



Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz	Band 78 Heft 1	S. 47 – 54	2006
--	-------------------	------------	------

ISSN 0373-7586

Beitrag zum 5. Milbenkundlichen Kolloquium vom 6. bis 8. Oktober 2005
im NLU-Institut Biogeografie der Universität Basel

Feinstruktur der Spermatogenese und Spermien von *Antennophorus* sp. (Antennophorina, Trigynaspida, Gamasida, Anactinotrichida)

WENCKE REIHER¹, BEVERLY S. GERDEMAN², GERD ALBERTI¹

¹Universität Greifswald, Zoologisches Institut und Museum, Greifswald

²Vancouver Research & Extension Unit, Washington State University, Vancouver

Abstract

Fine structure of spermatogenesis and spermatozoa in *Antennophorus* sp. (Antennophorina, Trigynaspida, Gamasida, Anactinotrichida) – The male *Antennophorus* sp. possesses the »vacuolated type« of sperm, which is considered as a plesiomorphic feature within the anactinotrichid Acari and develops during a complex spermatogenesis. In contrast to the two other antennophorine mite species investigated with regard to sperm morphology until now, which show a set of remarkable peculiarities, the sperm structure of *Antennophorus* sp. is rather conventional. It shows the following features:

A large vacuole is indented from the posterior by a cytoplasmic column. The membrane of the vacuole is provided with numerous thin processes of peculiar substructure. An acrosomal complex is formed by an acrosomal vacuole, an amorphous subacrosomal material and an acrosomal filament. The acrosomal vacuole is a flat cisterna which extends underneath the plasmalemma leaving only the anterior pole of the sperm free. The long nucleus is attached to the acrosomal cisterna which forms an acrosomal plate in this region. From here, the acrosomal filament runs into an indentation of the nucleus. The posterior pole of the cytoplasmic column is invaginated and thus an acrosomal canal is formed into which the acrosomal plate is transferred. The mature sperm cell, ready to be transferred into the female (also called »prosperrmium«), shows a long nucleus which extends posteriorly into the peripheral cytoplasm. Here it turns back and runs into the column where it is in contact with a peculiar dense material of unknown significance.

Although scarcely investigated, Trigynaspida already show a remarkable diversity of sperm cells of the »vacuolated type«.

Keywords: Acari, comparative spermatology, ultrastructure, vacuolated sperm

Zusammenfassung

Männchen von *Antennophorus* sp. produzieren Spermien vom »Vakuolentyp«, welcher als plesiomorphes Merkmal innerhalb der Anactinotrichida angesehen wird und im Zuge einer komplizierten Spermatogenese entsteht. Im Gegensatz zu den zwei anderen bisher untersuchten Arten der Antennophorina, die eine Reihe von Besonderheiten hinsichtlich der Spermienmorphologie zeigen, sind die Vakuolenspermien von *Antennophorus* sp. eher konventionell gebaut. Sie zeigen die folgenden Merkmale:

Eine große Vakuole wird vom hinteren Zellpol durch eine cytoplasmatische Säule eingebuchtet. Die Membran der Vakuole trägt zahlreiche dünne Fortsätze mit besonderer Feinstruktur. Der Akrosomkomplex besteht aus einer Akrosomvakuole, amorpher subakrosomaler Substanz sowie einem Akrosomfilament. Die Akrosomvakuole ist eine flache Zisterne, die sich unter dem Plasmalemma ausdehnt und nur den vorderen Zellpol freilässt. Der lange Zellkern ist an der Akrosomplatte, einem verdickten Bereich der Akrosomvakuole, angeheftet. Von hier zieht das Akrosomfilament in eine röhrenförmige Einbuchtung des Zellkerns. Der hintere Pol der Cytoplasmasäule ist eingestülpt, wodurch ein Akrosomkanal entsteht, in den die Akrosomplatte verlagert ist. Das übertragungsreife Spermium (auch »Prospermium« genannt) besitzt einen langgestreckten Zellkern, der nach hinten und in das periphere Cytoplasma verläuft. Dort biegt er um und endet in der Cytoplasmasäule mit Kontakt zu einer dichten Substanz unbekannter Bedeutung.

