

Röntgenmikroanalytische Untersuchung des Chorions der Gespenstschrecke *Pharnacia westwoodi* (Phasmatodea)

X-Ray Microanalysis of the Egg Chorion of the Stick Insect *Pharnacia westwoodi* (Phasmatodea)

HARTMUT GREVEN, MICHAEL MIELEWCZIK & HILDEGARD HAMMER

Zusammenfassung: Elektronenstrahlmikroanalysen (ESMA) belegen das Vorhandensein von Calcium im gesamten (Exo-)Chorion der Eier der Gespenstschrecke *Pharnacia westwoodi*. Punktanalysen an Bruchflächen zeigen, dass Calcium relativ gleichmäßig in den drei lichtmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch zu identifizierenden Schichten verteilt ist. Das gilt auch für die Mikropylarplatte; hier war zudem Schwefel nachzuweisen. Im Operculum war wenig oder kein Calcium vorhanden. Auch die leeren Eihüllen von *P. westwoodi* enthalten Calcium.

Schlüsselwörter: Phasmatodea, Chorion, Stabilisierung des Chorions, Calciumsalze

Summary: X-ray analysis (ESMA) of the (exo)chorion of the eggs of the stick insect *Pharnacia westwoodi* showed the presence of calcium. Spot analyses of fracture planes revealed a rather homogeneous distribution in the three layers identified in histological sections and by scanning electron microscopy. This was true also for the micropylar plate; some sulphur was also shown to be present here. The operculum contained calcium in very small amounts, if any. Even after hatching, calcium was present in the chorion.

Keywords: Phasmatodea, chorion, stabilization of the chorion, calcium salts

1. Einleitung

Die Eihülle (Chorion) von Insekten besteht aus Polysacchariden und einer Reihe mehr oder weniger taxonspezifischer Proteine und ist vielfach mechanisch äußerst widerstandsfähig. Dies wird unter anderem durch Sklerotisierung, bei einigen Taxa aber auch durch die Einlagerung mineralischer Bestandteile erreicht (Übersicht z.B. bei HINTON 1981; MARGARITIS 1985).

Verschiedene Mineralsalze, unter anderem von Calcium, finden sich auch im Exochorion von Gespenstschrecken (Phasmatodea); sie können hier bis 38 % des Trockengewichtes ausmachen. Bisher sind verschiedene Mineralsalze und Elemente entweder histochemisch – dies erlaubt zum Teil auch die Loka-

lisation von Elementen in bestimmten Schichten des Chorions (s. MOSCONA 1950a,b) –, meistens aber qualitativ und vereinzelt quantitativ unter Verwendung ganzer Eier, unter anderem mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie, bei einer Reihe von Arten nachgewiesen worden (RAMSAY 1955; CARLBERG et al. 1982). Dem Calcium kommt offenbar eine besondere Rolle zu, da es unter anderem bei manchen Arten von den Embryonen während der Entwicklung genutzt wird (PANTEL 1919, zitiert nach HINTON 1981; MOSCONA 1948); es scheint bevorzugt in den inneren Schichten des Chorions vorzukommen (MOSCONA 1950a,b).

Im Folgenden berichten wir über den Nachweis von Calcium im Chorion der Eier der Gespenstschrecke *Pharnacia westwoodi*, das bei

dieser Art offenbar in allen Chorionschichten vorhanden ist.

2. Material und Methoden

Zur Verfügung standen frisch abgelegte Eier und leere Eihüllen von *Pharnacia westwoodi* aus der Zucht des Aquazoos und Lössbecke-Museums in Düsseldorf.

Kleine Stücke des Chorions wurden in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 mol/l Cacodylatpuffer fixiert, in 1 % Osmiumtetroxid im gleichen Puffer nachfixiert und in Spurr eingebettet. Semidünnschnitte (etwa 1 µm dick) wurden mit Toluidinblau-Borax gefärbt.

