

PRIVATE LIBRARY
OF WILLIAM L. PETERS

Mikrokosmos

Vol. 60

Sonderabdruck aus
Heft 11 November 1971

Franck'sche Verlagshandlung Stuttgart

Viktor Benno Meyer-Rochow

Fixierung von Insektenorganen mit Hilfe eines Netzmittels

Das Dorsalauge der Eintagsfliege *Atalophlebia costalis*

Insekten sind für die mikroskopische Technik ganz allgemein schwierige Objekte: Die Cuticula setzt dem Eindringen von Fixierungslösungen erheblichen Widerstand entgegen, und stark chitinisierte Teile werden bei der Paraffineinbettung oft so hart und spröde, daß sie nur unter Anwendung besonderer Tricks zu schneiden sind. Vor al-

lem ist die Cuticula an vielen Stellen schwer benetzbar oder überhaupt unbenetzbar; sie verwehrt wäßrigen Fixierungslösungen nicht nur den Durchtritt, sondern die Objekte schwimmen häufig auf der Fixierungslösung anstatt unterzutau-chen. Vor allem gilt dies für die Cornea der Facettenaugen. Zwar wurden speziell

Bild 1: Querschnitt durch die mehrschichtigen, bikonvexen Cuticularlinsen des Dorsalalages eines Männchens der Eintagsfliege *Atalophlebia costalis*. Die Dicke einer Cornea beträgt ungefähr 20 μm . Der Maßstab (auf allen Fotos) entspricht einer Länge von 10 μm . Primärvergrößerung in allen Fällen 400.

Bild 2: Bei primitiven Insekten erstrecken sich die beiden primären Pigmentzellen zwischen Cornea und Kristallkegel, so daß der Eindruck zweier von den Pigmentzellen unabhängiger Zellen entstehen kann. Es ist zweifelhaft, ob diese beiden Zellen die Cornea bilden oder nicht. Nach unseren Untersuchungen sind Corneabildungszellen und primäre Pigmentzellen im Einzelaue der Insekten identisch.

Bild 3: Jedes Einzelaue besitzt einen aus vier Zellen gebauten, etwa 40 μm langen Kristallkegel („euconer Typ“).

für Insekten sehr viele verschiedene Fixierungslösungen beschrieben und empfohlen, aber keine davon befriedigt ganz. Feine Einschnitte in die Cuticula sollen ein rascheres Eindringen des Fixiermittels ermöglichen, doch führt auch diese Methode nicht immer zum Erfolg.

Ich habe daher versucht, die Oberflächenspannung des Fixiergemisches durch Zusatz einiger Tropfen eines handelsüblichen Netzmittels herabzusetzen. Als Objekt für diese Versuche diente vor allem das Dorsalauge des Männchens der Eintagsfliege *Atalophlebia costalis*. Der Zusatz des Detergenz bewirkte, daß die Augen von Anfang an untertauchen und so von allen Seiten der Fixierung ausgesetzt sind. Ohne Netzmittelzusatz treiben sie an der Flüssigkeitsoberfläche.

