

**Stereoskopische Studie zu den weiblichen akzessorischen Drüsen
der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* De Geer 1773
(Insecta, Orthoptera)**

Robert Sturm

Abstract

The present contribution purports the microscopic investigation of the female accessory glands of *Gryllus bimaculatus*, whereby stereoscopic visualization techniques were applied. For documentation of the organs under the reflected-light microscope production of respective stereo-pairs and anaglyphs was carried out by usage of the split light paths in the stereo-microscope and the separate photography of the structures through the left and the right ocular. In the case of transmitted-light microscopy the tilting method described in detail in previous works was deployed. As light-microscopic records clearly signify, the female accessory glands of the Mediterranean field cricket represent richly ramified organs covered with tracheoles and reaching a maximal size between 10 and 12 mm. Depending on the physiological state of the female they exhibit varyingly strong secretory activity. With the help of the stereoscopic image more accurate points concerning the spatial extension of the structures and their cellular components can be made.

Zusammenfassung

Die vorliegende Studie hat die mikroskopische Untersuchung der weiblichen akzessorischen Drüsen von *Gryllus bimaculatus* zum Inhalt, wobei stereoskopische Bildgebungsverfahren zur Anwendung gelangten. Bei der auflichtmikroskopischen Dokumentation der Organe erfolgte die Erzeugung entsprechender Stereobildpaare und Anaglyphen durch Nutzung der beiden getrennten Lichtwege des Stereomikroskops und separate Fotografie der Strukturen durch das linke und rechte Okular. Im Falle der Durchlichtmikroskopie wurde das in vergangenen Arbeiten mehrfach im Detail beschriebene Kippverfahren zum Einsatz gebracht. Wie die lichtmikroskopischen Aufnahmen klar zu erkennen geben, stellen die weiblichen akzessorischen Drüsen der Mittelmeerfeldgrille reich verzweigte, von Tracheolen überzogene Organe mit einer maximalen Größe von 10 bis 12 mm dar, welche je nach physiologischem Status des Weibchens unterschiedlich starke sekretorische Aktivität zeigen. Mit Hilfe des stereoskopischen Bildes lassen sich vor allem genauere Aussagen zur räumlichen Ausdehnung der Strukturen und ihrer zellulären Komponenten treffen.

Einleitung

In zahlreichen anatomischen und histologischen Studien der Vergangenheit konnte bereits die Feststellung getroffen werden, dass die weiblichen akzessorischen Drüsen bei den meisten Grillenarten als essenzieller Bestandteil des Repro-

duktionstraktes gelten. Die paarig auftretenden und seitlich der terminalen Papille in die Genitalkammer einmündenden Strukturen sind in der Regel ektodermalen Ursprungs und weisen zumeist eine dendritische Morphologie auf. Im Unterschied zu anderen Insektendrüssen besteht ihr Epithel lediglich aus einer einzelnen, homogen aufgebauten Zellschicht, wobei eine Basallamina der äußeren Begrenzung, eine kutikuläre Intima hingegen der inneren Abgrenzung vom Drüsenlumen dient (GILLOTT 1988, KAULENAS 1992, STURM 2000, 2002a, 2002b, 2008, 2012, STURM & POHLHAMMER 2000).

Für die gezielte Untersuchung von Morphologie und Internstruktur der weiblichen akzessorischen Drüsen gelangten in der Vergangenheit unterschiedliche mikroskopische Verfahren zur Anwendung. Während sich für die Bewertung der Morphologie und Beschreibung des Drüsenepithels die Lichtmikroskopie (Auflicht, Durchlicht, Interferenzkontrast) als zweckmäßig erwies, erfolgte die Erforschung der zellulären Feinstruktur unter Zuhilfenahme der Elektronenmikroskopie (TEM; STURM 2000, STURM & POHLHAMMER 2000). Für die Beobachtung der sekretorischen Aktivität der Organe wurde zudem ein spezielles mikrochirurgisches Verfahren entwickelt, welches entsprechende in-situ-Messungen des Sekretflusses erlaubt (STURM 2002a, 2016a). Dabei ließ sich unter anderem feststellen, dass die akzessorischen Drüsen während des Ovipositionsstadiums der Weibchen ihre stärkste Aktivität verzeichnen (STURM 2000, STURM & POHLHAMMER 2000).

