

Stereoskopische Untersuchung der Spermatophore von Männchen der australischen Feldgrille (Insecta, Orthoptera)

Robert Sturm

Abstract

In the present contribution, the spermatophore of the male black field cricket (*Teleogryllus commodus* WALKER 1869) should be illustrated more effectively with the help of stereoscopic techniques. For this purpose, germ cell vessels of selected animals were isolated and prepared for light- and electron-microscopic analysis. Production of stereo-pairs was carried out by using conventional photographs, from which object depth maps were modeled by application of a specific computer program (PICOLAY). These maps, on the other hand, allowed the generation of two perspectively different images, which were mounted to a stereogram being appropriate for the autostereoscopic technique of parallel view. Stereoscopic image results presented in this study clearly express that use of spatial photographs mainly serves for purposes of presentation on the one side, but, on the other side, also seems to be meaningful for more detailed structural analysis in some specific cases.

Zusammenfassung

Im vorliegenden Beitrag sollte die Spermatophore der männlichen australischen Feldgrille (*Teleogryllus commodus* WALKER 1869) anhand stereoskopischer Verfahren zur besseren Veranschaulichung gelangen. Zu diesem Zweck wurden die Keimzellgefäße von ausgewählten Tieren freigesetzt und für die licht- beziehungsweise elektronenmikroskopische Analyse präpariert. Die Herstellung der Stereobildpaare erfolgte unter Heranziehung herkömmlicher Fotografien, von welchen mithilfe eines speziellen Computerprogramms (PICOLAY) Objektiefenkarten modelliert wurden. Diese wiederum gestatteten die Erzeugung zweier perspektivisch unterschiedlicher Halbbilder, die jeweils zu einem für die autostereoskopische Betrachtungstechnik des Parallelblicks geeigneten Stereogramm montiert wurden. Die in der Studie präsentierten Bildergebnisse bringen recht deutlich zum Ausdruck, dass die Verwendung von Raumfotografien zwar hauptsächlich für Präsentationszwecke dienlich ist, jedoch bei manchen spezifischen Fragestellungen auch für eine detailliertere Strukturanalyse sinnvoll erscheint.

Einleitung

Bei Grillen erfolgt der Keimzelltransfer vom Männchen zum Weibchen über Spermatophoren, welche je nach betrachteter Spezies mit einer unterschiedlichen Menge an Spermatozoen befüllt sind (MANN 1984, STURM 2003a, 2003b, 2011a, 2014). Die in einer speziellen Gussform gebildete Spermatophore wird während des Kopulationsvorganges mittels Ankerplatte an der weiblichen Geschlechts-

öffnung fixiert, wobei der dem Gefäß anhaftende Schlauch durch das männliche Geschlechtsorgan zur Einführung in den Ductus receptaculi gelangt. Im Falle der australischen Feldgrille (*Teleogryllus commodus* WALKER 1869) werden bei einem Paarungsereignis zwischen $9 \cdot 10^4$ und $1,5 \cdot 10^5$ Spermatozoen übertragen, und die für die Bildung einer neuen Spermatophore benötigte Refraktärzeit beläuft sich in der Regel auf 20 bis 30 Minuten (STURM 2011a, 2014). Bei vorangegangenen morphologischen Untersuchungen des Keimzellgefäßes und seines Inhaltes konnte demonstriert werden, dass sich die Ampulla (= Spermatophorenkopf) aus mehreren Schichten zusammensetzt und in ihrem Inneren neben den Keimzellen einen mit Flüssigkeit gefüllten Druckkörper beherbergt. Dieser sorgt für die kontrollierte Freisetzung der Spermatozoen innerhalb eines Zeitintervalls von etwa 30 Minuten. Um die Keimzellen mit möglichst hoher Effizienz an das Weibchen transferieren zu können, sind diese nach einem regelmäßigen Schema mit parallel zueinander ausgerichteten Geißeln in der Ampulla angeordnet. Dadurch wird die Entstehung größerer zellulärer Agglomerationen verhindert und der Durchtritt einzelner Spermatozoen durch den dünnen Schlauch gefördert (STURM 2003a, 2003b, 2011a).

