Zytologische Untersuchung des Leuchtorgans von *Luciola cruciata*

Von

Prof. Dr. **Bun-ichi Hasama**

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Medizinischen Akademie zu Keijo)

Mit 6 Textabbildungen

Eingegangen am 18. Mai 1942

I. Einleitung

Trotz dem allgemeinen lebhaften Interesse für die Biolumineszenz der Leuchtkäfer ließ sich bisher weder in histologischer noch in physiologischer Hinsicht eine eindeutige Entscheidung darüber ermöglichen, in welchem Mechanismus die Biolumineszenz erfolgt und auf welche Weise das rhythmische Aufblinken vor sich geht. Was in den Leuchtorganen der meisten Leuchtkäfer unsere besondere Aufmerksamkeit auf sich lenkt, ist die pralle Verteilung der Granula, der Träger der Leuchtsubstanz, in den Leuchtzellen sowie das Vorhandensein der sog. Tracheenendzellen, welche mit den Leuchtzellen in funktionellem Zusammenhang stehen. Die Granula scheinen nach mehreren Autoren trotz dauerndem Aufleuchten nie aufgebraucht zu werden. Daraus aber zu schließen, daß sie mit dem Leuchten überhaupt keine Beziehung haben, hieße doch zu weit gehen. Die Entdeckung der Tracheenendzellen durch Anwendung der Osmiumsäure verdanken wir SCHULZE; erstickt man lebende Leuchtkäfer von verschiedenen Spezies mit Osmiumsäuregas, so werden nach einigen Stunden die sternförmigen Tracheenendzellen mit ihren in verschiedenen Richtungen ausstrahlenden Fortsätzen infolge der in ihnen erfolgenden Osmiumreduktion schwarz gefärbt. Nachdem ein Tracheenstämmchen in eine Tracheenendzelle eingedrungen ist, teilt es sich in mehrere Kapillaren, welche in die Fortsätze der Tracheenendzellen einlaufen. Diese Tracheenendzellen scheinen wegen ihrer Reduktionsfähigkeit mit dem rhythmischen Aufblinken etwas zu tun zu haben. Bei manchen tropischen Leuchtkäfern, bei denen eine konzentrisch angeordnete Gruppierung der Tracheenendzellen und der Leuchtzellen um die zuführenden Tracheen nachzuweisen ist, erfolgt ein streng rhythmisches Aufblinken.

Was den feineren Bau des Leuchtorgans des einheimischen, zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit dienenden Leuchtkäfers, d.h. von *Luciola cruciata* betrifft, so ist als bisherige Literatur nur die Abhandlung von OKADA anzugeben, und es herrschen darin noch Unklarheiten. Sollte diese meine Arbeit, welche hauptsächlich den Bau der Tracheenendzellen und den morphologischen und funktionellen Zusammenhang derselben mit den

Leuchtzellen behandelt, zur Lösung der Widersprüche im Leuchtorgan der Leuchtkäfer Einiges beitragen und damit zu weiteren Untersuchungen den Anstoß geben, so wäre damit meine Absicht erreichen.

