

**Untersuchungen an Eiern der *Rhithrogena semicolorata* – Untergruppe aus Rheinland-Pfalz  
(Insecta: Ephemeroptera: Heptageniidae) mittels Lichtmikroskopie**

ARNE HAYBACH

**Kurzfassung:**

Für die 3 aus Rheinland-Pfalz bekannten Arten der *Rhithrogena semicolorata* – Untergruppe werden Differentialmerkmale an den Eistrukturen benannt und dargestellt. Diese ermöglichen bereits lichtmikroskopisch eine sichere taxonomische Ansprache der Arten *R. semicolorata* (CURTIS), *R. picteti* SOWA und *R. puytoraci* SOWA & DEGRANGE im Eistadium. Da das Imaginalstadium der Eintagsfliegen sprichwörtlich kurz ist, ist die Eireifung bereits im letzten Larvenstadium abgeschlossen. Entsprechend lassen sich über das Eistadium schlupffreie Larven, weibliche Subimagines und die Weibchen bestimmen. Flächenhafte Kartierungen der larval kaum sicher trennbaren Arten, aber auch Auswertungen von Emergenzmaterial sind mit dieser Methode ohne größeren Aufwand möglich

**Abstract**

Ootaxonomic investigations of three species of the *Rhithrogena semicolorata* subgroup from Rhineland-Palatinate (Insecta: Ephemeroptera: Heptageniidae) by light microscopy

Characters of taxonomic significance are discussed and figured for 3 members of the *Rhithrogena semicolorata* subgroup known from Rhineland-Palatinate (SW-Germany). With the help of these ootaxonomic features separation of the species *R. semicolorata* (Curtis), *R. picteti* Sowa, and *R. puytoraci* Sowa & Degrange is possible by light microscopy. Because the imaginal life span of Ephemeroptera is rather short, egg-development is already finished in mature nymphs. In consequence not only females, but also female subimagoes and female nymphs are determinable by egg structure. In practice, whilst larval characters are not always sufficient to separate species, this method of determination allows faunistic studies in larger areas by the use of fully mature nymphs. In addition, the study of material from emergence traps that consists mainly of subimagoes becomes possible. Eggs of the three named species differ in the detail of the exochorion structure. In *R. picteti* it consists of large, rounded granulae that are more or less evenly spread over the egg surface, whilst in both other species they are more randomly scattered. In *R. semicolorata* these granulae are hook shaped and singular, while in *R. puytoraci* they are column shaped and often connected with a kind of membrane.

**Inhalt**

1. Einleitung	206
2. Problemstellung	206
3. Methode	206
3.1 Schwierigkeiten beim Auffinden der Oberflächenstrukturen	207
4. Ergebnisse	207
4.1 Eimorphologie	207
4.2 Eitaxonomie	208
4.2.1 <i>Rhithrogena picteti</i> SOWA 1971	208
4.2.2 <i>Rhithrogena puytoraci</i> SOWA & DEGRANGE 1987	209
4.2.3 <i>Rhithrogena semicolorata</i> (CURTIS 1834)	209
5. Danksagung	210
6. Schriftenverzeichnis	210

## 1. Einleitung

Der Verbreitungsschwerpunkt der Gattung *Rhithrogena* liegt in und an den europäischen Hochgebirgen, die mutmaßlich auch die glazialen Überdauerungsgebiete darstellten. Die 20 bislang aus Deutschland bekannten Arten (HAYBACH & MALZACHER 2002) sind überwiegend kaltstenotherm, rheo- und lithobiont und die Anzahl der Arten in dieser nur mäßig expansiven Gruppe nimmt in Deutschland sowohl von Süd- nach Nord, als auch mit abnehmender Höhenlage und Kontinentalität rasch ab. Entsprechend sind aus Rheinland-Pfalz neben den hier behandelten Arten *R. picteti* SOWA, *R. puytoraci* SOWA & DEGRANGE und *R. semicolorata* CURTIS nur noch *R. beskidensis* ALBATERCEDOR & SOWA und *R. savoienensis* ALBATERCEDOR & SOWA bekannt und aus zoogeographischen Erwägungen sind noch *R. germanica* EATON und *R. hercynia* LANDA zusätzlich zu erwarten. Von letztgenannten Arten existieren Nachweise in Hessen (HAYBACH & SCHMIDT 1997) und Luxemburg (nur *R. hercynia* DOLISY 2001; det. Haybach).

