

Aus der Eidgenössischen Versuchsanstalt für Obst-, Wein-  
und Gartenbau, Wädenswil, Kt. Zürich.

# Untersuchungen über die Struktur der Kutikula des Puppentönnchens der Kirschfliege, *Rhagoletis cerasi* L.

Von

R. WIESMANN (Wädenswil).

(Mit 4 Abbildungen im Text.)

(Als Manuskript eingegangen am 18. April 1938.)

Bei den Untersuchungen über die Bekämpfung der seit 1930 in der Schweiz epidemisch auftretenden Kirschfliege wurde festgestellt, dass die einzig wirksame Bekämpfung dieses Schädling nur im Puppenstadium erfolgen kann (WIESMANN, 1934—1936). Beim weitem Studium dieser Frage musste daher das Puppentönnchen eingehend untersucht werden, da die Struktur desselben für die Wirkung eines Mittels ausschlaggebend ist. Aber nicht nur vom praktischen Standpunkte aus, sondern auch rein wissenschaftlich ist das Problem interessant, denn über die feinem Strukturen der Kutikula des Tönnchens der cyclorhaphen Dipteren sind wir schlecht unterrichtet.

## Die Struktur der Tönnchenkutikula.

Bei der Kirschfliege bildet sich das Tönnchen, wie bei allen cyclorhaphen Dipteren, aus der erhärteten Kutikula der ausgewachsenen Larve. Die Kutikula des Kirschfliegentönnchens besteht aus fünf deutlich voneinander unterscheidbaren Schichten (Abb. 1).

Die *E p i k u t i k u l a*, im Durchschnitt  $0,75 \mu$  dick, überzieht lückenlos die Kutikula als feines, hellbraunes, quengerunzeltes Häutchen. Sie lässt sich mit Anilinplasmafarben nicht tingieren, nimmt dagegen mit der Farblösung von KÜHNELT, sowie mit Su-

dan III eine intensiv gelbrote Farbe an, während die übrigen Kutikularschichten, exkl. der Exokutikula, ungefärbt bleiben.

Die *Exokutikula*, durchschnittlich  $1\ \mu$  dick, ist gelbbraun gefärbt. Im Querschnitt lässt sich an ihr eine feine, vertikale Stäbchenstruktur feststellen. Färberisch verhält sie sich wie die *Epikutikula*.

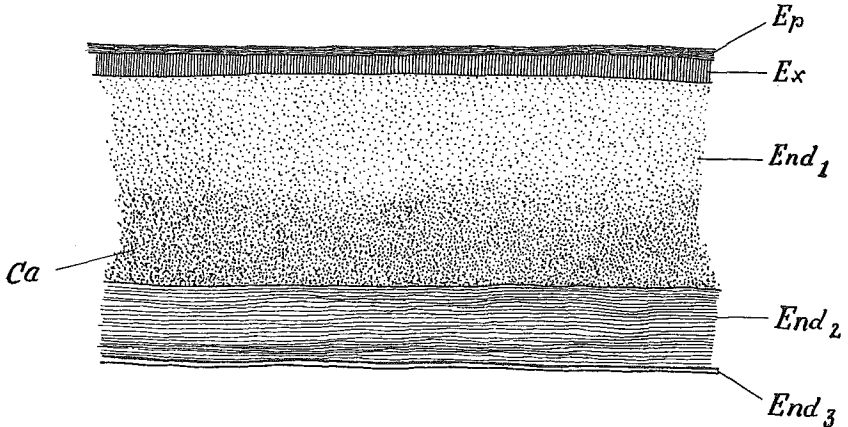


Abb. 1.

Querschnitt durch die Kutikula des *cerasi*-Tönnchens. Ep = Epikutikula. Ex = Exokutikula, End<sub>1-3</sub> = Endokutikula<sub>1-3</sub>, Ca = Kalkeinlagerungen.

