

Über die Morphologie und den taxonomischen Wert von Kleinsäugetierspermien

Von

E. VON LEHMANN, Bonn, und H. E. SCHAEFER, Köln

Die Taxonomie der Wirbeltiere hat sich herkömmlicherweise bei der morphologischen Typisierung der Arten, Gattungen und Familien etc. am makroskopischen Erscheinungsbild der Organismen orientiert. In dem Bestreben nach einer Erweiterung des Spektrums der Unterscheidungsmöglichkeiten finden neben solchen klassischen makroskopischen auch mikroskopische, und zwar cytologische, Kriterien Beachtung. Hier sei z. B. auf arttypische cytochemische Differenzen der weißen Blutkörperchen hingewiesen, wie sie an einigen Säugetierarten von Undritz und Mitarbeitern (1956) sowie von Schaefer und Mitarbeitern (1968, 1970) mitgeteilt wurden.

In besonderem Maße speziesspezifisch ist die Morphologie der Spermien. Obwohl grundsätzlich die Unterscheidbarkeit der Wirbeltiere anhand ihrer Spermienformen anerkannt ist (Bargmann 1959, l. c. p. 566) und bereits eine Reihe arttypischer Formunterschiede herausgearbeitet worden sind (Retzius 1909, Friend 1936, Bishop und Austin 1957, Sebek 1960), erscheinen uns die aus der Spermienmorphologie zu gewinnenden Aussagemöglichkeiten besonders für Probleme der Systematik mangelhaft genutzt.

Der Grund für diese ungenügende Berücksichtigung der Spermienmorphologie mag z. T. in der Beobachtungstechnik liegen. Manche artabhängigen Formdifferenzen liegen nämlich am Rand lichtmikroskopisch eindeutig darstellbarer und sichtbarer Dimensionen. Daher haften den zeichnerisch sehr bestechenden Spermien Darstellungen besonders älterer Autoren viele subjektive Momente an. — Ein Ziel dieser Arbeit soll daher sein, ein möglichst einfaches elektronenmikroskopisches Beobachtungsverfahren mitzuteilen.

Weiterhin wurde bisher mangelhaft berücksichtigt, daß nur völlig ausgereifte Spermien eine artkonstante Form besitzen. So bestehen z. T. nicht unerhebliche Formunterschiede zwischen den Spermien des Hodens und Nebenhodens. Auch innerhalb der verschiedenen Nebenhodenabschnitte sind bei manchen Arten noch diskretere reifungsbedingte Formänderungen möglich (Übersicht: Thibault 1969). — Es muß daher das Ziel sein, nur reife Spermien aus dem Nebenhoden während einer Phase aktiver Fortpflanzung zum Formvergleich heranzuziehen.

Schließlich zeigen besonders die neueren Untersuchungen von Fawcett und Mitarbeitern (1971), daß die Kopfform der Spermien primär vom genetisch determinierten Aggregationsverhalten der DNS während der Spermiogenese geprägt wird. — Wir verwenden daher zur lichtmikroskopischen Untersuchung ein Färbeverfahren, welches die DNS des Kernes mit der Feulgenreaktion rot färbt, während die übrigen Zellbestandteile in blauem Kontrastton sichtbar sind.

Methodik

Lichtmikroskopie: Luftgetrocknete Nebenhodenausstriche von möglichst frisch toten Tieren 10 min bei Zimmertemperatur in einem Gemisch aus 9 Teilen Äthanol und 1 Teil Formalin fixieren, 3mal in Aceton spülen, an der Luft trocknen. Anschließend Feulgenreaktion mit Schiffschem Reagens (nach Graumann 1953) (10 min Hydrolyse in 1 N HCl bei 60° C). Gegenfärbung in 0,5%iger Anilinblaulösung (z. B. Anilinblau „wasserlöslich“, Fa. Chroma) bei 60° C 60 min lang. Schließlich 1 min in fließendem Wasser spülen, 30—60 sec in 70%igem Äthanol differenzieren, über die aufsteigende Alkoholreihe in Xylol bringen und in Eukitt eindecken.

Elektronenmikroskopie: Gereinigte Glasobjektträger werden zur Befilmung in einer 0,4%igen Lösung von Polioform F in Chloroform getaucht und an der Luft getrocknet. Derart vorbereitete Objektträger können längere Zeit gelagert werden, wobei Verschmutzung (Staub) oder mechanische Beschädigung (Kratzer) zu vermeiden sind. Auf diese Objektträger werden mit einem Spachtel (z. B. Zahnstocher) möglichst dünn Nebenhodenhinhalt frisch getöteter Tiere aufgetragen und an der Luft getrocknet. Nach fakultativ wochenlanger Lagerung wird der Film in der Umgebung des aufgetragenen Ausstriches geritzt, an einer Stelle randlich mechanisch gelöst und durch vorsichtiges schräges Eintauchen in destilliertes Wasser zum Ausschimmen an der Wasseroberfläche gebracht. Dieser schwimmende Film wird auf übliche Kupfernetze übertragen. Nach Lufttrocknung können solche Präparate ohne weitere Behandlung unmittelbar im Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV betrachtet werden. Dabei empfiehlt sich eine Primärvergrößerung von ca. 5000fach, bei welcher alle Einzelheiten der flach ausgebreiteten Spermienköpfe ausgewertet werden können. (Höhere Vergrößerungen verbieten sich wegen auftretender Unschärfe infolge relativer Dicke der Objekte.)