Die Verwendung stereoskopischer Bildgebungsverfahren gilt mittlerweile als eine Selbstverständlichkeit bei zahlreichen entomologischen Untersuchungen, da mithilfe der Raumfotografie mitunter wichtige Zusatzinformationen für verschiedenste Fragestellungen gewonnen werden können (STURM 2016b, 2017, 2018a, 2018b). Die hinter dem dreidimensionalen Bild stehende Methodik hat in den vergangenen Jahren eine sukzessive Vereinfachung erfahren und benötigt für ihre Realisierung keine teuren Aufnahmesysteme mehr, so dass sie einem immer breiteren Anwenderkreis zugänglich gemacht werden kann. Im vorliegenden Beitrag wird das stereoskopische Aufnahmeverfahren zur detaillierten Beschreibung der weiblichen akzessorischen Drüsen in der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus* genutzt. Diese Organe zeichnen sich unter dem Lichtmikroskop durch zahlreiche Besonderheiten aus, welche anhand der Raumfotografie mitunter besser zur Darstellung gebracht werden können.

Material und Methoden

Auflichtmikroskopie der akzessorischen Drüsen

Für die auflichtmikroskopische Dokumentation wurden die akzessorischen Drüsen gemäß den Anweisungen von STURM (2000, 2002a) aus dem Abdomen ausgewählter Weibchen entfernt und in ein mit wenig Ringerlösung befülltes Embryoschälchen übertragen. Die Dokumentation der freipräparierten Strukturen erfolgte mit einem Stereomikroskop (Fa. WILD) bei zehner- bis hundertfacher Vergrößerung, wobei durch Verwendung eines schwarzen Untergrundes störende Reflexionen weitestgehend vermieden werden konnten. Für die Herstellung von Stereobildpaaren wurde das Untersuchungsobjekt zunächst mithilfe einer Einzelobjektivkamera durch das linke Okular fotografiert und danach unter Beibehaltung der Beleuchtungs- und Vergrößerungseinstellung nochmals durch das rechte (STURM 2016b,

2017). Die beiden durch diesen Prozess gewonnenen Halbbilder wurden unter Zuhilfenahme des Computerprogrammes PICOLAY (CYPIONKA et al. 2016) zu einer Rot-Cyan-Anaglyphe kombiniert.

Durchlichtmikroskopie der akzessorischen Drüsen

Für die durchlichtmikroskopischen Studien wurden isolierte akzessorische Drüsen gemeinsam mit Ringerlösung auf einen Glasobjektträger transferiert und nach Montierung von Wachsfüßchen mit einem dünnen Glasplättchen abgedeckt. Entsprechende Beschreibungen der Organmorphologie wurden an einem IK-Mikroskop (Fa. REICHERT) bei 40- bis 400-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Erzeugung stereoskopischer Aufnahmen erfolgte durch Anwendung des sogenannten Kippverfahrens (STURM 2016b, 2017). Hier wird das Untersuchungsobjekt zunächst in seiner Ausgangsposition fotografiert. Für die Erstellung des zweiten stereoskopischen Halbbildes werden Glasobjektträger und darauf befindliche Strukturen leicht gekippt, wobei der Kippwinkel je nach Vergrößerung zwischen 2° und maximal 10° liegen sollte. Die anschließende fotografische Aufnahme geschieht unter identischen Beleuchtungs- und Vergrößerungseinstellungen wie beim ersten Bild. Die beiden nach dem Kippverfahren gewonnenen Halbbilder wurden wiederum zu einer Rot-Cyan-Anaglyphe konvertiert.

Um ein genaueres Bild von der zellulären Organisation des Drüsenepithels zu erhalten, gelangten auch gefärbte Semidünnschnitte der akzessorischen Organe zur Untersuchung. Die Beobachtungen wurden in diesem Fall im normalen Durchlichtmodus bei 100- bis 1000-facher Vergrößerung getätigt. Zur Erzeugung von anaglyphischen Raumbildern wurde wiederum die oben beschriebene Kipptechnik zur Anwendung gebracht.