Für die konventionelle Rasterelektronenmikroskopie wurden die Objekte (ganze Eier oder Bruchstücke) mit Kohlenstoff-Klebeplättchen auf Probenhalter aus Aluminium befestigt, mit Gold besputtert und in den Rasterelektronenmikroskopen Jeol JSM 5500 (Institut für Physikalische Chemie) und Leo 1430 VP, Zeiss (FB Biologie) untersucht.

Für die Analysen wurden die Eier oder Bruchstücke davon ebenfalls auf Probenhalter aus Aluminium geklebt und ohne Goldbeschichtung im Rasterelektronenmikroskop Philips XL 30 ESEM mit einem EDAX-X-Ray-Detektor (Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie) bei einer Primärelektronenenergie von 20 kV analysiert und mit der Software EDAX-Genesis 4.0 ausgewertet.

Untersucht wurden an ganzen frisch abgelegten Eiern und leeren Eihüllen die äußere Oberfläche des unспеzialisierten Exochorions – im Folgenden Chorion genannt –, aus den spezialisierten Bereichen Operculum und Mikropylarplatte (von innen) sowie Bruchflächen von Chorion (ohne Endochorion), Operculum und Mikropylarplatte.

Bei der Elektronenstrahlmikroanalyse (ESMA) wird der Elektronenstrahl auf festgelegte Punkte (jedoch ohne zu rastern) eingestellt (Punktanalyse) auf die Probe ge-

schoßen. Dabei werden unter anderem die Atome der Probe ionisiert, das heißt Elektronen aus inneren Schalen herausgeschlagen. Die angeregten Atome und Ionen fallen in den Grundzustand zurück und emittieren dabei ein Röntgenquant mit einer für das Element charakteristischen Energie. Durch einen Detektor werden Energie und

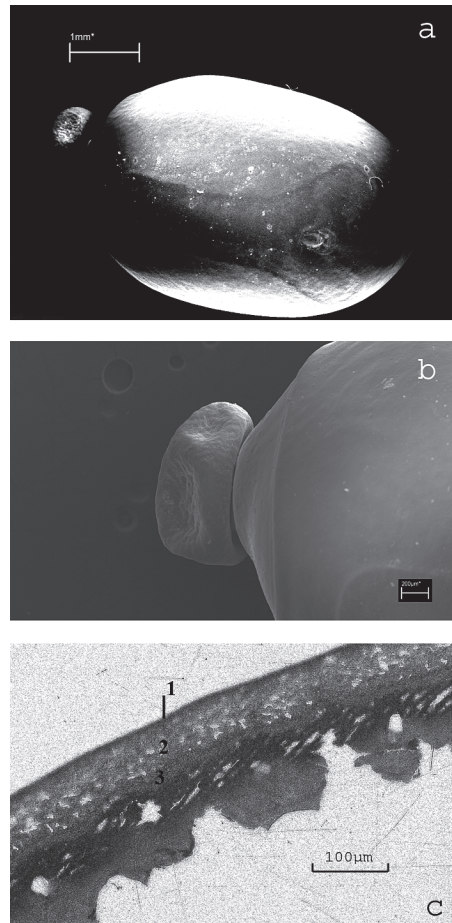


Abb. 1: Struktur der Eihülle von *Pharnacia westwoodi*: **a:** Gesamtansicht mit Mikropylarplatte (REM); **b:** Operculum mit Capitulum (links) (REM); **c:** unentkalkter Semidünnschnitt des Chorions mit drei Schichten (1, 2, 3).

Fig. 1: Structure of the egg capsule of *Pharnacia westwoodi*: **a:** total aspect with micropylar plate (SEM); **b:** operculum plus capitulum (left) (SEM); **c:** uncalcified semi-thin section of the chorion with three layers (1, 2, 3).