## 2. Problemstellung

Die Arten der sog. *Rhithrogena semicolorata* – Untergruppe (Einteilung n. TOMKA & RASCH, 1993) sind ein stetiges und häufiges Faunenelement sauberer Bäche und Fließchen in Rheinland-Pfalz. So einfach jedoch die Gattung an sich in Form der Larven über die abgeflachte Form, den Femurfleck und die ventral zu einem Haftapparat gestalteten Kiemen erkennbar ist, so schwierig und auch für Spezialisten unbefriedigend bleibt häufig der Versuch der Artansprache. Die in der einschlägigen modernen Bestimmungsliteratur (z.B. SOWA 1971, SOLDÁN & LANDA 1999, BAUERNFEIND & HUMPEŠCH 2001) genannten Merkmale zur Bestimmung der Larven schwanken bei den Arten *Rhithrogena picteti* und *R. puytoraci* doch erheblich. Nach eigenen Erfahrungen zeigen weder die Färbungsmerkmale noch die Mikrodentikulation der Abdominaltergite der Larven immer befriedigende Ergebnisse. Zudem kommen in Rheinland-Pfalz *R. picteti* und *R. puytoraci* nicht selten im gleichen Bach vor, so daß hier Merkmale, die sich häufig auch auf physikochemische Parameter der Larvalgewässer

zurückführen lassen. (z.B. Färbung), nicht zur Differenzierung herangezogen werden können.

Doch nicht nur die Larven sind problematisch. Weibliche Stadien gelten nach äußeren morphologischen Merkmalen generell als unbestimmbar. Männchen sind über die Gestalt des Penis unterscheidbar. Da sich die Penisloben jedoch bei der Begattung und auch im Todeskampf bei der Abtötung häufig verdrehen, sind meist mehrere Exemplare notwendig um zu einer sicheren Bestimmung zu gelangen. Eine flächenhafte kleinräumige Erfassung der Arten läßt sich über Fänge schwärmender Männchen allein kaum erreichen, da diese sowohl tageszeitlich als auch jahreszeitlich nur sehr begrenzt schwärmen, und das auch nur bei günstigen Witterungsbedingungen.

Subimagines beider Geschlechter sind nur in wenigen Ausnahmefällen über äußere Merkmale, z.B. Titillatorenform oder Flügelfärbung bestimmbar. Subimagines fallen jedoch bei Emergenzuntersuchungen an Bächen mit selbsttötenden Fallen häufig in großen Mengen an.

Einen Ausweg aus der Bestimmungsmisere bietet die Exochorionstruktur der Eier, die, anders als bei imaginal langlebigeren Insektenordnungen, bereits im letzten Larvenstadium völlig ausgereift sind! Sie zeigen somit von wenigen Ausnahmen z.B. in der Gattung *Baetis* abgesehen, die gleichen Oberflächenstrukturen, wie Subimagines und Weibchen. Wegen der Bestimmbarkeit subimaginaler Eier kann nun auch Emergenzmaterial zeitsparend bearbeitet werden. Ein weiterer Vorteil ist der geringe Präparationsaufwand bei außerordentlich guter Verfügbarkeit an Material, da selbst kleine Weibchen mehrere Hundert bestimmbarer Eier tragen. Im internationalen Schrifttum spielt das Eistadium entsprechend eine wesentliche Rolle und auch die hier behandelten Arten sind bereits bei SOWA (1971), SOWA & DEGRANGE (1987) und KLONOWSKA-OLEJNIK (1997) beschrieben. Letztgenannte Autorin hat eine sorgfältige Studie mittels Raster Elektronenmikroskopie für zahlreiche europäische Arten vorgelegt. Eine vergleichende lichtmikroskopische Betrachtung ist

jedoch derzeit nicht verfügbar und die Schwierigkeit der Umsetzung des rastermikroskopischen Bildes in das selbst am Lichtmikroskop erblickte ist einer der Hauptgründe für die nach wie vor geringe Anzahl von deutschen Bearbeitern, die das Eistadium in die routinemäßige Bestimmungspraxis miteinbeziehen.