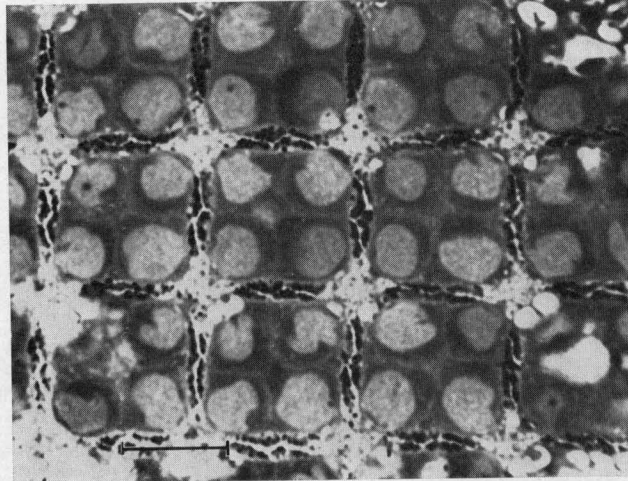
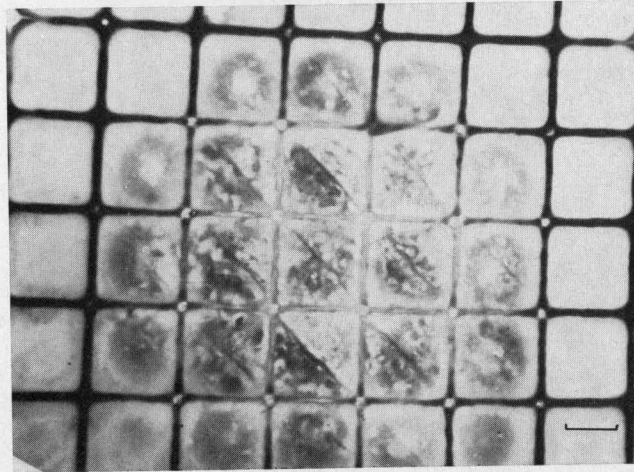
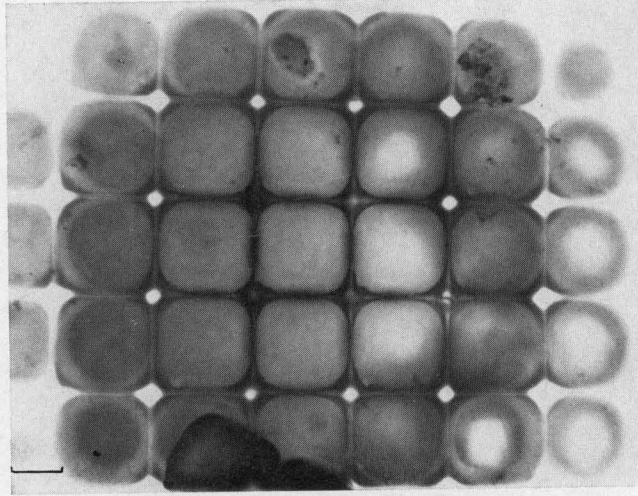
Es ergaben sich nicht mehr Artefakte als bei anderen Verfahren. Im Gegenteil: Für einige Insektenaugen scheint diese Methode die einzigen brauchbaren Ergebnisse zu liefern, und zwar sowohl für licht- als auch für elektronenmikroskopische Untersuchungen. Elektronenmikroskopien lassen an den so fixierten Objekten sogar Einheitsmembran und mitochondriale Strukturen deutlich erkennen.

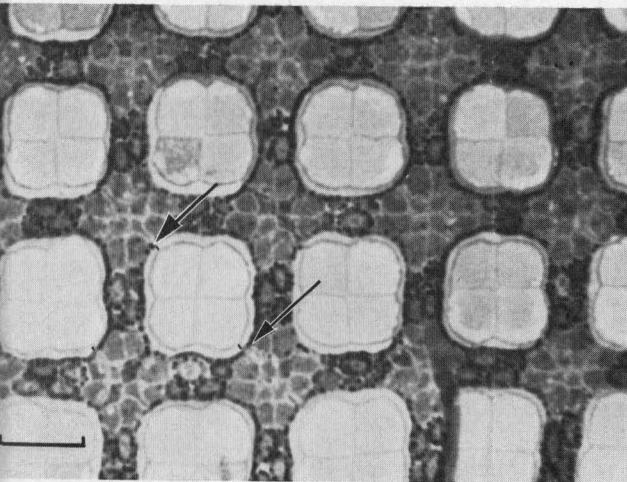
In Kombination mit der Schnellfixiermethode von HAYAT und GIAQUINTA (1970) kann die hier beschriebene neue Methode einen erheblichen Zeitgewinn bedeuten.

Technik

Den nichtnarkotisierten Eintagsfliegenmännchen wurde mit einer Rasierklinge unter 10facher Binokularvergrößerung der Kopf abgetrennt.

