

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von neurosekretorischen Zellen im Gehirn der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae)

Helmut Kaiser

Zoologisches Institut der Universität Basel, Schweiz

(Accepted November 22, 1978)

Abstract

Kaiser, H. 1979. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung von neurosekretorischen Zellen im Gehirn der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae). [Light- and electron microscopic investigation on neurosecretory cells in the brain of the mayfly *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae).] (Zoologisches Institut der Universität Basel, Schweiz.) — *Acta zool.* (Stockh.) 60(2): 93—104.

In the brains of the males the amount of stained secretory material was nearly constant during the last four instars. In the females a decrease in this neurosecretory product in the last nymphal and subimaginal stage could be observed, followed by an increase in the imagines. In the final nymphal stage four types of neurosecretory cells (nsc) were found in the medial protocerebral cell group, showing differences in shape, size, and the contents of the cytoplasm, especially of the secretory granules. In addition to the medial nsc, some cells in the frontal part of the brain and in the deutocerebrum are described. They contain electron-opaque granules and probably have a neurosecretory function. The secretory product of the medial nsc is transported along the axons of the nervus corporis cardiaci 1 (ncc1), an unpaired nerve tract on the ventral side of the brain. Leaving the brain the ncc1 immediately enters the corpus cardiacum. Connections between secretory granules and neurotubuli point to an important role for the neurotubuli in the transport of secretory material.

Helmut Kaiser, Zoologisches Institut der Universität Basel, Rheinsprung 9, CH-4051 Basel, Schweiz.

Einleitung

Mediane und laterale neurosekretorische Zellen (NSZ) im Gehirn von Ephemeriden werden erstmals von Hanström (1940) erwähnt. Cazal (1948) bestätigt Hanströms Angaben und beschreibt ausserdem den Verlauf der von diesen Zellen ausgehenden Nervenbahnen. Genauere histophysiologische Untersuchungen führten Arvy und Gabe (1952, 1953 a, b, c) durch. In einer Arbeit (1953a) wird von diesen Autoren neben anderen Arten auch *Ephemera danica* erwähnt. Elektronenoptische Untersuchungen des Gehirns

einer Ephemeride wurden bislang noch nicht durchgeführt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine erste Beschreibung der Ultrastruktur neurosekretorischer Gehirnzellen von *E. danica*. Die von den medianen NSZ abgehenden Axone werden bis zu ihrem Austritt aus dem Gehirn licht- und elektronenmikroskopisch verfolgt. Ausserdem wird der Zustand der medianen protocerebralen NSZ während der letzten vier Entwicklungsstadien (vorletzte Nymphe, letzte Nymphe, Subimago, Imago) im Lichtmikroskop beobachtet.

PRIVATE LIBRARY
OF WILLIAM L. PETERS

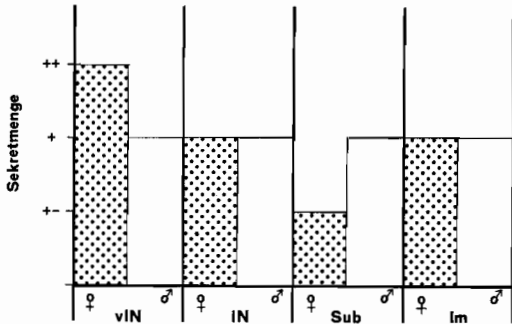


Abb. 1. Vergleich der Sekretmenge in den medianen protocerebralen NSZ während der letzten Entwicklungsstadien. *vlN* vorletztes Nymphenstadium, *IN* letztes Nymphenstadium, *Sub* Subimago, *Im* Imago, +, -, +, + geringe, mittlere, grosse Sekretmenge mit PAF nachweisbar. Die Einteilung in diese drei Kategorien beruht auf subjektiven Schätzungen.

Material und Methoden

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden insgesamt 53 Gehirne von männlichen und weiblichen Tieren der letzten vier Entwicklungsstadien in einem Glutaraldehyd/Formaldehyd/Pikrinsäure-Gemisch fixiert (Ito und Karnovsky 1968). Die Färbung der 7 µm dicken Paraplastschnitte erfolgte mit Paraldehydfuchsin (PAF), Hämalaun und Pikroindigocarmin (vgl. Kaiser 1977, unpubl. Diss.).

Die für die Elektronenmikroskopie präparierten Gehirne stammen von letzten Nymphen-Stadien. Die Fixierung erfolgte ebenfalls im oben erwähnten Gemisch. Damit die Fixierungslösung besser in die medianen NSZ eindringen konnte, wurden die lateralen Gehirnteile weitgehend entfernt. Die weitere Präparation fand in der üblichen Weise statt: Waschen in Cacodylatpuffer, Nachfixieren und Kontrastieren in OsO₄ und Uranylacetat, Entwässerung in einer Acetonreihe, Einbetten über Propylenoxid in Epon, Kontrastierung der Schnitte mit Bleicitrat (vgl. Kaiser 1978).

Bei den Angaben der mittleren Durchmesser der verschiedenen Sekret-Granula handelt es sich um die "wahren mittleren Durchmesser", die nach der Methode von Froesch (1973) bestimmt wurden.

Ergebnisse

a) Die medianen NSZ

1. Lichtmikroskopie:

Fast bei allen untersuchten Tieren liessen sich mit Hilfe der PAF-Färbung die medianen proto-

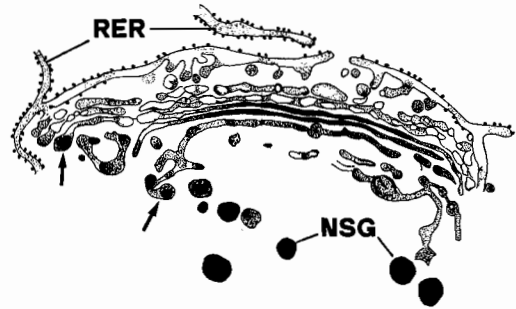


Abb. 2. Golgi-Körper einer NSZ des Typs 1. Auf dieser nach einer elektronenmikroskopischen Aufnahme angefertigten Zeichnung lässt sich die Entstehung der Sekret-Granula deutlich verfolgen. *RER* granuläres endoplasmatisches Reticulum, *NSG* Neurosekret-Granula, *Pfeile* Granula kurz vor der Abschnürung.

