

## Nachweis von Neurosekretspeichern bei der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae)

Identification of neurosecretory reservoirs in the mayfly *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae)

Helmut Kaiser<sup>1)</sup>

Zoologisches Institut der Universität Basel/Schweiz

Received December 14, 1978

Accepted March 20, 1979

### *Endocrine system - corpus cardiacum - ultrastructure*

Neurosecretory reservoirs were found in the head of *Ephemera danica*. In the region where the nervus corporis cardiaci 1 is leaving the brain, the diameter of this nerve increases considerably. Different types of axons were observed, filled with great amounts of electron opaque secretory granules with mean diameters of 170 nm and 110 nm, respectively.

Another neurosecretory reservoir is situated in the rostral part of the corpus cardiacum containing a secretory material of a different kind. Most of the granules have diameters of about 90 nm, and are electron opaque. A relatively small number of axons contains nearly electron lucent vesicles with the same mean diameter.

### Einleitung

Bei einer früheren Untersuchung der medianen neurosekretorischen Zellen (NSZ) im Protocerebrum von *Ephemera danica* stellte sich heraus, daß diese Zellgruppe gesamthaft betrachtet keine periodischen Schwankungen der Neurosekret-Produktion zeigt [15]. Dies wäre verständlich, wenn das Neurosekret in einem speziellen Speicher gesammelt würde, aus dem bei Bedarf sofort größere Mengen sekretorischen Materials freigesetzt werden könnten. Aus diesem Grunde wurden das Gehirn und das Corpus cardiacum (Cc) nach einem solchen Speicher abgesucht.

Daß Sekret auch außerhalb der NSZ gespeichert werden kann, zeigten bereits Highnam und West bei *Locusta* [11], Geldiay und Edwards bei *Acheta* [9] und Steel bei *Megoura* [16]. In allen Fällen wurden Sekretanhäufungen innerhalb des Gehirns gefunden.

### Material und Methoden

Für die Lichtmikroskopie wurden neben ganzen Köpfen auch Gehirne geschnitten, die zusammen mit dem vordersten Teil des Cc freipräpariert worden waren. Die Fixierung erfolgte in einem Formaldehyd/Glutaraldehyd/Pikrinsäure-Gemisch [12]. Die 7 µm dicken Paraplastschnitte wurden mit Paraldehydfuchsin/Hämalaun/Pikroindigocarmin gefärbt [13].

Auch zur Fixierung der elektronenmikroskopischen Präparate diente die erwähnte Fixierungslösung [12]. Zum Nachfixieren und Kontrastieren wurde OsO<sub>4</sub> verwendet. Eine zusätzliche Kontrastierung der Epon-Schnitte wurde mit Bleicitrat durchgeführt. Der genaue Gang der Präparation ist in einer früheren Arbeit beschrieben [14].

Die für die Elektronenmikroskopie verwendeten Tiere befanden sich im vorletzten und letzten Nymphenstadium. Für die Lichtmikroskopie standen jüngere Nymphen sowie vor allem Tiere der letzten vier Entwicklungsstadien (vorletzte Nymphen, letzte Nymphen, Subimagines, Imagines) zur Verfügung.

Bei den Angaben der mittleren Durchmesser der verschiedenen Sekret-Granula handelt es sich um die „wahren mittleren Durchmesser“, die nach der Methode von Froesch [7] bestimmt wurden.

### Ergebnisse

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen des Gehirns und auch des Cc führten vorerst zu keinem Resultat. Mit der Paraldehydfuchsin (PAF)-Färbung läßt sich gut der Verlauf der von den medianen protocerebralen NSZ abgehenden Axone verfolgen, jedoch können keine speziellen Neurosekret-Ansammlungen beobachtet werden. Auch im Cc – einem unpaaren langgestreckten Organ in der dorsalen Aortawand – läßt sich neurosekretorisches Material anfärben. Es ist aber ebenfalls nicht in auffällig großen Mengen vorhanden.