II. Methode

Zur histologischen Untersuchung des Leuchtorgans und besonders der Tracheenendzellen in demselben wurde die Erstickungsmethode mit Osmiumsäuregas angewandt. Lebende Leuchtkäfer werden in einem Beutel aus Gaze zusammen eingeschlossen. Nachdem 5 ccm wässriger Osmiumsäurelösung (1:400) in eine Flasche von 50 ccm Volum eingegossen worden ist, wird der Beutel mit den Leuchtkäfern an einem Faden in der Flasche aufgehängt und die Flasche dann mit einem Pfropfen luftdicht verschlossen, wodurch sie mit Osmiumsäuregas erfüllt wird. Die Leuchtkäfer gehen meist nach einigen Stunden an Erstickung mit Osmiumsäuregas zugrunde. Nur selten bleiben sie bei Einatmung desselben über 24 Stunden am Leben. Mit Zunahme der Einatmung von Osmiumsäuregas wird der ganze Körper und besonders die Leuchtorgane, welche vor der Einatmung als weiße Flecke zu erkennen sind, allmählich geschwärzt. Die erstickten Leuchtkäfer werden dann in Formalin-Alkohol-Eisessig (Formalin 12 ccm, Alkohol 12 ccm und Eisessig 1 ccm) 24 Stunden lang fixiert. Manchmal wurden auch die noch lebenden Leuchtkäfer in der obigen Lösung fixiert, wenn bei ihnen die Leuchtorgane durch Einatmung von Osmiumsäuregas genügend gebräunt waren. Nachdem die so erstickten Leuchtkäfer in Wasser 24 Stunden lang gespült worden sind, wird der unnötige vordere Teil der Käfer abgeschnitten. Der zurückbleibende hintere Teil bleibt dann mehrere Tage in 60%igem Alkohol liegen und wird mit alkoholischer Boraxkarminlösung gefärbt, welche wie folgt hergestellt wird. Bestes Karmin 2–3 g wird mit Borax 4 g fein verrieben und das Gemisch in 100 ccm kochendem destillierten Wasser gelöst. Nach Abkühlung wird 100 ccm von 70%igem Alkohol zu dieser Lösung beigefügt. Man läßt diese alkoholische Boraxkarminlösung einige Wochen stehen und filtriert sie dann vom Bodensatz ab. Das Versuchsmaterial wird während 1–3 Tagen mit dieser Farbstofflösung gefärbt und dann während mehrerer Tage zur Differenzierung in 70%igen Alkohol gebracht, welcher Salzsäure in einer Konzentration von 0,25:100 enthält. Diese Flüssigkeit (Salzsäurealkohol), in welche das Versuchsmaterial eingetaucht ist, wird mehrmals gewechselt, bis sie endlich trotz Eintauchen des gefärbten Versuchsmaterials keinen roten Farbenton mehr annimmt. Das Versuchsmaterial wird dann in 70%igen Alkohol gebracht und zum Zweck der Härtung und der Einbettung ferner durch eine Alkoholreihe in Paraffin eingebettet. Schließlich wird es in 8 μ Dicke geschnitten. Durch das Karmin werden die Kerne der Leuchtzellen rot gefärbt, während nur die Tracheenendzellen mit ihren Fort-

sätzen, den Tracheenkapillaren und Kernen schwarz oder bräunlich werden. Neben der obigen Behandlung mit Osmiumsäure und nachfolgender Karminfärbung geschah auch die gewöhnliche Färbung mit Hämatoxylin-Eosin oder mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN, wobei die Methode der Fixation und der Einbettung dieselbe war wie bei der Osmiumsäurebehandlung mit nachfolgender Karminfärbung.

III. Feinerer Bau des Leuchtorgans

Das Männchen der *Luciola cruciata* besitzt an der Ventralseite des vorletzten sowie des letzten Abdominalsegments je ein Leuchtorgan, welches der Hypodermis unmittelbar anliegt und die ganze ventrale Seite der betreffenden Segmente einnimmt (Abb. 1). Die Chitindecke über

Abb. 1. Längsschnitt durch das Abdomen. A Weibchen und B Männchen. Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. a Leuchtorgan des Weibchens, b vorderes und c hinteres Leuchtorgan des Männchens. Vergr. 35fach.

den Leuchtorganen ist pigmentlos, so daß diese als weiße Flecke durchschimmern. Das Weibchen der *Luciola cruciata* trägt ein Leuchtorgan im drittletzten Abdominalsegment. Es nimmt auch die ganze ventrale Seite des betreffenden Segments ein, liegt der Hypodermis unmittelbar an und schimmert durch die pigmentlose durchsichtige Chitindecke als ein weißer Fleck durch.

Ebenso wie bei anderen Arten von Leuchtkäfern besteht das Leuchtorgan der *Luciola cruciata* aus einer durchsichtigen ventralen Schicht (Leuchtzellschicht) und einer undurchsichtigen dorsalen Schicht (Uratzellschicht) (Abb. 2). Die Undurchsichtigkeit dieser Schicht beruht darauf, daß die Zellen in ihr dicht gedrängt Konkretionen von harnsaurem Ammoniak enthalten, welche in Natronlauge, Kalilauge, Eisessig, Glycerin, namentlich bei erhöhter Temperatur löslich sind. Die beiden Schichten

sind von gleicher Dicke und werden von einer unregelmäßigen Linie ziemlich scharf abgegrenzt. Die Leuchtzellen enthalten prall gedrängt

Abb. 2. Querschnitt durch das Leuchtorgan des Weibchens. Färbung mit Hamatoxylin-Eosin. *a* Leuchtzellschicht und *b* Uratzellschicht. Vergr. 490fach.