Der Kopf wurde eine halbe Stunde lang bei Zimmertemperatur in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung vorfixiert; die Lösung wurde aus einer 8%igen, im Kühlschrank verwahrten Lösung durch Verdünnung mit MILLONIGS Puffergemisch¹ hergestellt. Zu 2 ml des Vorfixiermittels wurden dann drei Tropfen (ca. 0,1 ml) eines Netzmittelkonzentrates zugesetzt. Verwendet





wurde das in jedem Fotogeschäft erhältliche Kodak-Photo-Flo, das in der Fototechnik Wasserflecken auf Filmstreifen verhindern soll.

Die Fixierungsflüssigkeit wurde in MILLONIGS Puffergemisch ausgewaschen und anschließend wurde das Objekt eine halbe Stunde lang in 1%iger Osmiumtetroxid-Lösung nachfixiert. Auch hier wurde das Netzmittel zugesetzt (1 Tropfen zu 1,5 ml Fixiermittel).

Anschließend an die Nachfixierung wurden die Augen in destilliertem Wasser gewaschen und in aufsteigender Acetonreihe entwässert (jeweils 10 Minuten in 30%iger,

- ▶ Bild 5
- ▼ Bild 6

Bild 5 und 6: Der Kristallkegel verjüngt sich zum Augennieren (Pfeil) und wird an seinem Ende von den Kernen der Retinulazellen umlagert.

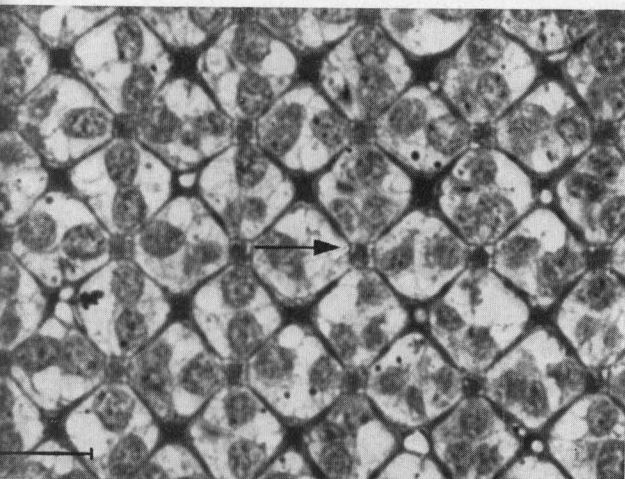
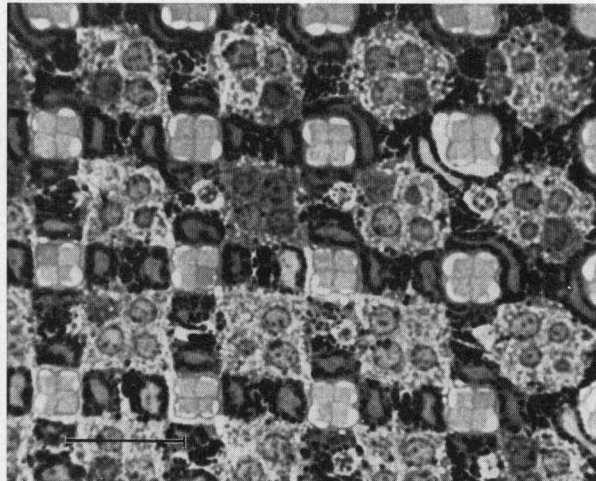


Bild 4: Der Kristallkegel wird von den beiden primären Pigmentzellen eingehüllt (Pfeile!) und von acht weiteren sekundären Pigmentzellen umgeben.

50%iger, 70%iger, 90%iger und 100%iger Acetonlösung).

Eingebettet wurden die Augen in Epon 812 (in Europa durch die Shell-Chemical Corporation unter dem Namen „Epikote“ vertrieben). Das Präparat kam zunächst für 12 Stunden in ein homogenes Gemisch aus reinem Aceton und Epon im Verhältnis 1 : 1. Schließlich wurde das Präparat in Epon 812 eingebettet, in einem Wärmeschrank bei 65° C 24 Stunden lang gehärtet und dann auf einem Kunststoffblock mit Sieglack befestigt.