Ergebnisse

Die in Abb. 1 zusammengestellten auflichtmikroskopischen Stereofotografien geben sehr klar zu erkennen, dass die weiblichen akzessorischen Drüsen der Mittelmeerfeldgrille durch zahlreiche tubuläre Komponenten gekennzeichnet sind, die an der Organbasis zusammenlaufen. Die Endköpfchen der einzelnen Verzweigungen treten entweder einzeln oder paarweise auf und verfügen über ein dichtes Netz an feinsten Tracheolen, welche für die Sauerstoffzufuhr verantwortlich zeichnen. Kleine in den apikalen Lumina vorhandene Sekrettröpfchen belegen die insbesondere in den Endstücken ablaufende Syntheseaktivität der Drüsen. Die ölige Flüssigkeit wird von den apikalen Bereichen zur Drüsenbasis geleitet und von dort in die Genitalkammer entlassen. Dieser Prozess wird durch eine an der Organmündung sitzende Muskulatur, welche das basale Epithel in peristaltische Bewegungen versetzt, noch zusätzlich befördert. Die etwa 12 mm langen und ebenso breiten akzessorischen Drüsen lassen sich gemäß auflichtmikroskopischem Befund in eine apikale Region mit den sekretorisch aktiven Endköpfchen, eine mittlere Region mit den sekretleitenden Strukturen und eine basale Region mit dem Mündungsbereich untergliedern.

Die mit dem IK-Mikroskop erzeugten Raumbilder geben Aufschluss über die interne Organisation der akzessorischen Drüsen (Abb. 2). Demnach lässt sich die Struktur der Organe grob in einen epithelialen und einen luminalen Bereich

untergliedern. Das Drüsenepithel setzt sich aus einer einzelnen Schicht hochprismatischer Zellen zusammen, die über große, vermehrt basal positionierte Zellkerne verfügen. Nach außen hin wird das Epithel durch eine einfache Basallamina abgegrenzt, um die herum im basalsten Drüsenabschnitt mehrere Schichten aus Ring- und Längsmuskulatur verlaufen. Die Trennung zwischen Gewebe und Drüsenlumen erfolgt durch kutikuläre Intima, die zahlreiche in den Hohlraum reichende Fortsätze bildet. Diese dienen einerseits dem Sekrettransport und andererseits der Stabilisierung des Lumens. Das Epithel besitzt eine Gesamthöhe von 40 bis 60 μm , wohingegen die Basallamina mit einer Mächtigkeit von etwa 2 μm zu Buche schlägt. Die kutikuläre Intima erreicht eine Dicke von bis zu 10 μm und entwickelt Fortsätze mit einer maximalen Länge von 20 μm .