Befunde

Da sich die Spermienköpfe stets mit ihrer breitesten Fläche der Oberfläche des Objektträgers auflagern, stellen sie sich in Ausstrichpräparaten stets mit einem einzigen, gleichbleibenden Profil dar und werden nicht wie in Schnittpräparaten in unterschiedlichen Profilebenen, die bei einem unrunder räumlichen Körper grundsätzlich zu erwarten sind, sichtbar. Diese Einheitlichkeit der Profile im Ausstrichpräparat stellt zwar eine Einschränkung des räumlichen Bildes der Spermienköpfe, aber auch eine Erleichterung ihres Formvergleiches dar. Folgende Grundformen des Kopfes lassen sich abgrenzen (stets auf das Profil im Ausstrich bezogen!): eine *stumpfe*, mehr oder weniger abgerundete anteriore Begrenzung des Kopfes (z. B. Abb. 1—5) und ein *spitzes* Kopfende (Abb. 6, 7, 8).

Die stumpfen Spermienköpfe sind im Tierreich relativ weit verbreitet, zeigen jedoch mannigfache Variationsmöglichkeiten: Einmal fällt die unterschiedliche Größe auf, ein andermal die maximale Entwicklung des Akrosoms. Daß aber auch noch bei relativ gleicher Kopfgröße und übereinstimmend stumpfer Kopfform weitere Formgruppen unterscheidbar sind, zeigt der Vergleich der Spermienköpfe bei den Spitzmäusen (Abb. 1—5). Die Gattungen *Sorex* (Rotzahnspitzmäuse) und *Crocidura* (Weißzahnspitzmäuse) verfügen gegenüber *Neomys* (Wasserspitzmäuse) über relativ breite Köpfe. *Crocidura* (Abb. 5) unterscheidet sich von *Sorex* (Abb. 1—2) durch eine stärker gekrümmte Rundung der anterioren Begrenzung des Kernes gegenüber dem Akrosom. Das Akrosom ist bei *Crocidura* größer als bei *Sorex* und die Insertion des Schwanzes erfolgt bei *Crocidura* mehr parazentral als bei *Sorex*. *Neomys* (Abb. 3—4) ist von allen anderen Spitzmäusen durch die weitaus schmalere Kopfform abgrenzbar. — Innerhalb der genannten Gattungen ist eine sichere Unterscheidung der Arten nicht sicher möglich. Das unterstreicht den gattungstypischen Charakter der beschriebenen Formeigentümlichkeiten.

Spermien mit spitzen Köpfen zeigen zusätzlich stets eine deutlich ausgeprägte Asymmetrie, wobei sich oft geschwungene Beilformen ergeben. Die eigentliche Spitze ist meist leicht abgebogen. — Diese Kopfform ist unter den Nagern verbreitet und typisch für alle bisher untersuchten Muriden (Echtmäuse), Arvicoliden (Wühlmäuse) und Cricetiden (Hamster) (Abb. 6, 7, 8), allerdings mit zwei Ausnahmen: *Micromys minutus*, die Zwergmaus, *Ondatra zibethica*, die Bisamratte, die gesondert behandelt werden sollten. Sieht man von der Ausnahme *Micromys* und *Ondatra* ab, so stellt das Phänomen der spitzen, asymmetrischen Spermienköpfe ein gruppentypisches Merkmal für die Familie der Muriden, Arvicoliden und Cricetiden dar.