Wie anhand zahlreicher Studien gezeigt werden konnte, gewinnen stereoskopische Methoden in den Biowissenschaften und insbesondere in der Insektenforschung zunehmend an Bedeutung (STURM 2009, 2011b, 2015, 2017a, 2017b, 2017c, 2017d). Dieser Umstand ist auf mehrere Gründe zurückzuführen: (1) Im modernen Computerzeitalter bedarf es nur mehr eines äußerst geringen Zeitaufwandes zur Erstellung von Raumbildern eines gegebenen Objektes. (2) Durch Anwendung autostereoskopischer Betrachtungstechniken (SCHEIDEL 2009, STURM 2016a, 2016b) besteht die Möglichkeit, Raumbilder ohne Zuhilfenahme von optischen Hilfsgeräten (Stereobrille, Stereoskop) zu studieren, so dass sich der in das Verfahren investierte Kostenaufwand deutlich reduziert. (3) Die stetige Verbreitung stereoskopischer Visualisierungsmethoden in wissenschaftlichen Studien führt dazu, dass diese Techniken einem immer größeren Kreis an Entomologen zugänglich gemacht werden. (4) Sowohl in der Strukturforschung als auch bei Fragen der Artendetermination stellt das Raumbild ein potenzielles Hilfsmittel dar, auf welches in Zukunft wohl kaum mehr verzichtet werden kann (GOLDSTEIN et al. 2003, CYPIONKA et al. 2016, STURM 2016a, 2016b).

Der vorliegende Beitrag widmet sich der stereoskopischen Analyse der Spermatophore von Männchen der australischen Feldgrille. Neben der Präsentation von entsprechendem Bildmaterial sollen die Vorzüge der räumlichen Visualisierung einzelner Strukturelemente im Detail diskutiert werden.

Material und Methoden

Freisetzung und Präparation der Spermatophore

Die Spermatophore wurde gemäß den Beschreibungen von STURM (2003a, 2003b) aus dem geschlechtsreifen und paarungsbereiten Männchen der australischen Feldgrille unter Zuhilfenahme des Stereomikroskops und einer Spitzpinzette isoliert. Das Objekt wurde in weiterer Folge in 70%-igem Alkohol konserviert. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde die in Ethanol fixierte Spermatophore in ein Embryoschälchen transferiert und im Auflichtmodus fotografiert. Die Studie der Internstruktur erfolgte nach Anfertigung geeigneter Medianschnitte.

Für die elektronenmikroskopische Dokumentation wurde das Keimzellgefäß einer vollständigen Dehydratation und nachfolgenden Trocknungsprozedur unterzogen. Das auf den Objektträger aufgebrachte und mit Kohlenstoff bedampfte Objekt wurde bei Standardbedingungen (Beschleunigungsspannung: 15 kV) mikroskopisch untersucht.

Herstellung der stereoskopischen Aufnahmen

Die Erstellung der Stereobildpaare erfolgte nach dem von CYPIONKA et al. (2016) vorgestellten Prozedere. Bei diesem wird mithilfe eines speziellen Computerprogrammes (PICOLAY; RAAP & CYPIONKA 2011) aus einer einzelnen Fotografie des zu untersuchenden Objektes ein zugehöriges Raumbild modelliert. Das Verfahren beruht im Allgemeinen auf zwei Grundprinzipien: Zunächst wird von der licht- oder elektronenmikroskopischen Aufnahme eine nach Bildhelligkeit beziehungsweise Tiefenschärfe gestaffelte Objektiefenkarte erstellt. Hierbei wird der Umstand genutzt, dass mit dem Mikroskop erzeugte Bilder durch eine vom Vorder- zum Hintergrund fortschreitende Abnahme der Helligkeit und Tiefenschärfe gekennzeichnet sind (STURM 2017d). In einem zweiten Schritt wird die Tiefenkarte dazu genutzt, nicht sichtbare Bereiche der abgebildeten Struktur unter Anwendung eines sogenannten Render-Prozesses zu rekonstruieren. Dadurch gelingt es letztlich, eine für die Stereoskopie essenzielle Darstellung des Objektes aus zwei unterschiedlichen Perspektiven zu erzeugen. Es entstehen zwei stereoskopische Halbbilder, welche entweder zu einem Stereogramm angeordnet oder in eine Rot-Grün-Anaglyphe umgewandelt werden können.