Die *Endokutikula*,  $25-29\ \mu$  dick, besteht aus drei Schichten, die sich in bezug auf Struktur und Farbspeicherung unterscheiden. Direkt an die *Exokutikula* anschliessend, liegt eine  $15-23\ \mu$  dicke, ungefärbte Schicht, die beim unbehandelten Tönnchen dicht mit feinen, lichtbrechenden Granulae durchsetzt ist, die von Innen nach Aussen an Mächtigkeit abnehmen. Es sind dies Einlagerungen von kohlen saurem Kalk, über dessen Herkunft noch zu sprechen sein wird. In mit Diaphanol behandelten Schnitten ohne Kalk findet man an den ehemals mit Kalk inkrustierten Stellen feine, mit der Immersion eben noch sichtbare Poren. Zudem ist diese Kutikularschicht aus vielen Lamellen zusammengesetzt. Färbt man unbehandelte Schnitte durch das Tönnchen mit Plasmafärbungen, dann speichert diese äussere Schicht der *Endokutikula* die Farbstoffe sehr stark. — Die zweite *Endokutikularschicht*, aus vielen Lamellen bestehend, ist hart und spröde, in der Aufsicht völlig strukturlos. Sie löst sich leicht von der ersten *Endokutikularschicht* ab. Mit Plasmafärbungen färbt sie sich nur schwach. — Als dritte, innerste *Endokutikularschicht* gewahrt man eine  $1-2\ \mu$  dicke, stark

lichtbrechende Schicht, ohne sichtbare Struktur, sich scharf von der zweiten Schicht absetzend. Mit Plasmafarben wird sie sehr stark gefärbt.

Mit der Methode von SCHULZE und KUNIKE lässt sich die Tönnchenkutikula in drei Schichten zerlegen. Epi- und Exokutikula ergeben zusammen eine, die kalkführende Endokutikula eine zweite und die mittlere und die innere Endokutikularschicht eine dritte Schicht.

### Chemisches Verhalten der Tönnchenkutikula.

Die Kutikula des *cerasi*-Tönnchens zeigt in heisser, gesättigter Kalilauge gekocht keine Veränderungen. Nach Diaphanolbehandlung tritt in der Endokutikula bei Einwirkung von Jod-Jodkali und Chlorzinkjod eine intensive Violettfärbung ein, Epi- und Endokutikula zeigen dagegen keinerlei Färbung. Auch die Biuret- und Xanthoproteinreaktion sowie der Chitinnachweis mit  $\alpha$  und  $\beta$  Naphthol nach SCHULZE fallen nur in der Endokutikula positiv aus, ein Beweis dafür, dass alle drei Endokutikularschichten aus Chitin bestehen. Bringt man unbehandelte Schnitte durch das Tönnchen in konzentrierte Salz- oder Schwefelsäure, dann lösen sich zuerst die Kalkeinlagerungen in der Endokutikula heraus, dann quillt die Endokutikula stark auf, wobei die Schichtung sehr deutlich wird, um sich unter schwacher Schlierenbildung aufzulösen. Zurück bleiben noch Epi- und Exokutikula, die sich auch in heissen Säuren in keiner Weise verändern. Epi- und Exokutikula bestehen demnach nicht aus Chitin, was für die Epikutikula allgemein bekannt ist.

WIGGLESWORTH, der die Kutikula der tropischen, blutsaugenden Wanze *Rhodnius* eingehend untersuchte, fand, dass die Epikutikula ein komplexes Fett oder ein Wachs oder ein Gemisch von beiden darstellt. Wie KÜHNELT nimmt er an, dass es sich um Kutin oder Suberin handle. Weiter konnte er dann feststellen, dass bei *Rhodnius* die Exokutikula nicht nur aus Chitin, sondern auch aus Melanin, Protein und Cuticulin bestehe, also ähnliche Verhältnisse wie beim *cerasi*-Tönnchen vorliegen.