Innerhalb der noch wenig untersuchten Trigynaspida ist bereits jetzt eine bemerkenswerte Formenvielfalt von Spermien vom Vakuolentyp zu erkennen.

1. Einleitung

Alle Acari besitzen aflagellate Spermien, deren Morphologie die Einteilung in zwei Hauptgruppen unterstützt: Anactinotrichida und Actinotrichida. Die Spermien der Anactinotrichida sind meist sehr kompliziert aufgebaut. Bei allen Untergruppen der Anactinotrichida, also den Opilioacarida, Holothyrida, Ixodida und Gamasida, finden sich Spermien vom »Vakuolen-Typ«. Andere Typen (z.B. Bänder-Typ bei einigen Gamasida) sind innerhalb der Taxa entstanden. Der Vakuolen-Typ ist besonders kompliziert und entsteht im Verlauf einer sehr eigenartigen Spermatogenese. Nichts desto weniger muss dieser Typ als plesiomorph innerhalb der Anactinotrichida angesehen werden (ALBERTI 1980, 2000a, b, ALBERTI & COONS 1999). Die Gruppe der Gamasida wird oft in zwei große Subtaxa untergliedert, Trigynaspida und Monogynaspida, deren Status aber umstritten ist (z.B. KRANTZ 1978, EVANS 1992). Während bei den Monogynaspida schon eine Reihe von Vertretern aus verschiedenen Gruppen hinsichtlich der Spermienmorphologie untersucht wurden (Heterozercnina, Sejina, Uropodina, Epicriina, Zerconina, Arctacarina, Parasitina, Dermanyssina), liegen bei den Trigynaspida nur von zwei Vertretern erste Resultate vor (ALBERTI 1980, ALBERTI & COONS 1999, ALBERTI & KLOMPEN 2002, ALBERTI & DI PALMA in press, ALBERTI & KRANTZ in press, ALBERTI et al. in press). Da die Spermienmorphologie geeignet ist, Argumente für phylogenetisch-systematische Interpretationen zu liefern (z.B. BACCETTI 1979, ALBERTI 1980, 1984, 2000b, JAMIESON et al. 1999), soll mit diesem Beitrag die Kenntnis der Spermienmorphologie im Bereich dieser Gruppe erweitert werden.

2. Material und Methoden

Als Untersuchungsobjekte dienten Milben der Gattung *Antennophorus*, die am 28.08.2003 bei Lynden, Whatcom Co., WA, USA gesammelt wurden. Dort wurden die Milben einem Nest der Ameisengattung *Lasius* entnommen und anschließend mit 3,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Sørensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) vorfixiert. Nach dem Waschen der Probe mit Sørensen-Phosphatpuffer wurde das Material mit 2 % Osmiumtetroxid (wässrige Lösung) für 2 Stunden nachfixiert. Dem schlossen sich eine erneute Spülung mit 0,1 M Phosphatpuffer und die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe an. Die Einbettung erfolgte in Spurr-Medium (SPURR 1969).

Mittels eines Leica-Ultramikrotoms wurden dann mit einem Diamantmesser 70 nm dicke Ultradünnschnitte vom Objekt hergestellt. Diese wurden für 5 Minuten mit Uranylacetat (gesättigte Lösung, in 70 % Methanol) und für 10 Minuten mit Bleicitrat (wässrige Lösung) kontrastiert (REYNOLDS 1963). Für die Untersuchung der Schnitte wurde ein Zeiss EM 10A-Transmissionselektronenmikroskop (TEM) verwendet.

3. Ergebnisse

Die Reifung der Keimzellen im Hoden erfolgt nach Abschluss der Teilungsprozesse in Gruppen (sogenannten Cysten), die von den somatischen Zellen des Hodens umgeben und dadurch von anderen Gruppen separiert werden. Die Keimzellen innerhalb einer Cyste sind untereinander über einen längeren Zeitraum durch Zellbrücken verbunden (Abb. 1a, b, d) und befinden sich im gleichen Stadium der Entwicklung.

