

**Veränderungen des Integuments
von *Gryllus bimaculatus* (Saltatoria)
während des 1. Larvenstadiums ***

Changes in the Integument During the First Larval
Instar of *Gryllus bimaculatus* (Saltatoria)

FRANZ ROMER

Institut für Allgemeine Zoologie der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

(Z. Naturforsch. 26 b, 1386—1388 [1971]; eingegangen am 6. Juli 1971)

Die Cuticula der Insekten besteht nach lichtmikroskopischen Untersuchungen aus 3 Schichten: 1. einer Epicuticula, die sich wiederum aus einer Zementschicht, einer Lipidschicht, einer Polyphenolschicht und einer Cuticulinschicht zusammensetzt, 2. einer mit Phenolen gegerbten Exocuticula und 3. einer nicht gegerbten Endocuticula. Exo- und Endocuticula werden aus parallel liegenden Lamellen aufgebaut. Elektronenmikroskopisch ließen sich bislang in der Epicuticula mit Sicherheit folgende Schichten nachweisen: Eine „dense layer“¹, eine Cuticulinschicht², darüber von verschiedenen Autoren unterschiedlich interpretiert eine Lipidschicht³⁻⁴, an deren Basis noch eine orientierte Lipidschicht ausgebildet sein kann, und eine Zementschicht^{3, 4}. Da einmal Unstimmigkeiten über die Zahl der vorhandenen Schichten in der Cuticula bestehen, zum ändern die Ausbildung bestimmter Schichten der Epicuticula in Zusammenhang mit der Aktivität der Oenocyten gebracht wird⁵⁻⁸, erschien es lohnenswert, die Veränderung von Cuticula und Epidermis während eines Larvenstadiums genauer zu untersuchen.

Material und Methode

Zur Untersuchung wurde das 1. Larvenstadium von *Gryllus bimaculatus* herangezogen. Bei einer Zuchttemperatur von 30–32 °C dauerte es etwa 72 Stunden. Tiere verschiedenen Alters wurden in 2-proz. OsO₄, die mit Michaelis-Puffer auf pH 7,2 eingestellt war, bei 0–4 °C fixiert. Nach Entwässerung in der steigenden Alkoholreihe wurden die Objekte in Araldit eingebettet. Silberne bis hellgoldene Schnitte wurden in Bleicitrat nach REYNOLDS⁹ kontrastiert und mit dem Siemens Elmiskop Ia aufgenommen.

Ergebnisse und Diskussion

RINTERKNECHT und LEVI¹⁰ untersuchten die Cuticula während eines Häutungszyklus bei *Locusta migratoria*. *Locusta* kommt von den Arten, die bislang untersucht

wurden, *Gryllus bimaculatus*, was die Verwandtschaft betrifft, am nächsten. Die Autorinnen beschreiben bei *Locusta* eine zweischichtige Epicuticula, die sich aus Cuticulinschicht und „dense layer“ zusammensetzt sowie eine in Exo- und Endocuticula aufzutrennende lamellierte Schicht.

Bei *Gryllus bim.* sind in der Epicuticula 4 verschiedene Schichten zu unterscheiden (Abb. 2 c, d, e): Die dense layer mit einer Dicke von ca. 1000 Å. Sie ist nur kurze Zeit nach ihrer Anlage von der darunterliegenden lamellierten Cuticula zu unterscheiden (Abb. 1 a *). Die Cuticulinschicht ist in der von LOCKE^{2, 3}, RINTERKNECHT und LEVI¹⁰, GNATZY¹¹ u. a. angegebenen Weise ausgebildet. Eine Lipidschicht unterschiedlicher Dicke (Abb. 2 c, d), die partiell sogar Tropfenform annehmen kann. Bei der angewandten Konservierung gibt sie immer einen guten Elektronenkontrast. In der Regel bildet sie eine Auflage zwischen 250 und 1000 Å. Über der Lipidschicht liegt noch ein feinmaschiges Netz von Fibrillen, das man als Zementschicht deuten könnte (Abb. 2 e). LOCKE³ beschreibt diese Schicht in einer Untersuchung von Cuticulen verschiedener Insektenarten ebenfalls. Die Ausbildung einer Zementschicht wird an das Vorhandensein von Zementdrüsen gebunden. Da beim vorliegenden Untersuchungsobjekt entsprechende Drüsen nicht nachgewiesen werden konnten, dürfte sie bei *Gryllus* nicht ausgebildet sein, falls sie nicht von den Epidermiszellen direkt gebildet wird. Es wäre aber auch daran zu denken, daß die 4. Schicht ihre Entstehung einem Fixierungsartefakt zu verdanken hat. Fixiert man nämlich frei in der Zelle liegende Lipidtropfen mit Osmiumtetroxid, so entsteht an deren freiem Rande eine membranartige Struktur, die nach der Ansicht von FAWCETT¹² aus stärker oxidierten Fettmolekülen besteht. Andererseits deuten Experimente von WIGGLESWORTH^{5, 6}, die allerdings nicht an *Gryllus* durchgeführt wurden, auf die Existenz einer Zementschicht hin.

