

# Einsatz des Rasterelektronenmikroskops bei taxonomischen Studien an Eintagsfliegen (Ephemeroptera)

von IVAN TOMKA und WERNER HASLER,  
CH-1722 Bourgnillon

## Einführung

Die Taxonomie der europäischen Ephemeroptera ist noch weit von einem Abschluß entfernt. Vergleicht man die Listen der Ephemeroptera in den zwei aufeinander folgenden Auflagen der Limnofauna Europaea (1967 resp. 1977), so findet man in der früheren Auflage 199, in der letzten Auflage 217 Arten. Seit 1967 sind etwa 70 neue Taxa dazugekommen und etwa 50 weggefallen. Die zwei umfangreichsten Familien, die Heptageniidae und die Baetidae, enthalten laut letzter Auflage der Limnofauna Europaea 75 resp. 57 Arten. Über die Baetidae liegt eine moderne Untersuchung vor. Zwar sind nicht alle Probleme der Taxonomie der Baetidae geklärt, weitaus unbefriedigender ist aber die Situation der Taxonomie der Heptageniidae. Die drei umfangreichsten Gattungen der Heptageniidae stellen *Rhithrogena* (28 Arten), *Ecdyonurus* (32 Arten) und *Heptagenia* (9 Arten) dar. Eines der am meisten verwendeten Merkmale bei diesen Gattungen ist die Penisform. Vergleicht man die Darstellung über Kopulationsorgane der Heptageniidae bei verschiedenen Autoren wie THOMAS (1968, 1970), SOWA (1969, 1970, 1971), GRANDI (1953, 1960), SINITSCHENKOWA (1973), THOMAS und SOWA (1970), BOGOESCU (1958), BOGOESCU und TABACARU (1962), LANDA (1969), UHIELYI (1959) und PUTHZ (1972), so findet man oft zwischen Darstellungen identischer Taxa bei verschiedenen Autoren größere Unterschiede als zwischen Darstellungen verschiedener Taxa. Der Grund für die genannte Situation liegt bei den Schwierigkeiten, denen man gegenüber steht, wenn man mit dem Lichtmikroskop Gegenstände beobachtet oder photographiert, deren Abmessungen in allen drei Dimensionen etwa gleich groß sind. Diese Situation trifft für die Kopulationsorgane der Heptageniidae zu. Wir begegnen zwei Arten von Problemen:

- Die Schärfentiefe der optischen Einrichtungen für die benötigten Vergrößerungsmaßstäbe (50-100fach) ist nicht ausreichend.
- Die Objekte müssen mit Flüssigkeit bedeckt sein, sonst trocknen sie aus was unerwünschte Ausfälle durch Schrumpfung zur Folge hat. Es ist ferner unumständlich, die Objekte zu befestigen und Drehungen mit ihnen durchzuführen.

Diese Schwierigkeiten treten nicht auf, wenn die Objekte frei von Schrumpfung getrocknet, mit einer elektrisch leitenden Schicht bedampft und im Rasterelektronenmikroskop betrachtet werden. Rasterelektronenmikroskope sind außerdem mit Probenhaltungen ausgestattet, welche fast alle beliebigen Drehungen der Proben zulassen, wodurch verschiedene Ansichten beobachtet werden können. Außerdem ist die photographische Aufzeichnung des Beobachteten gut gelöst. Die zeitraubende Arbeit der Anfertigung von Zeichnungen wird hier drastisch reduziert: Es ist möglich, von vier bis acht Objekten je vier Hauptansichten pro Stunde aufzunehmen.

Wir haben vor, die europäischen Heptageniidae mit der beschriebenen Methode zu untersuchen und begrüßen es, wenn uns Material zur Verfügung gestellt wird.

## Methodisches

Objekte, welche in den Proberaum des Rasterelektronenmikroskops gelangen, müssen vorher von flüchtigen Substanzen befreit und außerdem mit einer genügend dünnen, leitenden Schicht versehen werden.