Abb. 3. Granula in den Leuchtzellen. Färbung mit Eisen-hämatoxylin nach HEIDENHAIN. Der rechte obere helle Teil zeigt Uratzellschicht ohne Granula. Vergr. 1000fach.

feine Granula, welche gerne Eosin bzw. Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN aufnehmen (Abb. 3). Die Leuchtzellen sind polyedrisch, überall fast gleich groß, gegeneinander scharf abgegrenzt und enthalten je einen chromatinreichen Kern. Die Urat- und die Leuchtzellen zeigen jede für sich in ihrer Größe und Form keinen Unterschied. Selbst nach wiederholtem Aufleuchten während langer Zeit bleiben die Granula in den Leuchtzellen unaufgebraucht und zwar in Zahl, Größe und Verteilung gleich wie nach längerem Verlöschen des Leuchtorgans. Es wäre aber voreilig, daraus zu schließen, daß die Granula überhaupt mit dem Leuchten in keinerlei Zusammenhang stehen. Größe, Form und Verteilung der Granula zeigen bei *Luciola cruci-*

ciata keinen geschlechtlichen Unterschied.

An den Präparaten des Leuchtorgans der *Luciola cruciata*, welche mit Osmiumsäuregas erstickt worden ist, sieht man in der Leuchtzellschicht überall geschwärzte sternförmige Gebilde (Tracheenendzellen), von welchen 3–4 ebenfalls geschwärzte Fortsätze nach verschiedenen Richtungen ausstrahlen (Abb. 4 u. 5). Die Fortsätze, welche fein zugespitzt sind oder wie abgerissen aufhören, sind mit denen von den benachbarten Tracheenendzellen scheinbar nicht verbunden. Sie scheinen

also an den meisten Stellen sölitär zu enden und laufen immer zwischen den Leuchtzellen, dringen aber nie in dieselben ein. Das Tracheen-

Abb. 4. Geschwärzte Tracheenendzellen des Weibchens nach Erstickung mit Osmiumsäuregas. Färbung mit Boraxkarmin. Vergr. 800fach.

stämmchen geht in eine Tracheenendzelle hinein, um sich dort in 3-4 gleichfalls geschwärzte Kapillaren zu teilen, welche in den Fortsätzen eine Strecke lang verlaufen und dann plötzlich endigen. Die Kapillaren übertreffen aber an Länge die Fortsätze nicht (Abb. 6). Man sieht jedoch weder Verzweigung noch anastomosenbildung der

Kapillaren; auch kein Zerfallen dieser in feinere Kapillaren ist zu bemerken. Die Tracheenstämmchen verlieren vor ihrem Eintritt in die

Tracheenendzellen ihre Spiralen. In den Tracheenendzellen findet sich stets ein Kern, der dunkler gefärbt ist als das Zellprotoplasma. An sehr intensiv gefärbten Präparaten ist der Kern schwer zu erkennen. Die Tracheenkapillaren sind auch durch die Osmiumsäure schwarz gefärbt. In den

Abb. 5. Geschwärzte Tracheenendzellen des Männchens nach Erstickung mit Osmiumsäuregas. Färbung mit Boraxkarmin. Vergr. 800fach.

Leuchtzellen ist keine deutliche Osmiumreduktion, also keine merkliche Verschwärzung zu beobachten, ausgenommen daß die den Tracheenendzellen anliegenden Teile der Leuchtzellen sich mäßig verschwärzen. Die übrigen Leuchtzellen werden höchstens leicht gebräunt. Die Osmiumreduktion beginnt von der Bifurkationsstelle der Tracheenkapillaren an.

Abb. 6. Halbschematische Darstellung einer Tracheenendzelle. a Trachee, b Tracheenendzelle, c Tracheenkapillare und d Leuchtzelle.