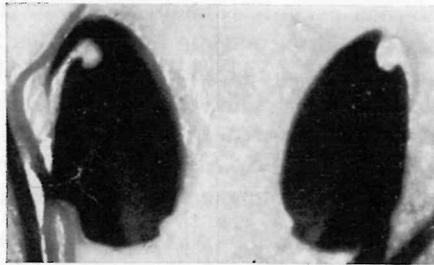
Befunde bei der Schneemaus und taxonomische Folgerungen

Um so auffälliger war daher eine kürzlich (v. Lehmann 1970) mitgeteilte Abweichung in der Ausformung des Spermienkopfes innerhalb der Familie der Wühlmäuse (Arvicolidae), und zwar bei der Gattung *Microtus*. Die Wühlmäuse dieser Gattung zeigen im paläarktischen Bereich im allgemeinen weitgehend übereinstimmende bzw. äußerlich ähnliche Spermienköpfe, nur bei der Schneemaus (*nivalis*) fanden wir durchgehend eine merkwürdige Abweichung (Abb. 6 und 8): Im Verlaufe des anterioren Randes des Spermienkopfes (der „Beilschneide“) zeigt sich bei ausgereiften (!) Spermien regelmäßig eine deutliche Scharfe, während alle bisher bekannten Spermienköpfe dieser Gruppe einen glatten Verlauf dieser Linie zeigen (s. zum Vergleich den Spermienkopf einer Rötelmaus, *Clethrionomys glareolus*, in Abb. 7).



Abb. 7: *Clethrionomys glareolus* (R ö t e l m a u s): ähnliche Kopfform wie bei *Chionomys* (Abb. 8), jedoch ohne anteriore Kerbe. Elektronenmikroskopische Aufnahme, 5000fache Primärvergrößerung.

Abb. 8: *Chionomys nivalis* (S c h n e e m a u s): gleicher Befund wie in lichtmikroskopischer Abbildung 6, anteriore Kerbe im Spermienkopf im elektronenmikroskopischen Bild (5000fache Primärvergrößerung) jedoch eindeutiger dokumentiert.



Diese Abweichung fand sich an allen Tieren, die an weit voneinander entfernt liegenden Plätzen der Alpen (Liechtenstein, Wettersteingebiet, Bergell) im Verlaufe mehrerer Jahre gesammelt und untersucht wurden.

Interessanterweise fand Steiner (briefl. Mitteilung) diese Scharte auch bei den von ihm im Kaukasusgebiet und Kleinasien gesammelten und untersuchten Schneemäusen der Arten *nivalis*, *roberti* und *gud*, wenn auch nicht durchgehend (wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Entwicklungsstadium der geprüften Spermien, s. o.!). — Diese Feststellung ist also eine weitere Bestätigung dafür, daß der Schneemaus (vielleicht zusammen mit *Dolomys*) eine Sonderstellung im System zukommt, d. h. sie ist, wie im Zusammenhang mit der Mitteilung der abweichenden Hautdrüsen bereits früher vorgeschlagen (v. Lehmann 1969), in den Rang einer eigenen Gattung *Chionomys* zu erheben (früher Untergattung *Chionomys* innerhalb der Gattung *Microtus*).

Es zeigt sich hier also, daß mit den besseren technischen Möglichkeiten auch innerhalb der einzelnen Gattungen u. U. feinere Unterschiede in der Struktur der Spermien sichtbar werden; und damit bessere taxonomische Einstufungen möglich sind.

Literatur

- Bargmann, W. (1959): Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Stuttgart.
- Bishop, M. W. H., und C. R. Austin (1957): Die Spermien der Säuger. *Endeavour*, XVI, 61: 137—150.
- Fawcett, D. W., W. A. Anderson, D. M. Phillips (1971): Morphogenetic factors influencing the shape of some sperm head. *Developmental Biology* 26: 220—251.
- Friend, G. F. (1936): The sperms of the British Muridae. *Quart. J. Micr. Sci.* 78: 418—433.
- Graumann, W. (1953): Zur Standardisierung des Schiffschens Reagens. *Z. wiss. Mikr.* 61: 225—226.
- v. Lehmann, E. (1969): Über die Hautdrüsen der Schneemaus (*Chionomys nivalis nivalis* Martins, 1842). *Bonner Zool. Beiträge* 20: 373—377.
- : Spermienköpfe mitteleuropäischer Wühlmäuse. Vortrag gehalten auf der 44. Hauptversammlung der Dtsch. Ges. f. Säugetierkunde, München 9. 9. 1970.
- Retzius, G. (1909): Die Spermien der Nagetiere. *Biologische Untersuchungen*, N. F., XIV: 14 ff. Stockholm und Jena.
- Schaefer, H. E., R. Fischer und E. v. Lehmann (1968): Die alkalische Leucocytenphosphatase als Unterscheidungsmerkmal für *Apodemus sylvaticus* und *flavicollis*. *Z. Säugetierkunde* 33: 364—368.
- , C. Käufer und R. Fischer (1970): Vergleichende fermentcytochemische Untersuchungen an Blut- und Knochenmarkzellen bei Laboratoriumstieren. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 4: 310—334.
- Sebek, Z. (1960): Neuere Artkriterien bei den Mäuseartigen (Fam. Muridae). *Symposium Theriologicum in Erno. Prag: Czechoslovak Acad. Sci.* (S. 318—325).
- Thibault, G. (1969): La spermiogenèse chez les mammifères. *Traité de Zoologie*. (Edt.: P.-R. Grassé). Tome XVI, fasc. VI, p. 716—798. Paris.
- Undritz, E., E. M. Lang et E. van Oye (1956): La réaction peroxydasique des éosinophiles comme moyen de taxonomie (classification) des mammifères. *Sang* 27: 513—515.