Unsere Objekte, ob frisch oder konserviert, enthalten Wasser, Alkohol oder sonstige Flüssigkeiten (flüchtige Substanzen), welche im Vakuum des Proberaumes verdampfen und Artefakte durch Schrumpfung verursachen. Hierzu kommt noch, daß das Vakuum-system des Rasterelektronenmikroskops durch die abgegebenen Dämpfe unnötig verschmutzt wird. Die Kopulationsorgane der Heptageniidae enthalten neben chitinisierten Elementen (Skleroten) weiche, proteinhaltige Gewebe. Die weichen Gewebe müssen fixiert werden, bevor eine Trocknung vorgenommen wird.

### 1. Fixierung

Die Fixierung wurde nach den üblichen Methoden mit Glutaraldehyd und anschließend mit Osmiumtetroxyddampf vorgenommen. Dieser Teil der Präparation ist nicht kritisch, und es wird auf die allgemein zugängliche einschlägige Literatur hingewiesen.

### 2. Trocknung

Die Methode, welche bei den Kopulationsorganen die geringsten Artefakte verursacht, war die kritische Trocknung mit CO<sub>2</sub>. Die Balzers Hochvakuum AG in Liechtenstein bringt Geräte in den Handel, mit welchen Trocknungen von kleinen Objekten durchgeführt werden können. Die kritische Trocknung funktioniert nach folgendem Prinzip: Die flüchtigen

Anlie der Proben werden durch eine hydrophil-hydrophobe Reihe von Flüssigkeiten ausgetauscht, deren kritische Temperatur und deren kritischer Druck nicht sehr hoch sind, so daß die Probe in der Umgebung des kritischen Punktes nicht durch extreme Temperaturen beschädigt wird. Die Handhabung darf wegen des hohen Druckes nicht zu umständlich sein. Am Anfang des Trocknungsprozesses liegt die Probe in einem geschlossenen Gefäß und ist mit einer Flüssigkeit bedeckt. Zur Bedeckung wählt man üblicherweise CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> hat folgende kritische Daten:

– Die kritische Temperatur liegt bei etwa 28° C, ist also für diese Präparate gut verwendbar.

– Der kritische Druck beträgt nur etwa 80 atü, was bei der Ausführung der Geräte keine besondere Schwierigkeiten verursacht.

Zu Anfang des Trocknungsprozesses hat man normale Umgebungstemperatur. Ein gewisser Überdruck im Gefäß (~80 atü) ist notwendig, um CO<sub>2</sub> bei der vorliegenden Temperatur im flüssigen Aggregatzustand zu halten. Erhöht man nun vorsichtig die Temperatur des CO<sub>2</sub> und der Probe, so wird etwa bei 28° C der kritische Punkt des CO<sub>2</sub> erreicht. Beim kritischen Punkt verschwindet die Phasengrenze zwischen den zwei Aggregatzuständen des CO<sub>2</sub>, und der Druck im Gefäß steigt auf etwa 80 atü an. Da wir jetzt keine flüssig-gasförmige Phasengrenze mehr im CO<sub>2</sub> vorfinden, kann mit der eigentlichen Entgasung des Systems begonnen werden. Die Schrämpfungseffekte eines in der Entgasung befindlichen Objektes treten nämlich wegen Grenzflächenspannungen an der flüssig-gasförmigen Phasengrenze auf. Nach Erreichen des Umgebungsdrucks am Ende des Entgasungsprozesses öffnet man das Gefäß und findet die trockene Probe vor. Wir konnten 8 verschiedene Proben gleichzeitig trocknen. Als hydrophil-hydrophobe Reihe dienen: Wasser, Alkohol, Azeton und CO<sub>2</sub>.