LOCKE³ weist darauf hin, daß am Aufbau der Cuticula neben der gewöhnlichen Lipidschicht noch eine orientierte, die er auch darstellen konnte, beteiligt ist. Beim hier vorliegenden Objekt ist an manchen Stellen an der Basis der normalen Lipidschicht nochmals eine feine Linie zu beobachten (Abb. 2 d). Ihre Dicke beträgt höchstens 50 Å und könnte demnach aus einer oder 2 Reihen von Lipidmolekülen bestehen. LOCKE selbst vermochte die normale Lipidschicht in keinem Falle darzustellen. Er begründete ihr Fehlen mit der Anwendung von Fettlösungsmitteln bei der Einbettung. FILSHIE¹³ konnte bei *Calpodes* durch Anwendung von

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Sonderdruckanforderungen an Dr. F. ROMER, Institut für Allgemeine Zoologie der Johannes Gutenberg-Universität, D-6500 Mainz, Saarstraße 21.

¹ M. LOCKE, J. Morphology 127, 7 [1969].

² M. LOCKE, J. Morphology 118, 461 [1966].

³ M. LOCKE, J. biophysic. biochem. Cytol. 10, 589 [1961].

⁴ A. GLUUD, Zool. Jb. Anat. 85, 191 [1968].

⁵ V. B. WIGGLESWORTH, Quart. J. micr. Sci. 76, 269 [1933].

⁶ V. B. WIGGLESWORTH, Quart. J. micr. Sci. 89, 197 [1948].

⁷ L. S. WOLFE, Quart. J. micr. Sci. 95, 49 [1954].

⁸ M. J. DELACHAMBRE, C. R. hebd. Seances Acad. Sci. 263, 764 [1966].

⁹ E. S. REYNOLDS, J. Cell Biol. 17, 208 [1963].

¹⁰ E. RINTERKNECHT u. P. LEVI, Z. Zellforsch. 72, 390 [1966].

* Abb. 1 u. 2 s. Tafel S. 1386 a u. b.

¹¹ W. GNATZY, Z. Zellforsch. 110, 401 [1970].

¹² D. W. FAWCETT, Die Zelle, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1969.

¹³ B. K. FILSHIE, Tissue and Cell 2, 181 [1970].