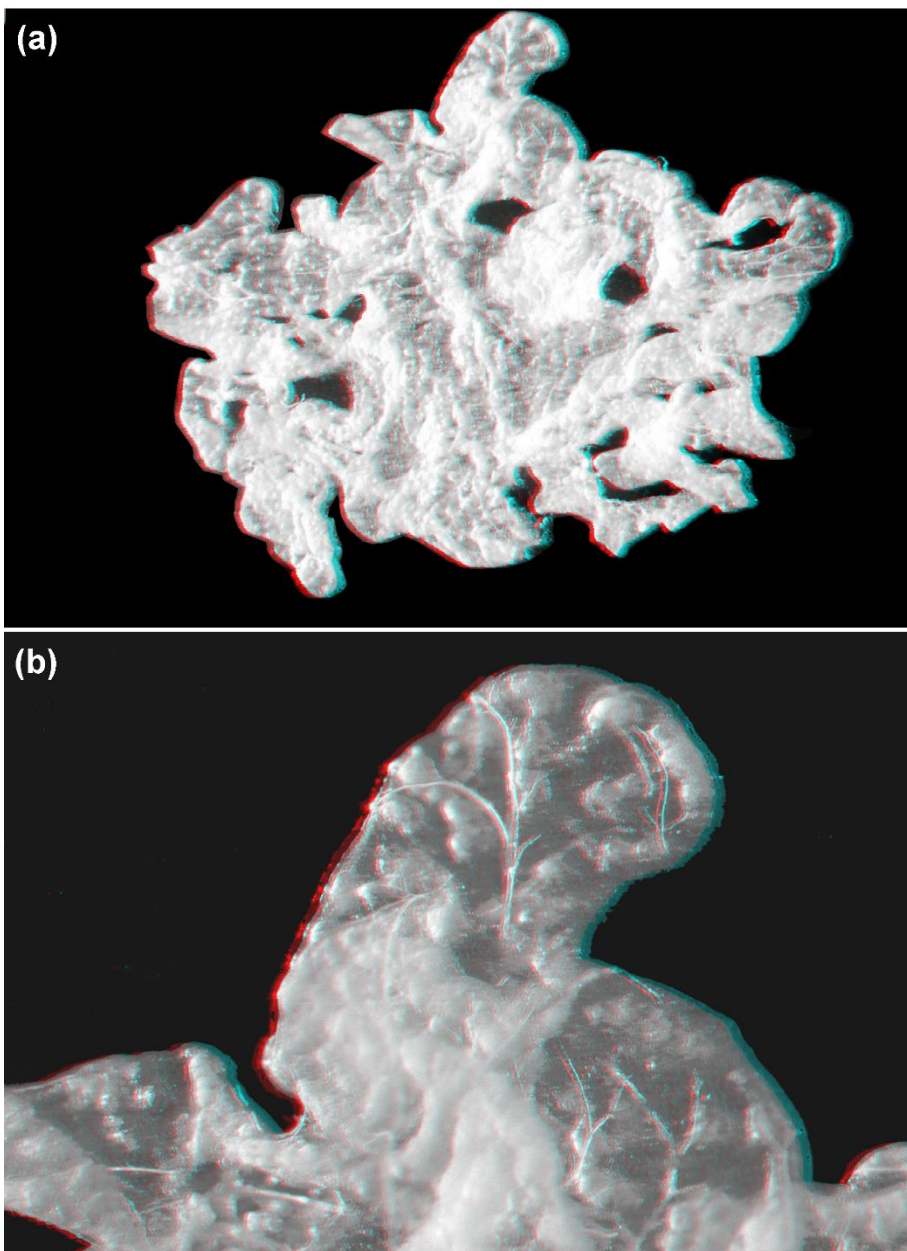
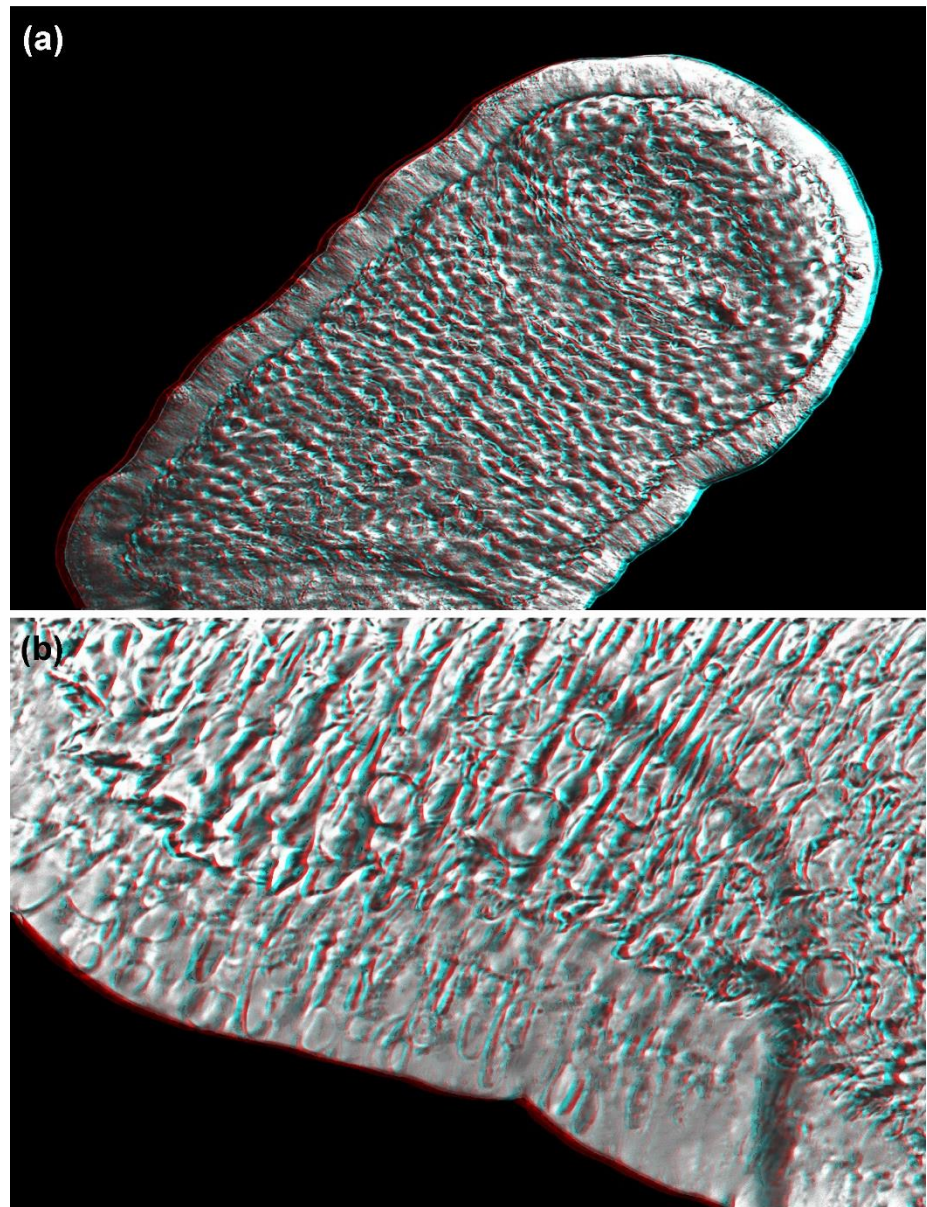