Die in diesem Beitrag präsentierten Stereogramme können mit optischen Hilfsmitteln (Stereobrille, Stereoskop) oder unter Anwendung autostereoskopischer Betrachtungstechniken (SCHEIDEL 2009, STURM 2016a, 2016b) studiert werden. Im gegebenen Fall eignet sich der sogenannte Parallelblick am besten für die visuelle Bilduntersuchung. Dabei hat man die flache Hand parallel zu den Sehachsen vor die Nase zu führen, so dass das linke Auge lediglich das linke Halbbild und das rechte Auge lediglich das rechte Halbbild zu sehen bekommen. Mit einiger Übung treten nach kurzer Zeit eine Bildverschmelzung und die Entstehung eines zwischen den Halbbildern positionierten Raumbildes auf.

Ergebnisse

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Spermatophore

Die aus der lichtmikroskopischen Dokumentation der Spermatophore gewonnenen Stereobildpaare sind in den Abbildungen 1 und 2 zusammengefasst. Im Allgemeinen setzt sich dieses zur Übertragung der Keimzellen dienende Gefäß aus der Ampulla, dem mehrere Millimeter langen Schlauch und der Ankerplatte zusammen. Im Raumbild wird die ovale Form der Ampulla deutlich, und zudem bekommt man einen besseren Eindruck von jenen an der Ankerplatte sitzenden, dreieckigen Fortsätzen, welche eine starre Fixierung der Spermatophore an der weiblichen Geschlechtsöffnung garantieren. Die entlang der Medianebene halbierte Ampulla erlaubt einen mikroskopischen Einblick in das Innenleben der Struktur. Dabei werden vor allem zwei Dinge anhand des stereoskopischen Bildes recht gut zur Veranschaulichung gebracht:

Zum einen kann eine gute Abschätzung der Wanddicke der Ampulla vorgenommen werden, zum anderen wird die fixierte, zu einem Agglomerat arrangierte Spermienmasse sehr deutlich vor Augen geführt.