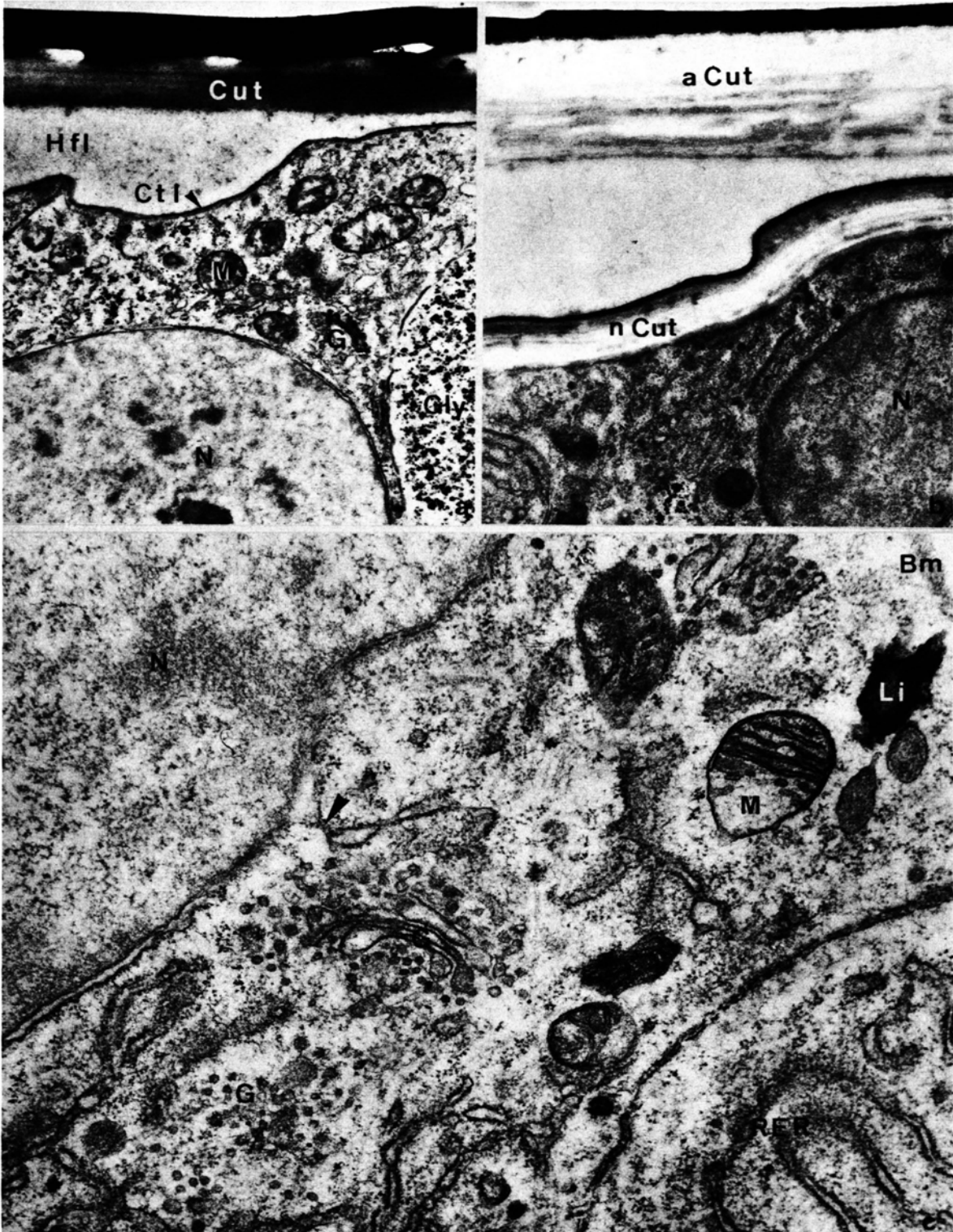


Abb. 1 a-c

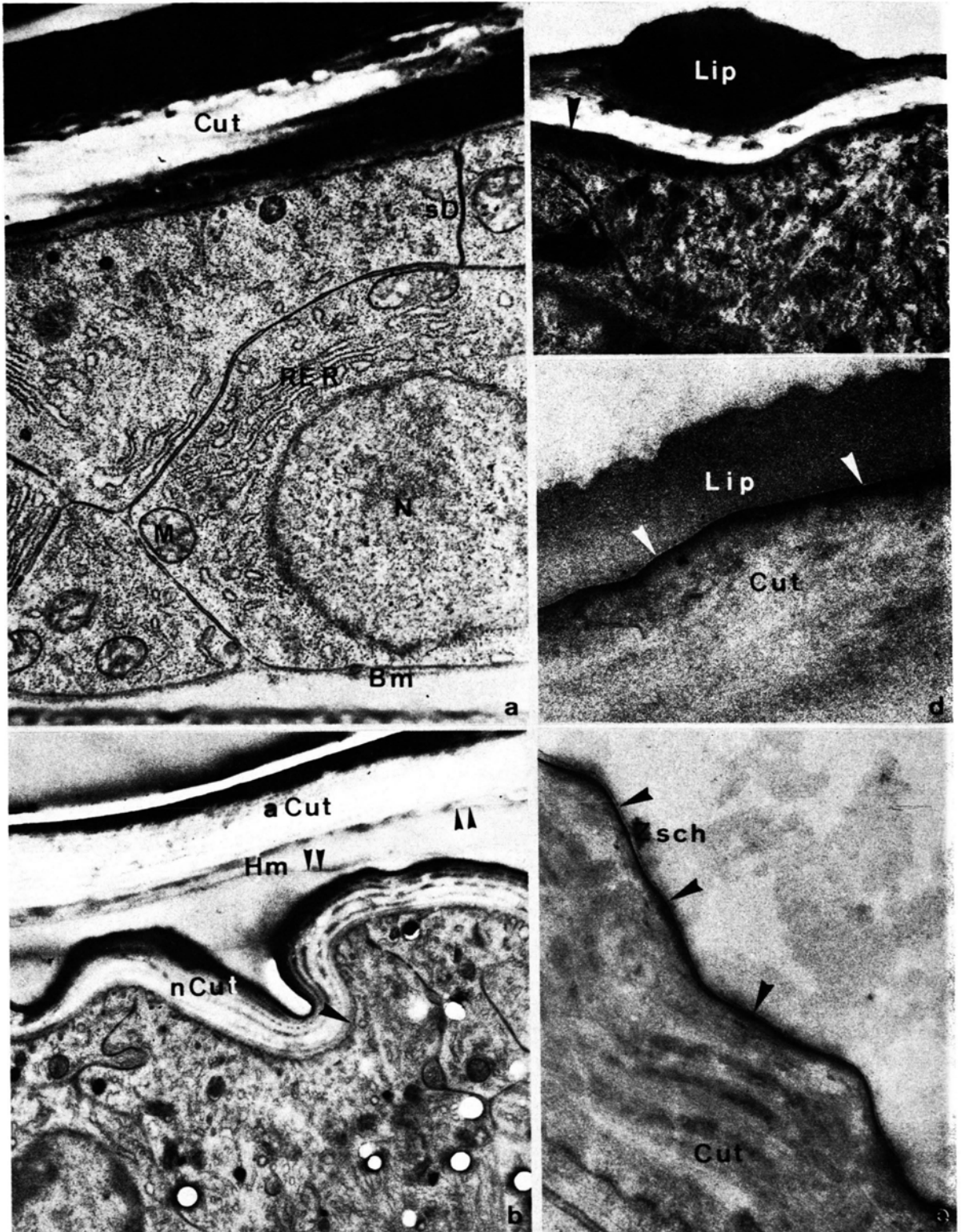


Abb. 2 a—e

Fettlösungsmitteln die Schichten, welche außerhalb der Cuticulinschicht liegen, nicht eliminieren. Bei der Lipidschicht von *Gryllus* kann natürlich der Einwand gemacht werden, daß kein Versuch unternommen wurde, sie mittels stärkerer Lösungsmittel abzulösen. Der Vergleich der Fetttropfen auf der Cuticula mit jenen im Fettkörper oder den Oenocyten (in Vorb.) ließ jedoch an ihrer Lipidnatur keinen Zweifel. In Tieren, die die neue Cuticula gerade aufbauen (Abb. 1 c), konnten sogar Lipidtropfen im Plasma der Epidermiszellen gefunden werden. Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um das Material handelt, welches auf die Cuticula aufgelagert wird. Abgesehen davon ist die bisweilen kräftige Lipidschicht von *Gryllus* auch im Lichtmikroskop an Gefrierschnitten darstellbar.

Die lamellierte Cuticula ist kurz nach dem Auskriechen der Larve aus dem Ei noch relativ kontrastlos, und man kann die einzelnen Lamellen, die von Porenkanälen durchzogen werden, klar unterscheiden. 12 Stdn. nach dem Ausschlüpfen erscheint der äußere Teil der Cuticula bereits ganz dunkel und die Schichtung ist nicht mehr zu erkennen. Die Melanisierung findet, wie man aus der Lebendbeobachtung der Tiere schließen kann, zwischen 2 und 5 Stdn. nach dem Schlüpfen statt. Der kräftig melanierte Teil der Cuticula dürfte der Exocuticula entsprechen, während der Rest, der weniger elektronendicht ist, an dem man aber die Lamellierung noch gut verfolgen kann, als Endocuticula anzusprechen ist.