Abb. 1:
Auflichtmikroskopische Stereofotografien der weiblichen akzessorischen Drüse der Mittelmeerfeldgrille *Gryllus bimaculatus*:
(a) Übersichtsdarstellung (horizontale Bildkante: 15 mm),
(b) Detailabbildung eines Drüsenendstückes (horizontale Bildkante: 5 mm).
Für die Betrachtung der Anaglyphen ist eine Rot-Cyan-Brille heranzuziehen.

Abb. 2:

Durchlichtmikroskopische Stereoaufnahmen eines Endköpfchens der weiblichen akzessorischen Drüsen mit seiner charakteristischen abgeplatteten Morphologie:

(a) Übersichtsdarstellung (horizontale Bildkante: 2 mm),
(b) Detailabbildung des einschichtigen Drüsenepithels (horizontale Bildkante: 0,5 mm).



Die dreidimensionalen Fotografien der Drüsenschnitte verdeutlichen nochmals sehr klar die oben erläuterte Differenzierung zwischen Drüsenepithel und -lumen. Zudem kann ein besseres Bild von der Größe und Form der kutikulären Fortsätze gewonnen werden (Abb. 3). Die entlang dieser Strukturen geleiteten Sekrettröpfchen erfahren durch ihre Verschmelzung ein stetiges Wachstum, was die Bildung eines großen Flüssigkeitsdepots an der Drüsenbasis zur Folge hat.

Diskussion

Die Stereofotografie blickt mittlerweile auf eine mehr als 150-jährige Geschichte zurück. Wurde sie in ihrer Ursprungszeit noch für die bildliche Präsentation von Neuigkeiten und Kuriositäten aus aller Welt eingesetzt, so fand sie zu Beginn des 20. Jahrhunderts ihren sukzessiven Eingang in die wissenschaftliche Forschung. In der Biologie konnte sich dieses optische Verfahren erstmals in den 1970er und 1980er Jahren etablieren, als die Rot-Cyan-Anaglyphe durch ihre Verwendung in Film und Fernsehen einen massiven Aufschwung erlebte (STURM 2016b, 2017).