Während der frühen Spermiogenese von *Antennophorus* sp. werden durch den Golgi-Apparat in den Spermatiden zahlreiche kleine, anfangs rundliche Bläschen (periphere Vesikel) gebildet, die nahe der Zelloberfläche aufgereiht sind, wo sie sich nach und nach vergrößern und eine charakteristische Form annehmen (Abb. 1a – c). Die sich anschließenden Vorgänge führen zu einer Polarisierung der Zellen. An einer bestimmten Stelle setzt nahe dem Plasmalemma mit der Entstehung der Akrosomplatte, die später nur einen kleinen, leicht verdickten Bereich der Akrosomvakuole darstellen wird, die Bildung des Akrosoms ein. Die peripheren Vesikel konzentrieren sich an dem (vorderen) Zellpol, der der Akrosomplatte gegenüberliegt (Abb. 1d), und verschmelzen dort schließlich miteinander, wodurch eine große Vakuole entsteht (Abb. 1e).

Der Zellkern wird während einer frühen Phase der Chromatinkondensation an der Akrosomplatte fixiert. Mit der Verdichtung des Kernmaterials einhergehend findet eine Längsstreckung des Zellkerns statt, wobei das eine Ende an der Akrosomplatte befestigt ist, während das andere Ende mit einer im Folgenden als »dunkle Substanz« bezeichneten Struktur in Kontakt steht (Abb. 1d, f), die mit fortschreitender Chromatinkondensation an Volumen zunimmt. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich vor allem um Histone u.a. Kernproteine, die während der Verdichtung des Kerninhaltes aus dem Inneren des Zellkerns ausgestoßen werden. Die genaue Zusammensetzung und Funktion dieses Materials sind jedoch noch unbekannt.

Die typische Gestalt der übertragungsreifen Spermien (in der Literatur über Zecken auch Prospermien genannt; Abb. 1f, g; 2a, b) entsteht schließlich durch eine vom hinteren Bereich der Zelle ausgehende Einstülpung der Vakuole, die dieser ein becherförmiges Aussehen verleiht. Charakteristisch für die Spermien ist die Unterteilung des Cytoplasmas in einen zentralen und einen peripheren Bereich, die durch die nun recht englumige Vakuole größtenteils voneinander getrennt werden und nur im hintersten Teil der Zelle in Verbindung stehen (Abb. 2a, b). Der innere Cytoplasmabereich hat in etwa die Form einer kurzen, vorn abgerundeten Säule, wohingegen der schmale äußere Bereich den inneren wie ein Mantel umschließt. Mikrovilliartige Zellfortsätze verlaufen innerhalb der Vakuole und bilden eine spezielle Randstruktur, die nur im Bereich des Vorderendes fehlt (Abb. 1g; 2a, b).

Von der Akrosomplatte ausgehend hat sich die Akrosomvakuole als extrem abgeflachte Zisterne dicht unter dem Plasmalemma so weit ausgedehnt, dass nur das Vorderende des Spermiums von ihr ausgespart bleibt. Vom Hinterende der Zelle ausgehend ragt ein extrazellulärer Kanal, begrenzt von der nach innen gestülpten Zellmembran, weit in den

