

Hormon- und serochemische Untersuchungen zur Bestimmung des Geschlechtes und zur Überprüfung des Gesundheitszustands bei *Trachydosaurus rugosus* (GRAY, 1827)

(Sauria: Scincidae)

ULRICH JOGER, ERICH WALLIKEWITZ & ANDREE HAUSCHILD

Mit 2 Abbildungen

Abstract

In an attempt to determine the sex of eight *Trachydosaurus rugosus*, sounding and testosterone radio-immunoassay (Iodine-125 RIA) were executed simultaneously. The reliability of both methods is discussed. In addition, the levels of estradiol (and partly thyroxine) were measured by RIA.

In order to provide basic serological data for veterinary purposes, electropherograms of the serum proteins and the following clinical chemistry standard determinations were made: total serum protein, cholesterol, glucose, calcium, and creatinine. Two electrophoretic morphs of *T. rugosus* belong to geographically different populations, which deserve, at least, subspecific status. One protein band was observed only in males.

Key words: Sauria; Scincidae; *Trachydosaurus rugosus*; determination of sex; sounding; testosterone and estradiol radio-immunoassay.

Einleitung

Die Bestimmung der Geschlechter ist leider nicht bei allen Reptilien einfach. Für uns stellte sich dieses Problem bei acht Tannenzapfenechsen, die bekanntlich keinen eindeutigen Sexualdimorphismus zeigen. Wir stellten uns die Aufgabe, die Geschlechtsbestimmung sowohl mit der in letzter Zeit favorisierten Knopfsondenmethode (SZIDAT 1968, HONEGGER 1978, HITZ 1984) als auch mit der bei Reptilien noch nicht etablierten Testosteronbestimmung aus dem Blut (RÜEDI et al. 1981) vorzunehmen, so daß ein Methodenvergleich möglich wird. Aus dem verbleibenden Blutserum bestimmten wir weitere Hormon- und klinisch-chemische Parameter und führten eine Gelelektrophorese der Blutproteine durch.

Methodik

Die Blutentnahme bei *Trachydosaurus rugosus* erfordert einige Übung und Geduld. Man nimmt das Tier in beide Hände und läßt dann die hintere Körperhälfte frei herunterhängen. Der Vorderkörper muß dabei waagrecht bleiben, da die Tannenzapfenechse sonst unruhig wird. Wenn die Echse entspannt auf einer Hand sitzt, hält man mit der freigewordenen Hand den Schwanz so, daß seine Unterseite nach vorne zeigt. Ein Helfer muß nun in der Mitte des letzten Schwanzdrittels (dies, um Verletzungen der Hemipenes der Männchen auszu-schließen) zwischen den Schuppen mit der Nadel (zum Beispiel 20 G × 1,5 Zoll) bis zur Wirbelsäule einstechen. Der Kolben des Blutentnahmesystems wird nun halb hochgezogen. Darauf tastet man mit der Nadel quer zur Wirbelsäule, bis man die Schwanzvene trifft. Dabei sind leichte Auf- und Abbewegungen der Nadel erforderlich, um die Schwanzvene zu verletzen. Bei manchen Tieren gelingt dies auf Anhieb, bei anderen erst nach mehrmaligem, minutenlangem Suchen. Echsen wie *Trachydosaurus* oder *Uromastyx* zeigen dabei keine Spur von Schmerzempfinden.

Auf diese Weise wurde den Tieren 1 bis 6 Ende April 1985, den Tieren 7 und 8 mehrfach zwischen Mitte Dezember 1984 und Anfang März 1985 je bis zu 1 ml Blut entnommen. Das Blutentnahmesystem enthielt keinerlei Zusätze. Nach Entnahme wurde das Blut circa 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen und danach 10 min bei 3 000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde bei -20°C zwei Tage eingefroren.

Zur Bestimmung von Testosteron und Östradiol wurde jeweils ein kompetitiver Radioimmunoassay (Jod-125) mit Extraktionsverfahren (Diäthyläther) verwendet. Die Trennung erfolgte mit Polyäthylenglykol (PEG). Die untere Nachweisgrenze lag für Testosteron bei 0,04 ng/ml und für Östradiol bei 3,8 pg/ml. Ein Doppel-Antikörper-RIA (Jod-125) mit Standards aus Hundeserum wurde zur Gesamt-T4-(Thyroxin)-Bestimmung eingesetzt (nur bei zwei Tieren).