### 3. Die Befestigung der trockenen Probe

Die trockenen Proben sind brüchiger als Quarz. Sie müssen an den Probetellern des Rasterelektronenmikroskops befestigt werden. Wir haben ein Gemisch aus den üblichen Klebstoffen, welche für die Präparation im Rasterelektronenmikroskop vorgeschlagen wurden, so hergestellt, daß die Konsistenz des Klebstoffes nicht zu flüssig und nicht zu fest war. Eine Vorsicht zu geben, ist nicht möglich; es sollen Versuche vorgenommen werden. Wir legten einen etwa 1 mm großen Tupfen vom härtenden Klebstoff auf den gereinigten Probeteller und applizierten die Probe mit Federn oder Haaren, deren Fasern genügend fein waren, in richtiger Position auf den Klebstoffleck. Nach erfolgter Härtung des Klebstoffs ist die Probe bereit für die Bedampfung.

### 4. Die Bedampfung

Die Kopulationsorgane der Ephemeroptera weisen häufig Stellen mit kleinen Krümmungsradien, i.e. enge Nuten, Ein- und Ausbuchtungen, auf. Diese Stellen müssen restlos mit einer zusammenhängenden Schicht aus elektrisch leitendem Material (Graphit, Platin, Iridium) bedampft werden. Ist diese Forderung nicht erfüllt, beschädigen die an der Probe ankommenden Elektronen die Probe so stark, daß eine Abbildung frei von Artefakten unmöglich wird. Wir dampften Kohle und Platin unter 45° auf, wobei die Probe gedreht wurde. Es ist auch wichtig, daß die Probe während der Bedampfung durch Hitzeinwirkung und Ionenartzung nicht beschädigt wird. Sind die Proben lückenlos bedampft, so können sie 3–4 mal im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden.

### 5. Das Rasterelektronenmikroskop

Alle handelsüblichen Geräte sind geeignet, welche eine Vergrößerung von 50–1000-fach zulassen. Wir benutzten das Gerät Stereoscan der Fa.C.I. Die Aufnahmen wurden auf Ilford Pan-F-Film aufgenommen, die Vergrößerungen wurden auf Ilfospeed gemacht.

### Resultate

Für die Illustration der Methode wurden die Penisloben von *Rhithrogena semicolorata* (Fig. 1–4) und *Ecdyonurus forcipula* (Fig. 5–8) benutzt. *Rhithrogena semicolorata* ist in den alpinen und voralpinen, kalten und schnellfließenden Gewässern des europäischen Raumes weit verbreitet. *Ecdyonurus forcipula* kommt in der genannten Region, als häufigste *Ecdyonurus*-Art, sogar bis auf 1600 m ü.M. von. *E. forcipula* wurde in vielen Studien im alpinen Raum mit *E. venosus* verwechselt, welcher bei uns nicht festgestellt werden konnte. *E. forcipula* kommt oft mit *E. heberticus* (Fig. 9) vor. Die *E. forcipula*-Exemplare, welche über 1000 m ü.M. festgestellt werden, sind oft sehr dunkel gefärbt, wodurch sie *E. heberticus*-ähnlich aussehen. Eine Verwechslung ist jedoch nicht möglich, wenn die Penisloben betrachtet werden.

Artefakte treten während der beschriebenen Präparation besonders dann auf, wenn das Wasser nicht vollständig gegen Azeton ausgetauscht wird. Am meisten sind die Penisloben der Submagines anfällig, und zwar wegen der relativ dicken Membran, welche diese Formen bedeckt. Wir zeigen die Penisloben der Submagines von *Rhithrogena aurantiaca* (Fig. 10) und *Rhithrogena germanica* (provisorisch) (Fig. 11). *Rhithrogena germanica* (provisorisch) wurde besonders häufig abweichend dargestellt (PUTHZ, 1972; LANDA, 1969; EATON, 1885; JACOBSON und BLANCHI, 1905; SOWA, 1971 a). Die Form, welche hier gefunden wurde, konnte mit keiner der zitierten Darstellungen identifiziert werden. Die von uns untersuchten Tiere leben in den voralpinen Flüssen der Schweiz: Aare, Emme, Saane. Die Fundstellen weisen nach den Untersuchungen von PERRET (1977) Makroindex 1–3 auf. Die Eier zeigen kein retardiertes Wachstum, und die Larven schlüpfen in einem engen Zeitraum, bei üblicher Witterung etwa 20.3–10.4. Die Larven schlüpfen an ganz bestimmten Stellen der genannten Flüsse, und obwohl sie zahlreich vorkommen, müssen die bevorzugten Stellen gefunden werden, wenn man sie feststellen will. Diese Stellen weisen ein relativ feines Substrat (Kies 1–10 cm Durchmesser) auf, sind mäßig durchströmt, mit einer 0,1–1 m tiefen Wasserschicht bedeckt und liegen bei 400–600 m ü.M. Die bevorzugten Stellen von *Rhithrogena germanica* (provisorisch) sehen somit den Stellen ähnlich, welche Forellen dieser Region als Laichstellen vorziehen. Als die Verschmutzung der Aare zwischen Thun und Bern ihren Höhepunkt erreichte (Mitte der 60er Jahre), verschwand die Art fast vollkommen. Nach Inbetriebnahme der örtlichen Kläranlagen hat sich die Art vermehrt, und die ab-