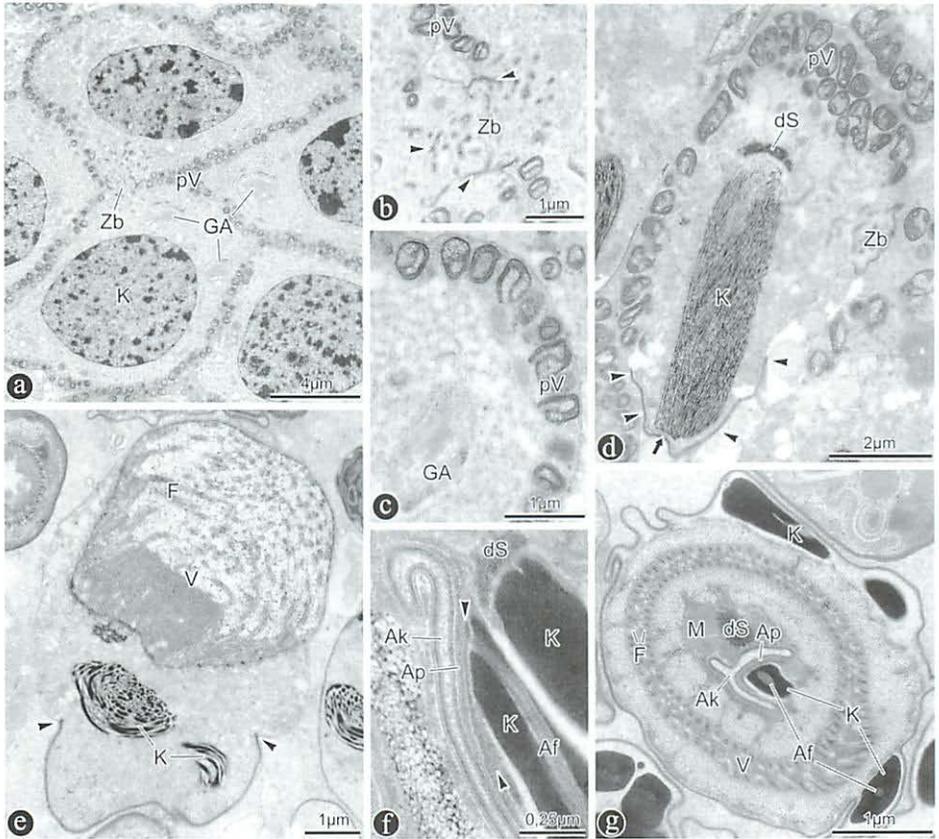


Abb. 1 a – e: Spermatiden im Hoden (TEM)

- a: Gruppe von Spermatiden (Cyste). Die Spermatiden innerhalb der Cyste sind über Zellbrücken miteinander verbunden. Unter dem Plasmalemma der Zellen sind zahlreiche, noch recht kleine periphere Vesikel aufgereiht. Der Golgi-Apparat ist in diesem Stadium sehr aktiv.
- b: Einzelne Zellbrücke, die zwei Spermatiden miteinander verbindet. Das Plasmalemma, das die Zellbrücke begrenzt, entsendet an einzelnen Stellen schmale, tubuläre Einstülpungen nach innen. Diese Tubuli durchsetzen mit ihren Verzweigungen das umliegende Cytoplasma (Pfeilköpfe).
- c: Ausschnitt einer Spermatide. Die peripheren Vesikel vergrößern sich mit der Zeit und nehmen eine in etwa becherförmige Gestalt an.
- d: An einem Pol der Spermatide hat sich die Akrosomvakuole gebildet, die sich nun von der Akrosomplatte (Pfeil) ausgehend flach unterhalb des Plasmalemmas ausdehnt (Pfeilköpfe). Der eine Pol des Zellkerns ist an der Akrosomplatte fixiert, an seinem anderen Ende entsteht die dunkle Substanz. Durch die Anordnung der kondensierenden Chromatinfibrillen im Zellkern entsteht dessen längsgestreiftes Aussehen. Die peripheren Vesikel sammeln sich in der vorderen Region der Zelle, um dort miteinander zu verschmelzen.
- e: Durch die Verschmelzung der peripheren Vesikel ist die große Vakuole entstanden, in deren Inneres zahlreiche Fortsätze der Vakuolenmembran hineinragen. Die Pfeilköpfe markieren den Rand der sich weiter ausdehnenden Akrosomvakuole.

f, g: Übertragungsreife Spermien (»Prospermien«) im Vas deferens (TEM).

f: Akrosomregion eines Spermiums im Längsschnitt. Die beiden Enden des langgestreckten Zellkerns liegen in dieser Zelle direkt nebeneinander. An der Akrosomplatte, die nun dem Akrosomkanal anliegt, beginnt das Akrosomfilament. Von dort aus erstreckt es sich weit durch den Zellkern. Die Pfeilköpfe deuten auf das elektronendichte Material der amorphen subakrosomalen Substanz.

g: Querschnitt durch ein Spermium auf Höhe der Akrosomplatte (vgl. Abb. 2b), der die regelmäßige Anordnung der längs ausgerichteten Fortsätze der Vakuolenmembran erkennen lässt.