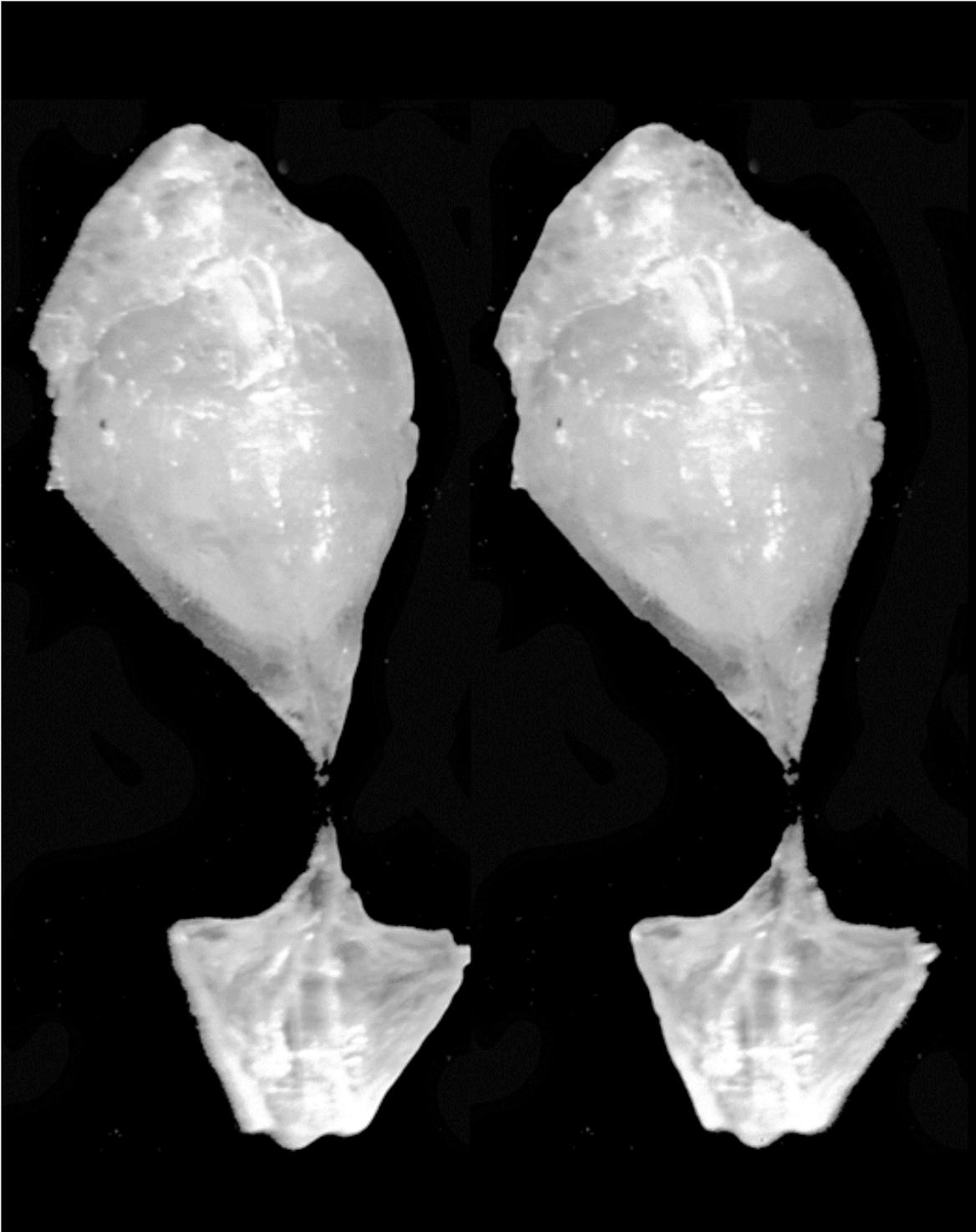


Abb. 1: Lichtmikroskopische Stereofotografie der Spermatophore der männlichen australischen Feldgrille mit Ampulla (oben) und Ankerplatte (unten) zur Fixierung des Objektes an der weiblichen Geschlechtsöffnung (Bildhöhe: ca. 2 mm).