Aus meinen Untersuchungen ist ersichtlich, dass sowohl die Epi- wie auch die Exokutikula nicht aus Chitin bestehen, sondern aus Cutin oder Suberin, denn beide Schichten zeigen die Eigenschaften, wie sie KÜHNELT von der Epikutikula verlangt. Epi- und Exokutikula sind demnach lipoid-, fettartige Schichten, die infolge ihrer geringen Dicke mechanisch bedeutungslos, aber ein sehr wirksamer Schutz gegen die verschiedensten äussern Einflüsse abgeben. Sie bedingen auch die Unbenetzbarkeit und geringe Durch-

lässigkeit der Kutikula, was sich bei der Wirkung von Bekämpfungsmitteln zeigt.

### Inkrusten.

Im *cerasi*-Tönnchen lassen sich in der Exo- und der Endokutikula 2 schwache Grünfärbungen mit Kobalt-Rhodankali erzeugen. In diesen beiden Schichten sind demnach geringe Mengen von organischen Inkrusten eingelagert, die nach SCHULZE Pentosane und Hexosane sind. Sie machen das Chitin spröde.

Den grössten Teil der Inkrusten nehmen die Kalkeinlagerungen ein, feine Körnchen in der Endokutikula 1, über deren Herkunft im folgenden berichtet werden soll. Glüht man das leere, unbehandelte *cerasi*-Tönnchen, dann bleibt ein starker weisser Rückstand in der Form des Tönnchens zurück. Dieser Glührückstand verwandelt sich in verdünnter Schwefelsäure in Gipskristalle sowie in eine geringe Menge unlöslicher, amorpher Körnchen. In Salzsäure löst er sich bis auf einige amorphe Körnchen restlos auf. Lässt man die Säure abdampfen, dann bilden sich rosettenartige, leicht zerfliessende Kristalle von  $\text{CaCl}_2$ . Damit ist der Beweis geliefert, dass dieser Glührückstand Kalksalze darstellt, in dem in geringen Mengen Siliziumsalze vorhanden sind. Dass es sich bei der Einlagerung um reinen kohlen-sauren und nicht um harn-sauren Kalk handelt, zeigt die Murexidprobe am unbehandelten Tönnchen, die ganz negativ ausfiel.

Das Gewicht des eingelagerten Kalkes wurde durch Wägungen ermittelt:

10 leere Tönnchen ohne Deckel wiegen	0,59 mgr
Gewicht des Glührückstandes	0,31 mgr
Gewicht der Kutikula	0,28 mgr.

Wir sehen, dass der Kalkanteil des Tönnchens etwas mehr als die Hälfte des Gesamtgewichtes, also einen recht grossen Anteil, ausmacht.

Das Vorhandensein von Kalkeinlagerungen in der Kutikula der Insekten ist, ausser bei Fliegentönnchen, ziemlich selten. SCHÜTTE hat als erster im Winter-tönnchen von *Hydromyca livens* Calcium und Silizium in chemisch gebundener Form gefunden. Weiter hat KELIN im Tönnchen der Trypetide *Acidia heraclei* und bei verschiedenen *Agromycinen* Kalk an die innerste Endokutikula angelagert nachgewiesen. Es erhebt sich nun die Frage, woher dieser Kalk stammt. Bei Dipterenlarven, die in faulenden organischen Substanzen sowie in Pflanzengewebe leben, findet man in den Malpighischen Gefässen oder im Fettkörper Calciumkarbonat. LYONET und PANTEL fanden solches bei *Ptychoptera*-Larven,

KEILIN bei *Eristalis*, *Myatropa*, *Stratiomyis*, *Acidia* usw. KEILIN hat dann auch den Zusammenhang zwischen diesen Kalkeinlagerungen in den Malpighi und dem Kalk im Tönnchen erkannt. Er stellte fest, dass der Kalk im Tönnchen von *Acidia heraclei* aus den Malpighischen Gefässen der Larven stammt. Von den vier Malpighischen Schläuchen sind zwei normal ausgebildet, während die zwei andern in ihrem Endteil blasig aufgetrieben sind, in dem sich grosse Kalksphärite befinden. KEILIN konstatierte dann weiter, dass dieser Kalk mit der Verpuppung verschwindet, wahrscheinlich, von der perivisceralen Flüssigkeit aufgelöst, in die Exuvialflüssigkeit übergeht. Wird die letztere dann wieder resorbiert, dann bleibt das  $\text{CaCO}_3$  am Tönnchen von innen her haften. KEILIN nennt diesen Vorgang die ectysiale Elimination des Calciumcarbonates.