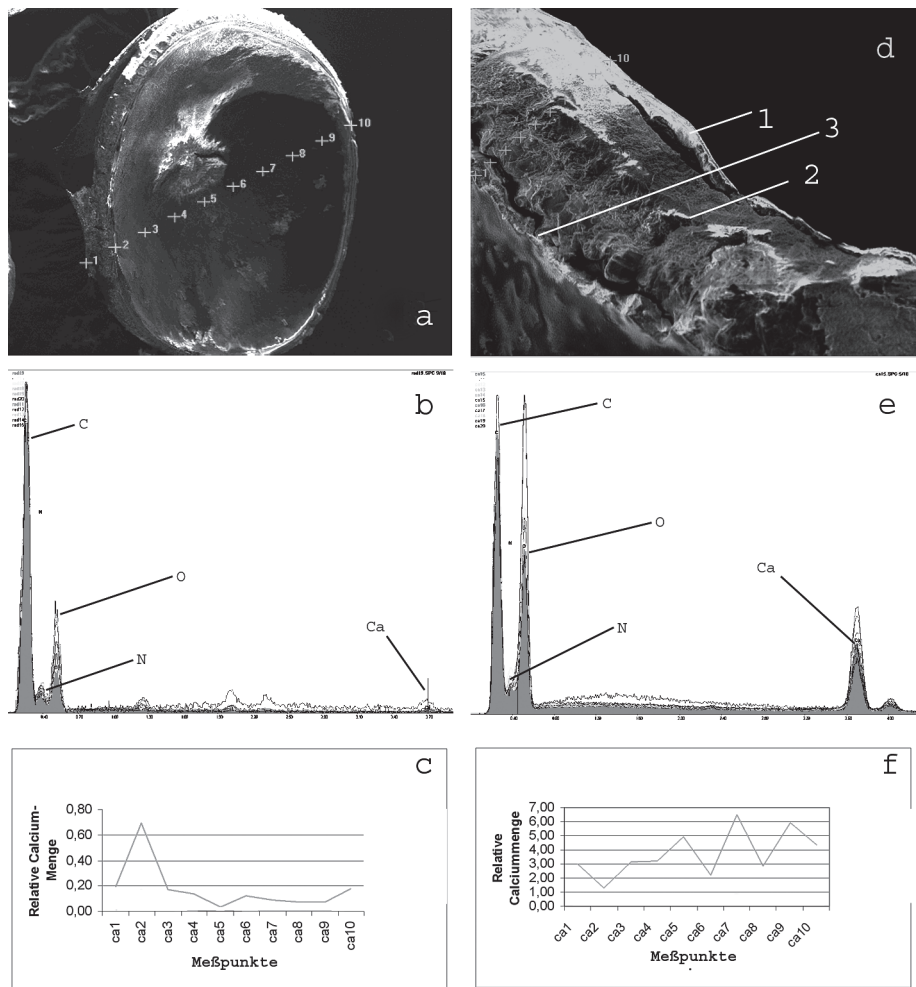


Abb. 2: Röntgenmikroanalyse der äußeren Oberfläche des Operculums einer leeren Eihülle (a-c) und Bruchfläche des Chorions (d-f) mit drei Schichten (1, 2, 3); a,d: Messpunkte; b,e: Sammelspektrum der 10 Messpunkte; c,f: Relation von Calcium zu Stickstoff. Weitere Erklärungen siehe Text.
Fig. 2: X-ray microanalysis of the outer surface of the operculum of an empty egg capsule (a-c) and the fractured chorion (d-f) showing three layers (1, 2, 3); a,d: measuring spots; b,e: ESMA spectrum of the 10 measuring spots; c,f: relation of calcium to nitrogen. For further explanations see text.