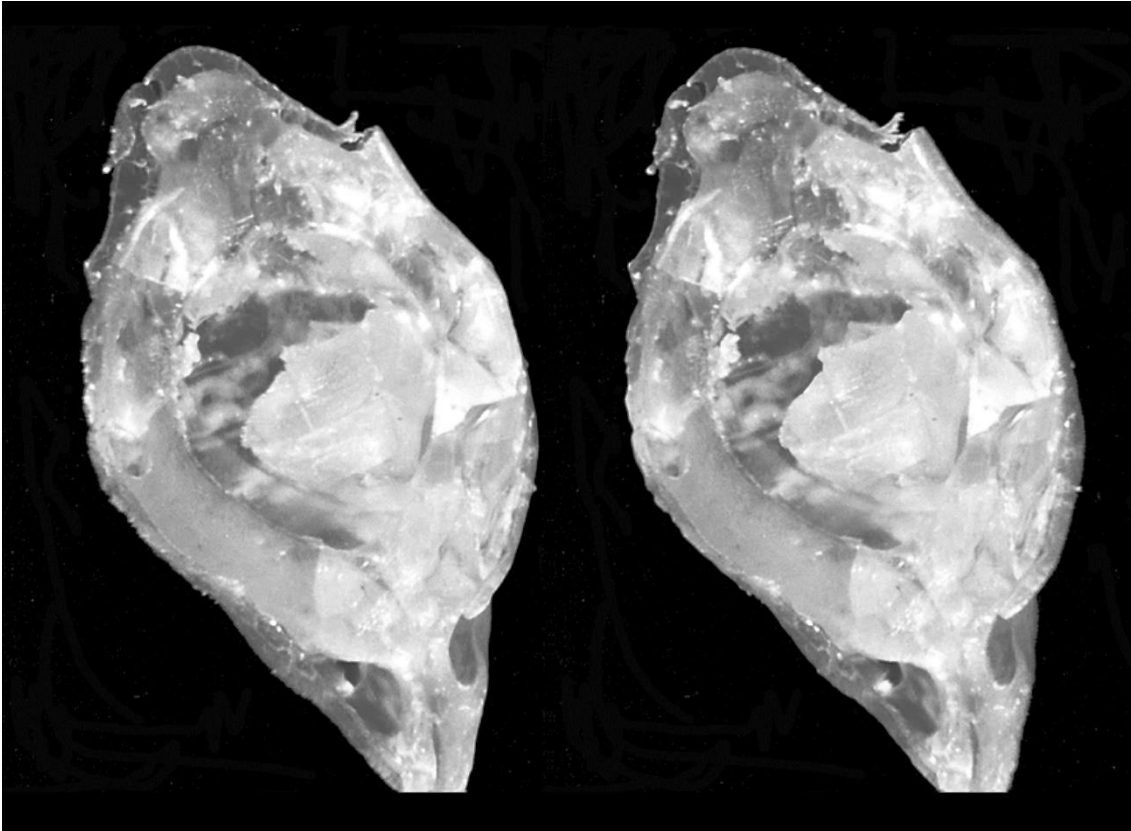


Abb. 2: Lichtmikroskopischer Blick in die median geteilte Ampulla mit ihrer mehrschichtigen Wand und dem zentralen Spermienpaket (Bildhöhe: ca. 1 mm).

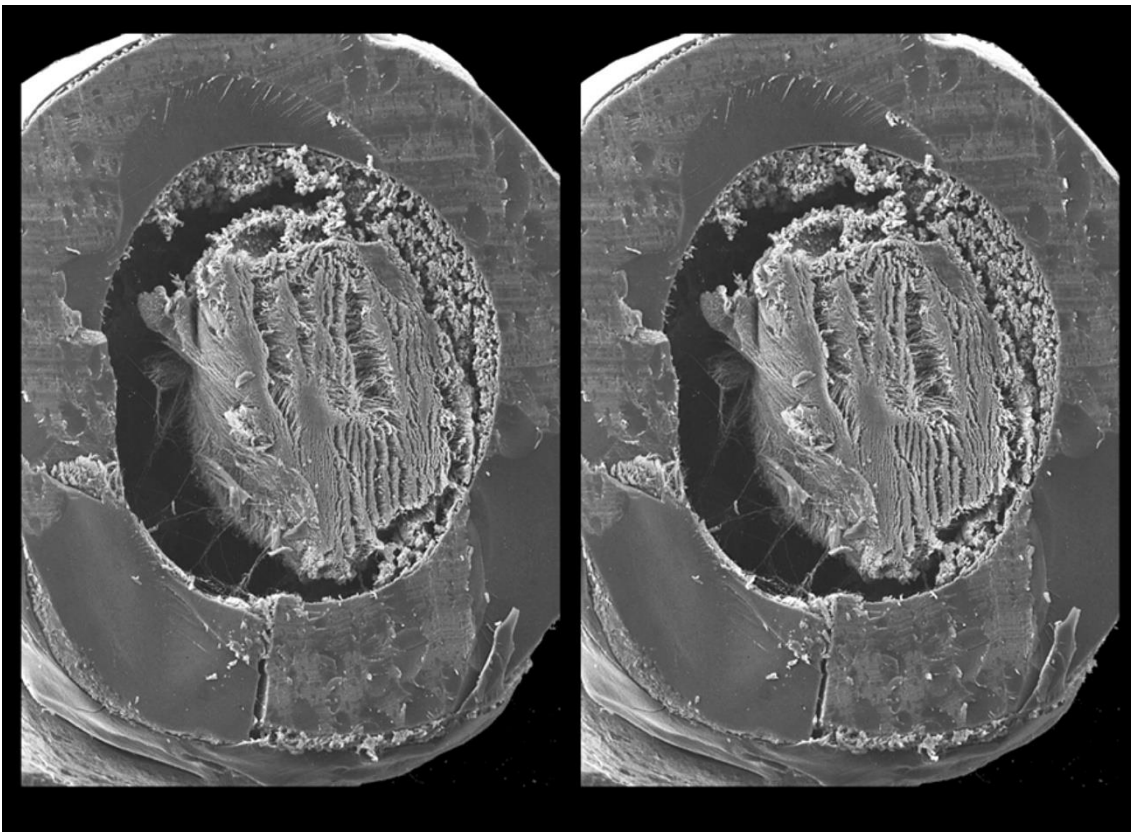


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme der horizontal geteilten Ampulla mit der Masse an regelmäßig angeordneten Spermatozoen (Bildhöhe: ca. 0,5 mm).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Spermatophore