Es war von vorneherein zu erwarten, dass auch bei *Rhagoletis cerasi* ähnliche Verhältnisse vorliegen.

### Die Malpighi der *cerasi*-Larven.

Wie bei andern Dipterenlarven, bestehen auch bei der Kirschfliegenlarve die Malpighischen Gefässe aus zwei kurz vor der Einmündung in den Enddarm sich vereinigenden Schlauchpaaren. Je einer dieser Malpighischen Schläuche besitzt die normale, allgemeinbekannte langwurmformige Gestalt. Die andern beiden sind in ihrem Endteile zu weitlumigen Schläuchen umgebildet, die bei allen Larvenstadien dicht mit grössern und kleinern Kalkphäriten voll-

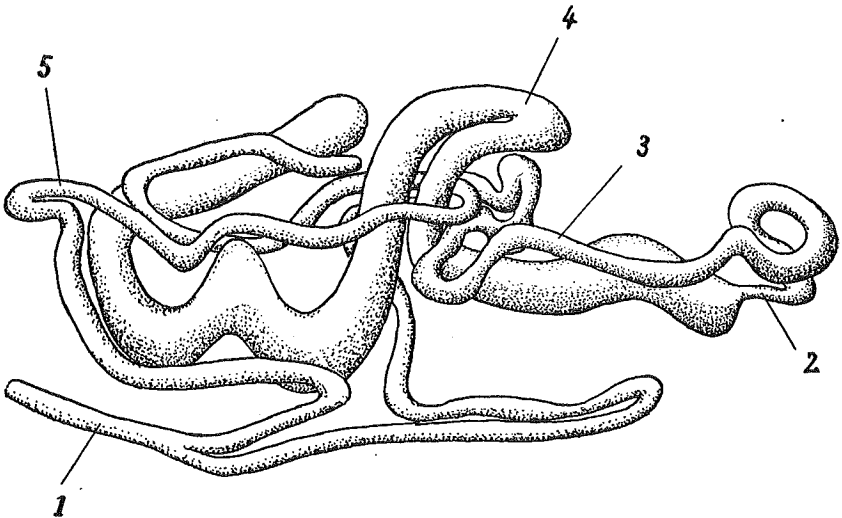


Abb. 2.

Die linke Hälfte der Malpighischen Schläuche einer ausgewachsenen *cerasi*-Larve. 1. Vereinigung der beiden Schläuche; 2. gangloser Übergang in das erweiterte Schlauchstück; 3. normaler Teil der erweiterten Malpighi; 4. erweiterter Teil der Malpighi, Konkrement-Reservoir; 5. unveränderter Malpighischer Schlauch.

gestopft sind. Dieser Teil der Malpighi ist im Larvenkörper schlangenförmig aufgewunden (Abb. 2). Während der vordere, normale Teil dieser Malpighi grosse Drüsenzellen und ein vacuoliges, stark sich tingierendes Plasma und im Querschnitt einen sternförmigen Sekretraum besitzt, ist der Abschnitt der Malpighi, der die Konkreme enthält, mit einem runden Lumen von 170—200  $\mu$  im Durchmesser ausgestattet. Die Zellkerne sind abgeplattet, langoval, chromatinarm und mit einem grossen Nucleolus ausgerüstet. Die Wandungen der konkrementführenden Schlauchteile sind nur 4—5  $\mu$  dick, gegen aussen eine sehr zellkernarme Peritonahülle aufweisend.