Geschnitten wurde das Objekt für lichtmikroskopische Untersuchungen mit einem Glasmesser 1 bis 2 µm dick. Die Schnitte wurden in 20%igem Aceton aufgefangen und auf einen Objektträger gebracht. Zur



Verdunstung der Lösung kam der Objektträger auf eine etwa 100° C warme Heizplatte.

Die Schnitte wurden mit einem Tropfen Farblösung bedeckt und auf der Heizplatte bei etwa 100° C gefärbt.

Zusammensetzung der Farblösung: 1%ige wäßrige Lösung von Toluidin mit Zusatz von einer Spur Borax pro 100 ml. Nach 15 Sekunden wurde die Farbe mittels eines kräftigen Strahls destillierten Wassers ausgewaschen.

Einschluß der wieder getrockneten Schnitte in „DePex“ der Firma G. T. Gurr, London. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden 0,1 µm dicke Schnitte verwendet, die mit Uranylacetat und Bleicitrat 10 bzw. 3 Minuten lang gefärbt und kontrastiert wurden.

Zum Objekt: Manche Insekten besitzen ungleichmäßige Augen. Zum Beispiel sind die

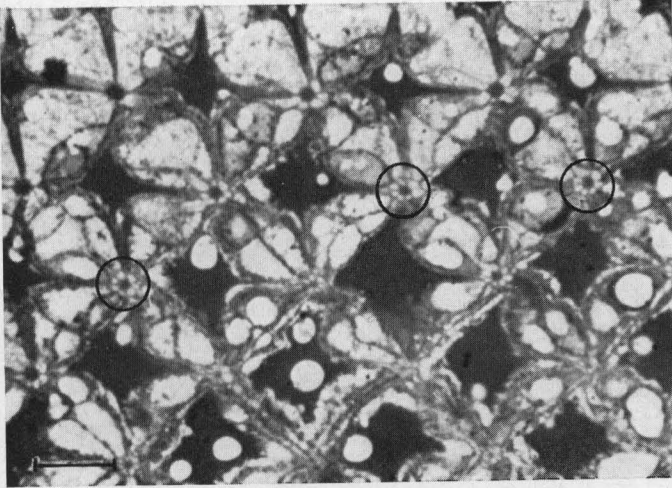


Bild 7: Noch tiefer verschwindet der Kristallkegel; es tauchen Retinulazellen auf, die in eine gallertige Flüssigkeit gebettet sind. Es sind sieben fadenbildende Elemente zu erkennen (Kreise!).

dorsalen Facetten des Libellenauges doppelt so groß wie die mehr bauchwärts gelegenen, und das Komplexauge des Taumelkäfers *Gyrinus* ist vollständig in eine obere und untere Hälfte geteilt. Männliche Eintagsfliegen besitzen 4 vollständig voneinander getrennte Augen: Zwei kleinere seitliche Augen („Lateralaugen“) und zwei große rückenseitig gelegene Augen („Dorsalaugen“).

Erläuterungen:

- ¹ Zusammensetzung von MILLONIGS Puffergemisch:
 Stammlösung I: Natriumdihydrogenphosphat (NAH₂PO₄) 2,26%
 Stammlösung II: Natronlauge (NaOH) 2,52%
 Puffergemisch: 83 ml Lösung I
 17 ml Lösung II
 Das Gemisch hat einen pH von genau 7,3 und denselben Gefrierpunkt wie Säuger-Blutplasma (-0,56° C), (in PEASE, 1964).

Verfasser: Viktor Benno Meyer-Rochow, Australian National University Canberra, A. C. T., 2601, Res. Sch. Biol. Sciences, Dep. Neurobiology. P. O. Box 475. Australia.