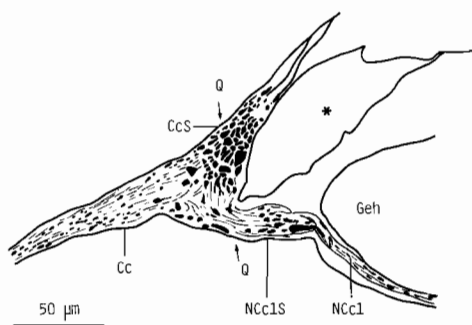
Erst die Untersuchung von Querschnitten und medianen Sagittalschnitten der Übergangzone vom Gehirn zum Cc lieferte Hinweise auf Sekretspeicher (Abb. 1, 2): Bei den meisten Tieren ist der Nervus Corporis cardiaci 1 (NCC1) an der Stelle, wo er das Gehirn verläßt (das ist fast gleichzeitig auch die Eintrittsstelle ins Cc; vgl. Abb. 1) stark verdickt und mit PAF-positivem Material gefüllt. An zahlreichen Querschnitten konnte gemessen werden, daß die Schnittfläche des

<sup>1)</sup> Helmut Kaiser, Zoologisches Institut der Universität Basel, Rheinsprung 9, CH-4051 Basel/Schweiz.

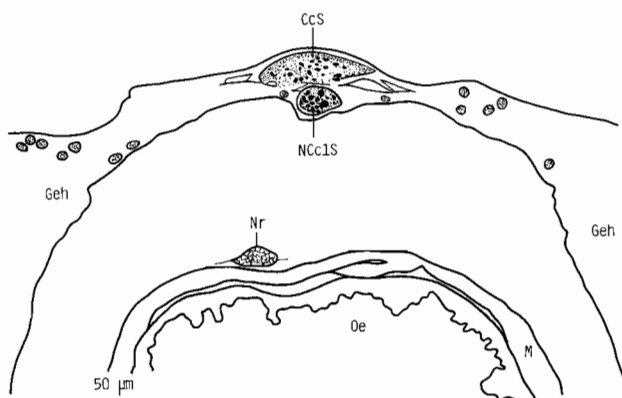
NCc1 in dieser Region fast  $6 \times$  größer ist als weiter rostral im Gehirn. Neben dem NCc1 ist hier auch das Cc zu einem Sekretspeicher erweitert. Das Cc beginnt nämlich nicht erst bei der Eintrittsstelle des NCc1, sondern besitzt noch einen nach dorsal und rostral gerichteten Fortsatz (Abb. 1). Dieser Cc-Anhang, der direkt dem Gehirn anliegt, wird mit PAF ebenfalls kräftig gefärbt.

Im Elektronenmikroskop zeigen sich sowohl im verdickten NCc1 als auch im rostralen Cc-Anhang große Mengen typischer Neurosekret-Granula. Bereits bei schwachen Vergrößerungen fällt auf, daß sich die Granula des NCc1 von denen des Cc-Fortsatzes in ihrer Größe unterscheiden. Die nähere Auswertung dieses Befundes ergab die folgenden Resultate (Abb. 3, 5, 6):

Im NCc1-Speicher lassen sich zwei Arten von Axonen unterscheiden, die mit verschiedenen großen elektronendichten Granula gefüllt sind. Die meisten Axone – sie sind mit Durchmessern von bis zu  $10 \mu\text{m}$  oft stark erweitert (Abb. 4) – enthalten Granula mit Durchmessern von 90 bis  $220 \text{ nm}$  (mittlerer Durchmesser:  $170 \text{ nm}$ ; Abb. 3: a<sub>1</sub>, Abb. 5). Seltener sind Nervenfasern mit kleineren Sekrettröpfchen zu finden,



**Abb. 1.** Halbschematische Darstellung der Übergangszone vom Gehirn zum Corpus cardiacum. Medianer Sagittalschnitt. – Cc Corpus cardiacum. – CcS Corpus cardiacum-Speicher. – Geh Gehirn. – NCc1 Nervus Corporis cardiaci 1. – NCc1S NCc1-Speicher. – Q ungefähre Lage des Querschnittes, nach dem Abb. 2 gezeichnet ist. – \* Hohlraum, der häufig bei der Präparation entsteht. In Wirklichkeit liegt der CcS direkt am Gehirn. –  $230 \times$ .