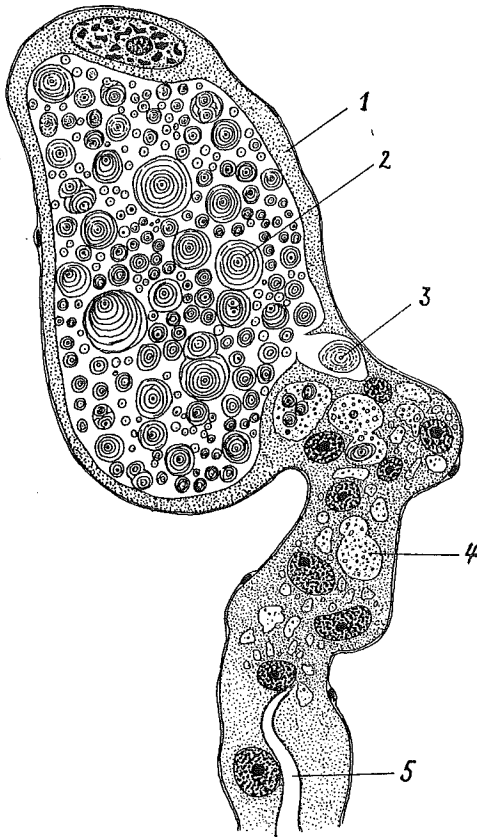


Abb. 3.

Schiefer Querschnitt durch das Konkrement-Reservoir an der Übergangsstelle zum normalen Malpighischen Schlauch. 1. Erweiterter Teil der Malpighi, Konkrement-Reservoir; 2. eingelagerte Konkreme; 3. aus einer Vacuole sich entleerendes Konkrement; 4. Vacuole mit Körnern; 5. Ende des Malpighischen Ganges.

Der normale Schlauchteil der Malpighi schliesst sich seitlich an den konkrementführenden mittels eines Pfropfens an (Abb. 3). Der Ausführungsgang des erstern geht nicht bis in die erweiterte Blase hinauf, sondern hört vorher zu existieren auf. Es ist also keine direkte Verbindung der beiden Teile der Malpighi vorhanden, so dass die grossen Kalkkonkremente gefangen sind. Der ganglose Teil der Malpighi ist sehr kern- und vacuolenreich. In diesen Vacuolen findet man einen körnigen Inhalt, der, je weiter man zur Blase vordringt, mehr und grössere Körner aufweist. Im direkt an die Blase anschliessenden Abschnitt gewahrt man in den Vacuolen bereits Körner, die sich deutlich als Konkreme zu erkennen geben.

Man kann aus den auf den Schnitten erhaltenen Bildern direkt darauf schliessen, wie die Konkreme in die Blase abgelagert werden. Die Kalksalze gelangen in gelöster Form durch den Gang der Malpighi nach dem hintern Ende desselben, werden hier als Vacuolen in das Plasma des ganglosen Teiles aufgenommen, wandern weiter und scheiden sich langsam zu Kristallen aus, die dann mit der Vacuole in die Blase entleert werden.

Die Kalksphärite (Abb. 4), typische, einfache oder kompliziert verschmolzene Gebilde von durchsichtiger, harter Beschaffenheit, besitzen bei den ausgewachsenen Larven Durchmesser von 2—160  $\mu$ .

Bei den einfachen Sphäriten ist im Innern ein feiner, weniger lichtbrechender Kristallisationskern zu finden, um den in konzentrischen oder exzentrischen Kreisen die Ablagerungen stattgefunden

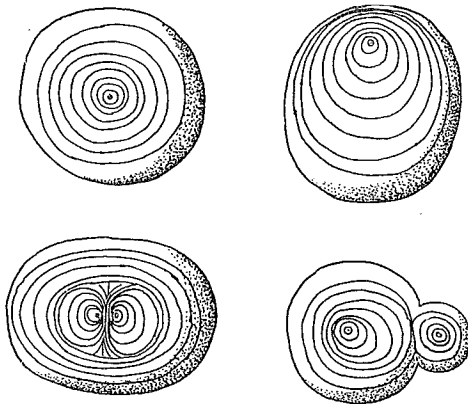


Abb. 4.  
Verschiedene Konkremmentsformen.

haben. Bei Zwillingen oder kompliziert verschmolzenen Sphäriten gewahrt man zwei oder mehr Kristallisationskerne.