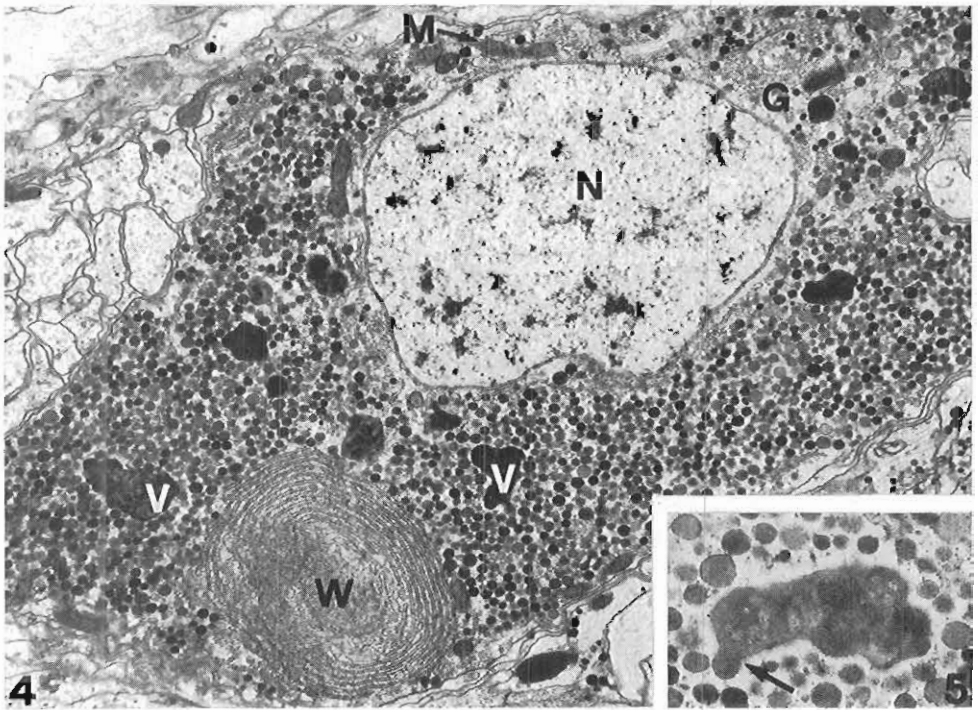
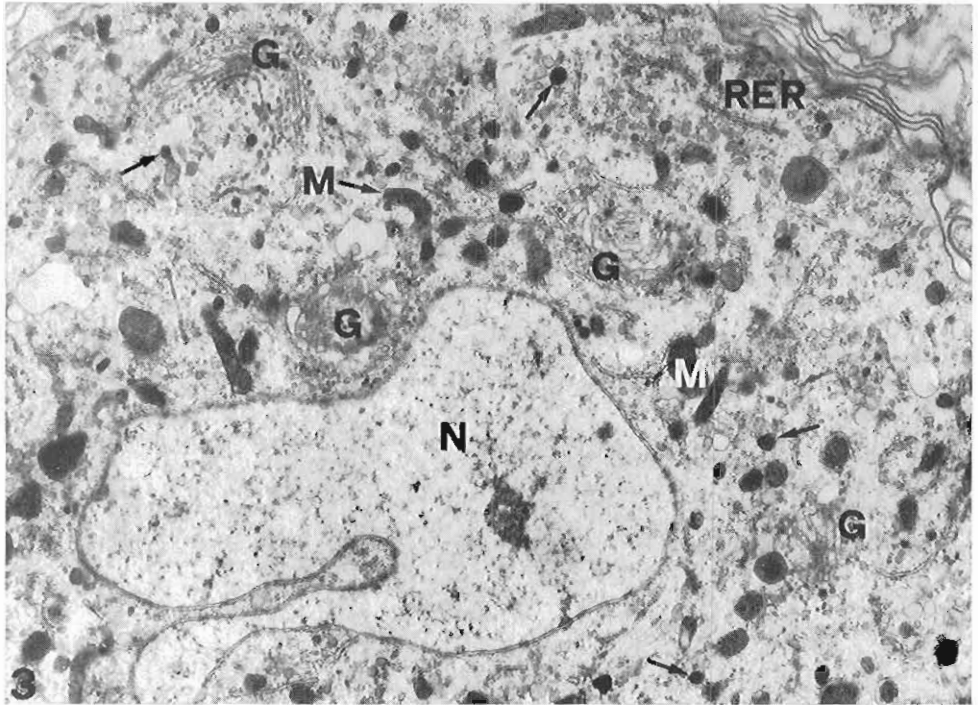
cerebralen NSZ auffinden. Vergleicht man die färbbare Sekretmenge dieser Neurone bei den verschiedenen Entwicklungsstadien, so erhält man folgende Ergebnisse:

- Bei allen (auch sehr frühen) Nymphenstadien ist in der Regel ohne Schwierigkeiten Neurosekret zu finden.
- Bei den letzten vier Entwicklungsstadien können je nach Stadium und Geschlecht verschiedene durchschnittliche Sekretmengen festgestellt werden (Abb. 1). Während bei den

Abb. 3. Ausschnitt aus einer NSZ des Typs 1. Neben der stark eingefalteten Kernmembran fallen vor allem zahlreiche Golgi-Körper auf, in deren Cisternen teilweise sekretorisches Material zu erkennen ist. *G* Golgi-Körper, *M* Mitochondrien, *N* Zellkern, *RER* granuläres endoplasmatisches Reticulum, *Pfeile* Sekret-Granula. ×12,600.

Abb. 4. NSZ des Typs 2. Ausser in einer schmalen Zone um den Kern ist fast das gesamte Cytoplasma mit Sekret-Granula angefüllt. An mehreren Stellen sind die Granula zu grösseren Gebilden verschmolzen. *G* Golgi-Körper, *M* Mitochondrien, *N* Zellkern, *V* Verschmelzungskörper, *W* Wirbelbildung des RER. ×8,400.

Abb. 5. Verschmelzungskörper. Im Inneren lassen sich teilweise noch die Umrisse der Sekret-Granula erkennen, aus denen dieser Körper entstanden ist. An einer Stelle (*Pfeil*) ist deutlich zu sehen, wie ein Sekret-Granulum mit dem Verschmelzungskörper zusammenhängt. ×19,600.



Männchen keine stärkeren Schwankungen auf-treten, fällt vor allem die deutlich geringere Menge des neurosekretorischen Materials in den Gehirnen der weiblichen Subimagines auf.

2. Elektronenmikroskopie:

In den Gehirnen des untersuchten Entwicklungsstadiums konnten zahlreiche Zellen gefunden werden, die sekretorische Granula enthalten. Die einzelnen Zellen unterscheiden sich teilweise in bestimmten Merkmalen voneinander. Aufgrund dieser Unterschiede lassen sie sich in vier Gruppen unterteilen.

Typ 1:

Die Zellen dieses Typs sind kugelförmig bis ovoid mit Durchmessern von 5–12 μm . Die Kerne enthalten wenig, fein verteiltes Chromatin. Ihre Membran ist an einzelnen Stellen tief eingefaltet (Abb. 3). Vor allem an der Peripherie der Zellen können grössere Bezirke mit Ergastoplasma ausgefüllt sein. Im Cytoplasma befinden sich neben „grauen“ Granula und wenigen „leeren“ Vesikeln auch einige elektronendichte Sekret-Granula mit mittleren Durchmessern von 120 nm (Abb. 3). Ein besonders auffälliges Merkmal dieser Zellen ist die grosse Zahl von Golgi-Körpern (Abb. 3), von denen häufig Sekret-Granula abgeschnürt werden. Abb. 2, die nach einer elektronenmikroskopischen Aufnahme angefertigt wurde, lässt den Weg erkennen, auf dem das sekretorische Material gebildet wird:

In den Cisternen des granulären endoplasmatischen Reticulums (RER) befindet sich stellenweise eine schwach elektronendichte Substanz, bei der es sich um eine Vorstufe des Sekrets handeln dürfte. Die einem Golgi-Körper am nächsten gelegenen Cisternen sind nur auf einer Seite mit Ribosomen besetzt. Auf der ribosomenfreien Seite bilden sich zahlreiche Ausbuchtungen, in denen sich die etwas elektronendichtere Substanz ansammelt. Von den Ausbuchtungen lösen sich kleine Vesikel ab. Sie treten allerdings nur kurz in Erscheinung, da sie sich zu den langgestreckten proximalen Cisternen des Golgi-Körpers vereinigen. Die älteren, weiter distal gelegenen Cisternen sind schmaler und ihr Inhalt ist an einigen Stellen völlig elektronenundurchlässig geworden. Dieses elektronendichte Material wird von den distalen Golgi-Cisternen in Form von Sekret-Granula abgeschnürt.