Fig. 1: Penisloben, dorsal, von *Rithrogena semicolorata*, 75fach vergrößert.



Fig. 2: Penislobus, ventral, von *Rithrogena semicolorata*, 225fach vergrößert.

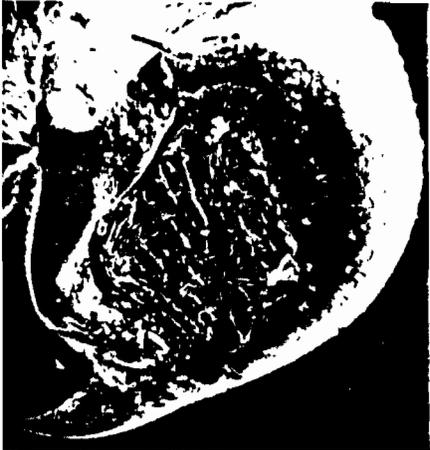


Fig. 3: Penislobus, apical, von *Rithrogena semicolorata*, 360fach vergrößert.



Fig. 4: Penislobus, lateral, von *Rithrogena semicolorata*, 150fach vergrößert.



Fig. 5: Penisloben, dorsal, von *Ecdyonurus forcipula*, 55fach vergrößert.



Fig. 6: Penislobus, ventral, von *Ecdyonurus forcipula*, 130fach vergrößert.



Fig. 7: Penisloben, apical, von *Ecdyonurus forcipula*, 70fach vergrößert.



Fig. 8: Penisloben, dorsal, Ausschnitt von d. inneren Scleriten, von *Ecdyonurus forcipula*, 340fach vergrößert.



Fig. 9: Penislobus, dorsal, von *Ecdyonurus hebricus*, 100fach vergrößert.



Fig. 10: Penislobus, ventral, von *Rithrogena dentiflora*, 350fach vergrößert.



Fig. 11: Penisloben, ventral, von *Rithrogena dentiflora*, 200fach vergrößert.

gestorbenen Imagines stellen für die Forellen, die überwintern, wieder eine wichtige Nahrungsquelle dar. Die schlüpfenden Subimagines werden erstaunlicherweise von den Forellen gemieden.

Wir bedanken uns bei den Herren Professor Dr. F. Allemann und F. Zweili, Institut für Rasterelektronenmikroskopie der Universität Bern, sowie bei den Herren Professor Dr. P. Sprunton und Dr. E. Stolic, Institut für Anatomie der Universität Fribourg, für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

#### Zusammenfassung

Für die Klärung der Taxonomie der europäischen Heptageniidae (Insecta, Ephemeroptera) wird ein neues Hilfsmittel vorgestellt: Die Rasterelektronenmikroskopie. Durch kritische Trocknung wurden Präparate angefertigt, welche sich für die Untersuchung mit dem Rasterlektronenmikroskop eignen. Zur Illustration der Methode werden die Penisloben von *Rhithrogena semicolorata*, *R. aurantiaca*, *R. germanica* (provisorisch), *Ecdyonurus forcipula* und *E. helveticus* dargestellt.