### 3. Methode

Das Material stammt durchgehend aus Rheinland-Pfalz. Eier wurden dem mittleren Abdominalbereich von schlupffreien Larven (schwarze Flügelscheiden!), weibliche Subimagines und Weibchen entnommen. Die Artzugehörigkeit des verwendeten Materials wurde durch Aufzuchten im Aquarium, Entnahme von Nymphen aus reinen Populationen, Auswertung von Subimagines aus Emergenzfallen, an denen nur 1 Art auftrat, sowie durch Abgleich mit Beschreibungen aus der Literatur (s.o.) getätigt.

Als Mikroskop für die routinemäßige Bestimmung im Hellfeld wurde ein Kursmikroskop der Firma Leitz (ohne Typenbezeichnung) mit bis zu 1000-facher Vergrößerung, zur Zeichnung eine Zeicheneinrichtung benutzt. Eine Phasenkontrasteinrichtung ist außerordentlich hilfreich, da sie die Oberflächenstrukturen plastischer erscheinen läßt. Sie ist aber nicht zwingend erforderlich.

Für die Betrachtung sollten zunächst mit Vergrößerung 100 - 200 x, für die Details dann mit 400 x, 630 x oder bis 1000 x gearbeitet werden. Obwohl die Zeichnungen nach Vergrößerungen von 1000 x angefertigt wurden, ist mit Erfahrung eine mittlere, d.h. 400 x Vergrößerung ausreichend.

Die Bestimmung kann dann direkt in einem Tropfen Wasser oder Alkohol erfolgen, Dauerpräparate wurden in Polyvinyl-Lactophenol (HEINZE 1952) angefertigt. Die enthaltene Milchsäure hellt das ganze Ei rasch auf, so daß die Strukturen der Oberfläche nach 1-3 Tagen besser sichtbar sind, als im Frischpräparat. Für eine dauerhafte Konservierung erscheint mir dieses Medium wegen fortschreitender Aufhellungstendenzen jedoch nicht optimal geeignet.

### 3.1 Schwierigkeiten beim Auffinden der Oberflächenstrukturen

Der Dotter füllt das gesamte Ei vollständig aus. Er besteht im wesentlichen aus Proteinen, Lipiden und Glykogen (DETTNER & PETERS 1999) und bietet im lichtoptischen Bild ein unregelmäßiges Bild von mehr oder weniger stark differenzierten Klumpen. Diese überdecken immer auf den ersten Blick die wesentlich feineren Strukturen des Chorions. Zunächst sollte man deshalb versuchen, im äquatorialen Bereich des Eies ein KCT oder aber eine Mikropyle scharf einzustellen, um sicher zu gehen, sich in der richtigen optischen Ebene zu befinden.

Eine weitere Schwierigkeit kann auftreten, wenn Follikel-epithelzellen der Ovariolen sich nicht vollständig vom Ei gelöst haben. Dann wird die Chorionstruktur von diesem Nährgewebe vollständig maskiert und eine Bestimmung ist nicht möglich. Sind keine unmaskierten Eier vorhanden, so kann versucht werden, das Gewebe mit leichten Bewegungen des Deckglases zu entfernen. Ist dies nicht erfolgreich kann das Gewebe durch etwa 1-tägige Mazeration mit einer 10 % KOH Lauge (Vorsicht stark ätzend!) entfernt werden. Vor einer Präparation sollten dann die Eier zunächst in Wasser oder 70 % Alkohol gewaschen werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Eimorphologie

Die untersuchten, im Umriss etwa ovalen und im Querschnitt runden Eier der Gattung *Rhithrogena* sind typisch für die Familie der Heptageniidae. Sie besitzen spiralig aufgewundene mit einer knopfförmigen Struktur endende Fäden (engl. KCT von knob-terminated coiled threads), die sich bei Kontakt mit Wasser aufzwirbeln und das Ei am Grund verankern. Diese KCT's sind nicht gleichmäßig über das Ei verteilt, sondern konzentrieren sich stets auf einen der Pole (Abb. 1). Anzahl, Verteilung und Größe der KCT's können sehr gute diagnostische Unterschiede auch im Artbereich bieten. Im vorliegenden Fall sind sie jedoch zur Diagnose weniger gut als das Exochorion geeignet. Die Eier sind bei allen