Bei sechs *T. rugosus* wurden folgende klinisch-chemische Bestimmungen im Serum durchgeführt:

1. Gesamteiweiß (Biuret ohne Probenleerwert/Endwert)
2. Cholesterin (Enzymatischer Farbttest [CHOD-PAP]/Endwert)
3. Glucose (Gluc-DH mit Enteiweißung/Endwert)
4. Calcium (o-Kresolphtalein-Komplexon, ohne Enteiweißung/Endwert)
5. Creatinin (Jaffe ohne Enteiweißung/kinetisch)

Für diese sechs Tiere wurde schließlich eine diskontinuierliche senkrechte Polyacrylamid-Plattenelektrophorese der Serumproteine durchgeführt (Sammegel: 2,5%ig, pH 7,8; Trenngel: 7,5%ig, pH 8,4; Puffer: Tris-Glycin, pH 8,7; Laufstrecke 5,5 cm; Laufzeiten: 30 min bei 50 V/35 mA, 30 min bei 75 V/56 mA, 3 h bei 100 V/68 mA). Färbung: 2 h in Coomassie-blue/Äthanol/Eisessig. Differenzierung: 2 Tage in Essigsäure (7,5 %).

Die Hemipenis-Sondierung führte Herr Dr. HITZ mit Knopfsonden nach der von ihm beschriebenen Methode (HITZ 1984) durch. Die Ergebnisse der Hormonbestimmungen waren ihm zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Hormon- und Sondierungswerte sind in Tabelle 1 vergleichend dargestellt.

Testosteron ist ein Androgen, das überwiegend im Hoden gebildet wird. Deshalb sollte der Wert dieses Hormons bei einem männlichen Tier eindeutig höher sein als bei einem weiblichen. JUDD et al. (1977) haben Testosteron bei sieben *Varanus komodoensis* bestimmt. Davon hatten drei Warane Werte unter 700 pg/ml (0,7 ng/ml) vier dagegen zwischen 5 910 pg/ml und mehr als 16 000 pg/ml. Diese vier wurden aufgrund der Ergebnisse als männliche, die restlichen drei als weibliche Tiere eingestuft.

Der Vergleich der Testosteron-Werte bei Tannenzapfenechsen und Komodowaranen macht wahrscheinlich, daß mit dieser Methode eine klare Unterscheidung der Geschlechter möglich ist.

Tier Nr.	Gesamtlänge (cm)	Sondierungstiefe (cm)		Geschlecht nach Sondierung	Testosteron im Serum (ng/ml)	Östradiol im Serum	Geschlecht nach Testosteron-Bestimmung
		links	rechts				
1	35	1,5	0,7	♂	2,5	13,6	♂
		2,2	0,5	♂			
2	39	3,5	3,6	♂	4,8	8,6	♂
		2,4	0,5	♂			
3	36	2,2	2,0	♂	<0,05	7,6	♀
		0,5	0,5	♀			
4	37	0,5	0,5	♀	<0,05	16,4	♀
		0,5	0,5	♀			
5	33	2,5	0,5	♂	2,7	17,6	♂
		1,0	0,8	♀			
6	39	1,0	0,8	♀	<0,05	23,2	♀
		0,5	0,5	♀			
7 (15. 12.) (30. 1.) (28. 2.)	34	0,5	0,5	♀	0,3	6,0	♀
					0,04	23,0	♀
					0,3	25,6	♀
8 (15. 12.) (30. 1.) (28. 2.)	35	2,2	1,1	♂	19,2	< 3,8	♂
					7,1	4,8	♂
					11,8		♂

Tab. 1. Versuch der Geschlechtsbestimmung bei *Trachydosaurus rugosus* mit Hilfe von Hemipenis-Sondierungen und Hormonanalysen.

Attempted sex determination by sounding of hemipenes and by hormone assays in *Trachydosaurus rugosus*.