Anzahl dieser Röntgenquanten gemessen und als Röntgenspektrum dargestellt. Die sich bei den verschiedenen Energien ergebenden ‘peaks’ können bestimmten Elementen zugeordnet werden. Die Höhe der ‘peaks’ kann allerdings kaum als Maß für die Konzentration des nachzuweisenden Elements gelten. Für eine erste Annäherung haben wir daher das Verhältnis von Anzahl

der Signale (‘counts’) der Calciumlinien zu den unter denselben Bedingungen (‘counts per life seconds’) erhaltenen ‘counts’ für Stickstoff und/oder Sauerstoff bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass beide Elemente mehr oder weniger gleichmäßig verteilt sind, sind so relative Aussagen möglich. Eine Aussage über die chemischen Verbindungen, in denen sich die nachgewiese-

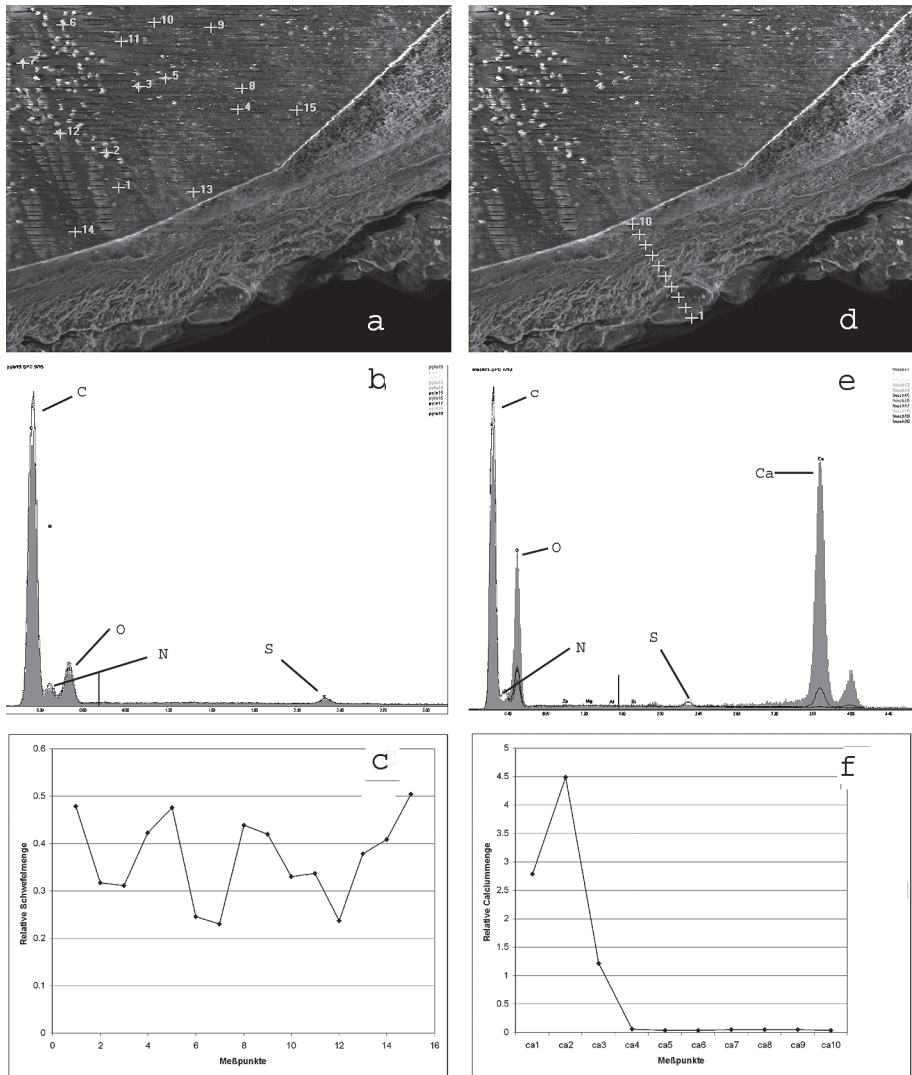


Abb. 3: Röntgemikronanalyse der Mikropylarplatte einer leeren Eihülle, innere Fläche (a-c) und Bruchfläche (d-f): a,d: Messpunkte; b,e: Sammelspektrum der Messpunkte, man beachte das Vorkommen von Schwefel; c: Relation von Schwefel zu Stickstoff; f: Relation von Calcium zu Sauerstoff. Weitere Erklärungen siehe Text.