Anschriften der Verfasser:

Prof. Dr. E. von Lehmann, 53 Bonn, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Adenauerallee 150—164.

Prof. Dr. H. E. Schaefer, Pathologisches Institut der Universität Köln, Abteilung für feinstrukturelle Pathologie, 5 Köln 41, Josef-Stelzmann-Straße 9.



Abb. 1: *Sorex minutus* (Zwergspitzmaus): reife Spermien bei Standardfärbung. Stumpfe Kopfform mit zentralem Schwanzansatz.

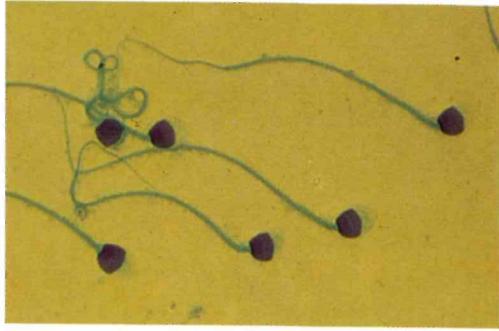


Abb. 2: *Sorex alpinus* (Alpenspitzmaus): reife Spermien bei Standardfärbung. Scheinbare Unterschiede zu *Sorex minutus* (Abb. 1) spiegeln nur methodisch bedingte Abweichungen der Färbintensität der Anfärbung des Akrosoms wider. Die Grundform des Kopfes — stumpf, rund-oval, zentraler Schwanzansatz — stimmt mit *Sorex minutus* überein.

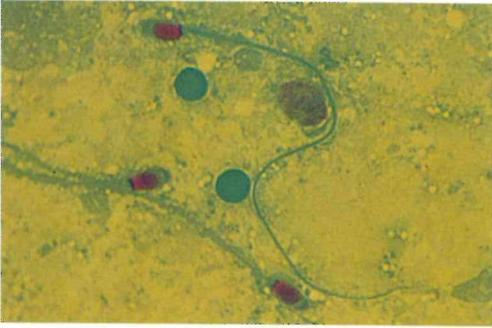


Abb. 3: *Neomys fodiens* (Wasserspitzmaus): reife Spermien bei Standardfärbung. Stumpfe Kopfform, aber wesentlich schlanker als bei den *Sorex*-Arten (vergl. Abb. 1, 2). Übereinstimmung zu *Neomys anomalus* (Abb. 4).

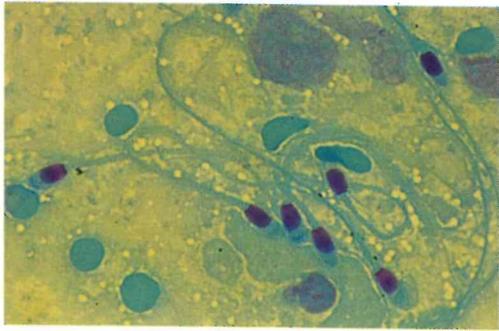


Abb. 4: *Neomys anomalus* (Sumpfspitzmaus): reife Spermien bei Standardfärbung. Stumpfe, schlanke Kopfform wie bei *Neomys fodiens* (Abb. 3), deutliche Abweichung von den *Sorex*-Arten (Abb. 1, 2).

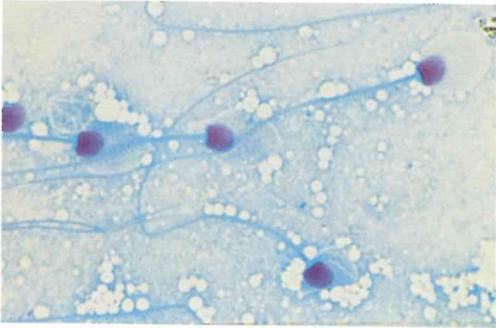


Abb. 5: *Crocidura leucodon* (Feldspitzmaus): reife Spermien bei Standardfärbung. Im wesentlichen gleiche Kopfform wie bei *Crocidura russula* mit entsprechenden Abweichungen von den *Neomys*- und *Sorex*-Arten.



Abb. 6: *Chionomys nivalis* (Schneemaus): spitze asymmetrische Kopfform wie bei den meisten Muriden. Zweizipflige Kopfspitze (Verlust des Akrosoms als Folge beginnender Autolyse). Charakteristische Kerbe am anterioren, basisnahen Kopfumfang eben sichtbar (vergl. Abb. 8!).