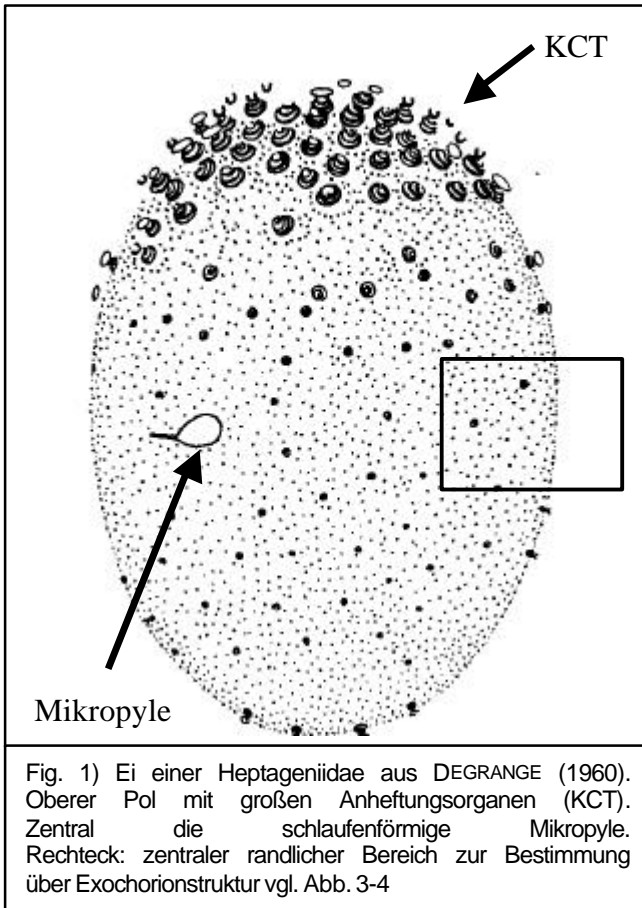


Fig. 1) Ei einer Heptageniidae aus DEGRANGE (1960). Oberer Pol mit großen Anheftungsorganen (KCT). Zentral die schlaufenförmige Mikropyle. Rechteck: zentraler randlicher Bereich zur Bestimmung über Exochorionstruktur vgl. Abb. 3-4

3 Arten etwa 170 – 200 x 100 – 130 µm groß. Etwa im Äquatorialbereich sind 2-3 schlaufenförmige Strukturen, die sog. Mikropylen, das sind die Eintrittsstellen für die Spermien zu sehen.

Das Exochorion ist nicht glatt, sondern mit kleinen warzigen Strukturen versehen, die je nach Größe in der Literatur als Mikro-, Meso- und Makrogranula bezeichnet werden. Die Form und das Arrangement dieser Granulae erweist sich nun als sehr konstantes diagnostisches Merkmal zur Unterscheidung der Arten *R. picteti*, *R. puytoraci* und *R. semicolorata*.

#### 4.2 Eitaxonomie

Zur Bestimmung soll das Exochorion etwa im äquatorialen Bereich untersucht werden (Abb. 1: Rechteck). Die Abbildungen 3-5 aus HAYBACH (1998) zeigen die Struktur und Details aus diesem

Bereich bei etwa 1000 - facher Vergrößerung. Diese Abbildungen sind durchgehend im gleichen Maßstab gezeichnet. Die dargestellten

Größenverhältnisse der Granulae verschiedener Arten sind somit vergleichbar. Die vergrößerten Schemata in den figs. 3-5 sind maßstabslos und verdeutlichen relevante Strukturen. Entsprechend der bei den Ephemeroptera keineswegs typischen hühnereiförmigen Form der Eier ist die Tiefenschärfe bei photographischer Darstellung gering. Das nachfolgende Bild zeigt dies am Beispiel der Exochorionstruktur von *Rhithrogena picteti* Sowa. Es soll den Vergleich zwischen Zeichnung und mikroskopischen Bild erleichtern.