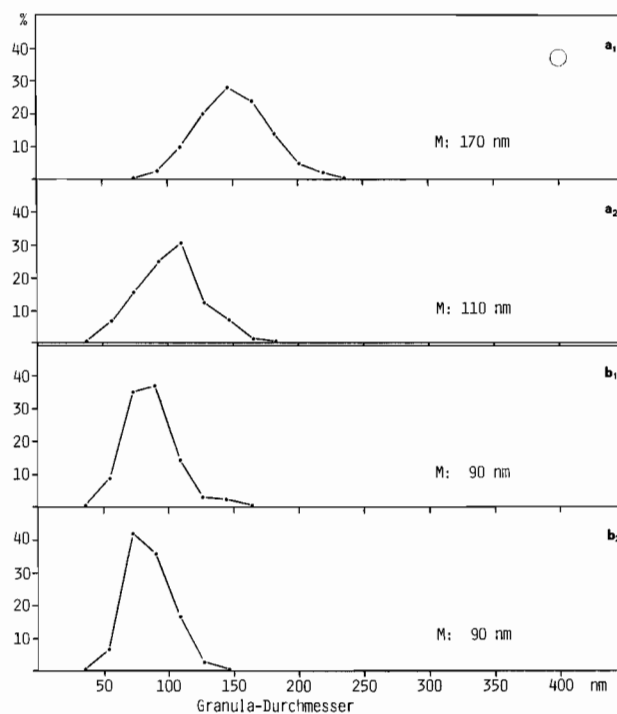


**Abb. 2.** Querschnitt durch die Übergangszone vom Gehirn zum Corpus cardiacum. Halbschematische Darstellung. – CcS Corpus cardiacum-Speicher. – Geh Gehirn. – M Muskulatur. – NCc1S NCc1-Speicher. – Nr Nervus recurrens. – Oe Oesophagus. –  $230 \times$ .

deren Durchmesser 55 bis  $160 \text{ nm}$  betragen (mittlerer Durchmesser:  $110 \text{ nm}$ ; Abb. 3: a<sub>2</sub>, Abb. 5).

Im Cc-Speicher können vier Typen von sekretorischen Granula beobachtet werden. Bei weitem am häufigsten sind elektronendichte Granula mit Durchmessern von 55 bis  $145 \text{ nm}$  (mittlerer Durchmesser:  $90 \text{ nm}$ ; Abb. 3: b<sub>1</sub>, Abb. 6). Genau die gleichen Werte konnten für eine andere, weniger häufige Art von sekretorischem Material bestimmt werden. Es handelt sich dabei um nahezu elektronendurchlässige Vesikel (Abb. 3: b<sub>2</sub>, Abb. 6). In den Axonen, die mit diesen Vesikeln gefüllt sind, kommen manchmal einige elektronendichte Granula oder auch Übergangsstadien vor (Abb. 6). Beide Sekretarten unterscheiden sich von den Granula im NCc1-Speicher durch eine unregelmäßigere, oft etwas längliche Form.