Nach LOCKE und KRISHNAN¹⁴ geht die Häutungsmembran bei *Calpodex* aus den am weitesten innen gelegenen Teilen der Endocuticula hervor. Sie nehmen an, daß diese so abgelösten Schichten durch Imprägnation mit Phenolen einem Angriff durch die Enzyme der Häutungsflüssigkeit widerstehen. *Gryllus* ist indessen nicht der einzige Fall, in dem eine persistierende Häutungsmembran vermißt wird. Auch *Culex* (GNATZY¹⁴ folgt demselben Modus, und bei *Lucilia cuprina* er-

wähnt FILSHIE¹⁵ ihre Existenz weder in Wort noch in Bild.

Während der gesamten Zeit, in der die Cuticula dicht über der Epidermis liegt, ist die jeweils am weitesten innen gelegene Schicht die mit dem größten Elektronenkontrast (Abb. 2 b, c). Dieses ist auch in der ganz jungen Larve der Fall, also zu einem Zeitpunkt, in dem noch nicht alle Lamellen angelegt sind (die postecdysialen fehlen noch). Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich dabei um noch nicht ausdifferenzierte Lamellen und nicht, wie von verschiedenen Autoren gefordert wird, um die Häutungsmembran. Diese tritt erst nach Abstoßung der Cuticula etwa im Alter zwischen 55 und 60 Stdn. in Erscheinung und bildet sich jeweils aus der innersten Lamelle der Endocuticula. Sie ist unmittelbar nach der Anlage der Cuticulinschicht noch nicht vorhanden (Abb. 1 a). Erst nachdem die ersten Lamellen der praecdysialen Cuticula angelegt sind, werden die Lamellen der alten Cuticula angegriffen. Dabei wird meist die innerste vom übrigen Verband abgelöst und dann verdaut. Bisweilen können es auch deren 2 sein (Abb. 2 b), was natürlich mit der Vorstellung einer persistierenden Membran nicht gut vereinbar ist. Mit 72 Stdn. erfolgt dann das Abstreifen der alten nicht verdauten Cuticula.

Epidermiszellen: Die Epidermiszellen werden gegen das Haemocoel von einer Basalmembran abgedeckt, die eine Dicke von 500 Å erreicht (Abb. 2 a). In den basalen Zellbereichen bilden benachbarte Zellen als Zellzusammenschluß eine Zonula adhaerens. In unmittelbarer Nähe der apikalen Zellmembran ist eine Macula adhaerens ausgebildet, die dann in basaler Richtung von septierten Desmosomen abgelöst wird (Abb. 2 a sD).

Die Epidermiszellen spiegeln in ihrer Aktivität die Phasen des Auf- und Abbaus der Cuticula deutlich wider. Die *apikale Zellmembran* weist während der Abscheidung der Cuticula deutliche Mikrovilli auf, die

Abb. 1. a) Häutungstier. Die alte Cuticula (*Cut*) ist abgehoben. An der apikalen Zellmembran ist die neue Cuticulinschicht (*Cil*) gerade durchgehend angelegt. Die darunterliegende *dense layer* ist noch sehr dünn. Im Exuvialraum findet sich koagulierte Häutungsflüssigkeit (*Hfl*). In der rechten unteren Bildhälfte ist ein größeres Glykogendepot angeschnitten (*Gly*). Vergr. 12000-fach. b) Häutungstier. Diese Abbildung zeigt die abgelöste Cuticula (*a Cut*) an deren Basis keine Häutungsmembran ausgebildet ist, trotzdem die neue Cuticula (*n Cut*) bereits verschiedene Lamellen stark ist. Vergr. 14000-fach. c) Ausschnitt aus einer Epidermiszelle einer 60 Stdn. alten Larve. Auffallend ist die große Zahl von Golgi-Feldern (*G*). Das rauhe ER (*RER*) hat Verbindung zur Kernmembran (Pfeil). Während der Vorbereitung für die Neuanlage der Cuticula finden sich auch Lipidtropfen (*Li*) in den Epidermiszellen. Vergr. 37500-fach.

