

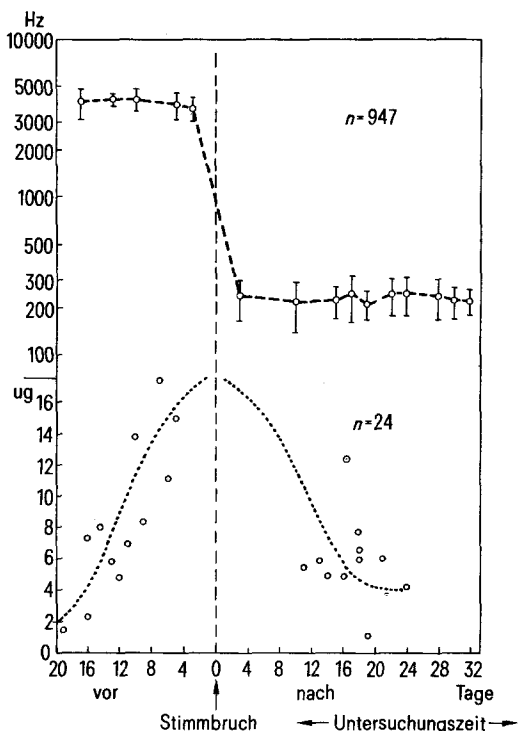
Der Zusammenhang zwischen dem sogenannten Stimmbruch und der täglichen Ketosteroidausscheidung bei juvenilen Haustauben (*Columba livia domestica*)

Der natürliche Stimmbruch der Tauben, d.i. der Abfall der mittleren Frequenzen ihrer Lautäusserungen von 4000 Hz auf 200 Hz, tritt im Alter von 7 bis 8 Wochen auf. Da er zeitlich nicht mit dem Eintritt der Geschlechtsreife, die erst mit 4–6 Monaten erfolgt, zusammenfällt, ist ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhter Testosteronproduktion bei eintretender Geschlechtsreife und der Auslösung des Stimmbruchs nicht zu vermuten. Da jedoch ein künstlicher Stimmbruch bei hypophysektomierten Tauben durch Testosteroninjektionen ausgelöst werden kann¹, könnte eine präpubertäre, kurzfristige Erhöhung des Testosteronspiegels oder derjenige anderer Androgene den Stimmbruch auslösen.

Die tägliche Ausscheidung neutraler Ketosteroide wurde bei 12 jungen, unbehandelten Haustauben (5 ♂♂, 7 ♀♀) während der Stimmbruchphase gemessen, nachdem jene aus dem Harn-Kot-Gemisch extrahiert worden sind ($2 \times 1/2$ h mit 70% Methanol kochen). Der Extrakt wurde hydrolysiert (1,5 N HCl, 36 h bei 35°C) und nach anschliessender Ätherextraktion (1 h Hydrolysat/Äther, 1:1, v/v) von sauren Bestandteilen (mit 10% NaHCO₃, 1:1, v/v) und phenolischen Steroiden (mit 0,2 N NaOH, 1:1 v/v) befreit. Zur weiteren Reinigung wurde die zur Trockene eingedampfte, neutrale Fraktion mit 1 N NaOH unter Erwärmen gelöst und anschliessend mit der gleichen Menge CHCl₃ extrahiert. Dieser Reinigungsprozess

wurde einmal wiederholt und anschliessend inertes Material von der in Äthanol abs. aufgenommenen Fraktion abzentrifugiert. Der so erhaltene Rohextrakt wurde weiterhin dünnstichtchromatographisch (Sandwichkammer, Kieselgel G, CHCl₃/Äther 4:1, 22°C) gereinigt, indem die Kieselgelschicht, ausgenommen Startlinie und Laufmittelfront, wo nur unspezifische Farbstoffe lagen, abgeschabt und mit Äthanol (1 × 2 ml) sowie Diäthyläther (5 × 2 ml) eluiert wurde. Das Eluat wurde mit der Zimmermann-Reaktion nach der Mikromodifikation von WILSON² auf seinen Ketosteroidgehalt photometrisch geprüft. Mit den Extinktionen bei 460, 520 und 580 nm wurde nach der Korrekturformel von ALLEN³ die korrigierte Extinktion bei 520 nm berechnet. Als Ketosteroid-Eichsubstanz diente DHEA⁴.