Typ 2:

Dieser am häufigsten beobachtete Zelltyp unterscheidet sich weder in der Grösse noch in der Gestalt von den Zellen des Typs 1. Insgesamt erscheint aber Typ 2 wesentlich dunkler. Dies hängt damit zusammen, dass vor allem periphere Bezirke mit einem dichten, stark von Ribosomen besetzten RER ausgefüllt sind, das oft Wirbelstrukturen aufweist (Abb. 4). Ausserdem enthält der grösste Teil des Cytoplasmas zahlreiche mehr oder weniger elektronendichte Sekret-Granula mit mittleren Durchmessern von 120 nm (Abb. 4). Lediglich eine schmale Zone, die den Zellkern umgibt, ist nahezu frei von Sekret (Abb. 4). Hier liegen neben freien Ribosomen die Mitochondrien und die meisten Golgi-Körper. Das Chromatin in den Kernen ist teilweise zu kleineren Klumpen verdichtet (Abb. 4.).

Zwischen den kugelförmigen Sekret-Granula befinden sich in der Regel mehrere grössere elektronendichte Körper von unregelmässiger Gestalt (Abb. 4). Diese von einer Membran umgebenen Gebilde treten gelegentlich auch in den Zellen des Typs 1 auf. Abb. 5 zeigt, dass es sich bei diesen Körpern um Verschmelzungsprodukte aus mehreren Sekret-Granula handelt.

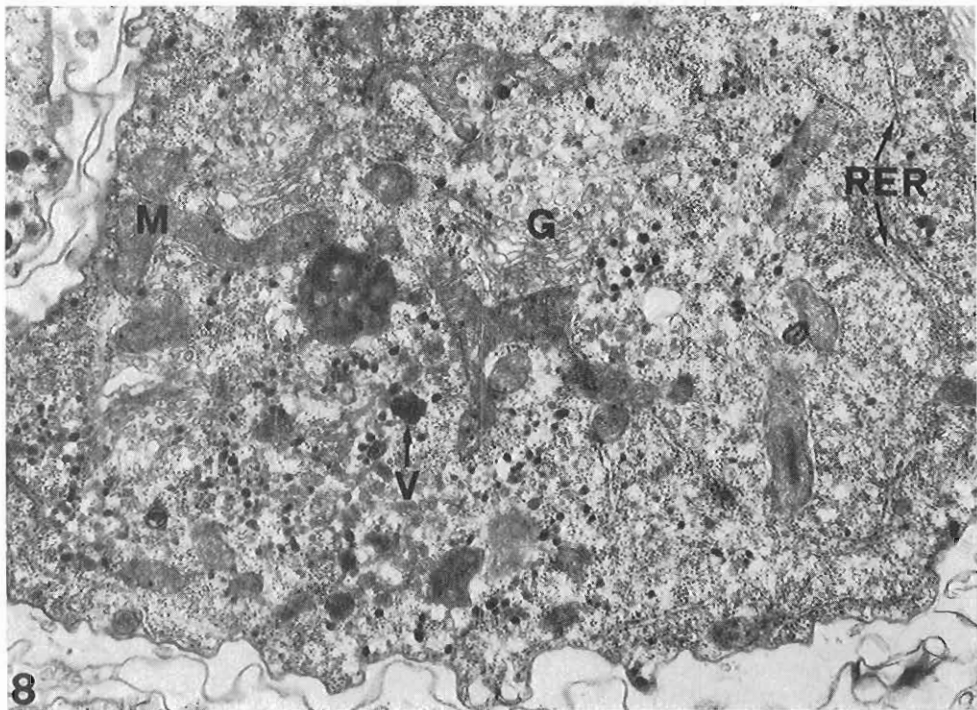
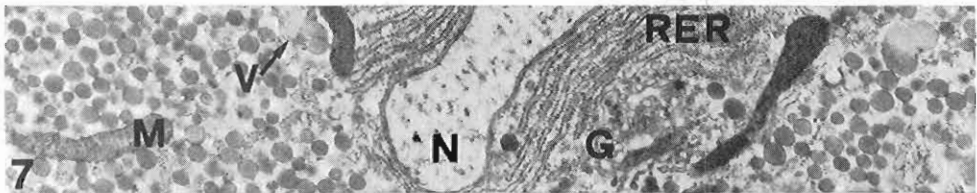
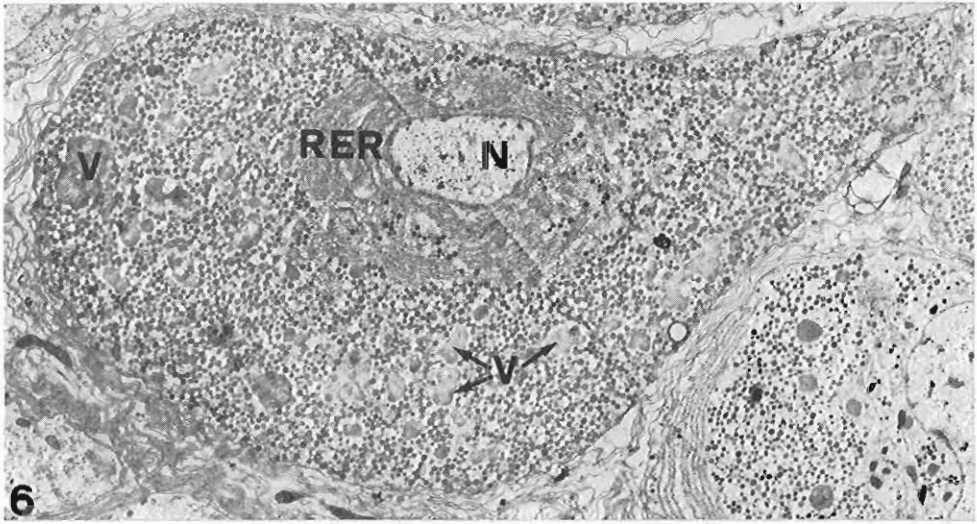
Typ 3:

Die Zellen des Typs 3 sind wesentlich grösser (grösster Durchmesser 20–25 μm) als die Zelltypen 1 und 2 und zeigen eine bimenförmige Gestalt (Abb. 6). Ihr Inneres ist fast vollständig mit sekretorischen Granula gefüllt, deren mittlere Durchmesser 155 nm betragen. Sie sind also etwas grösser als die Granula der Zelltypen 1 und 2. Ausserdem sind sie weniger elektronendicht (Abb.

Abb. 6. NSZ des Typs 3. Die Sekret-Granula dieser Zellen sind etwas grösser und elektronendurchlässiger als bei den Typen 1 und 2. Die Zone um den Zellkern ist fast vollständig mit RER gefüllt. *N* Zellkern, *RER* granuläres endoplasmatisches Reticulum, *V* Verschmelzungskörper. $\times 5,100$.

Abb. 7. Ausschnitt aus einer NSZ des Typs 3. *G* Golgi-Körper, *M* Mitochondrien, *N* Zellkern, *RER* granuläres endoplasmatisches Reticulum, *V* Verschmelzungskörper. $\times 14,100$.