Aus dem elektronenmikroskopischen Bild lässt sich bessere Klarheit über die strukturelle Organisation der Ampulla und die Anordnung der Spermatozoen innerhalb dieses Transportgefäßes gewinnen. Bereits in der Übersichtsdarstellung fällt neben der Mehrschichtigkeit der Ampullawand insbesondere die doch sehr regelmäßige Ausrichtung der Keimzellen auf, wodurch deren Transport in das weibliche Receptaculum seminis (Spermatheka) deutlich erleichtert wird (Abb. 3). Aus der stereoskopischen Aufnahme gewinnt man fast den Eindruck, dass die Spermien in Reih und Glied arrangiert sind. Diese Beobachtung wird durch das Detailbild der Zellmasse noch zusätzlich verstärkt (Abb. 4). Hier wird nämlich deutlich, dass die Geißeln der Spermatozoen eine nahezu parallele, nur durch die Fixierung und Präparation etwas in Unordnung geratene Orientierung besitzen. Im stereoskopischen Bild kann die räumliche Orientierung der einzelnen Zellfortsätze im Detail studiert und einem interessierten Publikum präsentiert werden.

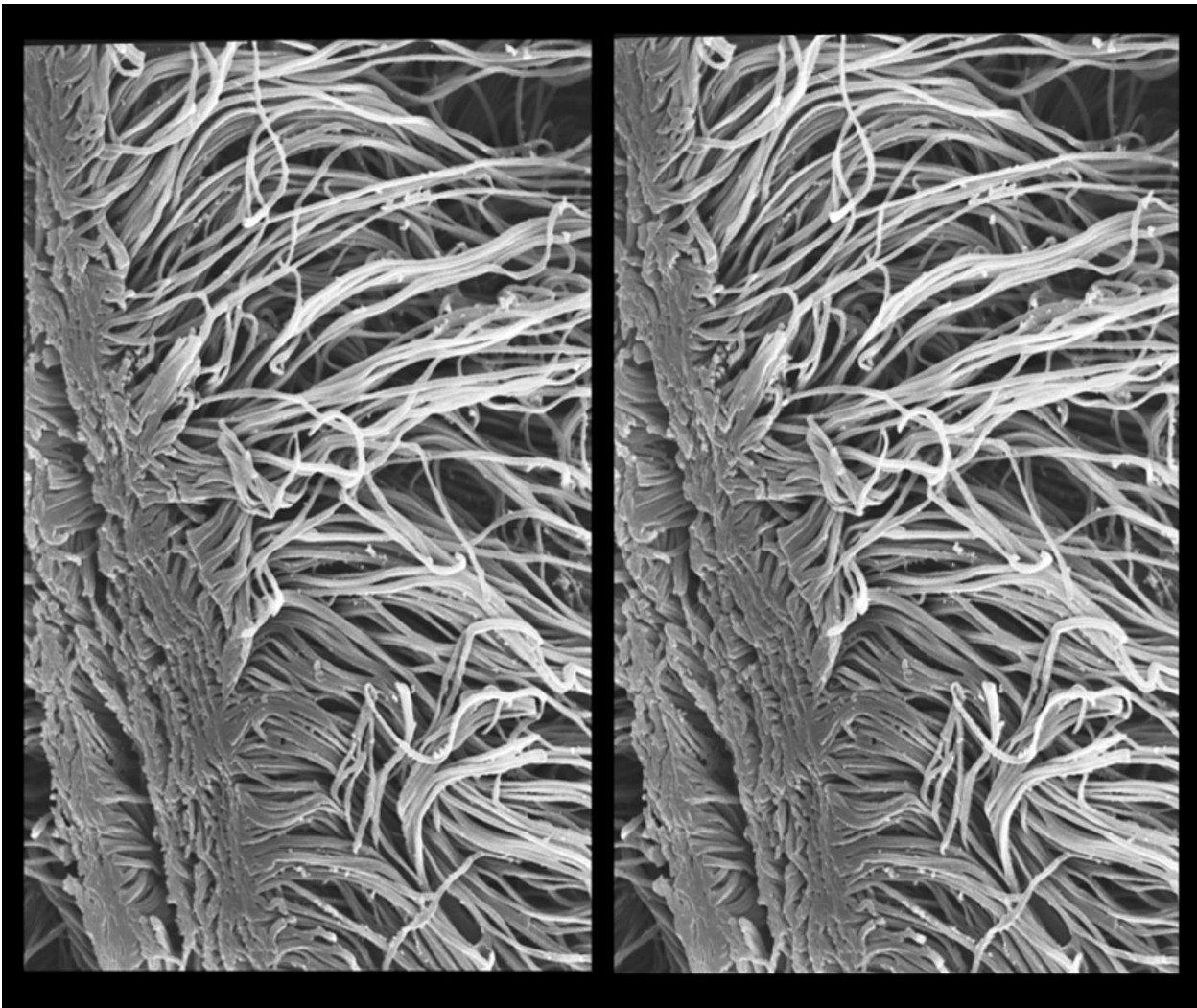


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Detaildarstellung der in der Ampulla gespeicherten Spermienmasse. Hier wird die relativ regelmäßige Anordnung der Geißeln deutlich (Bildhöhe: ca. 0,1 mm).

Diskussion und Schlussfolgerungen

Die gleichzeitige Erfassung eines Objektes durch beide Augen, welche im Abstand von etwa 6,5 cm voneinander entfernt liegen, führt zu einer räumlichen Wahrnehmung des Gegenstandes. Diesen Umstand machen sich die Stereoskopie und die unmittelbar mit ihr in Verbindung stehende Stereofotografie zunutze, wobei zwei perspektivisch leicht unterschiedliche Halbbilder im Gehirn zu einer dreidimensionalen Abbildung verschmolzen werden (SCHEIDEL 2009, STURM 2016a, 2016b). Die erste wissenschaftliche Nutzung des stereoskopischen Verfahrens datiert an den Beginn des 20. Jahrhunderts. Seitdem konnte sich diese Methode in zahlreichen Forschungsdisziplinen etablieren, verzeichnete jedoch vor allem in den Naturwissenschaften eine vermehrte Anwendung (STURM 2009, 2011b, 2015, 2017a, 2017b, 2017c, 2017d).