Abk.: Af – Akrosomfilament; Ak – Akrosomkanal; Ap – Akrosomplatte; dS – dunkle Substanz; F – Fortsätze der Vakuolenmembran, die ins Lumen der Vakuole reichen; GA – Golgi-Apparat; K – Zellkern; M – Mitochondrien; pV – periphere Vesikel; V – Vakuole; Zb – Zellbrücke

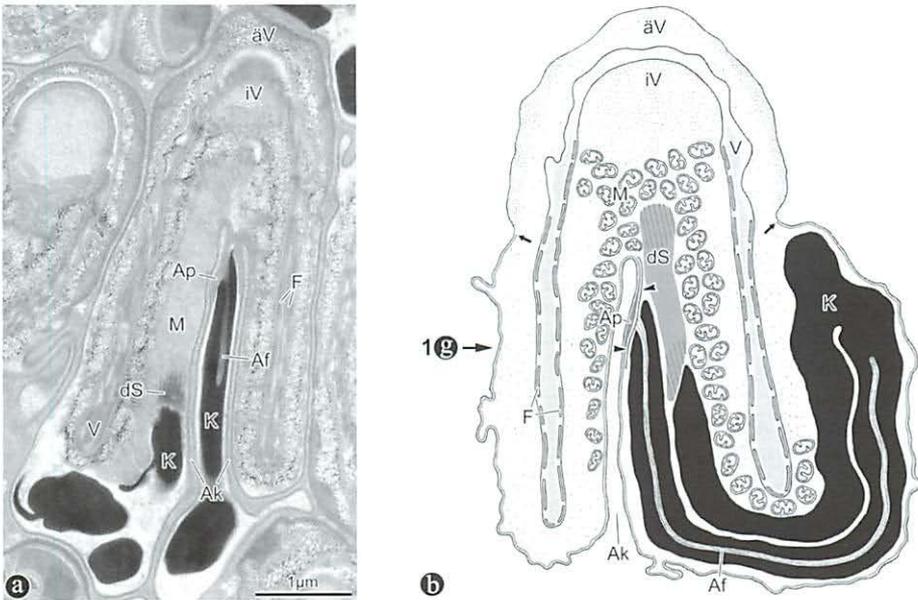


Abb. 2 Übertragungsreife Spermien

a: Längsschnitt durch ein Spermium (TEM). Innerhalb der zentralen Cytoplasmasäule liegen zahlreiche dicht aneinander gedrängte Mitochondrien, die im Bereich des abgerundeten Vorderendes jedoch fehlen. Der Akrosomkanal legt sich flach dem Zellkern an und ist dadurch mit diesem Schnitt zweimal getroffen worden.

b: Schematischer Längsschnitt eines Spermiums. Links ist die Lage des in Abb. 1g dargestellten Querschnittes angegeben. Die Pfeile markieren den Rand der Akrosomvakuole, von der nur der vordere Teil des Spermiums ausgespart bleibt. Die Pfeilköpfe deuten auf die amorphe subakrosomale Substanz.

Abk.: Af – Akrosomfilament; Ak – Akrosomkanal; Ap – Akrosomplatte; äV – äußeres Vorderende (Vorderende des peripheren Cytoplasmamantels); dS – dunkle Substanz; F – Fortsätze der Vakuolenmembran, die ins Lumen der Vakuole reichen; iV – inneres Vorderende (Vorderende der zentralen Cytoplasmasäule); K – Zellkern; M – Mitochondrien; V – Vakuole

inneren Cytoplasmabereich hinein (Abb. 1f; 2a, b). Dieser Akrosomkanal entsteht während oder nach der Hervorstülpung der Cytoplasmensäule und offensichtlich wird bei seiner Ausbildung zusammen mit der Akrosomplatte auch der daran fixierte Pol des Zellkerns in die Tiefe der Säule verlagert. Das Chromatin des Spermiums ist vollständig kondensiert und der Zellkern daher größtenteils sehr elektronendicht. An der Akrosomplatte beginnend verläuft er nach hinten, zieht in den peripheren Cytoplasmamantel hinein, wo er einige unregelmäßige Windungen vollzieht, kehrt von dort aus wieder in den inneren Cytoplasmabereich zurück und verläuft ein Stück weit in Richtung Zellvorderende. Vom Ende des Zellkerns ausgehend dehnt sich die »dunkle Substanz« in Richtung Zellvorderende aus. An der Akrosomplatte beginnt auch das Akrosomfilament, das sich weit durch den Zellkern zieht.