Dass es sich bei diesen Konkrementen um kohlen-sauren Kalk handelt, zeigt die Gipsbildung in verdünnter Schwefelsäure. Die Murexidprobe mit Aufschwemmungen solcher Kristalle verlief absolut negativ, so dass anscheinend kein harn-saurer, sondern wie bei *Acidia* und andern Dipteren reiner kohlen-saurer Kalk vorliegt.

### Die Einlagerung des Kalkes in das Tönnchen.

Wie und wann geschieht die Einlagerung des Kalkes in das *cerasi*-Tönnchen?

Während bei vielen Dipterenlarven die Malpighi zur Zeit der Verpuppung von dem darin befindlichen Kalke entleert werden (*Ptychopiera* nach PANTEL), oder, wie bei *Drosophila* nach EASTHAM, er sogar in die Imago übergeht, ist sowohl bei *Acidia* als auch bei *Rhagoletis* ein Ausstossen der Exkrete aus den Malpighi nicht möglich, da der gespeicherte Kalk in einem geschlossenen Anhang der Malpighi sich befindet. Da sowohl bei der fertigen Puppe als auch bei der frischgeschlüpften Imago in den Malpighi kein Kalk nachzuweisen ist, und die Malpighi der Larven schon sehr bald während der Metamorphose vollkommen histolysiert werden, muss der in den Malpighi gespeicherte Kalk irgendwie abgebaut werden und mit fortschreitender Entwicklung der Puppen in das Chitin des Tönnchens hinein wandern.

Im Balg der reifen Larve konnte weder mit verdünnter Schwefelsäure noch durch Glühen ein Kalkbelag festgestellt werden. Die Einlagerung des Kalkes muss erst während der Verpuppung erfolgen. Bei fünf-stündigen, noch ganz weissen und weichen Präpuppen waren die Malpighi noch völlig mit Kalksphäriten vollgestopft, und das Tönnchen ergab keinen Glührückstand. 10 Stunden nach der Verpuppung war in der Vorpuppe, die sich noch nicht gehäutet hatte, noch viel Kalk in den Malpighi vorhanden, dabei ergab sich zudem ein kleiner Kalkglührückstand im Tönnchenchitin. Nach dieser Zeit hatte schon ein Abwandern des Kalkes in das Tönnchen stattgefunden. Bei 15—20-stündigen Vorpuppen, bei denen die Puppenhäutung sich vorbereitete, die Vorpuppe sich dem Tönnchen noch eng anschmiegte, war in den Malpighi noch gespeicherter Kalk vorhanden, doch waren die Kalkkristalle um mehr als die Hälfte kleiner als bei der reifen Larve. Eine Auflösung musste stattgefunden



den haben. Tönnchen solcher Puppen ergaben starke Glührückstände. Bei der eintägigen Vorpuppe, bei der die Häutung im Kopfteil eingesetzt hat, findet man in den Malpighi nur noch minime Kalkreste, dafür aber einen starken Glührückstand im Chitin des Tönnchens.