Nur gelegentlich treten Axone auf, die größere ( $70\text{--}160 \text{ nm}$ , mittlerer Durchmesser:  $140 \text{ nm}$ ) oder kleinere ( $40\text{--}140$

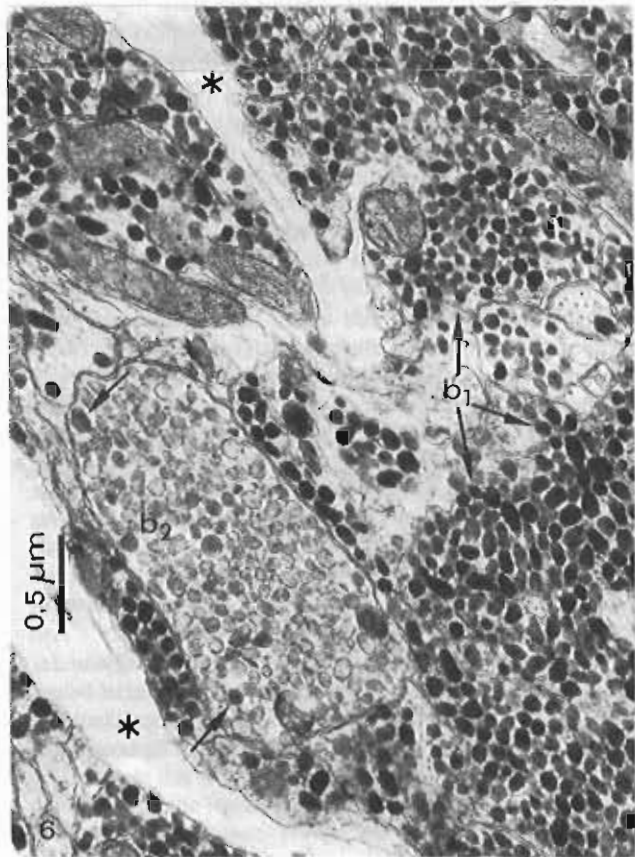
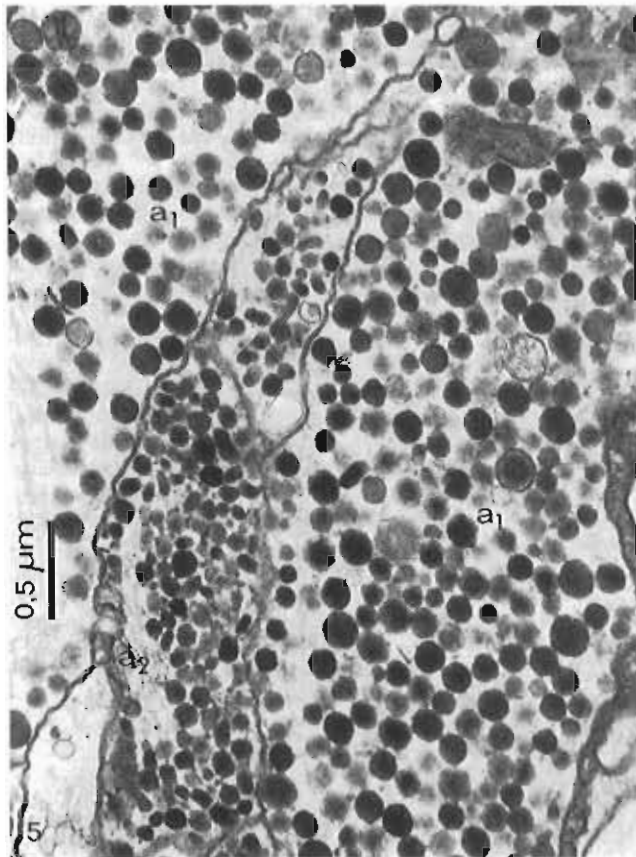
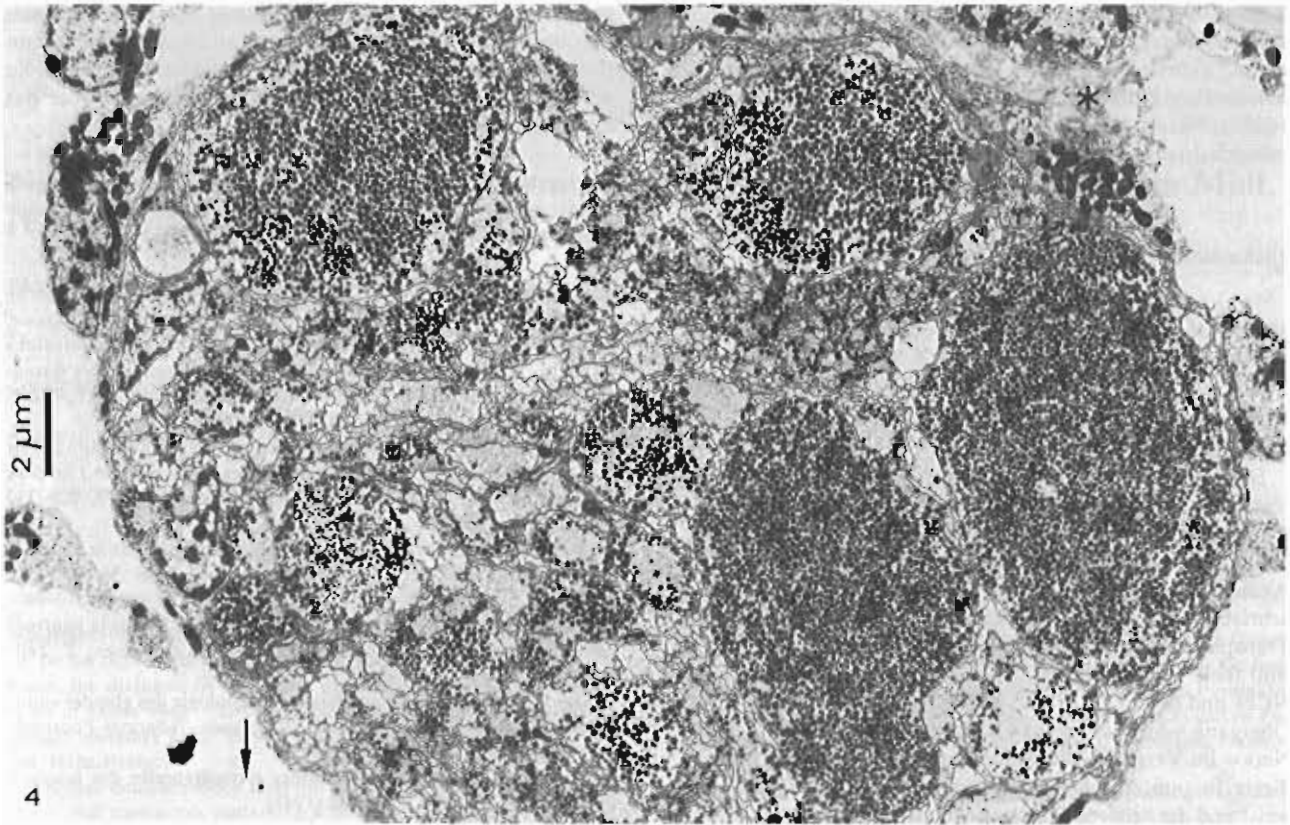


