

Wissenschaft

Österreichs Fischerei

Jahrgang 47/1994

Seite 84–89

F. Lahnsteiner, T. Weismann und R. A. Patzner

Neue Gesichtspunkte bei der Gefrierkonservierung von Salmonidensamen

1. Einleitung

Gefrierkonservierung von Fischesamen hat Bedeutung zur effizienteren Ausnutzung von Eimaterial bei der künstlichen Befruchtung von Fischen, im Einkreuzen von Genen aus Wildpopulationen in teichwirtschaftlich gehaltene Populationen und im Artenschutz zur Konservierung von Genen. Aufgrund der großen Bedeutung ist die Gefrierkonservierung von Fischesamen seit etwa 15 Jahren das Ziel intensiver Forschung (Zusammenfassung siehe Jamieson 1991), insbesondere an den Salmoniden wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (z. B. Mounib 1978, Legendre und Billard 1980, Stoss 1983, Piironen und Hyvärinen 1983, Stein und Bayerle 1985, Baynes und Scott 1987, Holtz 1993, Piironen 1993). Die entwickelten Gefrierkonservierungsmethoden weisen aber gegenüber der Befruchtung mit Frischsamen den großen Nachteil auf, daß die Befruchtungsraten signifikant vermindert sind und großen Schwankungen unterliegen.

In dieser Arbeit wird eine Gefrierkonservierungsmethode für den Samen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Renke (*Coregonus sp.*), Seeforelle (*Salmo trutta f. lacustris*) und Bachforelle (*Salmo trutta trutta f. fario*) vorgestellt, mit der Befruchtungsraten von 80–100% der Kontrollbefruchtung erzielt werden.

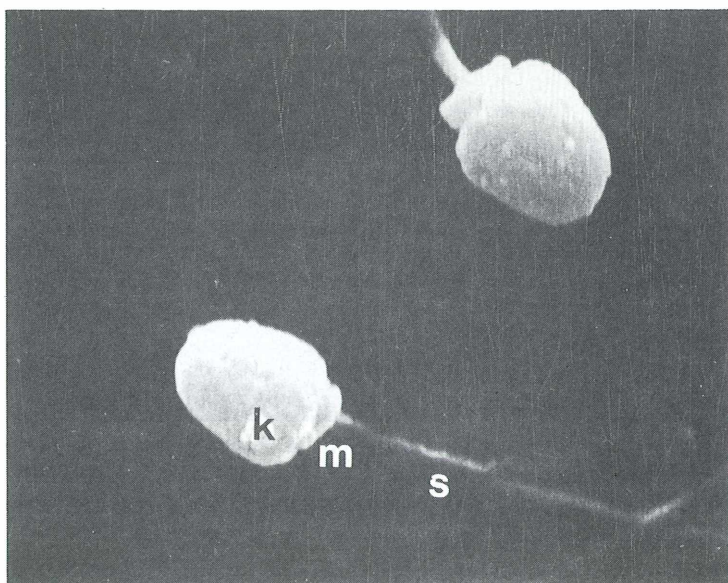


Abbildung 1: Seeforellenspermien. Raster-elektronenmikroskopische Aufnahme.
k – Kopf, m – Mittelstück, s – Schwanz.
Vergrößerung: $\times 8000$

2. Material und Methoden

2.1 Material

Laichreife Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Seeforellen (*Salmo trutta f. lacustris*) und Bachforellen (*Salmo trutta trutta f. fario*) wurden aus Fischzuchten in Oberösterreich und Salzburg bezogen, Renken (*Coregonus sp.*) stammten von Wildfängen aus dem Irrsee. Samen und Eier der Tiere wurden abgestreift und makroskopisch beurteilt: Samen wurde nur verwendet, wenn er von dickflüssiger und weißlicher Konsistenz war und keine Verschmutzung mit Kot, Urin oder Schleim aufwies. Eier wurden auf ihre Form, Transparenz und auf Verkleben geprüft. Die Gameten wurden innerhalb von 30 min. verarbeitet, die Spermiedichte der verwendeten Samenpools wurde in eine Burker-Türk-Zählkammer bei 1000facher Verdünnung der Proben bestimmt.