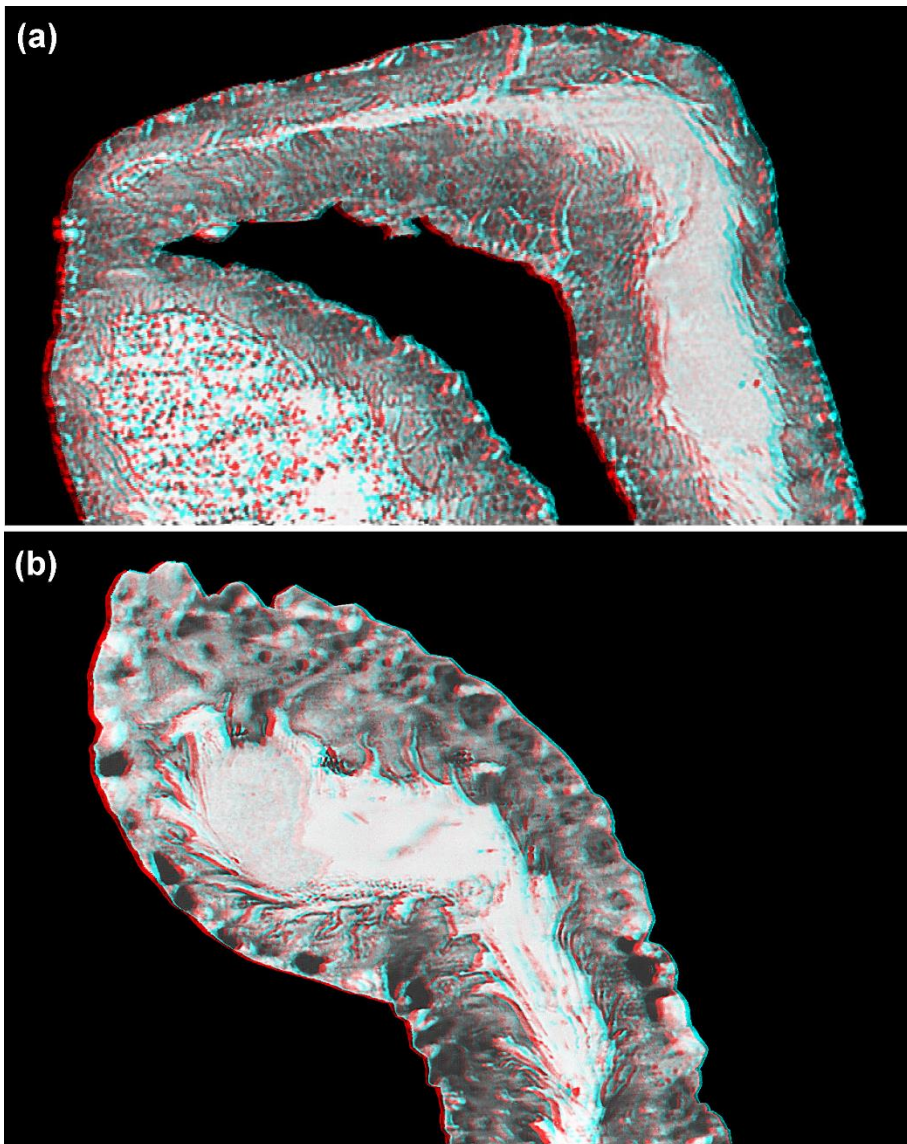


Abb. 3:
Stereoskopische
Fotografien der
Dünnschnitte durch
die weiblichen ak-
zessorischen Drü-
sen. Anhand des
3D-Bildes kann hier
mehr über die zellu-
läre Struktur des
Epithels in Erfah-
rung
gebracht werden.
(a) Übersichtsdar-
stellung (horizontale
Bildkante: 0,3 mm,
(b) Detailabbildung
(horizontale Bild-
kante: 0,15 mm).