Um die Tracheenkapillaren zu verfolgen, ist es ratsam die Leuchtkäfer kürzere Zeit das Osmiumsäuregas einatmen zu lassen. Wenn man nämlich das Gas zu lange wirken läßt, so werden die Tracheenkapillaren und die Kerne durch die starke Schwärzung des Tracheenendzellprotoplasmas verdeckt.

Welche biologische Bedeutung kommt nun den Tracheenendzellen zu? Die Schwärzung

der Tracheenendzellen nach Einatmung von Osmiumsäuregas beruht darauf, daß Körnchen des metallischen Osmiums in den Zellen abgelagert werden. Wegen der Reduktionsfähigkeit der Tracheenendzellen wird die eingeatmete Osmiumsäure dort in schwarzes metallisches Osmium reduziert — Osmiumreduktion. Die von den Tracheenendzellen ausstrahlenden Fortsätze, in denen die Tracheenkapillaren verlaufen, nehmen ihren Lauf zwischen den Leuchtzellen. Also ist es höchst wahrscheinlich, daß in diesen Tracheenendzellen, dem Verbindungsapparat der Tracheen mit den Leuchtzellen, eine rhythmische Entziehung des in die Tracheen eingeführten Sauerstoffes erfolgt, anders ausgedrückt, daß eine rhythmische Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr in die Leuchtzellen — also der Oxydation der Leuchtsubstanz — in ihnen stattfindet, wodurch ein rhythmisches Verlöschen des Leuchtorgans beobachtet werden muß. Dafür sprechen die Tatsachen, daß bei verschiedenen tropischen Leuchtkäfern, bei welchen ein streng rhythmisches Aufblinken mit sogar noch strengerem Rhythmus als bei *Luciola cruciata* und *Pyrocoelia rufa* erfolgt, eine Differenzierung der Leuchtvorrichtung mit dem Bild einer konzentrischen Gruppierung der Tracheenendzellen und der Leuchtzellen um die zuführenden Tracheen zu beobachten ist und ferner daß bei den Larven von *Luciola cruciata* und *Pyrocoelia rufa* mit noch unentwickelten Tracheenendzellen auch kein rhythmisches Aufblinken stattfindet. Gegen diese Annahme könnte man freilich den Einwand machen, daß die Tracheenendzellen mit der rhythmischen Regulierung der Oxydation der Leuchtsubstanz keine Beziehung zu haben brauchen, weil diese Zellen nach LEYDIG auch in der Larve von *Corethra plumicornis*, nach SCHULTZE an den Samenschläuchen von *Lampyrus splendidula*, in der leuchtunfähigen Uratzellschicht bei einer Art Leuchtkäfer (*Photuris pennsylvanica*) und auch bei manchen nicht leuchtenden Käfern vorkommen.

Diese Befunde schließen aber deswegen die Möglichkeit einer Beziehung der Tracheenendzellen zu der rhythmischen Regulierung der Oxyda-

tion der Leuchtsubstanz nicht aus, weil diese Zellen bei den oben erwähnten Tieren weit weniger vollkommen entwickelt sind, als bei *Luciola cruciata*.

IV. Zusammenfassung

1. Ebenso wie bei anderen Leuchtkäfern besteht das Leuchtorgan der *Luciola cruciata* aus einer Leuchtzellschicht und einer Uratzellschicht. In der Leuchtzellschicht sind Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN besonders gern aufnehmende feine Granula prall gedrängt enthalten, während in den Uratzellen Konkretionen von harnsaurem Ammoniak vorgefunden werden. Nach Einatmung von Osmiumsäuregas lassen sich überall in der Leuchtzellschicht sternförmige, mit 3–4 Fortsätzen versehene Tracheenendzellen erkennen, welche regellose Anordnung aufweisen. Diese Fortsätze verlaufen zwischen den Leuchtzellen, ohne Anastomosen zu bilden oder in die Leuchtzellen einzudringen.

2. Eine Teilung der Tracheenstämmchen in 3–4 Tracheenkapillaren erfolgt in den Tracheenendzellen, nachdem sie ihre Spiralen verloren haben. Die Kapillaren dringen in die 3–4 Tracheenendzellenfortsätze, welche zugespitzt sind oder plötzlich abreißen, hinein und können in ihnen noch eine Strecke lang verfolgt werden. Die Osmiumreduktion erfolgt nur in den Tracheenendzellen mit ihren Fortsätzen, während sie in den Leuchtzellen mit Ausnahme der den Tracheenendzellen anliegenden Teile der Leuchtzellen nicht stattfindet.