Gestützt auf diese Untersuchungen, können wir folgende Schlüsse ziehen: Die Kalkeinlagerungen in der *cerasi*-Tönnchenkutikula stammen aus besondern Behältern der Malpighi der Larven. Im gleichen Tempo wie dieser Kalk aus den Malpighi verschwindet, ist er in der Tönnchenkutikula zu finden. Die Einlagerung des Kalkes in die Tönnchenkutikula erfolgt noch im Vorpuppenstadium und ist nach einem Tage beendet. Kurz nach beendeter Einlagerung setzt die Larvenpuppenhäutung ein. So ist es verständlich, dass die Einlagerung des Kalkes in die Endokutikula möglich ist, weil zur Zeit der Einlagerung die Larvenkutikula noch in einem physiologischen Zusammenhange mit dem Körper der Vorpuppe steht. Der Modus der Einlagerung des Kalkes in das Puparium ist hier etwas anders als bei *Acidia heraclei*, wo der Kalk aussen an den innersten Teil der Endokutikula angelagert, bei *cerasi* dagegen eingelagert wird. Bald nach beendeter Einlagerung wird das Tönnchen, wohl bedingt durch den Kalk, hart und ziemlich spröde.

KEILIN hat an Hand seiner Untersuchungen eine interessante Hypothese über die Funktion des Kalkes im Larvenkörper der Muscidenlarven aufgestellt, der ich mich anschliessen kann. Während PANTEL die Kalkablagerungen in den Malpighi als ein Produkt der Exkretion ansieht, das mit der Nahrung aufgenommen in den Malpighi unschädlich gemacht wird, glaubt KEILIN, dass das  $\text{CaCO}_3$  bei der Neutralisation von  $\text{CO}_2$  im Körper als Entgiftungsprodukt entstanden sei, das dann in den Malpighi gespeichert wird.

Die ökologische Bedeutung der Kalkeinlagerungen in die Tönnchenkutikula könnte doppelter Art sein, indem sie einerseits eine Versteifung des Chitins des Tönnchens bedingt, die im Boden äusserst nützlich sein kann, und andererseits könnten sie dazu dienen, die sehr lange im Boden liegenden Puppenhüllen zu konservieren und gleichzeitig das Eintreten von Humussäuren verhindern, resp. dieselben abschwächen.

### Zitierte Literatur.

- 1925 EASTHAM, L. Peristalsis in the Malpighian tubules of Diptera, Preliminary account; with a note on the Elimination of Calciumcarbonate from the Malpighia tubules of *Drosophila funebris*. Quart. Journ. Micr. Sci. LIX, S. 385.
- 1921 KEILIN, D. On the Calcium carbonate and the calcosphaerites in the Malpighian tubes and the fat Body of Dipterous larvae and the ecdysial elimination of these products of excretion. Quart. Journ. Micr. Sci. LV, S. 248.
- 1928/29 KÜHNELT, W. Über den Bau des Insekten skelettes. Zool. Jahrb. Abt. Anat. L., S. 219.
- 1832 LYONET, P. DE. Recherches sur l'anatomie et les metamorphoses de différentes espèces d'insectes. Paris.
- 1914 PANTEL, J. Signification des glandes annexes intestinales des larves de Ptychopteridae et observations sur les tubes Malpighi de ces Nematocères larves et adultes. La Cellule, XXIX, S. 393.
- 1921 SCHÜTTE, L. Das Tönnchen der Musciden. Zool. Anz. LIII, S. 48.
- 1922 SCHULZE, P. Über die Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Skelettsubstanzen und über Chitinreaktionen. Biol. Zentralbl. XLII, S. 388.
- 1923 SCHULZE, P. und KUNIKE, G. Zur Mikrochemie tierischer Skelettsubstanzen. Biol. Zentralbl. XLIII, S. 556.
- 1933 WIESMANN, R. Untersuchungen über die Lebensgeschichte und Bekämpfung der Kirschfliege, *Rhagoletis cerasi* L. Landw. Jahrb. d. Schweiz, S. 711. 1. Mitteilung.
- 1934 — 2. Mitteilung, Landw. Jahrb. d. Schweiz, S. 281.
- 1936 — 3. Mitteilung, Landw. Jahrb. d. Schweiz, S. 811.
- 1934 WIGGLESWORTH, V. B. The physiology of the cuticle and edysis in *Rhodnius proxilus* with special reference to the function of the Oenocytes and of the Dermal glands. Quart. Journ. Micr. Sci. LXXVI, S. 269.
-