#### 4.2.1 *Rhithrogena picteti* SOWA 1971

Oberfläche des Eichorion dicht und fast gleichmäßig mit annähernd gleichgroßen, in Aufsicht mehr oder weniger runden Makrogranulae bedeckt. Diese dicht stehend, pflasterartig, Zwischenräume "glatt", fast ohne Mikrogranulae (figs 2, 3a). Bei Seitenansicht

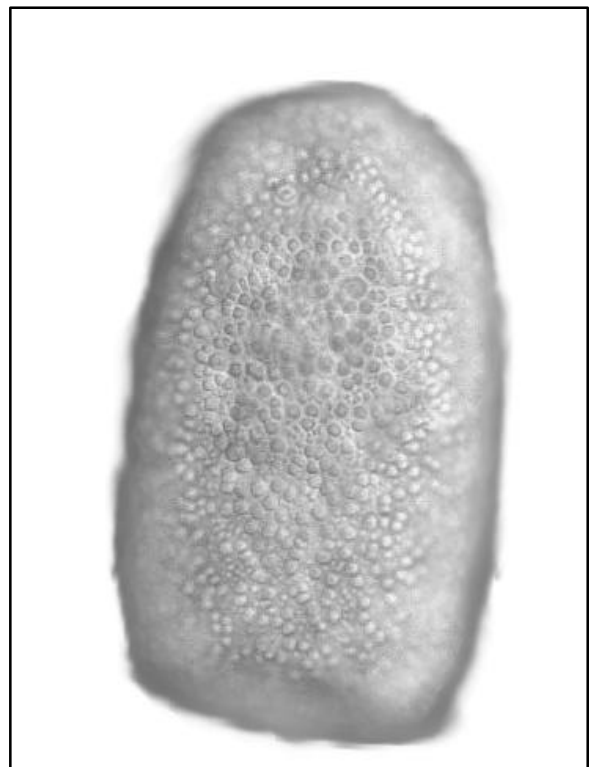
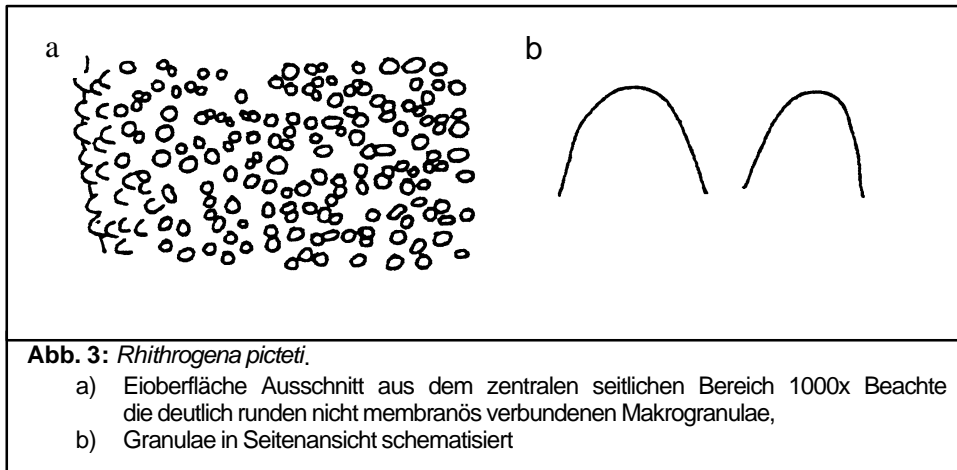


Abb. 2) *Rhithrogena picteti*  
Ei aus Subimago. Vergrößerung etwa 250 x. Phasenkontrast. Beachte die dicht stehenden großen runden Granulae auf der Oberfläche.

(zentraler Rand) erscheinen die Makrogranulae deutlich rund (fig. 3b). Die Makrogranulae sind nicht membranös verbunden.

Ökologie: In Quellbächen und Bächen der oberen Forellenregion. Hypokrenon u. Epirhithon.