Die Datierung des Stimmbruchs der Tauben erfolgte aufgrund der sonographischen Analysen ihrer Lautäusserungen, die wöchentlich einmal auf Tonband aufgenommen wurden. Durch sogenannte Sektionsanalysen wurde die Verteilung der akustischen Energie über das Frequenzspektrum der Lautäusserungen ermittelt und die Frequenz mit dem höchsten Energieanteil zur statistischen Mittelwertbildung herangezogen. Das von einer Taube im Laufe des Tages ausgeschiedene Harn-Kot-Gemisch reichte nicht aus, um die Ketosteroide nach der hier angewandten Methode bestimmen zu können. Demzufolge wurde die Untersuchungszeit auf 5–24 Tage ausgedehnt, indem die gesammelten Ausscheidungen gemeinsam extrahiert wurden und die darin gemessenen Ketosteroidkonzentration dann auf 24 h und 1 kg Körpergewicht umgerechnet wurden. In der Tabelle sind diese Werte der mittleren täglichen Ketosteroidausscheidung bezogen auf den DHEA-Standard getrennt nach Geschlechtern und getrennt nach den Fraktionen, die vor und nach dem Stimmbruch gesammelt wurden, aufgeführt.



Mittlere Frequenzen von Lautäusserungen und Ketosteroidausscheidung in der Stimmbruchphase von juvenilen Haustauben. ----, Mittelwerte der Frequenzen (Hz) mit dem höchsten Energieanteil der Lautäusserungen in der Stimmbruchphase. (Es wurde über die Lautäusserungen aller Tauben gemittelt; I, Inter- und intraindividuelle Streuung der Frequenzwerte;, Untersuchungszeitraum und daraus berechnete mittlere Ketosteroidausscheidung pro kg Körpergewicht bezogen auf 24 h in μg; ..., Verlauf der an die experimentellen Werte vor und nach Stimmbruch angepassten zwei Gompertzfunktionen.

Mittlere Ketosteroidausscheidung bezogen auf 24 h und 1 kg Körpergewicht

Geschlecht	n Fraktion	Mittelwert ± Standardfehler (μg)	Streuung (μg)
♂	5 vor Stimmbr.	7,92 ± 0,99	2,22
♂	5 nach Stimmbr.	5,19 ± 0,36	0,80
♀	7 vor Stimmbr.	8,95 ± 2,42	6,41
♀	7 nach Stimmbr.	6,13 ± 1,27	3,36

Unterschiede zwischen den Werten der täglichen Ketosteroidausscheidung der Fraktionen vor und nach dem Stimmbruch sind für alle 12 Tauben zusammen nach den *t*-Tests von Student⁵ auf dem 10%-Niveau signifikant. Geschlechtsunterschiede in der Ketosteroidausscheidung

¹ M. ABS, J. Orn. 111, 227 (1970).

² H. WILSON, Archs Biochem. Biophys. 52, 217 (1954).

³ W. M. ALLEN, J. clin. Endocr. 10, 71 (1950).

⁴ B. DAHLMANN, Bestimmung von Ketosteroiden aus den Ausscheidungen von jungen Haustauben während der Zeit des «Stimmbruchs». Diplomarbeit Univ. Bochum (1973).

⁵ L. SACHS, Statistische Auswertungsmethoden (Springer, Berlin 1969).

sind weder vor noch nach dem Stimmbruch nachzuweisen. War bei einer Taube der Untersuchungszeitraum, in dem Kot gesammelt wurde, auf wenige Tage vor dem Stimmbruch beschränkt, so ergaben die Messungen eine im Mittel höhere tägliche Ketosteroidausscheidung im Gegensatz zu solchen Tauben, bei denen sich Untersuchungszeitraum auf 2–3 Wochen vor dem Stimmbruch erstreckte. Deren niedrige Werte ergeben sich aus der Mittelung über anfänglich sehr geringen und später erst ansteigenden höheren Ketosteroidausscheidungen. In der Figur sind die Änderungen der mittleren Frequenzen der Lautäusserungen in der Stimmbruchphase und die Ketosteroidausscheidung derselben Tauben in dieser Phase in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitraum dargestellt. Da der Zeitraum, in dem das Untersuchungsmaterial der einzelnen Tauben gesammelt wurde, unterschiedlich war, ergibt sich nach Umrechnung auf 1 kg Körpergewicht und 24 h eine Punkteschar jeweils für die Fraktionen vor und nach dem Stimmbruch.

Vier Tage vor dem Stimmbruch sind die Frequenzen signifikant gegenüber denjenigen 10 Tage vor Stimmbruch um über 400 Hz abgesunken (U-Test von Mann-Whitney, $p < 0,03$, Frequenzwerte sind nicht normal verteilt, wie der Lilliefors-Test von Kolmogorow-Smirnow ergab). Es tritt also eine erste erkennbare Änderung der Frequenzen rund 10 Tage nach einer deutlich erhöhten Steroidausscheidung auf. Auch bei Hausenten und Haushähnen verstreichen ungefähr 10 Tage zwischen einer Erhöhung der Gonadenaktivität und dem Absinken der Frequenzen der Lautäusserungen (ABS, unveröffentlicht). Geschlechtsunterschiede in der Frequenz der Lautäusserungen – die Frequenzen der Lautäusserungen von Weibchen liegen um rund 40 Hz über denjenigen von Männchen – sind erst 24 Tage nach dem Stimmbruch nachweisbar (t -Test nach Student, $p < 0,01$).