Fig. 3: X-ray microanalysis of the micropylar plate of an empty egg capsule, inner surface (a-c) and fractured plate (d-f): a,d: measuring spots; b,e: ESMA spectrum of the measuring spots, note the presence of sulphur; c: relation of sulphur to nitrogen; f: relation of calcium to oxygen. For further explanations see text.

nen Elemente befinden, ist nicht möglich. Zudem kommen Informationen über die elementare Zusammensetzung aus einer Tiefe von maximal 1 μm (GOLDSTEIN et al. 1981).

3. Ergebnisse

Das Ei von *Pharnacia westwoodi* ist sphärisch, etwa 5 mm lang und besitzt eine dreilappige Mikropylarplatte (Abb. 1a). Das Operculum

trägt ein gestieltes Capitulum; der Opercularwinkel tendiert gegen Null (Abb. 1b). Das Chorion ist etwa 60 µm dick. Im lichtmikroskopischen (Abb. 1c) und rasterelektronenmikroskopischen Bild (Abb. 2d) sind drei Schichten zu unterscheiden, die alle sehr kompakt wirken.

Die Analyse der äußeren Flächen des Eis (Operculum s. Abb. 2a-c; Chorion, Mikropylarregion, nicht abgebildet) zeigt in allen Fällen Calcium an. Im Operculum scheint wenig Calcium vorhanden zu sein. Die Abweichung in Messpunkt 2 ist aufgrund der Skalierung geringer als Abbildung 2c vermuten lässt und ist durch die Schattenwirkung der Probe zu erklären (Abb. 2b,c). Punktanalysen über die Bruchfläche des unspezialisierten Chorions von innen nach außen belegen, dass Calcium in allen Schichten vorkommt, sehr wahrscheinlich aber in schwankender Konzentration. Diese ist offenbar unabhängig von der Schichtung (Abb. 2d-f). Calcium lässt sich in leeren Eihüllen und frisch abgelegten Eiern nachweisen. Deutliche Unterschiede in der Konzentration, insbesondere der inneren Schichten, waren nicht auszumachen (ohne Abbildung). In der Mikropylarplatte konnte Calcium lediglich im äußeren Bereich der Bruchstelle nachgewiesen werden, nicht aber weiter innen (weder durch die Punktanalyse der Bruchfläche noch durch die Analyse der Innenseite) (Abb. 3d-f). Abbildung 3f zeigt die relative Verteilung von Calcium in der Mikropylarplatte in der Relation zu Sauerstoff. Auch die Relation von Calcium zu Stickstoff (nicht abgebildet) ist ähnlich. Auffällig ist die relativ gleichmäßige Verteilung von Schwefel in der Mikropylarplatte (Abb. 3c), sowohl an den Bruchflächen (Abb. 3e) als auch auf der Innenfläche (Abb. 3b).

4. Diskussion

Unsere Daten belegen zunächst das Vorkommen von Calcium(-Salzen) in unspezialisierten und zum Teil in spezialisierten Bereichen des Chorions von *Pharnacia westwoodi*. Neben

Calcium haben wir noch Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel (in der Mikropylarplatte) detektiert. Vor allem die spezialisierten Regionen sind von taxonomisch-systematischer Bedeutung (u.a. MAZZINI et al. 1993; CLARK SELLIK 1997; LIPINSKI et al. 1999; ZOMPRO 2004).

Calcium wird mit der Nahrung aufgenommen. Daher dürfte der Calciumgehalt des Chorions in Abhängigkeit vom gebotenen Futter schwanken. RAMSAY (1955) ist der Meinung, das von den Erwachsenen aufgenommene Calcium würde über die Faeces und die Eier „entsorgt“ (s.u.).