Wie bereits in früheren Beiträgen angemerkt wurde (STURM 2017b, 2017c), vermag die Stereoskopie in der Entomologie insbesondere bei der Ergreifung mikroskopischer Strukturen eine erweiterte Hilfestellung zu leisten. Zudem kann das Verfahren bei der sicheren Determination einzelner Spezies, welche nur über minimale Merkmalsunterschiede verfügen (z. B. Trichopterenlarven) durchaus eine brauchbare Unterstützung anbieten. Insgesamt ist jedenfalls damit zu rechnen, dass die Stereofotografie für sich noch etliche Anwendungsbereiche eröffnen wird, unter denen beispielsweise die bildunterstützte Vermessung kleinster Strukturen vorrangig zu nennen ist.

Im vorliegenden Beitrag wurde die Spermatophore der australischen Feldgrille mithilfe der Stereofotografie dokumentiert. Dieses Objekt eignet sich aus mehrerlei Gründen besonders gut für das dreidimensionale Visualisierungsverfahren: (1) Einzelne Komponenten wie Ampulla oder Ankerplatte können in Bezug auf ihre räumliche Ausdehnung besser abgeschätzt werden. (2) Die Analyse der Internstruktur mit ihrem Keimzell-Cluster bedarf eines detaillierteren Einblicks, der durch das Raumbild gewährt werden kann. Erst in der dreidimensionalen Ansicht entsteht über die Anordnung der einzelnen Spermatozoen Klarheit. (3) Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind größtenteils durch eine klare Differenzierung in hellen Vorder- und dunklen Hintergrund gekennzeichnet, wodurch die Software zur Erstellung stereoskopischer Bilder optimale Ergebnisse bei der Gestaltung von Tiefenkarten und gerenderten Objektoberflächen liefert. Insgesamt bestätigt sich am Beispiel des beschriebenen Objektes jene Tauglichkeit des optischen Verfahrens, welche bereits in früheren Studien festgestellt werden konnte (STURM 2016a, 2016b).