2.2 Gefrierkonservierung

Samen von drei bis fünf Individuen wurden gepoolt. Der Samenpool wurde in 4° C kaltem Verdünner (Tab. 1) im Verhältnis 1 : 3 eingebracht. Innerhalb von 5 min. wurde er in 0,5-ml-Pailletten aufgezogen und in einem offenen Einfriergerät im Dampf von flüsigem Stickstoff eingefroren. Der Abstand der Pailletten von der Oberfläche des Flüssigstickstoffs betrug 1,5 cm, was einer Temperatur von etwa -160° C entspricht. Nach einer Einfrierdauer von 5 min. wurden die Pailletten in flüssigen Stickstoff übergeführt und maximal drei Monate gelagert. Zur Befruchtung wurden die Pailletten in 25±1° C warmem Wasser 30 sec. aufgetaut. Der aufgetaute Samen wurde sofort nach Beendigung des Auftauvorganges den Eiern zugegeben und gut mit diesen vermischt (Abb. 1a).

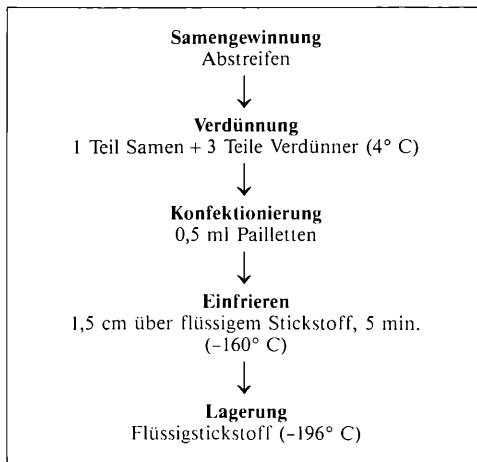
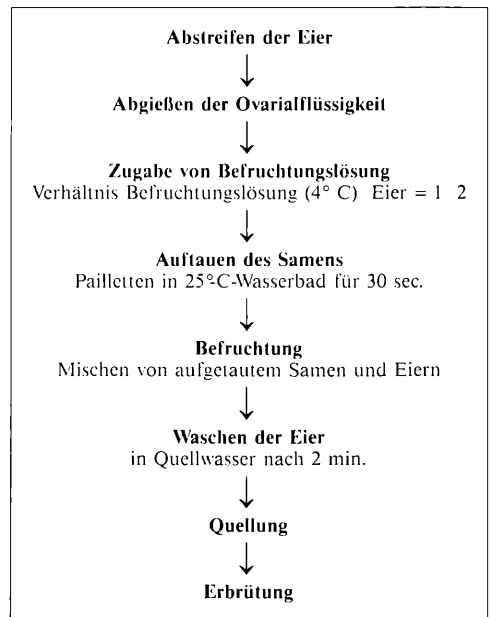
2.3 Befruchtung

Unmittelbar vor der Befruchtung wurde die Ovarialflüssigkeit von den Eiern abgegossen und durch eine spezielle Befruchtungslösung (NaHCO₃ 60 mM, Glycin 20 mM, Theophyllin 5 mM, Tris 50 mM, pH 9) im Verhältnis 1 : 2 (Befruchtungslösung : Eier) ersetzt. Der aufgetaute Samen wurde sofort nach Beendigung des Auftauvorganges den Eiern zugegeben und gut mit diesen vermischt. Etwa 2 min. nach der Befruchtung wurden die Eier gewaschen und in der Fischzuchtanstalt Kreuzstein erbrütet (Abb. 1b).

Tabelle 1: Verdünnerzusammensetzung

Mineralische Komponenten	
NaCl (mM)	103
KCl (mM)	40
MgSO ₄ (mM)	5
CaCl ₂ (mM)	1
Hepes ¹ (mM)	20
pH	7,8
Gefrierschutzmittel	
DMSO (%)	5
Glyzerin (%)	1
Rinderserumalbumin ² (%)	1,5
Hühnereidotter (%)	7
Saccharose (%)	0,5

1 N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N-2-ethane-sulfonic acid
2 SERVA, Bestellnr. 11930

Abbildung 1a: Arbeitsschritte zur Gefrierkonservierung von Samen**Abbildung 1b:** Arbeitsschritte zur Befruchtung von Eiern mit gefrierkonserviertem Samen

Bei Regenbogenforellen wurden 12,5 ml Eier mit 2 Pailletten tiefgefrorenem Samen bzw. 25 ml Eier mit 4, 2 und 1 Paillette befruchtet. Bei Renken, Bachforelle und Seeforelle wurden 12,5 ml Eier mit 2 Pailletten tiefgefrorenem Samen befruchtet. Die Versuche wurden mit verschiedenen Samen- und Eipools wiederholt, um die Methodik auf ihre Zuverlässigkeit zu überprüfen.