#### Summary

We present a new aid for the investigation of the taxonomic situation of the European Heptageniidae (Insecta, Ephemeroptera): The scanning electron microscopy. The penis lobes of the following insects were dried in critical CO<sub>2</sub> and observed with the scanning electron microscope: *Rhithrogena semicolorata*, *R. aurantiaca*, *R. germanica* (prov.), *Ecdyonurus forcipula*, and *E. helveticus*.

#### Résumé

Nous présentons une nouvelle méthode auxiliaire pour la recherche taxonomique des Heptageniidae (Insecta, Ephemeroptera) d'Europe: La microscopie à balayage. Par la méthode du séchage critique les lobes de penis des espèces suivantes ont été préparés et ensuite observés et photographiés à l'aide du microscope à balayage: *Rhithrogena semicolorata*, *R. aurantiaca*, *R. germanica* (prov.), *Ecdyonurus forcipula* et *E. helveticus*.

#### Literaturverzeichnis

- BOGOESCU, C.: Fauna Republicii Populare Romine. Insecta, Ephemeroptera. Bucarest 1958.
- , und TABACARU, I.: Beiträge zur Kenntnis der Untersuchungsmerkmale zwischen den Gattungen *Ecdyonurus* und *Heptagenia*. Beitr. Entomol. 12, 273–291 (1962).
- EATON, A.E.: A revisional monograph of recent Ephemeridae or mayflies. Trans. Linn. Soc. London, Zool. 3, 229–281 (1885).
- GRANDI, M.: Contributi allo studio degli Ephemeroidi Italiani, XVII Ecdyonuridae. Boll. Ist. Entomol. Univ. Bologna 19, 307–386 (1953).
- : Fauna Italia, Ephemeroidi. Bologna 1960.
- JACOBSON, G.C., und BIANCHI, V.L.: Orthopteren und Pseudorthopteren des Russischen Reiches und angrenzender Länder. St. Petersburg 1905.

LANDA, V.: Fauna ČSSR 18. Jepice – Ephemeroptera. Prag 1969.

PERRET, P.: Zustand der schweizerischen Fließgewässer in den Jahren 1974/1975. Bern 1977.

PUTHZ, V.: Eine neue *Rhithrogena* aus Südosteuropa. Entomol. Mitt. Zool. Mus. Hamburg 4, 303–307 (1972).

SINITSCHENKOWA, N.D.: To the question about the knowledge of the genus *Rhithrogena* Westnik Moskovskowo Universiteta 3, 16–22 (1973).

SOWA, R.: *Rhithrogena degrangei* sp. n. des Alpes françaises. Bull. Acad. pol. Sci. 17, 563–567 (1969).

—: Sur la taxonomie de *Rhithrogena semicolorata* (CURTIS) et de quelques espèces voisines d'Europe continentale. Rev. Suisse Zool. 77, 895–920 (1970).

—: Note sur quelques *Rhithrogena* de la collection Esben-Petersen et la redescription de *Rhithrogena germanica* EATON. Bull. Acad. pol. Sci. 19, 485–492 (1971 a).

—: Note sur les deux espèces de la famille Heptageniidae des Carpathes polonaises. Acta Hydrobiol. (Krakow) 13, 29–41 (1971 b).

THOMAS, A.: Sur la taxonomie de quelques espèces d'*Ecdyonurus* du sud-ouest de la France. Ann. Limnol. 4, 51–71 (1968 a).

—: Quelques *Ecdyonurus* et *Rhithrogena* européens de la collection Navás. Ann. Limnol. 4, 209–218, (1968 b).

—: Sur la taxonomie de deux *Rhithrogena* des Pyrénées. Ann. Limnol. 6, 305–315 (1970).

—, et SOWA, R.: *Ecdyonurus macani* n. sp., espèce européenne voisine d'*Ecdyonurus torrentis* KIMMINS. Ann. Limnol. 6, 75–85 (1970).

UJHELYI, S.: Kérészek Ephemeroptera. Fauna Hungariae 49, 1–99 (1959).