Abb. 8. Teil einer NSZ des Typs 4. Wegen der zahlreichen freien Ribosomen erscheint die Zelle relativ dunkel. Auffallend sind die Sekret-Granula, deren Durchmesser wesentlich geringer ist als bei den anderen Zelltypen. *G* Golgi-Körper, *M* Mitochondrien, *RER* granuläres endoplasmatisches Reticulum, *V* Verschmelzungskörper. $\times 18,000$.



6, 7). Auch bei den Zellen des Typs 3 liegt um den Kern herum eine sekretarme Zone. Neben den Golgi-Körpern befindet sich hier der grösste Teil des RER (Abb. 6, 7). Die Mitochondrien treten in diesen Zellen auch in den mit Sekret gefüllten Bereichen auf (Abb. 7). Grössere Körper, die aus der Verschmelzung mehrerer Sekret-Granula entstanden sind, lassen sich in grosser Zahl finden (Abb. 6). Wie die Granula sind auch sie elektronendurchlässiger als in den anderen Zelltypen.

Typ 4:

Zellen dieses Typs konnten nur in geringer Zahl beobachtet werden. Sie sind wegen ihrer stark eingebuchteten Zellmembran (Abb. 8) unregelmässiger geformt als die anderen NSZ. Ihr Durchmesser beträgt 5–10 μm . Wie die Zellen des Typs 2 erscheinen auch sie ziemlich dunkel (Abb. 8.). Dies hängt hier aber nicht mit den Sekret-Granula oder dem RER zusammen, sondern mit der überaus grossen Zahl von freien Ribosomen. Das Ergastoplasma ist nur schwach ausgebildet und ist nicht auf bestimmte Zellregionen konzentriert. Ebenso sind auch die Mitochondrien und Golgi-Körper frei im Cytoplasma verteilt. Das auffälligste Merkmal dieser Zellen bilden Sekret-Granula, die nur in relativ geringer Zahl auftreten und lediglich einen mittleren Durchmesser von ca. 70 nm besitzen (Abb. 8). Verschmelzungskörper — wie sie in den anderen Zelltypen vorkommen — sind auch hier zu beobachten.

b) Die lateralen NSZ

Von den lateralen NSZ liegen noch keine Ergebnisse vor, da es bislang nicht möglich war, bei *E. danica* eindeutige Hinweise auf die Existenz dieser Zellen zu finden. In den lichtmikroskopischen Präparaten konnte nur in einem einzigen Fall eine laterale Zelle beobachtet werden, die mit PAF schwach reagiert hatte. Auch beim Präparieren der Gehirne, wo die medianen NSZ durch ihre bläuliche Farbe deutlich auffielen, liessen sich lateral keine besonderen Zellen erkennen.

c) Die rostralen NSZ

Im rostralen Teil des Gehirns von *E. dandica* befinden sich einige auffällig grosse Zellen (Abb. 16). Sie zeigen keine spezifische Reaktion mit PAF und fallen auch bei der Präparation nicht durch eine besondere Färbung auf. Im Elektronenmikroskop lassen sich in ihnen geringe Mengen

elektronendichter Granula beobachten (Abb. 9), die auf eine gewisse neurosekretorische Aktivität hinweisen. Die Durchmesser der meisten Granula betragen etwa 150 nm, doch kommen auch wesentlich grössere Granula vor (Durchmesser bis 300 nm). Wegen der zahlreichen freien Ribosomen erscheinen diese Zellen relativ dunkel. Mitochondrien, eine grössere Zahl von Golgi-Körpern und kurze Abschnitte des RER sind unregelmässig im Cytoplasma verteilt (Abb. 9). Ausserdem fallen einige stark elektronendichte, mitochondriengrosse Körper auf, in denen hellere Zonen sichtbar sind (Abb. 9). Es dürfte sich dabei um Verschmelzungsprodukte aus mehreren Sekret-Granula handeln.

Insgesamt erinnert das Aussehen dieser Zellen — abgesehen vom unterschiedlichen Durchmesser der Sekret-Granula — an die medianen NSZ des Typs 4.

d) NSZ im Deutocerebrum

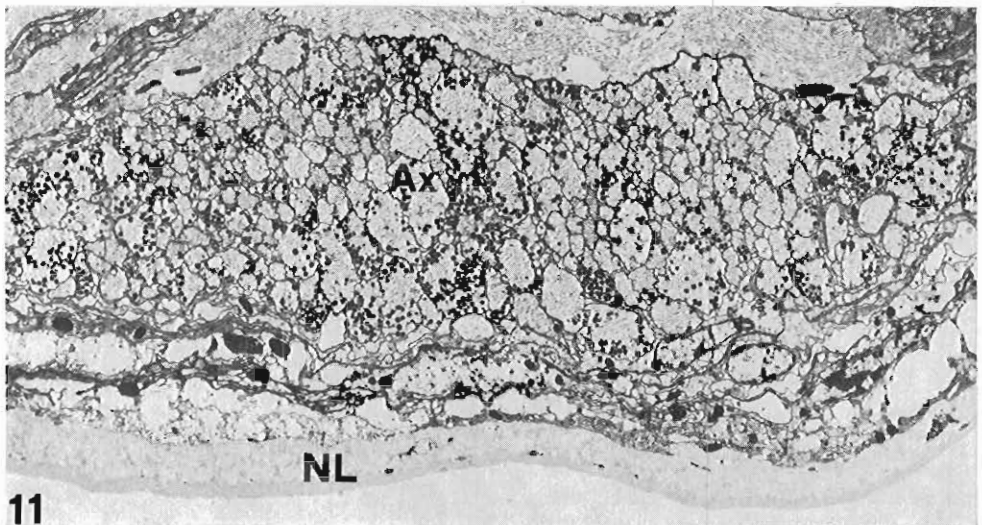
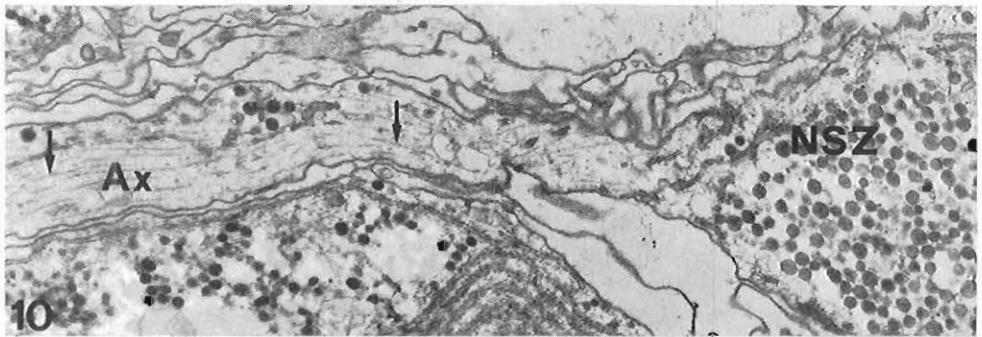
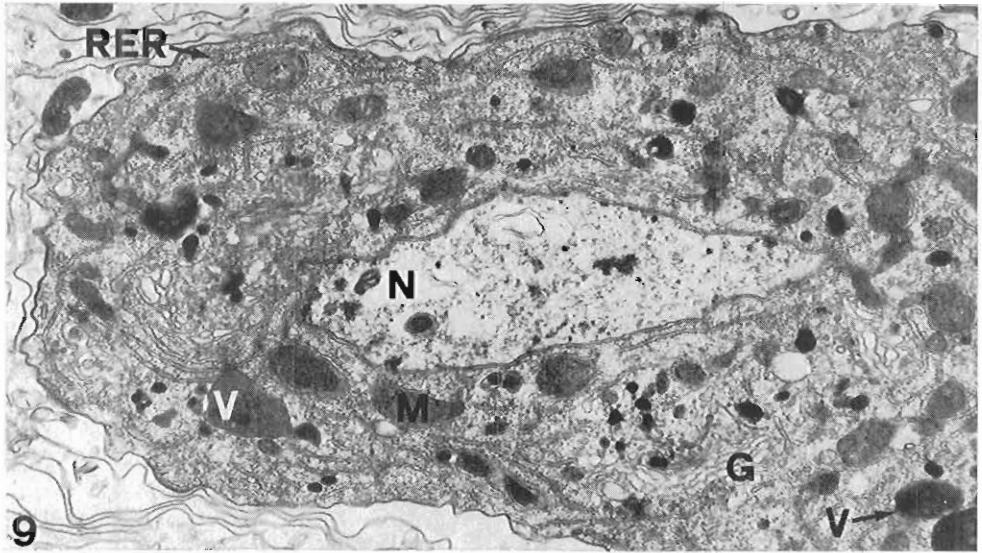
Im Deutocerebrum einiger Tiere liessen sich lichtmikroskopisch einzelne bis über 20 μm grosse Zellen beobachten, in denen andeutungsweise paraldehydfuchsinophiles Material erkennbar war. In einem zu Testzwecken vollständig präparierten Gehirn eines Weibchens im vorletzten Nymphenstadium war es möglich, diese Zellen auch im Elektronenmikroskop aufzufinden (Abb. 14). Ihr Fixierungszustand ist allerdings schlecht.