Das Chorion der Eier von *Pb. westwoodi* und das anderer Phasmidenarten, deren Eihüllen mineralisiert sind, ist schwer zu schneiden (s. auch LIPINSKI et al. 1999). MOSCONA (1950a,b) hat in dem außerordentlich komplexen Chorion der Eier von *Bacillus libanicus* histologisch nach verschiedenen Farbreaktionen acht Schichten (einschließlich des Endochorions) identifiziert; in der vierten Schicht wurde Calciumoxalat, in der sechsten Calciumcarbonat nachgewiesen. Die Anzahl der Schichten des Chorions sowie deren Aufbau können allerdings von Art zu Art außerordentlich unterschiedlich sein (HINTON 1981; s. auch LIPINSKI et al. 1999). Bei *Pb. westwoodi* haben wir im Rasterelektronenmikroskop und in Semidünnschnitten nur drei Schichten im Exochorion identifizieren können. In diesen ist Calcium offenbar mehr oder weniger gleichmäßig vorhanden. Bemerkenswert sind das Fehlen von Calcium in den inneren Schichten sowie das Vorkommen von Schwefel in der gesamten Mikropylarplatte. Dies deutet auf beträchtliche regionale Unterschiede hin (vgl. dazu MOSCONA 1950a,b).

Calcium ist auch in leeren Eihüllen nach dem Schlupf der Nymphen nachzuweisen. Da die von uns angewendete Methode eine exakte Quantifizierung nicht erlaubt (s.o.), können wir noch nichts darüber aussagen, ob und in welchem Maße die Embryonen von *Pb. westwoodi* während ihrer Entwicklung dem Chorion Calcium entziehen. Dies ist aber zumin-

dest indirekt für einige Phasmiden-Arten belegt. PANTEL (1919, zitiert nach HINTON 1981) fand Calcium in den Malpighischen Gefäßen frisch geschlüpfter *Domusa prolixa*, nicht jedoch in den Embryonen. Das Exochorion besitzt hier zudem eine „kristalline“ Lage von Calcium, die beim Schlupf der Jungen weitgehend reduziert ist. Das Chorion von *Bacillus libanicus* gibt im Laufe der Entwicklung etwa 19 % seines Mineralgehaltes – ca. 38 % des Trockengewichtes bestehen aus Calcium, Magnesium, Aluminium, Kalium, Schwefel, Stickstoff und Oxalat – offenbar an den Embryo ab. Dabei wird eine innere Lage des Exochorions, die Calciumcarbonat enthält, dünner. Eine andere Lage, die Calciumoxalat enthält, dient offenbar lediglich der Stabilisierung und wird nicht von den Embryonen genutzt. Aus Eiern von Adulten, die nur calciumfreies Futter zur Verfügung hatten, schlüpften nur wenige Junge, die nicht überlebten (MOSCONA 1948, 1950a,b). Dies spricht zumindest bei diesen Arten gegen eine bloße Entsorgung des Calciums über die Eihüllen (s.o.).

Inwieweit sich die unterschiedlichen Mengen von Mineralsalzen auch mit anderen Parametern der Phasmiden-Biologie korrelieren lassen, zum Beispiel mit der Wahl des Eiablageplatzes (versteckt in Hohlräumen von Pflanzenteilen oder angeklebt) und klimatischen Bedingungen (so wenn die Eier in Regionen mit periodischer Vegetationsruhe längere Perioden überdauern müssen) (BEIER 1968), ist unseres Wissens nicht bekannt.

Danksagung

Herr D. SCHULTEN, Aquazoo und Löbbecke-Museum der Stadt Düsseldorf, überließ uns freundlicherweise die Eier, Herr Prof. Dr. SEIDEL, Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie II der Universität Düsseldorf, ermöglichte die Röntgenanalytik, Herr M. BRENNER, Zoologie II der Universität Düsseldorf, half bei der Herstellung einiger REM-Fotos.