**Abb. 3.** Häufigkeitsverteilung von sekretorischen Granula im NCc1-Speicher (a<sub>1</sub> und a<sub>2</sub>) und im Cc-Speicher (b<sub>1</sub> und b<sub>2</sub>). – M mittlerer Durchmesser.

**Abb. 4.** Querschnitt durch einen Nervus Corporis cardiaci 1-Speicher. Mehrere Axone sind stark erweitert und vollständig mit Sekret-Granula (a<sub>1</sub> von Abb. 3) gefüllt. – \* Bindegewebe. – Pfeil Richtung nach ventral. –  $5600 \times$ .

**Abb. 5.** Ausschnitt aus einem Nervus Corporis cardiaci 1-Speicher. Deutlich lassen sich Axone mit größeren (a<sub>1</sub>) und kleineren (a<sub>2</sub>) Granula unterscheiden. –  $25800 \times$ .

**Abb. 6.** Ausschnitt aus einem Corpus cardiacum-Speicher. Neben Axonen, die den häufigsten Sekret-Typ enthalten (b<sub>1</sub>), ist auch ein Axon mit elektronendurchlässigeren Vesikeln zu erkennen (b<sub>2</sub>). – Pfeile in b<sub>2</sub> Elektronendichtere Granula. – \* Bindegewebe. –  $25800 \times$ .



nm, mittlerer Durchmesser: 70 nm) elektronendichte Granula enthalten. Vereinzelt sind auch interstitielle Zellen eingelagert, während sich Zellen mit sekretorischer Funktion in diesem Cc-Abschnitt nicht beobachten lassen. Die sekretführenden Nervenfasern werden durch Bindegewebe zusammengehalten (Abb. 6).

## Diskussion

Das Cc und der Verlauf der NCc1 von Ephemeriden sind bereits seit langem beschrieben [1, 2, 3, 4, 5, 6, 10]. Noch nie wurde allerdings auf Sekretspeicher hingewiesen, auch wenn zum Teil spezifische Sekretfärbungen zur Anwendung kamen [1, 3, 4, 5].

Daß es sich bei dem verdickten Teil des NCc1 und beim rostralen Cc-Anhang von *E. danica* wirklich um Speicher handelt, liegt nicht nur wegen der großen Sekretmengen nahe. Auch die Verteilung der sekretorischen Granula in den Axonen weist darauf hin. Wie an anderer Stelle bereits beschrieben [15], sind die Granula während des axonalen Transportes kettenartig hintereinander aufgereiht. Dieses Bild fehlt weitgehend bei den hier untersuchten Stellen des NCc1 und des Cc. Für die Speicherfunktion des NCc1 beim Übergang vom Gehirn ins Cc spricht außerdem, daß dieser Nerv – im Vergleich mit weiter rostral gelegenen Teilen – in dieser Region eine fast 6 × größere Querschnittsfläche aufweist und die größten Durchmesser von Axonen etwa 10 µm (verglichen mit 1,5 µm weiter rostral) betragen.

Die in einer früheren Arbeit vorgenommene Untersuchung sekretorischer Gehirnzellen [15] ermöglicht es, den Ursprungsort der beiden Sekretarten im NCc1-Speicher zu bestimmen. Die Granula-Verteilung entspricht recht genau jener, die bei den NSZ des Typs 3 bzw. bei den Typen 1 und 2 gemessen wurde. Es kann deshalb festgestellt werden, daß die größeren Granula (mittlerer Durchmesser um 170 nm) von den NSZ des Typs 3 produziert werden. Die Granula mit mittleren Durchmessern um 110 nm stammen dagegen von den NSZ der Typen 1 und 2.

Über den Cc-Anhang und seinen Inhalt lassen sich noch keine sicheren Aussagen machen. Aufgrund mehrerer Beobachtungen ist allerdings die folgende Vorstellung am wahrscheinlichsten: Der rostrale Cc-Speicher besteht aus Kollateralen des NCc1. Das Sekret, mit dem er gefüllt ist, stammt ebenfalls aus dem Gehirn, nimmt aber erst auf dem Weg zum Cc-Speicher oder in ihm selbst die beobachteten Merkmale an (90 nm mittlerer Durchmesser, zum Teil helle Granula und Übergangsformen). Sowohl das Prinzip der Sekretspeicherung in Kollateralen als auch Veränderungen von Neurosekret auf dem Weg vom Gehirn zum Cc wurden bei anderen Insekten bereits beobachtet [8, 9, 11, 16].