3. Bei *Luciola cruciata* spielen die mit Reduktionsfähigkeit begabten Tracheenendzellen die Rolle eines Regulators der rhythmischen Sauerstoffzufuhr in die Leuchtzellen und also der Verbrennung der Leuchtsubstanz, was ein rhythmisches Verlöschen des Leuchtorgans bedingt.

Schrifttum

- Bongardt, J., Beiträge zur Kenntnis der Leuchtorgane einheimischer Lampyriden. Z. wiss. Zool. 75, 1 (1903).
- Buchner, P., Sind die Leuchtorgane Pilzorgane? Zoolog. Anz. 45, 17 (1914).
- , Tier und Pflanze in Symbiose. S. 664. Berlin: Bornträger 1930.
- Dahlgren, U., The production of light by animals. Journ. Franklin Inst. 183, 211, 323, 596 (1917).
- Emery, C., Untersuchungen über *Luciola italica*. Z. wiss. Zool. 40, 338 (1884).
- Geipel, E., Beiträge zur Anatomie der Leuchtorgane tropischer Käfer. Z. wiss. Zool. 11?, 239 (1915).
- Harvey, E. N. u. P. E. Snell, The analysis of bioluminescences of short duration recorded with photoelectric cell and string galvanometer. J. Gen. Physiol. 14, 527 (1931).
- Hasama, B., Potentialschwankungen am Leuchtorgan des Gluhwurms. Protoplasma 33, 103 (1939).
- , Über die bioelektrischen Phänomene am Ei von *Hynobius nebulosus* bei künstlicher Befruchtung. Protoplasma 22, 597 (1934).
- , Über die elektrobiologischen Erscheinungen beim Furchungsprozeß des Eies des *Hynobius nebulosus*. Pflügers Arch. 232, 798 (1933).
- , Über die Biolumineszenz bei *Chetopterus variopedatus* RENIER im bioelektrischen sowie histologischen Bild. Z. wiss. Zool. 154, 357 (1941).

- Hasama, B., Über die Biolumineszenz bei einem fernöstlichen Leuchtintenfisch, der *Watasenia scintillans* BERRI im bioelektrischen sowie histologischen Bild. Im Druck in Z. wiss. Zool.
- , Über die Aktionsströme des Schließ- sowie des Fußmuskels bei der Venusmuschel. Z. Biol. 100, 394 (1940).
- , Über die Biolumineszenz bei *Pyrocoelia rufa* im Aktionsstrombild sowie im histologischen Bild. Im Druck in Jap. Journ. Zool.
- , Über die Biolumineszenz bei *Luciola lateralis* im zytologischen Bild sowie im Potentialbild ihres Leuchtorgans. Cytologia 12, 366 (1942).
- , Über die Biolumineszenz der Larve von *Luciola cruciata* sowie von *Pyrocoelia rufa* im Aktionsstrombild und im histologischen Bild ihres Leuchtorgans. Cytologia 12, 378 (1942).
- Lund, E. J., On the structure, physiology and use of photogenic organs, with special reference to the Lampyridae. Journ. Exper. Zool. 11, 415 (1911).
- Maluf, N. S. R., Zit. n. Annual review of biochemistry 10, 532 (1941).
- Okada, Y. K., Origin and development of the photogenic organs of lampyrids, with special reference to those of *Luciola cruciata* MOTSCHULSKY and *Pyrocoelia rufa* ERN. OLIVIER. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. B 10, 209 (1935).
- , Luminous apparatus of lampyrids. Shokubutsu oyobi Dobutsu (jap.) 3, 1312, 1475, 1638, 1799 (1935).
- Okada, T., S. Koishi u. I. Yasuda, Studien über die Biolumineszenz von Leuchtkäfern. Journ. of the Provincial Medical College in Kyoto 19, 993 (1937).
- Townsend, A. B., The histology of the light organs of *Photinus marginellus*. Americ. Nature 38, 127 (1904).
- Vogel, R., Beiträge zur Anatomie und Biologie der Larve von *Lampyrus noctiluca*. Zoolog. Anz. 39, 515 (1912).
-