Es ist jedoch zu beachten, daß in zwei Fällen (Tier 3 und Tier 5) anfänglich ein Widerspruch zwischen den Ergebnissen der Testosteronbestimmung und denen der Sondierung bestanden (Tab. 1). Eine Zweitsondierung ergab in einem Fall (Nr. 5) eine Korrektur im Sinne der Testosteronwerte, im zweiten Fall (Nr. 3) nicht. Der hier verbleibende Widerspruch ist noch ungeklärt. HITZ (mdl).

Mitt.) neigt zu der Ansicht, daß aufgrund der einen Fehlsondierung auch beim anderen Tier Skepsis bezüglich der Sicherheit der Sondenmethode angebracht ist. Bei nachgiebigem Gewebe kann unter Umständen auch beim Weibchen die Knopfsonde mehr als 1 cm in die Schwanzwurzel eingeführt werden (vgl. auch Tier 6), während beim Männchen Muskelkontraktionen das Eindringen der Sonde erschweren können (vgl. die beiden Messungen an Tier 1). Die Sondenmethode ist also mit Unsicherheiten behaftet.

Andererseits ist auch nicht ganz ausgeschlossen, daß ein niedriger Testosteronspiegel (zum Beispiel krankheits- oder konstitutionsbedingt) auch beim Männchen zeitweise auftritt, zumal saisonale Schwankungen sicher auftreten (BOURNE & SEAMARK 1975: von 3 ng/ml im Juni bis 33 ng/ml im Oktober in Süd-Australien). Sicher ist, daß Tiere mit hohen Testosteronwerten männlich sind.

Eine Interpretation der Werte für Östradiol (Follikelhormon) und Gesamt-T4 (Schilddrüsenhormon; nur bei Tier 7 = 0,15 µg/ml und Tier 8 = 0,28 µg/ml bestimmt) ist zur Zeit nicht möglich. Jedoch scheinen besonders hohe Östradiolwerte (> 20 pg/ml) nur bei Weibchen vorzukommen. Es wird hier gezeigt, daß mit entsprechend empfindlichen RIAs die Möglichkeit besteht, diese Hormone auch bei Reptilien nachzuweisen. Eine Messung über ein ganzes Jahr könnte eventuell zeigen, inwieweit diese Hormone im Zusammenhang mit Winterruhe, Häutung und/oder Fortpflanzungsperiode stehen (MARCUS 1983).

Die klinisch-chemischen Bestimmungen (Tab. 2), ebenso wie das Bluteiweißbild (Abb. 1), haben vor allem Bedeutung zur Bestimmung von veterinärmedizinischen Normalwerten, um pathologische Abweichungen erkennbar zu machen (WILL 1975).

Tier Nr.	Gesamteiweiß (g/dl)	Cholesterin (mg/dl)	Calcium (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Creatinin (mg/dl)
2 (♂)	3,8	119	10,6	108	0,8
4 (♀)	5,7	89	11,3	171	—
5 (♂)	5,4	155	9,7	127	0,4
6 (♀)	4,6	145	10,6	118	—
7 (♀) 15. 12.	5,5	109	11,9	137,6	0,4
30. 1.	6,2	112	10,6	113,3	0,6
28. 2.	5,9	131	—	—	—
8 (♂) 15. 12.	6,4	141	10,7	140,4	0,6
30. 1.	6,5	134	—	—	—

Tab. 2. Klinisch-chemische Analysenergebnisse bei *Trachydosaurus rugosus*.
Results of chemical analysis of clinical blood parameters in *Trachydosaurus rugosus*.

Gesamteiweißwerte sind interessant für die Erkennung einer Hypo- oder Hyperproteinämie. Beide Erkrankungsmöglichkeiten sind bei den hier untersuchten Tieren nicht akut, da die gefundenen Werte innerhalb des von DES-SAUER (1974: 190) für Echsen angegebenen Spektrums von 3 bis 7,8 g/dl liegen.