Diese Neuronen enthalten neben einem kräftig ausgebildeten RER zahlreiche elektronendichte Sekret-Granula, die von den Golgi-Körpern abgeschnürt werden (Abb. 14). Wegen der mangelhaften Fixierung ist es nicht sinnvoll, die Durch-

Abb. 9. Zelle aus dem rostralen Teil des Gehirns. Sie erinnert stark an die medianen NSZ des Typs 4. Der hauptsächlichste Unterschied liegt im viel grösseren Durchmesser der Sekret-Granula. *G* Golgi-Körper, *M* Mitochondrien, *N* Zellkern, *RER* granuläres endoplasmatisches Reticulum, *V* Verschmelzungskörper. $\times 13,500$.

Abb. 10. Teil einer medianen NSZ mit wegführendem Axon. Die zahlreichen Sekret-Granula scheinen im Perikaryon zurückgehalten zu werden. Nur sehr wenige Granula befinden sich auf dem Weg zum Corpus cardiacum. *Ax* Axon, *NSZ* neurosekretorische Zelle, *Pfeile* Neurotubuli. $\times 12,000$.

Abb. 11. Querschnitt durch die Neurosekret führenden Axone, die die medianen NSZ mit dem Corpus cardiacum verbinden. Die Nervenbahn (= Nervus corporis cardiaci 1, *NCc1*) verläuft direkt an der Unterseite des Gehirns. *Ax* Neurosekret führende Axone (= *NCc1*), *NL* Neurallamelle. $\times 4,500$.



messer der Granula näher auszumessen. Wohin dieses Material transportiert wird, ist noch unbekannt. Es steht lediglich fest, dass es das Gehirn nicht über die Schlundkonnektive verlässt (Kaiser 1977, unpubl. Diss.).

c) Die neurosekretorischen Axone

Die Axone der beiden medianen neurosekretorischen Zellgruppen ziehen nach rostral und überkreuzen sich teilweise an der Vorderseite des Gehirns. Anschliessend verlaufen sie unter der Neurallamelle an der Ventralseite in der Medianlinie nach hinten, steigen auf und treten in das direkt dem Gehirn anliegende Corpus cardiacum (Cc) ein (Abb. 16). Von dem Punkt, an dem die Nervenfasern die Unterseite des Gehirns erreichen bis zur Einmündung ins Cc verlaufen alle Axone in einer gemeinsamen Nervenbahn (Abb. 11), die als Nervus corporis cardiaci 1 (NCc1) bezeichnet werden kann. Als eigentlicher, frei verlaufender Nerv tritt der NCc1 allerdings nicht oder nur über eine ganz kurze Strecke in Erscheinung (Abb. 16).

Lichtmikroskopisch lässt sich beobachten, dass im NCc1 bei allen untersuchten Stadien und bei beiden Geschlechtern etwa gleich viel neurosekretorisches Material vorhanden ist. Im elektronenmikroskop werden Sekret-Granula mit mittleren Durchmessern zwischen 140 und 150 nm sichtbar (Abb. 11, 12). Nur selten finden sich Axone, die kleine Granula mit mittleren Durchmessern von etwa 80 nm enthalten (Abb. 12, 13). Sie stammen vermutlich von den medianen NSZ des Typs 4.

Auf den Abb. 15 und 17 lässt sich an zahlreichen Stellen erkennen, dass die Sekret-Granula durch feine Verbindungen mit den Neurotubuli zusammenhängen. Dies erklärt, warum die Granula oft kettenartig hintereinander aufgereiht sind (Abb. 12, 17).

Diskussion

Die in der vorliegenden Untersuchungen festgestellte Abnahme PAF-positiven Materials in den medianen protocerebralen NSZ der Weibchen von *E. danica* dürfte auf eine starke Abgabe neurosekretorischen Materials aus diesen Zellen zurückzuführen sein. Noch nie ist bei den Ephemeriden experimentell untersucht worden, welche Vorgänge durch diese Stoffe beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall muss es sich um geschlechtsspezifische Einflüsse, beispielsweise auf die Eientwicklung handeln. Bei anderen Insekten konnte

bereits gezeigt werden, dass die medianen NSZ die Eientwicklung beeinflussen (z.B. Girardie und Girardie 1977, Goltzène und Porte 1978).

Ein Zusammenhang zwischen der Sekretmenge im Gehirn und den Häutungsvorgängen liess sich bei beiden Geschlechtern nicht feststellen, auch wenn die einzelnen Stadien noch in drei Altersgruppen unterteilt wurden. Dies bedeutet allerdings nicht, dass das neurosekretorische Material keinen Einfluss auf die Häutungen ausübt, sondern weist eher darauf hin, dass auch bei den Ephemeriden eine grössere Zahl von Vorgängen von den Gehirn-Hormonen abhängt (Marks et al. 1973, Granger und Borg 1976, Baehr 1976, Girardie und Girardie 1977, Cole und Gillett 1978). Eine andere Möglichkeit, die das Fehlen periodischer Vorgänge in den medianen Zellgruppen erklären könnte, wäre das Vorhandensein eines Sekretspeichers, dem mehr oder weniger regelmässig Neurosekret zugeführt wird. Ein solcher Speicher wurde von Steel (1977) im Gehirn von *Megoura* und von Highnam und West (1971) im Gehirn von *Locusta* beschrieben. Ob *E. danica* ebenfalls über einen Sekretspeicher verfügt, muss noch abgeklärt werden.

Seit den ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen protocerebraler NSZ durch Nishiitsutsuji-Uwo (1961) und Stiennon und Drochmans (1961) befasste sich eine grosse Zahl von Autoren

Abb. 12. NCc1 sagittal. Auffallend sind die meist genau hintereinander aufgereihten Granula. Sterne Axone, die kleine Granula enthalten. $\times 12,000$.