In der Insektenkunde bestand vor allem in jüngerer Zeit ein vermehrtes Interesse an dreidimensionalen Visualisierungsmethoden, da das Raumbild unter anderem bei der Dokumentation feinsten Strukturen zusätzliche Informationen zu liefern vermag (GOLDSTEIN et al. 2003, STURM 2017, 2018a, 2018b). Wenn es etwa darum geht, die räumliche Anordnung einzelner struktureller Komponenten im Detail zu erfassen, kann das stereoskopische Bild als entsprechender Lösungsansatz herangezogen werden. Auch die dreidimensionale Vermessung (Morphometrie) kleinster oberflächlicher Elemente wird durch die 3D-Fotografie und die damit verbundene Erstellung sogenannter Deviationskarten ermöglicht (SCHEIDEL 2009, RAAP & CYPIONKA 2011, CYPIONKA et al. 2016, STURM 2016b, 2017).

Stereoskopische Aufnahmeverfahren gelten in der Zwischenzeit als wichtige Bestandteile des licht- und elektronenmikroskopischen Methodenspektrums. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die Erzeugung von Raumbildern nach sehr einfachen, leicht nachvollziehbaren Prozeduren erfolgt, bei denen zwischen den Aufnahmen der beiden Halbbilder lediglich eine geringfügige Veränderung der Objektposition vorzunehmen ist.

Dieses sogenannte Kippverfahren lässt sich sowohl in der Licht- als auch in der Elektronenmikroskopie ohne größeren Aufwand realisieren. Dazu kommt noch, dass moderne Digitalkamerasysteme eine sofortige Kontrolle der aufgenommenen Bilder gestatten und somit insgesamt zu einer Erhöhung der Bildqualität führen (STURM 2016b, 2017). Mithilfe von frei erhältlicher Computersoftware können die produzierten Halbbilder entweder zu einem klassischen Stereogramm oder zu einer Rot-Cyan-Anaglyphe zusammengesetzt werden. Im Falle des Stereobildpaares kann in der Regel bei der Betrachtung auf optische Hilfsmittel verzichtet werden, wohingegen die Anaglyphe zwingend den Gebrauch einer entsprechenden Farbbrille voraussetzt. In der Wissenschaft finden beide Darstellungsformen ihre Anwendung, wobei die Anaglyphe vermehrt für Präsentationszwecke, das Stereogramm hingegen vor allem für Publikationszwecke genutzt wird (STURM 2018a, 2018b).

Die oben erläuterten Vorteile der Stereofotografie treten auch bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von verschiedenen Insektenorganen zum Vorschein. Wie am Beispiel der weiblichen akzessorischen Drüsen der Mittelmeerfeldgrille demonstriert werden konnte, verfügt das Stereobild im Vergleich zur herkömmlichen zweidimensionalen Fotografie oftmals über nützliche Zusatzinformation, welche sich auf die räumliche Ausdehnung beziehungsweise Dicke einzelner Strukturen bezieht. Erst durch das Raumbild erlangt man beispielsweise genauere Kenntnis von der räumlichen Tiefe der Drüsenregionen, der dreidimensionalen Anordnung einzelner Verzweigungen oder der Größe verschiedener intra- und extrazellulärer Komponenten. Hier vermag die Stereoskopie sicherlich einen sinnvollen Beitrag zum Gesamtverständnis des untersuchten Objektes zu leisten (STURM 2016b, 2017, 2018a, 2018b). Die Anwendung dreidimensionaler Bildgebungsverfahren auf das lichtmikroskopische Schnittpräparat mag im ersten Augenblick verwundern; auch hier liegt eine durch die Schnittdicke und Tiefenschärfe definierte Rauminformation vor, die mithilfe stereoskopischer Methoden gezielt zur Darstellung gebracht werden kann (STURM 2017, 2018c).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Stereofotografie durchaus ihre Daseinsberechtigung in der Lichtmikroskopie besitzt und in der Entomologie zur Klärung verschiedenster Forschungsfragen herangezogen werden kann. Die sukzessive Vereinfachung ihrer Anwendung wird wohl in den kommenden Jahren noch zu einer Steigerung ihrer wissenschaftlichen Nutzung führen. Die Anzahl zukünftiger Publikationen kann sicherlich als geeigneter Indikator hierfür angesehen werden.