Als wichtiges Intermediärprodukt im Fettstoffwechsel (Bestandteil von Lipoproteinen) ist Cholesterin im Blut aller Wirbeltiere zu finden. Es wird größtenteils in der Leber zu Gallensäuren umgewandelt (KARLSON 1977). Der Cholesterinspiegel kann daher zur Diagnose von Lebererkrankungen dienen. Ein dauerhaft erhöhter Cholesterinspiegel kann auch bei Reptilien zu Arteriosklerose führen (FINLAYSON 1964). Leider liegen uns keine Referenzwerte für Echsen vor. Bei Viperiden wurden 100 bis über 220 mg/dl gemessen, bei Schildkröten 69 bis 480 mg/dl (DESSAUER 1970).

Als eines der Hauptstoffwechselprodukte unterliegt Glucose größeren kurz- und mittelfristigen Schwankungen. Die Glucosekonzentration im Blut ist unter anderem von der Stoffwechselintensität und damit bei wechselwarmen Tieren von der Außentemperatur abhängig. Bei Schildkröten wurde mit höheren Temperaturen ein Abfall, bei anderen Reptilien ein Anstieg des Blutzuckers beobachtet. In Erregung haben Reptilien, wie Säugetiere, einen hormonell bedingten höheren Blutzuckergehalt. Vor und während Ruheperioden sinkt die Glucosekonzentration im Blut (DESSAUER 1970: 19f).

Die bei *T. rugosus* gemessenen Werte sind verhältnismäßig niedrig, da Echsen mit gewöhnlich über 150 mg/dl mehr Glucose im Blut haben als andere Reptilien. Diese von DESSAUER (l. c.) nach der Glucoseoxidase-Methode gewonnenen Werte sind allerdings nicht unbedingt direkt mit unseren Meßdaten vergleichbar. Unsere Werte erscheinen nicht besorgniserregend. Ein Absinken auf sehr niedrige Werte (unter 50 mg/dl) sollte jedoch bei Squamaten als Alarmzeichen eines sehr schlechten Ernährungszustands gewertet werden. Bei Schildkröten können niedrigere Werte noch als normal gelten.

Bei Calcium gibt DESSAUER (1970) für Squamaten Serumwerte zwischen 9,2 und 11,6 mg/dl an. Nur einer der von uns ermittelten Werte, nämlich der vom 30. 1. 1985 bei Tier 7, liegt höher. Da die Ca-Werte während des Östrus weiblicher Reptilien 300 mg/dl überschreiten können (DESSAUER, l. c.: 36), können hohe Blutcalciumkonzentrationen zur Bestätigung der Geschlechtsdetermination dienlich sein.

Creatinin-Werte können am ehesten in Zusammenhang mit der Nierenleistung gebracht werden, das heißt sinkt die Nierenleistung, steigt die Creatininkonzentration an. Da uns jedoch Werte aus der Literatur nicht bekannt sind, muß eine Interpretation zurückgestellt werden, bis mehr Ergebnisse vorliegen.

Die Elektropherogramme (Abb. 1) zeigen als erstes eine Zweiteilung der untersuchten sechs Tiere in zwei serologische Morphen (Tiere 2, 7 und 8 gegenüber den anderen drei Tieren). Diese Morphen entsprechen zwei Phänotypen von *T. rugosus*, die bereits aufgrund ihrer Färbung und Musterung auseinandergehalten werden können (vgl. Abb. 2). Die Tiere 2, 7 und 8 zählen zu einer westlichen Form der Tannenzapfenechse, die aufgrund der Unterschiedlichkeit vor allem bei der Albuminbande (unterste Banden in Abb. 1) mindestens Unterart rang verdient (vgl. zum Beispiel JOGER 1984) und von COGGER (1979) auch tatsächlich als Unterart *T. r. asper* aufgeführt wird. Die restlichen Tiere gehören alle der östlichen Form *T. r. rugosus* an.