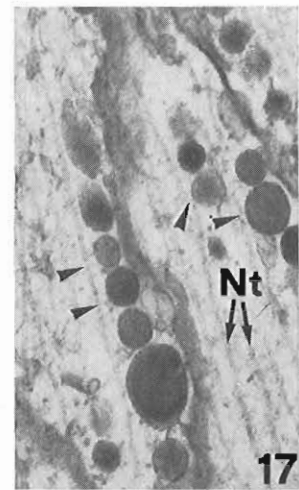
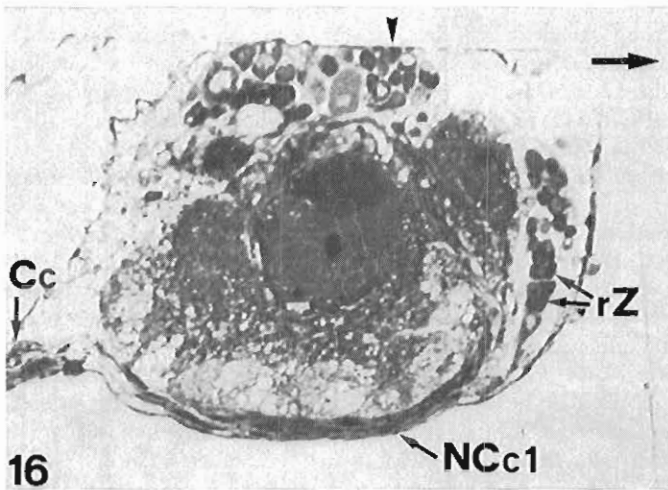
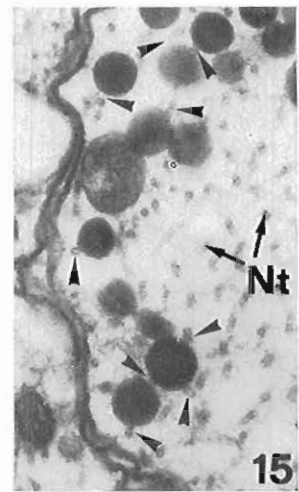
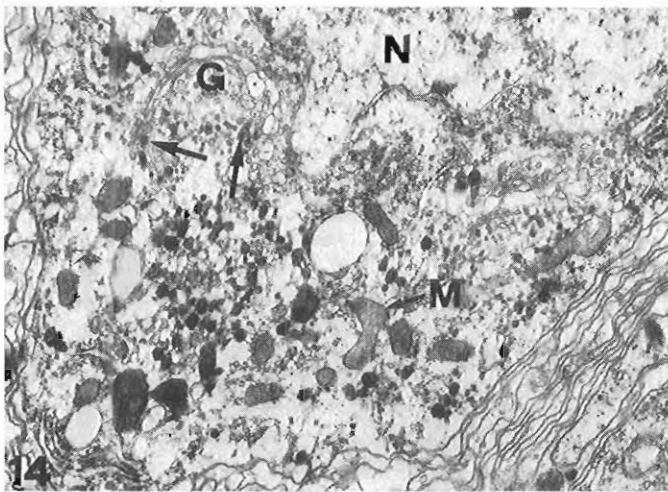
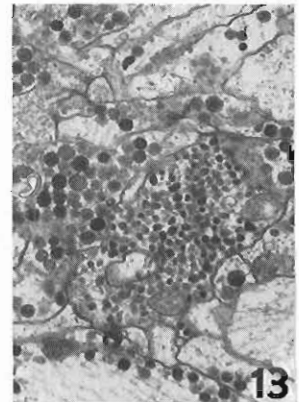
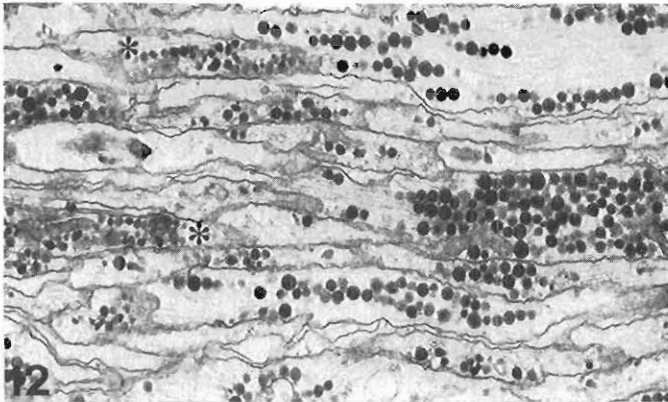
Abb. 13. Ausschnitt aus dem NCc1. Deutlich lassen sich Axone unterscheiden, in denen verschiedene grosse Sekret-Granula transportiert werden. $\times 12,000$.

Abb. 14. Ausschnitt aus einer Zelle im Deutocerebrum. Sie enthält Sekret-Granula, die von den Golgi-Körpern abgeschnürt werden. G Golgi-Körper, M Mitochondrien, N Zellkern, Pfeile Abschnürung von Sekret-Granula. $\times 15,000$.

Abb. 15. NCc1 quer. An mehreren Stellen erkennt man Verbindungen zwischen Neurotubuli und Sekret-Granula einerseits und zwischen verschiedenen Granula andererseits. Nt Neurotubuli, Pfeilspitzen Verbindungsstellen. $\times 40,000$.

Abb. 16. Sagittaler Semidünnschnitt durch ein Gehirn (Färbung mit Toluidinblau). Cc vorderster Teil des Corpus cardiacum, NCc1 Nervus corporis cardiaci 1, rZ rostrale Zellen, Pfeilspitze mediane NSZ, Pfeil Richtung nach rostral. $\times 400$.

Abb. 17. NCc1 sagittal. An mehreren Stellen erkennt man Verbindungen zwischen den Neurotubuli und sekretorischen Granula. Nt Neurotubuli, Pfeilspitzen Verbindungsstellen. $\times 34,000$.



bei den verschiedensten Insekten mit diesen Zellen (für Lit. z.B. Schooneveld 1974, Borg und Granger 1977, Borg und Bell 1977). Dabei konnte immer wieder eine unterschiedliche Zahl von Zelltypen festgestellt werden. Ein recht einheitliches Bild bieten die sogenannten A-Zellen, zu denen mit grosser Wahrscheinlichkeit auch die Zelltypen 1 und 2 von *E. danica* gehören. Bei diesen Typen handelt es sich kaum um prinzipiell andersartige Zellen wie bei den A₁- und A₂-Zellen von *Locusta* (Girardie und Rossi 1978), sondern eher um verschiedene Entwicklungsstadien. Dafür sprechen neben den vergleichbaren Zellgrössen auch die gleichen Durchmesser der Sekret-Granula. Vor allem wird diese Vermutung aber auch durch die Tatsache gestützt, dass sich zahlreiche Übergangsstadien — also Zellen, die weder eindeutig dem Typ 1 noch dem Typ 2 zuzuordnen sind — finden lassen.

In den Zellen des Typs 1 wird vermutlich eine Phase erhöhter Sekretproduktion beobachtet. Darauf deuten vor allem die zahlreichen Granula abschnürenden Golgi-Körper hin. In den Zellen des Typs 2 wäre dann diese Phase abgeschlossen. Die geringe Zahl von neurosekretorischen Granula, die in mehreren von solchen Zellen wegführenden Axonen beobachtet wurden (Abb. 10), weist darauf hin, dass das Sekret nicht ständig in grösseren Mengen wegtransportiert wird. Wahrscheinlich verlässt das sekretorische Material zu einem bestimmten Zeitpunkt relativ rasch die Perikaryen.