Wenn man an die raschen Veränderungen am Ende der Entwicklung von Ephemeriden denkt, erstaunt es in keiner Weise, daß gerade bei ihnen ausgeprägte Sekretspeicher auftreten. Da anzunehmen ist, daß auch bei den Ephemeriden

zahlreiche Prozesse direkt oder indirekt von Gehirnshormonen beeinflusst werden, erscheint es äußerst sinnvoll, wenn diese Produkte in großen Speichern bereitgestellt werden. So wird eine sofortige Abgabe großer Sekretmengen über das Cc gewährleistet.

*Danksagung.* Allen Mitarbeitern des Schweizerischen Tropeninstitutes, die mir bei der vorliegenden Arbeit behilflich waren, sei an dieser Stelle mein herzlicher Dank ausgesprochen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Arvy, L., M. Gabe: Données histophysiologiques sur les formations endocrines rétro-cérébrales chez les Ecdyonuridae (Ephéméroptères). Bull. Soc. zool. Fr. **75**, 267–285 (1950).
- [2] Arvy, L., M. Gabe: Particularités morphologiques des formations endocrines rétro-cérébrales chez *Ecdyonurus dispar* (Curt.) et chez *Ecdyonurus torrentis* Kimmins. Bull. Soc. zool. Fr. **77**, 229–230 (1952).
- [3] Arvy, L., M. Gabe: Données histophysiologiques sur la neurosécrétion chez quelques Ephéméroptères. Cellule **56**, 203–222 (1953).
- [4] Arvy, L., M. Gabe: Données histophysiologiques sur la neurosécrétion chez les Paléoptères (Ephéméroptères et Odonates). Z. Zellforsch. **38**, 591–610 (1953).
- [5] Arvy, L., M. Gabe: Contribution à l'histologie des glandes endocrines céphaliques chez la larve de *Prosopistoma foliaceum* Fourcroy. Bull. Soc. zool. Fr. **78**, 451–461 (1953).
- [6] Cazal, P.: Les glandes endocrines rétro-cérébrales des insectes. Bull. Biol. Fr. et Belg. Suppl. **32** (1948).
- [7] Froesch, D.: A simple method to estimate the true diameter of synaptic vesicles. J. Microsc. **98**, 85–89 (1973).
- [8] Gabe, M.: Données histo-chimiques sur l'évolution du produit de neurosécrétion protocéphalique des Insectes Ptérygotes au cours de son cheminement axonal. Acta Histochem. **43**, 168–183 (1972).
- [9] Geldiay, S., J. S. Edwards: The protocerebral neurosecretory system and associated cerebral neurohaemal area of *Acheta domestica*. Z. Zellforsch. **145**, 1–22 (1973).
- [10] Hanström, B.: Inkretorische Organe, Sinnesorgane und Nervensystem des Kopfes einiger niederer Insektenordnungen. Kungl. Svensk. Vetenskapsakad. Handl. Ser. III, **18**, No. 8 (1940).
- [11] Highnam, K. C., M. W. West: The neuropilar neurosecretory reservoir of *Locusta migratoria migratorioides* R. & F. Gen. Comp. Endocrinol. **16**, 574–585 (1971).
- [12] Ito, S., M. J. Karnovsky: Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. J. Cell Biol. **39**, 168 a, b (1968).
- [13] Kaiser, H.: Das endokrine System der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. während der Metamorphose: eine licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung. Cratander AG, Basel 1977.
- [14] Kaiser, H.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Ventraldrüsen von *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae) während der Metamorphose. Int. J. Insect Morphol. & Embryol. **7**, 377–385 (1978).
- [15] Kaiser, H.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von neurosekretorischen Zellen im Gehirn der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae). Acta Zool., in press (1979).
- [16] Steel, C. G. H.: The neurosecretory system in the aphid *Megoura viciae*, with reference to unusual features associated with long distance transport of neurosecretion. Gen. Comp. Endocrinol. **31**, 307–322 (1977).