Verfasser:
Mag.mult. Dr. Robert Sturm
Brunnleitenweg 41
5061 Elsbethen
Austria
E-Mail: sturm_rob@hotmail.com

Literatur

- CYPIONKA, H., VÖLCKER, E. & ROHDE, M. (2016): Stacking-Programm PICOLAY – Erzeugung virtueller 3D-Bilder mit jedem Lichtmikroskop oder REM. – BIOSpektrum 22: 143-145.
- GILLOTT, C. (1988): Accessory Sex Glands in Arthropoda - Insecta. – In: ADIYODI, K.G. & ADIYODI, R.G.: Reproductive Biology of Invertebrates III. – Accessory Sex Glands. John Wiley & Sons, New York: 319-473.
- GOLDSTEIN, J.I., NEWBURY, D.E., JOY, D.C., LYMAN, C.E., ECHLIN, P., LITSHIN, E., SAWYER, L. & MICHAEL, J.R. (2003): Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. – Springer, New York; 378 S.
- KAULENAS, M.S. (1992): Insect accessory reproductive structure. Function, structure, and development. – Springer Verlag, New York u.a.; 226 S.
- RAAP, E. & CYPIONKA, H. (2011): Vom Bilderstapel in die dritte Dimension: 3D-Mikroaufnahmen mit PICOLAY. – Mikrokosmos 100: 140-144.
- SCHEIDEL, A.J. (2009): Stereoskopie in Bild und Video - Möglichkeiten, Anwendungen und Grenzen des räumlichen Sehens. – Universität Mainz, Mainz; 156 S.
- STURM, R. (2000): Die weiblichen akzessorischen Drüsen der australischen Feldgrille *Teleogryllus commodus* WALKER (Orthoptera, Gryllidae): Morphologie, Funktion und Entwicklung. – Linzer biologische Beiträge 32/2: 213-233.
- STURM, R. (2002a): Development of the accessory glands in the genital tract of female *Teleogryllus commodus* WALKER (Insecta, Orthoptera). – Arthropod Structure & Development 31: 231-241.
- STURM, R. (2002b): Morphology and ultrastructure of the female accessory sex glands in various crickets (Orthoptera, Saltatoria, Gryllidae). – Deutsche Entomologische Zeitschrift 49: 185-195.
- STURM, R. (2008): Morphology and histology of the ductus receptaculi and accessory glands in the reproductive tract of the female cricket, *Teleogryllus commodus*. – Journal of Insect Science 8: 35.
- STURM, R. (2012): Morphology and ultrastructure of the accessory glands in the female genital tract of the house cricket, *Acheta domesticus*. – Journal of Insect Science 12: 99.
- STURM, R. (2016a): Morphology and development of the accessory glands in various cricket species. – Arthropod Structure & Development 45: 585-593.
- STURM, R. (2016b): Die Stereofotografie und ihre Nutzung zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen. – Mikroskopie 3: 86-100.
- STURM, R. (2017): Use of stereophotography in insect science – methods and applications. – Linzer biologische Beiträge 49/2: 1209-1218.
- Sturm, R. (2018a): Stereoscopic light-microscopy in biology – A review. – Linzer biologische Beiträge 50/2: 1697-1705.
- Sturm, R. (2018b): Stereophotography of malacological objects. – Linzer biologische Beiträge 50/1: 723-731.
- Sturm, R. (2018c): Stereofotografie in der Elektronenmikroskopie. Teil 1: Entomologie. – Mikroskopie 5: 66-72.
- Sturm, R. & Pohlhammer, K. (2000): Morphology and development of the female accessory sex glands in the cricket *Teleogryllus commodus* (Saltatoria: Ensifera: Gryllidae). – Invertebrate Reproduction & Development 38: 13-21.