4.2.2 *Rhithrogena puytoraci* SOWA & DEGRANGE 1987

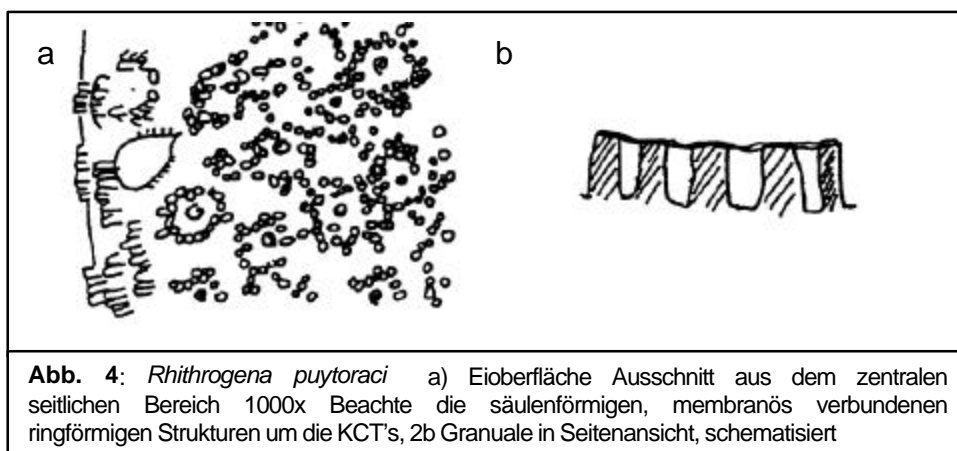
Oberfläche des Eiochorion mit einer Vielzahl unterschiedlich großer, jedoch im Vergleich zu *R. picteti* deutlich kleineren Meso- und Mikrogranulae bedeckt. Die Mesogranulae bilden häufig einen Ring aus zwei bis drei Reihen um die KCT's, welche über die ganze Eioberfläche verstreut sind (Abb. 4a). In Seitenansicht erscheinen die Granulae säulenförmig, höher als breit. Sie sind (das sieht zumindest bei lichtoptischer Betrachtung so aus) über eine Art Membran miteinander verbunden, was beim Fokussieren über den Seitenrand deutlich wird (Abb. 4b)

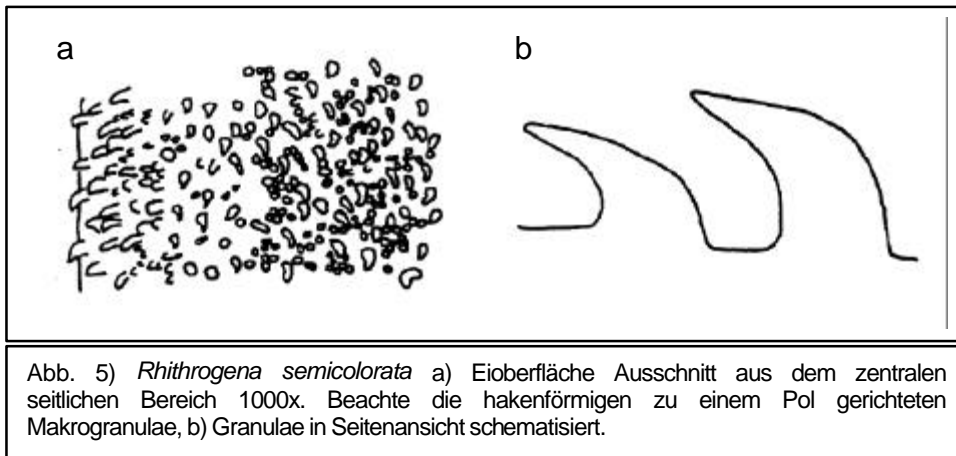
Ökologie: In Bächen der oberen und mittleren Forellenregion, Epi- bis Metarhithron.

4.2.3 *Rhithrogena semicolorata* (CURTIS 1834)

Oberfläche des Eiochorion dicht mit einer Vielzahl unterschiedlich großer und unterschiedlich geformter Makro-, Meso- und Mikrogranulae übersät (Abb. 5). In Aufsicht daher ähnlicher *R. puytoraci* (Abb. 4) als *R. picteti* (Abb. 3). Beim Fokussieren über den Seitenrand erscheinen die Makrogranulae deutlich gekrümmt, hakenförmig (Abb. 5b), stets überwiegend in Richtung des Poles, der die kleineren KCT's trägt, gerichtet. Die Granulae sind nicht über eine Membran miteinander verbunden.

Ökologie: In Bächen und kleinen Flüssen der mittleren und unteren Forellenregion, Meta- bis Hyporhithron.