Die fertigen Spermien werden aus dem Hoden entlassen und sammeln sich im Vas deferens.

4. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit konnte der Vakuolen-Spermientyp bei einer weiteren Art der Antennophorina belegt werden. Damit sind jeweils eine Art aus den folgenden Gruppen untersucht worden: Antennophoroidea, Celaenopsoida und Megisthanoidea, wobei die Befunde von *Celaenopsis badius* noch unvollständig sind. Im Vergleich der drei Arten kann aber schon jetzt gesagt werden, dass die Spermienmorphologien innerhalb der Grundorganisation »Vakuolen-Typ« stark differieren. Die Spermien von *Celaenopsis badius* (Celaenopsidae) bzw. *Megisthanus floridanus* (Megisthanidae) zeigen Besonderheiten, wie sie von anderen Vakuolenspermien nicht bekannt sind (ALBERTI & BLASZAK 1995, ALBERTI & KLOMPEN 2002), wohingegen die Spermien von *Antennophorus* sp. (Antennophoridae) eher konventionell wirken. Sie ähneln stark den Spermien der Uropodina (ALBERTI 1980, 1991). Allerdings fehlt ihnen die bei letzteren beobachtete Längsfurche in der Zellperipherie. In Anbetracht der Tatsache, dass nach wie vor nur ein sehr kleiner Ausschnitt der Trigynaspida (Cercomegistina: 4; Antennophorina: 21 Familien) untersucht wurde, und bei Berücksichtigung der Komplexität der Spermien wird deutlich, dass mit einer weit größeren Vielfalt zu rechnen ist, was wiederum die Erfassung weiterer Taxa dringend wünschenswert macht.

Das weitere Schicksal dieser eigenartigen Spermien ist im Detail nur von Zecken bekannt. Diese produzieren sehr komplizierte, sackförmige Spermatophoren, die dem Weibchen appliziert werden (s. COONS & ALBERTI 1999 mit Ref.). Im Weibchen kommt es zu einer Kapazitation, die von FELDMAN-MUHSAM & FILSHIE (1979) und OLIVER & BRINTON (1973) beschrieben wurde. Dabei wird die Struktur der Spermien drastischen Veränderungen unterzogen, wobei aus den »Prospermien« die bewegungs- und befruchtungsfähigen »Spermiphoren« gebildet werden (COONS & ALBERTI 1999 mit Ref.). Es scheint jedoch wahrscheinlich, dass auch bei anderen Gruppen mit diesem Spermientyp eine Kapazitation in dieser Form abläuft (ALBERTI 1980, ALBERTI & COONS 1999).

5. Danksagung

Wir bedanken uns bei Herrn P. Michalik und Frau Chr. Putzar (Universität Greifswald) für die technische Unterstützung.