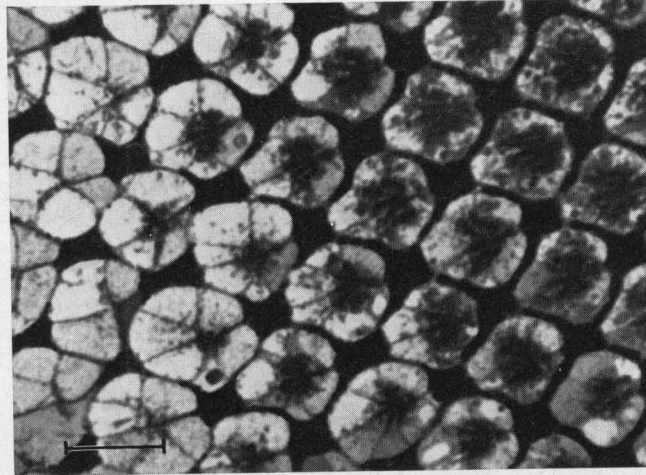


Bild 8: Erst etwa 190 µm unter der Augenoberfläche erscheint das Rhabdom. Die sieben das Rhabdom bildenden Retinulazellen werden von Tracheen und dichtem Pigment umgeben.

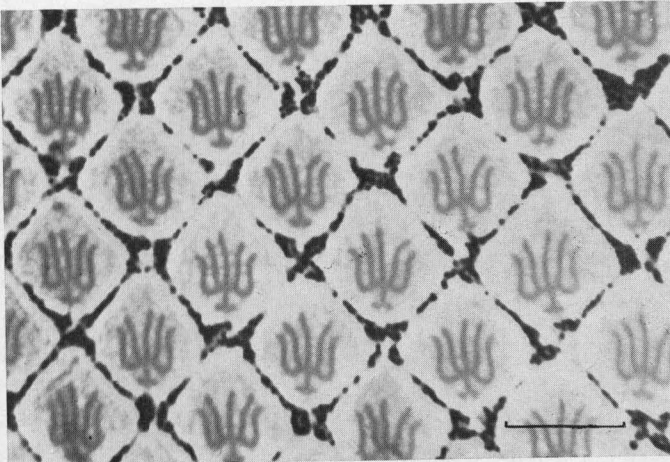


Bild 9: Die Form des Rhabdoms ähnelt einem fünfarmigen Kandelaber.

Literaturhinweise:

1. BURTON, P. R. u. K. A. STOCKHAMMER: Electron Microscopic Studies of the Compound Eye of the Toadbug, *Gelastocoris oculatus*; *J. Morph.*, 127, 2 (1969).
2. EXNER, S.: Die Physiologie der facettierten Augen von Krebsen und Insekten; Franz Deuticke Verlag — Leipzig u. Wien (1891).
3. GRENACHER, H.: Untersuchungen über die Sehorgane der Arthropoden; Vanderhoek und Ruprecht — Göttingen (1879).
4. HAYAT, M. A. u. R. GIAQUINTA: Rapid Fixation and Embedding for Electron Microscopy; *Tissue & Cell*, 2, 2 (1970).
5. HESSE, R.: Untersuchungen über die Organe der Lichtempfindung bei niederen Tieren; VII. von den Arthropodenaugen; *Z. wiss. Zool.*, 70, 347—473 (1901).
6. HORRIDGE, G. A.: The Eye of *Dytiscus* (Coleoptera); *Tissue & Cell*; 1, 3 (1969).
7. MORGENSTERN, E.: Vergleichende lichtoptische Untersuchungen im Rahmen elektronenmikroskopischer Arbeiten an ultradünnen Schnitten; *Mikroskopie*, 25, 250—260 (1969).
8. PEASE, D. C.: *Histological Techniques for Electron Microscopy*; Academic Press, London u. New York (1964).
9. SLIFER, E. H. u. S. S. SEKHON: Sense Organs of a Thysanuran, *Ctenolepisma lineata*, with Special Reference to Those on the Antennal Flagellum (Thysanura, Lepismatidae); *J. Morph.*, 132, 1 (1970).
10. ZIMMER, C.: Die Facettenaugen der Ephemeren; *Z. wiss. Zool.*, 63, 236—262 (1897).