## 5. Danksagung

Herrn Dipl.-Biol. Klaus Enting, Mainz und dem Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz habe ich für die Möglichkeit zur Anfertigung der Mikrofotographie zu danken. Special thanks to Craig Macadam (Edinburgh) for improving the English text.

## 6. Schriftenverzeichnis

- BAUERNFEIND, E. & HUMPECH, U. H. (2001): Die Eintagsfliegen Zentraleuropas (Insecta: Ephemeroptera): Bestimmung und Ökologie. 239 S. Wien: Verlag des Naturhistorischen Museums Wien.
- DEGRANGE, C. (1960): Recherches sur la reproduction des Éphéméroptères.- Travaux du Laboratoire d'Hydrobiologie et de Pisciculture de l'Université de Grenoble **50/51**: 7-193. Grenoble.
- DETTNER, K. & W. PETERS (1999): Lehrbuch der Entomologie 921 S. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- DOLISY, D. (2001): Les Éphémères du Grand-Duch, de Luxembourg : 1. Partie rhithrale des cours d'eau Faunistiques [Ephemeroptera].- *Ephemera* **2** (1) 2000: 7-14. Le Chesnay. France.
- HAYBACH, A. & SCHMIDT, T. (1997): Ein Beitrag zur Kenntnis der Heptageniidae-Fauna im nördlichen Hessen mit einem Nachweis von *Rhithrogena germanica* Eaton (Ephemeroptera: Heptageniidae).- *Lauterbornia* **31**: 41-48. Dinkelscherben.
- HAYBACH, A. (1998): Die Eintagsfliegen (Insecta: Ephemeroptera) von Rheinland-Pfalz - Zoogeographie, Faunistik, Ökologie, Taxonomie und Nomenklatur Unter bes. Berücksichtigung der Familie Heptageniidae und unter Berücksichtigung der übrigen aus Deutschland bekannten Arten. Dissertation Universität Mainz 417 S. + Anhang. (unpubl.)
- HAYBACH, A. & MALZACHER, P. (2002): Verzeichnis der Eintagsfliegen Deutschlands (Insecta: Ephemeroptera).- *Entomologische Zeitschrift* **112** (2): 34-45. Essen.
- HEINZE, K. (1952): Polyvinyl-Lactophenol-Gemisch als Einbettungsmittel für Blattläuse.- *Die Naturwissenschaften* **39**: 285-286. Berlin.
- KLONOWSKA-OLEJNIK, M. (1997): The Use of Egg Morphology in the Taxonomy of Some Species of the Genus *Rhithrogena* (Ephemeroptera, Heptageniidae). p. 372-381. In: *Ephemeroptera & Plecoptera: Biology-Ecology-Systematics*, LANDOLT, P. & SARTORI, M. [Eds.] 569 S., Mauron+Tinguely & Lachat SA, Moncor, Fribourg/Switzerland.
- SOLDÁN, T. & LANDA, V. (1999): A key to the Central European species of the genus *Rhithrogena* (Ephemeroptera: Heptageniidae). - *Klapalekiana* **35**: 25-37
- SOWA, R. (1971): Sur la taxonomie *Rhithrogena semicolorata* (CURTIS) et quelques espèces voisines d'Europe continentale (Ephemeroptera, Heptageniidae).- *Revue Suisse Zool.* **77**: 895-920. Genève.
- SOWA, R. & DEGRANGE, C. (1987): Sur quelques espèces européennes de *Rhithrogena* du groupe *semicolorata* (Ephemeroptera, Heptageniidae).- *Acta Hydrobiol.* **29** (4): 523-534. Krakow.
- TOMKA, I. & RASCH, P. (1993): Beitrag zur Kenntnis der europäischen *Rhithrogena* - Arten (Ephemeroptera, Heptageniidae): *R. intermedia* METZLER, TOMKA & ZURWERRA, 1987 eine Art der *alpestris* -Gruppe sowie ergänzende Beschreibungen zu fünf weiteren *Rhithrogena* - Arten.- *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* **66**: 255-281. Lausanne.

Anschrift des Verfassers: Dr. Arne Haybach,  
Tannenweg 3, D-55129 Mainz.

E-Mail: haybach@gmx.de

Manuskript eingegangen: 10.06.2002.