien.

Feinstrukturelle Befunde

Abbildung 2 zeigt die wesentlichen Strukturmerkmale der rektalen Chloridepithelien von *Aeshna cyanea*, die andeutungsweise bereits bei lichtmikroskopischer Auflösung zu erkennen sind (Abb. 1d). Das einschichtige, zellig gegliederte Epithel wird zum Lumen des Rectums von einer zarten Cuticula, zum Hämolympfraum von einer Basallamelle begrenzt. Die apikale Seite der Epithelzellen wird von mikrovilliartigen Zellmembranfalten gesäumt. Daran schließt sich eine Zone mit dichter Mitochondrienpopulation an, die in basaler Richtung merklich lockerer wird. Im mittleren und basalen Epithelbereich dominieren unübersichtlich gewundene Membranverläufe, die aus einer interzellulären Verzahnung resultieren und ein sog. basales Labyrinth (RUSKA, MOOR & WEINSTOCK, 1957) umschließen. Den gleichen Feinbau besitzen die drei rektalen Chloridepithelien der zygoteren Libellenlarven (WICHARD & KOMNICK, 1974b).

DISKUSSION

In die rektalen Kiemenkammern der Anisopteren wird Wasser durch den Anus gepumpt. Das Wasser versorgt die Larven über das respiratorische Epithel der Tracheenkiemen mit Sauerstoff und offenbar über das Chloridepithel mit Elektrolyten, um die osmotische Hyperregulation dieser Tiere zu gewährleisten; denn die aquatischen Larven dieser Insektengruppe leben normalerweise im salzarmen Süßwasser, das bezüglich der ionalen Hämolympfkonzentration (SUTCLIFFE, 1962) stark hypotonisch ist. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer aktiven Salzaufnahme, um das osmotisch in den Larvenkörper eindringende Wasser auf die Dauer durch die Malpighischen Gefäße ausscheiden zu können, ohne daß die Hämolymphe an anorganischen Bestandteilen verarmt. Der Ort dieser aktiven Salzaufnahme sind offenbar die rektalen Chloridepithelien. Für diese Auffassung spricht außerdem die Beobachtung, daß zygotere Libellenlarven, die ebenfalls rektale Chloridepithelien besitzen, die Ventilationsfrequenz bei veränderter Salzkonzentration des Außenmediums verändern, und zwar so, daß sie, wie theoretisch zu erwarten, bei erniedrigter Konzentration häufiger und bei erhöhter Konzentration seltener das Lumen des Rectums ventilieren (WICHARD & KOMNICK, 1974b).

DANKSAGUNG

Frl. I. BAAS half bei den Untersuchungen durch sorgfältige technische Assistenz.

LITERATUR

- KOCH, H., 1934. Essai d'interprétation de la soi-disant "réduction vitale" de sels d'argent par certains organes d'Arthropodes. *Ann. Soc. Sci. méd. nat. Brux.* (B), 54: 346-361.
- KOMNICK, H. & M. BIERATHER, 1969. Zur histochemischen Ionenlokalisation mit Hilfe der Elektronenmikroskopie unter besonderer Berücksichtigung der Chloridreaktion. *Histochemie* 18: 337-362.
- KROGH, A., 1939. Osmotic regulation in aquatic animals. Univ. Press, Cambridge.
- KUSHIDA, H., 1961. A styrene-methacrylate resin embedding method for ultrathin sectioning. *J. Electronmicrosc.* 10: 16-19.
- RUSKA, H., D.H. MOORE & J. WEINSTOCK, 1957. The base on the proximal convoluted tubule cells of rat kidney. *J. biophys. biochem. Cytol.* 3: 249-254.
- SADONES, I., 1896. L'appareil digestif et respiratoire des larves des Odonates. *Cellule* 11: 273-324.
- SUTCLIFFE, D.W., 1962. The composition of haemolymph in aquatic insects. *J. Exp. Biol.* 39: 325-343.
- TILLYARD, R.J., 1917. The biology of dragonflies. Univ. Press, Cambridge.
- WICHARD, W. & H. KOMNICK, 1971. Electron microscopical and histochemical evidence of chloride cells in tracheal gills of mayfly larvae. *Cytobiologie* 3: 215-228.
- WICHARD, W. & H. KOMNICK, 1973a. Fine structure and function of the abdominal chloride epithelia in caddisfly larvae. *Z. Zellf.* 136: 579-590.
- WICHARD, W. & H. KOMNICK, 1973b. Feinstruktureller und histochemischer Nachweis von Chloridzellen bei Steinfliegenlarven. 1. Die coniformen Chloridzellen. *Cytobiologie* 7: 297-314.
- WICHARD, W. & H. KOMNICK, 1974a. Zur Feinstruktur der rektalen Tracheenkiemen von anisopteren Libellenlarven. I. Das respiratorische Epithel. *Odonatologica* 3 (2): 121-127.
- WICHARD, W. & H. KOMNICK, 1974b. Fine structure and function of the rectal chloride epithelia of damselfly larvae. *J. Insect Physiol.* (In press).

ANMERKUNG BEI DER KORREKTUR: Nach Einreichung des Manuskriptes erschien eine Arbeit mit entsprechenden feinstrukturellen Befunden von H. GREVEN & R. RUDOLPH: Histologie und Feinstruktur der larvalen Kiemenkammer von *Aeshna cyanea* Müller (Odonata: Anisoptera). *Z. Morph. Tiere* 76: 209-226 (1973).