Abb. 2. a) Kräftig aktivierte Epidermis einer 54 Stdn. alten Larve. Neben membrangebundenen Ribosomen (*RER*) kommen auch viele frei im Plasma vor. *BM*, Basalmembran, *Cut*, Cuticula, *sD*, septiertes Desmosom. Vergr. 20000-fach. b) Cuticularbereich eines Häutungstieres. Die praecdysiale Cuticula (*nCut*) ist fast völlig angelegt; ihre innerste Schicht ist elektronendichter als die bereits von der apikalen Zellmembran abgerückten. Die Doppelpfeile zeigen auf die Häutungsmembranen, die sich von der alten Cuticula abspalten. Vergr. 16000-fach. c) Epidermis 1/2 Stde. nach dem Auskriechen aus dem Ei mit Lipidschicht. Diese liegt z. T. der Cuticulinschicht ganz dünn oder aber in Tropfenform auf. Auch hier ist die innerste Cuticulaschicht von hoher Elektronendichte. Vergr. 16000-fach. d) Die kräftige Lipidschicht weist an ihrer inneren Begrenzung zur Cuticula eine dichtere Linie auf (weiße Pfeile). Nach LOCKE handelt es sich um die orientierte Lipidschicht. Vergr. 80000-fach. e) Cuticula einer Segmentfalte, hier fehlt die Lipidschicht. Die dünne Linie über der Cuticulaschicht stellt wahrscheinlich die Zementschicht (*Zsch*) dar. Vergr. 43000-fach.

¹⁴ M. LOCKE u. N. KRISHNAN, *Tissue and Cell* 3, 103 [1971].

¹⁵ B. K. FILSHIE, *Tissue and Cell* 2, 479 [1970].

bei der 25 Stdn. alten Larve verflachen. Bei den 50 Stdn. alten Larven zieht sie sich von der Cuticula zurück und die Mikrovilli treten nach der Anlage der *dense layer* mit Beginn des Aufbaus der lamellierten Cuticula wieder deutlicher hervor. Das *endoplasmatische Reticulum*, teils tubulär, teils vesikulär, läßt in gleicher Weise in seiner Ausbildung Parallelen zur Ablagerung der Cuticula erkennen. Während es bei 12 Stdn. alten Tieren noch gut zu erkennen ist, zeigt es im Alter von 25 Stdn. ein Minimum seiner Ausbildung. 35 Stdn. nach dem Auskriechen ist es wieder kräftiger entwickelt und erfährt insbesondere kurz vor der Abstoßung der alten Cuticula seine intensivste Ausprägung (Abb. 2 a). In diesem Stadium zeigen die Zisternen des ER ihre dichteste Lagerung und das Grundcytoplasma ist mit freien Ribosomen überschwemmt. In der Folgezeit nehmen die Zellen an Umfang zu. Das ER lockert sich auf und die Zisternen werden erweitert. RINTERKNECHT und LEVI¹⁰ fanden bei der Untersuchung der Epidermiszellen von *Locusta* keine Golgi-Apparate. Die Befunde an *Gryllus* erbrachten das Gegenteil (Abb. 1 c). Hauptsächlich während der Aktivierung der Epidermiszellen, d. h. zur Zeit der Abscheidung von Cuticular-

material waren pro Zellanschnitt 2–3 Golgi-Felder zu finden. Die meist flachen und elektronenleeren Golgi-Vakuolen sind in ihrer Peripherie von zahlreichen mit elektronendichtem Inhalt gefüllten Golgi-Bläschen umgeben. Eine bevorzugte Lage zur basapikalen Achse war dabei nicht festzustellen, genauso wenig wie Anzeichen über den Verbleib der Sekretprodukte.

Elektronenmikroskopisch ließen sich in der 25 Stdn. alten Larve größere Ansammlungen von Glykogen feststellen. Sie treten in der Epidermis also früher auf als in den Oenocyten. Mit steigendem Alter nimmt die Zahl der Glykogendepots weiter zu, und auch zwischen den Tubuli und Vesikeln des ER sind zahlreiche einzeln liegende Glykogenrosetten zu finden. Mit der Neuanlage der Cuticula werden die Depots wieder abgebaut, so daß zum Zeitpunkt der Häutung und kurz danach keine Glykogenrosetten zu finden sind. Die eindeutige Beziehung zum Häutungszyklus legt den Gedanken nahe, daß das hier deponierte Glykogen zum Aufbau des Chitins in der neuen Cuticula Verwendung findet.