Bei den Zellen 3 und 4 dürfte es sich wirklich um verschiedene Typen handeln, da Übergangsstadien fehlen und unterschiedliche Granula festgestellt werden können. Besonders erwähnenswert ist der mit ca. 70 nm ungewöhnlich kleine Durchmesser der Granula in den Zellen des Typs 4. Lediglich im Gehirn von *Hyphantria* wurden bislang vergleichbare Zellen beschrieben (Panov und Melnikova 1974).

In allen medianen NSZ-Typen konnten bei *E. danica* sogenannte Verschmelzungskörper beobachtet werden, die es offenbar ermöglichen, besonders grosse Neurosekretmengen in den Perikaryen zu speichern. Auf solche Verschmelzungskörper weisen bereits Nishiitsutsuji-Uwo (1961, „giant granule“) bei *Philosamia*, Geldiay und Edwards (1973) bei *Acheta* und Morris und Steel (1975) bei *Rhodnius* hin. Auch bei *Locusta* (Girardie und Girardie 1967), *Leptinotarsa* (Schooneveld 1970) und *Sitophilus* (Sandifer und Tombes 1972) scheinen sie vorzukommen, obwohl sie von den Autoren nicht speziell erwähnt werden.

Während in allen bisher untersuchten Insektengehirnen NSZ mit mehr oder weniger elektronendichten Granula festgestellt wurden, ist die Zahl der Arten, die auch Zellen mit „leeren“ Vesikeln enthalten, deutlich geringer. Es handelt sich um *Calliphora erythrocephala* (Bloch et al. 1966), *Bombyx mori* (Bassurmanova und Panov 1967, Park and Seong 1975), *Musca domestica* (Ramade 1970), *Monema flavescens* (Takeda 1972), *Manduca sexta* (Borg und Marks 1973, Borg und Bell 1977) und *Leptinotarsa decemlineata* (Schooneveld 1974). Die Herkunft dieser Vesikel ist verschieden. Sie können sich aus dem endoplasmatischen Reticulum bilden (Bassurmanova und Panov 1967) oder möglicherweise durch Abgabe oder Umwandlung sekretorischen Materials aus elektronendichten Granula entstehen (Takeda 1972, Borg und Marks 1973). Bei den elektronendurchlässigen Vesikeln in den NSZ des Typs 1 von *E. danica* besteht wohl kaum ein Zusammenhang zum Neurosekret, da diese Vesikel sonst auch in den wegführenden Axonen gefunden werden müssten.

Laterale NSZ wiesen Arvy und Gabe (1953a) bei mehreren Ephemeriden-Arten — darunter auch *E. danica* — nach. In der vorliegenden Untersuchung war es nicht möglich, die Angaben dieser Autoren zu bestätigen, was wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Färbemethoden zusammenhängt. Da das Tiermaterial nur in einem sehr beschränkten Ausmass zur Verfügung steht, konnte noch keine Untersuchung mit einer anderen Färbung durchgeführt werden.

Neben den medianen und lateralen NSZ wurden im Protocerebrum gewisser Insekten auch andere NSZ beobachtet (Borg und Granger 1977, Steel 1977, Bessé 1978). Die Entdeckung der rostralen Zellen bei *E. danica* kommt deshalb nicht überraschend. Ob es sich dabei um NSZ handelt, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Die Durchmesser der elektronendichten Granula sprechen aber eher dafür, denn sie liegen in der für Neurosekret üblichen Grössenordnung. Auch die geringe Zahl dieser Granula kann nicht als Hinweis gegen eine neurosekretorische Funktion dieser Zellen angesehen werden, da nur ein einziges Entwicklungsstadium untersucht wurde. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass zeitweise wesentliche grössere Mengen des elektronendichten Materials vorhanden sind. Ihrer Lage nach könnten die rostralen Zellen von *E. danica* den von Bessé (1978) untersuchten antero-ventralen Zellen von *Leucophaea* entsprechen.

Bislang konzentriert sich die Erforschung neurosekretorischer Zellen weitgehend auf das Proto-

cerebrum. Nur wenige Arbeiten befassen sich mit anderen Gehirnteilen (z.B. Raabe 1963, Masson 1972, Girardie 1975). Ein Vergleich der im Deutocerebrum von *E. danica* gefundenen Zellen mit entsprechenden Zellen anderer Insekten ist deshalb noch nicht möglich. Trotz des schlechten Fixierungszustandes kann man erkennen, dass es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um NSZ handelt. Diese Vermutung wird vor allem dadurch gestützt, dass neben der in Abb. 14 gezeigten Zelle noch andere Zellen vorhanden sind, deren Cytoplasma sehr viel mehr elektronendichte Granula enthält.

Die aus den medianen protocerebralen NSZ abgehenden Axone bilden nach Hanström (1940) wie auch nach den Angaben von Cazal (1948) und Arvy und Gabe (1953 a, b) die bereits im Gehirn als getrennte Nervenbahnen verlaufenden Nervi corporis cardiaci 1. Abb. 11 zeigt dagegen, dass bei *E. danica* nur ein unpaarer NCc1 vorhanden ist. Wahrscheinlich ist die Situation bei verschiedenen Arten unterschiedlich.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen intracerebraler Bereiche des NCc1 fallen besonders die häufig kettenartig hintereinander aufgereihten Sekret-Granula auf. Die genauere Untersuchung dieses Phänomens lieferte Hinweise auf den möglichen Transportmechanismus des sekretorischen Materials. Danach dürfte die Ursache des Neurosekret-Transportes in den Neurotubuli zu suchen sein. Zwischen den Neurotubuli und einzelnen Granula konnten feine Verbindungen beobachtet werden, weshalb diese Vermutung naheliegt. Durch Bewegungsvorgänge der Neurotubuli scheinen die Granula durch die Axone gezogen zu werden. Ein Zusammenhang zwischen Neurotubuli und Sekret-Granula konnte auch bei *Rhodnius* festgestellt werden (Morris und Steel 1977). Ausserdem erkannten bereits Smith et al. (1975) bei Wirbeltieren, dass Mitochondrien und synaptische Vesikel oft mit den Neurotubuli verbunden sind.

Danksagung

Allen Mitarbeitern des Schweizerischen Tropeninstitutes, die mich bei dieser Arbeit unterstützten, sei an dieser Stelle mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Literatur

Arvy, L., Gabe, M. 1952. Particularités morphologiques des formations endocrines rétro-céré-

brales chez *Ecdyonurus dispar* (Curt.) et chez *Ecdyonurus torrentis* Kimmins. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 77: 229—230.