Literatur

- BEIER, M. (1968): 10. Phasmida (Stab- oder Gespenstheuschrecken). S. 1-56 in: HELMCKE, J.G., STARCK, D., & WERMUTH, H. (Hrsg.): Handbuch der Zoologie, IV. Band: Arthropoda, 2. Hälfte: Insecta, 2. Teil. De Gruyter; Berlin.
- CARLBERG, U., LINDQUIST, B.A.R., & PALMHEDEN, A.-K. (1982): Mineral contents of the egg shell of stick insects Phasmida (Insecta). Zoologischer Anzeiger 208: 66-73.
- CLARK SELLICK, J.T. (1997): Descriptive terminology of the phasmid egg capsule, with an extended key to the phasmid genera based on egg structure. Systematic Entomology 22: 97-122.
- GOLDSTEIN, J.I., NEWBURY, D.E., ECHLIN, P., JOY, D.C., FIORI, C.E., & LIFSHIN, E. (1981): Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Plenum Press; New York.
- HINTON, H.E. (1981): Biology of insect eggs, vol. II. Pergamon Press; Oxford, New York.
- LIPINSKI, K., GREVEN, H., SCHULTEN, D., & LÖSER, S. (1999): Die Struktur der Eihüllen von 48 Phasmatodea-Arten aus der Sammlung des Löbbecke-Museum und Aquazoo Düsseldorf. Entomologische Mitteilungen aus dem Löbbecke-Museum und Aquazoo, Beiheft 5: 1-125.
- MARGARITIS, L.H. (1985): Structure and physiology of the eggshell. S. 153-230 in: KERKUT, G.A., & GILBERT, L.I. (Hrsg.): Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 1: embryogenesis and reproduction. Pergamon Press; Oxford, New York.
- MAZZINI, M., CARCUPINO, M., & FAUSTO, A.M. (1993): Egg chorion architecture in stick insects (Phasmatodea). International Journal of Insect Morphology and Embryology 22: 391-415.
- MOSCONA, A. (1948): Utilization of mineral constituents of the egg shells by the developing embryo of the stick insects. Nature 162: 62-63.
- MOSCONA, A. (1950a): Studies on the egg of *Bacillus libanicus* (Orthoptera, Phasmidae). I. The egg envelopes. Quarterly Journal of Microscopical Science 91: 183-193.
- MOSCONA, A. (1950b): Studies of the egg of *Bacillus libanicus* (Orthoptera, Phasmidae). II. Moisture, dry material, and minerals in the

- developing egg. Quarterly Journal of Microscopical Science 91: 195-203.
- PANTEL, J. (1919): Le calcium dans la physiologie normale des Phasmides (Ins. Orth.): oeuf et larve éclosant. Comptes Rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, Série D; Sciences Naturelles 168: 127-129.
- RAMSAY, J.A. (1955): The excretory system of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae). Journal of Experimental Biology 32: 183-199.
- ZOMPRO, O. (2004): Revision of the genera of the Areolatae, including the status of *Time-ma* and *Agathemera* (Insecta, Phasmatodea). Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF) 37: 1-327.

Prof. Dr. Hartmut Greven
Michael Mielewczik
Institut für Zoomorphologie und Zellbiologie
Prof. Dr. Hildegard Hammer
Institut für Angewandte Physik
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Universitätsstr. 1
D-40225 Düsseldorf
E-Mail: grevenh@uni-duesseldorf.de

Rezension

Oliver Zompro (2004):

Revision of the genera of the Areolatae, including the status of *Timema* and *Agathemera* (Insecta, Phasmatodea).

Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF) 37. Goecke & Evers; Kelttern-Weiler. ISSN 0173-7481, ISBN 3-931374-39-4. Gebunden, 327 Seiten mit 161 Abbildungen. Preis: 90,00 EUR.

Der produktive und durchaus selbstbewusste (s.u.) Autor legt eine umfangreiche Revision der Gespenstschrecken (Phasmatodea) der Unterordnung Areolatae auf der Basis kladistischer Analysen vor. Die „Einleitung“ setzt sich auf 18 Seiten mit Phasmiden-Taxonomie, früher diskutierten Schwestergruppenverhältnissen, Merkmalen und evolutionären Trends, Ootaxonomie und Biogeographie auseinander. „Material und Methoden“ sind sehr kurz; darauf folgen eine Liste der Akronyme der Museen, aus denen das Untersuchungsmaterial stammt, und die „Ergebnisse“. Hier sind Einzelheiten zur Biologie der Tiere sowie weitere Informationen (dass die Eihülle sklerotisiert ist (S. 24), ist eine voreilige Verallgemeinerung) eher oberflächlich dargestellt.