Aus den in diesem Beitrag gewonnenen Ergebnissen kann der Schluss gezogen werden, dass die Stereofotografie in Zukunft wahrscheinlich noch an Bedeutung in der Insektenforschung gewinnen wird. Dazu wird die leichte Anwendbarkeit Computer-unterstützter Verfahren ihren wertvollen Beitrag leisten.

Verfasser
Mag. mult. Dr. Robert Sturm
Brunnleitenweg 41
5061 Elsbethen
Austria
E-Mail: sturm_rob@hotmail.com

Literatur

- CYPIONKA, H., VÖLCKER, E. & ROHDE, M. (2016): Stacking-Programm PICOLAY - Erzeugung virtueller 3D-Bilder mit jedem Lichtmikroskop oder REM. - *BIOspektrum* 22: 143-145.
- GOLDSTEIN, J.I., NEWBURY, D.E., JOY, D.C., LYMAN, C.E., ECHLIN, P., LITSHIN, E., SAWYER, L. & MICHAEL, J.R. (2003): *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. - Springer, New York; 378 S.
- MANN, T. (1984): *Spermatophores: Development, Structure, Biochemical Attributes and Role in the Transfer of Spermatozoa*. - Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 217 S.
- RAAP, E. & CYPIONKA, H. (2011): Vom Bilderstapel in die dritte Dimension: 3D-Mikroaufnahmen mit PICOLAY. - *Mikrokosmos* 100: 140-144.
- SCHEIDEL, A.J. (2009): *Stereoskopie in Bild und Video - Möglichkeiten, Anwendungen und Grenzen des räumlichen Sehens*. - Universität Mainz, Mainz; 156 S.
- STURM, R. (2003a): The spermatophore of the black field cricket *Teleogryllus commodus* (Insecta: Orthoptera: Gryllidae): size, structure and formation. - *Entomologische Abhandlungen* 61: 227-233.
- STURM, R. (2003b): Bau und Bildung der Spermatophore bei der australischen Feldgrille *Teleogryllus commodus* Walker (Orthoptera: Gryllidae). - *Linzer biologische Beiträge* 35/2: 1119-1129.
- STURM, R. (2009): 3D photography of fossils: Ammonites from the Northern Limestone Alps in Austria. - *Deposits Magazine* 18: 10-13.
- STURM, R. (2011a): The effect of remating on sperm number in the spermatophores of *Teleogryllus commodus* (Gryllidae). - *Invertebrate Biology* 130: 362-367.
- STURM, R. (2011b): 3D photographs of fossil gastropods from the ancient Paratethys ocean. - *Deposits Magazine* 24: 12-15.
- STURM, R. (2014): Comparison of sperm number, spermatophore size, and body size in four cricket species. - *Journal of Orthoptera Research* 23: 39-47.
- STURM, R. (2015): Die Stereofotografie biologischer Objekte. - *Biologie in unserer Zeit* 45: 52-55.
- STURM, R. (2016a): *Stereoskopie in Mathematik und Naturwissenschaften*. - Cuvillier-Verlag, Göttingen; 127 S.
- STURM, R. (2016b): Die Stereofotografie und ihre Nutzung zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen. - *Mikroskopie* 3: 86-100.
- STURM, R. (2017a): Stereoskopische Methoden in Mathematik und Naturwissenschaften. - *Naturwissenschaftliche Rundschau* 70: 168-174.
- STURM, R. (2017b): Stereoscopic Photography in Transmitted Light Microscopy. - *Microscopy Today* 27: 47-49.
- STURM, R. (2017c): Cricket embryos in 3D. - *Micscape Magazine*, June 2017.
- STURM, R. (2017d): Use of stereophotography in insect science - methods and applications. - *Linzer biologische Beiträge* 49/2: 1209-1218.