- Gabe, M. 1953a. Données histophysiologiques sur la neurosécrétion chez quelques Ephéméroptères. *Cellule* 56: 203—222.
- Gabe, M. 1953b. Données histophysiologiques sur la neurosécrétion chez les Paléoptères (Ephéméroptères et Odonates). *Z. Zellforsch.* 38: 591—610.
- Gabe, M. 1953c. Contribution à l'histologie des glandes endocrines céphaliques chez la larve de *Prosopistoma foliaceum* Fourcroy. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 78: 451—461.
- Baehr, J. C. 1976. L'étude du contrôle neuro-endocrine du fonctionnement du corpus allatum chez les larves du quatrième stade de *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 22: 73—82.
- Bassurmanova, O. K., Panov, A. A. 1967. Structure of the neurosecretory system in Lepidoptera. Light and electron microscopy of type A'-neurosecretory cells in the brain of normal and starved larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen. comp. Endocrinol.* 9: 245—262.
- Bessé, N. 1978. Mise en évidence des cellules neurosécrétrices protocérébrales impliquées dans la régulation de l'équilibre hydrique et de la sécrétion salivaire chez les adultes de *Leucophaea maderae* (F.). *C. R. Acad. Sci. Paris D* 268: 1695—1698.
- Bloch, B., Thomsen, E., Thomsen, M. 1966. The neurosecretory system of the adult *Calliphora erythrocephala*. III. Electron microscopy of the medial neurosecretory cells of the brain and some adjacent cells. *Z. Zellforsch.* 70: 185—208.
- Borg, Th. K., Bell, R. A. 1977. Ultrastructure of the neurosecretory cells in the brain of diapausing pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Tissue and Cell* 9: 567—574.
- Granger, N. A. 1977. Ultrastructure of the protocerebral neurosecretory cells of larval *Galleria mellonella*, in situ and after culture of the brain in vitro. *Tissue and Cell* 9: 645—652.
- Marks, E. P. 1973. Ultrastructure of the median neurosecretory cells of *Manduca sexta* in vivo and in vitro. *J. Insect Physiol.* 19: 1913—1920.
- Cazal, P. 1948. Les glandes endocrines rétro-cérébrales des insectes. *Bull. biol. Fr. Belg. Suppl.* 32.
- Cole, S. J., Gillett, J. D. 1978. The influence of the brain hormone on retention of blood in the mid-gut of the mosquito *Aedes aegypti* (L.). II. Early elimination following removal of the medial neurosecretory cells of the brain. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 202: 307—311.
- Froesch, D. 1973. A simple method to estimate the true diameter of synaptic vesicles. *J. Microsc.* 98: 85—89.
- Geldiay, S., Edwards, J. S. 1973. The protocerebral neurosecretory system and associated cerebral neurohaemal area of *Acheta domesticus*. *Z.*

- Zellforsch.* 145: 1—22.
- Girardie, A., Girardie, J. 1967. Etude histologique et ultrastructurale de la pars intercerebralis chez *Locusta migratoria* L. (Orthoptère). *Z. Zellforsch.* 78: 54—75.
- Girardie, J. 1975. Recherche en microscopie photonique et électronique des éléments neurosécréteurs tritocérébraux de *Locusta migratoria* (Insecte, Orthoptère). *Arch. Anat. Micr.* 64: 223—246.
- Girardie, A. 1977. Dynamique, après axotomie, des cellules neurosécrétrices protocérébrales médianes A₁ et A₂ du criquet migrateur. I. Etude histophysiologique. *Arch. Anat. Micr.* 66: 291—304.
- Rossi, Ch. 1978. Preuves histologiques et ultrastructurales de 2 catégories de cellules neurosécrétrices protocérébrales médianes de type A chez le criquet migrateur. *C. R. Acad. Sci. Paris D* 286: 97—100.
- Goltzène, F., Porte, A. 1978. Endocrine control by neurosecretory cells of the pars intercerebralis and the corpora allata during the earlier phases of vitellogenesis in *Locusta migratoria migratorioides* R&F (Orthoptera). *Gen. comp. Endocrinol.* 35: 35—45.
- Granger, N. A., Borg, Th. K. 1976. The allatotropic activity of the larval brain of *Galleria mellonella* cultured in vitro. *Gen. comp. Endocrinol.* 29: 349—359.
- Hanström, B. 1940. Inkretorische Organe, Sinnesorgane und Nervensystem des Kopfes einiger niederer Insektenordnungen. *Kungl. Svensk. Vetenskapsakad. Handl.* III 18 No. 8.
- Highnam, K. C., West, M. W. 1971. The neuropilar neurosecretory reservoir of *Locusta migratoria migratorioides* R&F. *Gen. comp. Endocrinol.* 16: 574—585.
- Ito, S., Karnovsky, M. J. 1968. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J. Cell Biol.* 39: 168a, b.
- Kaiser, H. 1977. Das endokrine System der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. während der Metamorphose: eine licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung. Dissertation. Cratander AG, Basel.
- 1978. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung der Ventraldrüsen von *Ephemera danica* Müll. (Ephemeroptera: Ephemeridae) während der Metamorphose. *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* 7: 377—385.
- Marks, E. P., Holman, G. M., Borg, Th. K. 1973. Synthesis and storage of a neurohormone in insect brains in vitro. *J. Insect Physiol.* 19: 471—477.
- Masson, C. 1972. Le système antennaire chez les fourmis. I. Histologie et ultrastructure du deutocérébron. Etude comparée chez *Camponotus vagus* (Formicinae) et *Mesoponera caffraria* (Ponerinae). *Z. Zellforsch.* 134: 31—64.
- Morris, G. P., Steel, C. G. H. 1975. Ultrastructure of neurosecretory cells in the pars intercerebralis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Tissue and Cell* 7: 73—90.
- Steel, C. G. H. 1977. Sequence of ultrastructural changes induced by activation in the posterior neurosecretory cells in the brain of *Rhodnius prolixus* with special reference to the role of lysosomes. *Tissue and Cell* 9: 547—561.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J. 1961. Electron microscopic studies on the neurosecretory system in Lepidoptera. *Z. Zellforsch.* 54: 613—630.
- Panov, A. A., Melnikova, E. Ju. 1974. Structure of the neurosecretory system in Lepidoptera. II. Light and electron microscopy of the medial neurosecretory cells in larval brain of *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera). *Gen. comp. Endocrinol.* 23: 361—375.
- Park, K. E., Seong, S. I. 1975. Fine structure of median neurosecretory cell in diapause and non-diapause brains of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 21: 1311—1317.
- Raabe, M. 1963. Mise en évidence, chez des insectes d'ordres variés, d'éléments neurosécréteurs tritocérébraux. *C. R. Acad. Sci. Paris D* 257: 1171—1173.
- Ramade, F. 1970. Données histologiques, histo-chimiques et ultrastructurales sur la pars intercerebralis de *Musca domestica* L. *Mém. Mus. nat. Hist. nat. Paris A* 58: 113—142.
- Sandifer, J. B., Tombes, A. S. 1972. Ultrastructure of the lateral neurosecretory cells during reproductive development of *Sitophilus granarius* (L.) (Insecta: Coleoptera). *Tissue and Cell* 4: 437—446.
- Schooneveld, H. 1970. Structural aspects of neurosecretory and corpus allatum activity in the adult colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say, as a function of daylength. *Neth. J. Zool.* 20: 151—237.
- Schooneveld, H. 1974. Ultrastructure of the neurosecretory system of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). I. Characterization of the protocerebral neurosecretory cells. *Cell Tiss. Res.* 154: 275—288.
- Smith, D. S., Järfors, U., Cameron, B. F. 1975. Morphological evidence for the participation of microtubules in axonal transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253: 472—506.
- Steel, C. G. H. 1977. 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.
- Stiennon, J. A., Drochmans, P. 1961. Electron microscope study of neurosecretory cells in Phasmidae. *Gen. comp. Endocrinol.* 1: 286—294.
- Takeda, N. 1972. Activation of neurosecretory cells in *Monema flavescens* (Lepidoptera) during diapause break. *Gen. comp. Endocrinol.* 18: 417—427.