6. Literatur

- ALBERTI, G. (1980): Zur Feinstruktur der Spermien und Spermiocyto-genese der Milben (Acari): I. Anactinotrichida. – Zool. Jb. Anat. **104**: 77 – 138
- (1984): The contribution of comparative spermatology to problems of acarine systematics. – In: GRIFFITHS, D. A. & C. E. BOWMAN (eds): Acarology VI, I. Vth Intern. Congr. of Acarology, Edinburgh. – Ellis Horwood lim. Press, Chichester: 479 – 490
- (1991): Spermatology in the Acari: Systematic and functional implications. – In: SCHUSTER, R. & P. W. MURPHY (eds): The Acari: Reproduction, Development and Life-History Strategies. 1st Symp. European Assoc. Acarol., Graz 1988. – Chapman & Hall, London: 77 – 105
- (2000a): Chelicerata. – In: JAMIESON, B. G. M. (ed.): Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny. – In: ADIYODI, K. G. & R. G. ADIYODI (eds): Reproductive Biology of the Invertebrates, Vol. 9. – Oxford & IBH Publishing/Wiley, New Delhi, New York: 311 – 388
- (2000b): Spermatologische Untersuchungen an Gamasiden – Stand und Perspektiven. – Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz **72**: 91 – 96
- & C. BLASZAK (1995): Further observations on spermatozoa in gamasid mites. – In: KROPCZYNSKA, D., J. BOCZEK & A. TOMCZYK (eds): The Acari – Physiological and ecological aspects of Acari-Host Relationships. – Dabor, Warszawa: 15 – 22
- & L. B. COONS (1999): Acari – Mites. – In: HARRISON, F. W. (ed.): Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 8c. – John Wiley & Sons, Inc., New York: 515 – 1265
- & A. DI PALMA (in press): Fine structure of male reproductive systems in *Phytoseiulus persimilis* (Phytoseiidae, Gamasida, Acari). – In: MORALES-MALACARA, J. B., V. BEHAN-PELLETIER, E. UECKERMANN, T. M. PÉREZ, E. ESTRADA, C. GISPÉRT & M. BADIÍ (eds): Acarology XI: Proc. XIth Intern. Congress of Acarology, 2002, Merida, Mexico.
- & H. KLOMPEN (2002): Fine structure of unusual spermatozoa and spermiogenesis of the mite *Megisthanus floridanus* Banks, 1904 (Acari: Gamasida: Antennophorina). – Acta Zool. (Stockh.) **83**: 277 – 295
- & G. W. KRANTZ (in press): Some ultrastructural observations on a species of Arctacaridae (Arctacarina; Gamasida), with remarks on their phylogenetic significance. – In: MORALES-MALACARA, J. B., V. BEHAN-PELLETIER, E. UECKERMANN, T. M. PÉREZ, E. ESTRADA, C. GISPÉRT & M. BADIÍ (eds): Acarology XI: Proc. XIth Intern. Congress of Acarology, 2002, Merida, Mexico
- , B. S. GERDEMAN & H. KLOMPEN (in press): Fine structure of spermiogenesis and sperm in a heterozercionid mite (Heterozercionidae; Heterozercionina; Gamasida). – In: MORALES-MALACARA, J. B., V. BEHAN-PELLETIER, E. UECKERMANN, T. M. PÉREZ, E. ESTRADA, C. GISPÉRT & M. BADIÍ (eds): Acarology XI: Proc. XIth Intern. Congress of Acarology, 2002, Merida, Mexico
- BACCETTI, B. (1979): Ultrastructure of sperm and its bearing on arthropod phylogeny. – In: GUPTA, A. P. (ed.): Arthropod Phylogeny. – Van Nostrand Reinhold Comp., New York: 609 – 644
- COONS, L. B. & G. ALBERTI (1999): Acari – Ticks. – In: HARRISON, F. W. (ed.): Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 8b. – John Wiley & Sons, Inc., New York: 267 – 514
- EVANS, G. O. (1992): Principles of Acarology. – CAB International, Wallingford, 563 S.
- FELDMAN-MUHSAM, B. & B. K. FILSHIE (1979): The ultrastructure of the pro-spermi-um of *Ornithodoros* ticks and its relation to sperm maturation and capacitation. – In: FAWCETT, D. W. & J. M. BEDFORD (eds): The spermatozoon. – Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich: 355 – 369
- JAMIESON, B. G. M., R. DALLAI & B. A. AFZELIUS (1999): Insects – Their Spermatozoa and Phylogeny. – Science Publishers, Inc., Enfield, 550 S.

- KRANTZ, G. W. (1978): A manual of Acarology (2nd Edn) – Oregon State University Book Stores, Corvallis, 509 S.
- OLIVER, J. H. JR & L. P. BRINTON (1973): Sperm maturation in ticks: an example of capacitation in invertebrates? – In: DANIEL, M. & B. ROSICKY (eds): Proc. 3rd Intern. Congr. Acarol., Prague 1971. – W. Junk, The Hague: 733 – 737
- REYNOLDS, E. S. (1963): The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. – J. Cell Biol. **17**: 208 – 212
- SPURR, A. R. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. – J. Ultrastr. Res. **26**: 31 – 43

Manuskriptannahme: 27. März 2006

Anschriften der Verfasser:

Dipl.-Biol. Wencke Reiher / Prof. Dr Gerd Alberti*
Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald
Zoological Institute and Museum
Johann-Sebastian-Bach-Straße 11/12
17489 Greifswald, Germany
e-mail: alberti@uni-greifswald.de

Dr Beverly S. Gerdeman
Vancouver Research & Extension Unit
Washington State University
Vancouver

* korrespondierender Autor