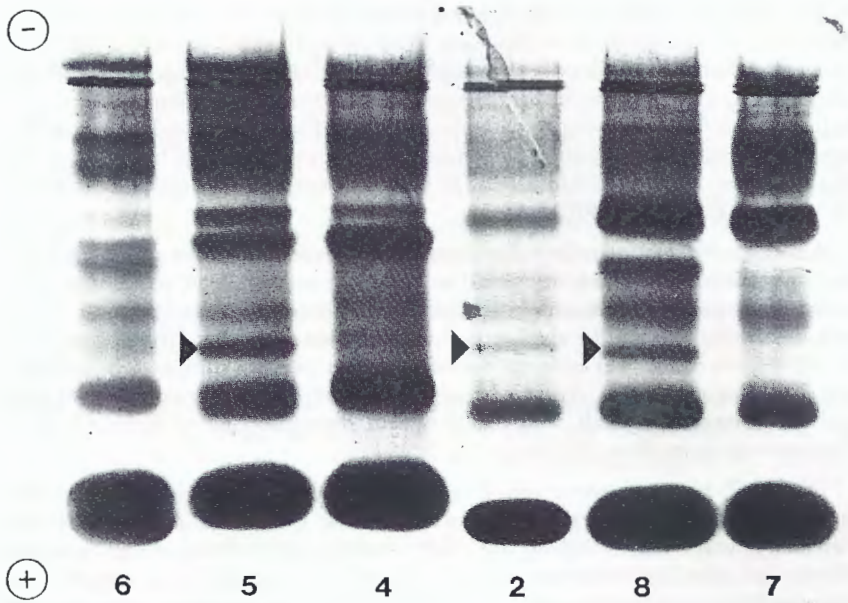


Abb. 1 Elektropherogramme von sechs *Trachydosaurus rugosus*. Links drei Exemplare der westlichen Unterart *T. r. asper*. Pfeile bezeichnen eine nur bei den Männchen beobachtete Bande.

Electrophoretic pattern of blood proteins of six *Trachydosaurus rugosus*. Left three specimens of the western subspecies, *T. r. asper*. Arrows indicate a band which was observed only in males.

Äußerst interessant ist weiter, daß eine andere Bande (Pfeil in Abb. 1) nur bei den drei als Männchen identifizierten Tieren auftritt und bei den drei Weibchen fehlt. Die Identität des betreffenden Proteins ist nicht bekannt. Da geschlechtsspezifische Proteinbanden bisher nicht bekannt geworden sind, wollen wir von einer weiteren Deutung des Phänomens vorerst noch Abstand nehmen.

Weitere serologische Untersuchungen sind geplant.

Dank

Unser Dank gilt Herrn Dr. R. HITZ für die Durchführung der Sondierungen sowie Herrn Dipl.-Biochem. HUNDT und der Firma Elias-Entwicklungslabor für Immunoassays, ohne deren Hilfe die biochemischen Analysen nicht möglich gewesen wären.

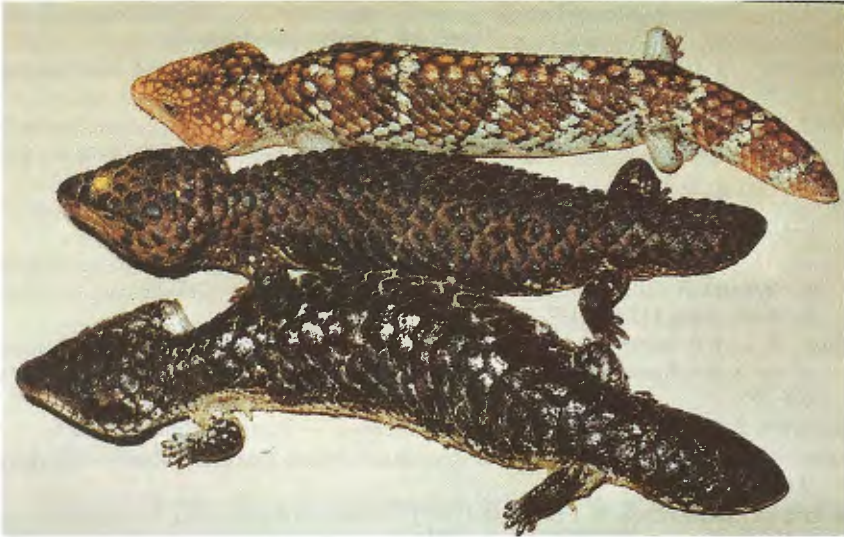


Abb. 2. *Trachydosaurus rugosus*; oben: *T. r. asper*, Männchen (Nr. 2); Mitte: *T. r. rugosus*, wahrscheinlich Weibchen (Nr. 3); unten: *T. r. rugosus*, Weibchen (Nr. 6). — Aufn. B. Boderke, Neuss.