Aus dem Anstieg der Werte der Steroidausscheidung mit Annäherung an das Stimmbruchsdatum lässt sich die These ableiten, dass die Ketosteroidausscheidung mit dem Eintritt in die Stimmbruchphase exponentiell anwächst und zum Zeitpunkt des Stimmbruchs ein Maximum durchläuft, um anschliessend wieder auf ein niedrigeres Niveau abzusinken. In der Figur ist diese Hypothese wiedergegeben durch den Verlauf von Gompertzfunktionen

[vor Stimmbruch: $y = 1,2 + 16,5 \exp(-0,09 \exp 0,2 \times)$; nach Stimmbruch: $y = 4 + 15,2 \exp(-0,09 \exp 0,2 \times)$], die den experimentellen Werten angepasst wurden. Ob die angenommene erhöhte Ketosteroidausscheidung bei Eintritt in die Stimmbruchphase den Schluss auf einen gesteigerten Testosteron-Stoffwechsel zulässt, bleibt offen. Dabei ist nämlich zu berücksichtigen, dass RIVAROLA et al.⁶ im Plasma adulter Tauben mehr Androstendion und DHEA als Testosteron nachgewiesen haben.

Eine Auftrennung des Ketosteroidgemisches aus den Kot-Harn-Proben von jungen Tauben mit dem oben beschriebenen Dünnschicht-Chromatographiesystem zeigte, dass das Gemisch aus wenigstens 7 verschiedenen Komponenten besteht (Farbreaktion mit Zimmermann's Reagens nach NEHER⁷). Eine Identifizierung der Komponenten brachte bisher keinen Erfolg⁸.

Summary. The daily ketosteroid excretions from 12 juvenile pigeons were measured during the phase of the breaking of the voice, i.e. from 5 to 12 weeks of age after hatching. The concentrations of the ketosteroids were determined photometrically with the Zimmermann-reaction after extraction of the collected voidings. During the days before the breaking of the voice, the ketosteroid concentrations are elevated. After the breaking of the voice, they sink to a low level.

M. ABS und B. DAHLMANN⁹

*Lehrstuhl für Allgemeine Zoologie,
Ruhr-Universität Bochum,
D-463 Bochum-Querenburg (BR Deutschland),
4. März 1974.*

⁶ M. A. RIVAROLA, CH. A. SNIPES and C. J. MIGEON, *Endocrinology* 82, 115 (1968).

⁷ R. NEHER, *Steroid chromatography* (Elsevier, Amsterdam 1964).

⁸ Berechnungen innerhalb dieser Arbeit wurde mit der Rechenanlage PDP 12 durchgeführt, die die DFG Herrn Prof. Dr. J. SCHWARTZKOPFF zur Verfügung gestellt hat.

⁹ Herrn Prof. Dr. G. Niethammer zum Gedächtnis.

PRO EXPERIMENTIS

An Isotope Dilution Method for the Determination of Dissolved Carbon Dioxide

In order to estimate primary production in natural waters by the radio-carbon method¹, it is necessary to know precisely the amount of inorganic carbon compounds present in those waters. The numerous published methods for this determination divide into two main classes²: a) those in which the pH buffering capacity of the water are used to calculate the inorganic carbon content. b) those in which the inorganic carbon compounds are liberated from the water, and assayed separately. We shall subsequently use the term dissolved carbon dioxide to encompass all components of the equilibrium, i.e. carbon dioxide, carbonic acid, carbonate, and bicarbonate ions.

Methods in Class [a] are simple to perform, but only give satisfactory results in oligotrophic lakes, the open sea and similar situations, and are not suitable for highly polluted waters or waters of variable salinity. Methods in Class [b] tend to require sophisticated or delicate equip-

ment and are only suitable for research laboratories or large and well equipped vessels.

Radioactive isotope dilution analysis, however, offers an alternative to these methods with their inherent limitations, by removing the need for a quantitative recovery, while at the same time providing an extremely sensitive internal standardization. We have therefore adopted this approach in the development of our method for measuring total dissolved carbon dioxide in aqueous solution, a need which arose during the course of our studies of primary production in some Western Scottish sea lochs³.

¹ E. STEEMAN NIELSEN, *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.* 78, 117 (1952).

² T. R. MILBURN and L. C. BEADLE, *J. exp. Biol.* 37, 449 (1960).

³ B. J. B. WOOD, P. B. TETT and A. EDWARDS, *J. Ecol.* 61, 569 (1973).