Die Diagnosen sind detailliert; eine Bereicherung sind zweifellos die Bestimmungsschlüssel, zum Teil auch anhand der Eier (die der untersuchten Arten liegen gezeichnet vor), für die Familien, Unterfamilien, Tribus und Genera. Die verschiedenen Taxa einschließlich fossiler Formen werden, soweit möglich, anhand ihrer Apomorphien charakterisiert. Genera und Arten sind weitgehend nach einem einheitlichen Schema bearbeitet: Synonyme, Verbreitung, Typus, Name, untersuchtes Material, Kommentar. Die Beschreibungen werden von Fotos ausreichender bis guter Qualität von genadelten Tieren und von Zeichnungen begleitet. Die beiden Detailfotos (Fig. 110b, die „Stridulationsmembran“ ist allenfalls für Eingeweihte erkennbar; Fig. 113b ist unscharf) und die beiden REM-Fotos sind wenig überzeugend. Es folgen Diskussion, Danksagungen, eine deutsche Zusammenfassung (ein Abstract findet sich am Anfang), eine sehr umfangreiche Literaturliste, die wichtige, aber auch zahlreiche unwichtige Arbeiten enthält, eine nützliche ‘Checklist’ der Genera, ein Abschnitt, der einige rezente Publikationen kommentiert, und ein Index. Die Kommentare lauten unter anderem so: “The large number of spelling mistakes ... and indicate that no experienced specialist in Phasmatodea was involved [S. 323].“ Oder: “The entire publication betrays rudimentary experience in Phasmatodea [S. 325].“

Hier ist nicht der Raum, um alle Änderungen (Verschiebung von Genera in andere oder sogar neue Familien, Beschreibung von 14 neuen Genera und von 13 neuen Arten etc.) aufzulisten. Unter anderem betont der Autor: 1) das Schwestergruppenverhältnis der Phasmatodea mit (Plecoptera + (Tinematodea + Embioptera)), die insgesamt die Phasmatomorpha n. tax. bilden, 2) die auch von anderen Autoren gewürdigte Bedeutung der Eistruktur für Taxonomie und Systematik und 3) die Polyphyly der Anareolatae, die eventuell von den Areolatae abzuleiten sind.

Der Autor mag Recht haben mit all den Autapomorphien, die er erkennt. Ich vermisste aber weitgehend Angaben darüber, warum diese und jene Struktur eine Autapomorphie ist, das heißt der Weg zu den getroffenen Aussagen wird nicht immer deutlich. Der Leser wird lediglich mit diesen konfrontiert und mag sie glauben oder nicht.

In diesem Zusammenhang ist interessant zu erfahren, warum der Autor die Monophylie einiger Taxa so akzeptiert, wie sie von früheren Autoren postuliert wurden: Dies geschieht aufgrund des Mangels “of real arguments to doubt monophyly ... and an intuitional feeling, based on 25 years of experience with Phasmatodea [S. 21].“

Alles in allem aber eine Arbeit, die niemand, der an der Taxonomie und Systematik der Phasmatodea interessiert ist, ignorieren kann.

Hartmut Greven, Düsseldorf

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Entomologie heute](#)

Jahr/Year: 2005

Band/Volume: [17](#)

Autor(en)/Author(s): Greven Hartmut, Mielewczik Michael, Hammer Hildegard

Artikel/Article: [Röntgenmikroanalytische Untersuchung des Chorions der Gespenstschrecke Pharnacia westwoodi \(Phasmatodea\). X-Ray Microanalysis of the Egg Chorion of the Stick Insect Pharnacia westwoodi \(Phasmatodea\) 39-45](#)