Above: *Trachydosaurus rugosus asper*, male (individual no. 2); centre: *T. r. rugosus*, probable female (no. 3); below: *T. r. rugosus*, female (no. 6).

Zusammenfassung

Die Testosteron-Bestimmung im Serum ist der Knopfsondenmethode bei der Unterscheidung der Geschlechter von *Trachydosaurus rugosus* überlegen. Bei sieben von acht Tieren gelang eine eindeutige Determination der Geschlechtszugehörigkeit.

Elektrophoretisch sind bei *T. rugosus* zwei Formen unterscheidbar, denen zumindest Unterart rang zukommt. Eine Proteinbande trat bei den untersuchten Tieren nur bei den Männchen auf.

Weiterhin werden Serumwerte für Östradiol, Thyroxin, Gesamteiweiß, Glucose, Calcium und Creatinin mitgeteilt und diskutiert.

Schriften

- BOURNE, A. R. & R. F. SEAMARK (1975): Seasonal changes in 17β -Hydroxysteroids in the plasma of a male lizard (*Tiliqua rugosa*). — *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford., **50B**: 535-536.
- COGGER, H. G. (1979): *Reptiles & Amphibians of Australia*. — 2. Aufl., Sydney (Reed), 608 S.
- DESSAUER, H. C. (1970): Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects. — In: GANS, C. & T. S. PARSONS: (eds.): *Biology of the Reptilia*, Vol. 3: 1-72. — London (Academic Press).

- (1974): Plasma proteins of Reptilia. — In: FLORKIN, M. & B. T. SCHEER (eds.): Chemical Zoology, Vol. 9: 187-216. — New York, London (Academic Press).
- FINLAYSON, R. (1964): Vascular disease in captive animals. — Symp. zool. Soc. London 11: 99-106.
- HITZ, R. (1984): Geschlechtsbestimmung bei Echsen der Gattungen *Tiliqua* und *Trachydosaurus* mittels der Sondenmethode (Sauria: Scincidae). — Salamandra, Bonn, 20 (1): 39-42.
- HONEGGER, R. (1978): Geschlechtsbestimmung bei Reptilien. — Salamandra, Frankfurt/M., 14 (2): 69-79.
- JOGER, U. (1984): Morphologische und biochemisch-immunologische Untersuchungen zur Systematik und Evolution der Gattung *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae). — Zool. Jb. Anat., Jena, 112 (2): 137-256.
- JUDD, H. L., J. P. BACON, D. RÜEDI, J. GIRARD & K. BERNISCHKE (1977): Determination of sex in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*. — Int. Zoo Yb., London, 17: 208-209.
- KARLSON, P. (1977): Kurzes Lehrbuch der Biochemie. — Stuttgart (Thieme), 418 S.
- MARCUS, L. C. (1983): Amphibien und Reptilien in Heim, Labor und Zoo. — Stuttgart (Enke), 184 S.
- RÜEDI, D., J. GIRARD & R. HELDSTAB (1977): Geschlechtsbestimmung bei Reptilien mit Hilfe des Testosterons. — Verh. Ber. XIX. intern. Symp. Erkrankung Zootiere 1977: 141-145. Poznan.
- SZIDAT, H. (1968): Eine Methode zur Erkennung des Geschlechts bei Squamaten. — Zool. Garten (N. F.), Leipzig, 35: 281-287.
- WILL, R. (1975): Die Verschiebungen des Bluteiweißbildes (Dysproteinämien) bei Lebererkrankungen von Reptilien (Boidae, Pythonidae, Varanidae). — Zbl. Vet. Med. (Berlin und Hamburg) B, 22: 635-655.

Eingangsdatum: 5. März 1985

Verfasser: Dr. ULRICH JOGER, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Adenauerallee 150-164, D-5300 Bonn 1; ERICH WALLIKIEWITZ, Pehler Hülle 32, D-5040 Brühl; ANDREE HAUSCHILD, Sebastianusstraße 15, D-4048 Grevenbroich 5.