2.4 Kontrolle

Für die Kontrollen wurden die gleichen Samen- und Eipools wie für die Gefrierkonservierungsversuche sowie die gleiche Befruchtungstechnik verwendet.

2.5 Erbrütung und Bestimmung der Befruchtungsrates

Die Erbrütung der Eier erfolgte in der Fischzuchtanstalt Kreuzstein. Regenbogenforellen-, Seeforellen- und Bachforelleneier wurden in Brutrahmen, Renkeneier in Zugergläsern in Quellwasser von 8,2–8,5° C erbrütet. Nach Erreichen des Augenpunktstadiums (Renke 20–25 d, Regenbogenforelle 28–30 d, Bach- und Seeforelle 35–38 d) wurde die Anzahl von Eiern mit Augenpunkten im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Eier ermittelt. Die Larven wurden bis zu einer Größe von 5 cm weiter beobachtet und makroskopisch auf Mißbildungen kontrolliert.

3. Ergebnisse

Mit der beschriebenen Gefrierkonservierungsmethode konnten bei allen untersuchten Arten und bei mehrfacher Wiederholung der Experimente Befruchtungsraten erzielt werden, die 80–100% der Kontrolle entsprachen (Tab. 2, 3). Die Befruchtungsraten unterschieden sich nicht, wenn zur Befruchtung 0,5 ml Samen/25 ml Eier (4 Pailletten) oder 0,25 ml Samen/25 ml Eier verwendet wurden. Bei Verwendung von 0,125 ml Samen/25 ml Eier war das Befruchtungsergebnis signifikant verringert und unterlag größeren Schwankungen (Tab. 4). Durch die Befruchtung von Eiern mit gefrierkonserviertem Samen

viertem Samen wurde die Embryonalentwicklung der Larven nicht beeinträchtigt. Die Mortalitätsrate der Embryonen und die Anzahl der Embryonen mit Mißbildungen entsprach der Kontrolle mit Frischsamen (etwa 3–5 %).

Tabelle 2: Befruchtungsraten mit gefrierkonserviertem Samen bei der Regenbogenforelle

Jedes Experiment wurde mit verschiedenen Ei- und Samenpools durchgeführt und 4- bis 5mal wiederholt.

	% Absolutbefeuchtung	% der Kontrollbefeuchtung	Spermien/ Ei ($\times 10^6$)	n
Versuch I	74,3 $\pm$ 6,3	88,9 $\pm$ 7,5	4,0	5
Versuch II	79,1 $\pm$ 5,0	85,4 $\pm$ 4,0	5,1	5
Versuch III	66,4 $\pm$ 8,4	71,5 $\pm$ 8,4	5,5	5
Versuch IV	75,2 $\pm$ 10,4	101,4 $\pm$ 14,3	3,8	5
Mittelwert	73,8 $\pm$ 8,8	89,6 $\pm$ 16,0	4,6 $\pm$ 0,7	20

Tabelle 3: Befruchtungsraten mit gefrierkonserviertem Samen bei Renke, Bachforelle und Seeforelle

Das Ei-/Samenverhältnis wurde in diesen Versuchen nicht standardisiert.

Art	% Absolutbefeuchtung	% Kontrollbefeuchtung	Spermien/ Ei ($\times 10^6$)	n
Renke				
Versuch I	78,1 $\pm$ 2,1	92,8 $\pm$ 2,5	0,45	4
Bachforelle				
Versuch I	88,1 $\pm$ 4,7	98,7 $\pm$ 5,3	9,2	3
Versuch II	82,6 $\pm$ 3,5	92,6 $\pm$ 3,6	8,5	3
Versuch III	84,6 $\pm$ 7,4	94,8 $\pm$ 8,3	10,2	3
Versuch IV	79,3 $\pm$ 2,4	88,8 $\pm$ 2,6	11,7	3
Mittelwert	83,6 $\pm$ 5,8	93,8 $\pm$ 6,4	9,9 $\pm$ 1,2	12
Seeforelle				
Versuch I	76,7 $\pm$ 7,5	80,6 $\pm$ 7,9	4,5	4
Versuch II	79,8 $\pm$ 7,3	90,8 $\pm$ 8,4	3,2	4
Versuch III	85,4 $\pm$ 4,8	87,7 $\pm$ 7,5	6,7	4
Mittelwert	75,8 $\pm$ 7,6	85,0 $\pm$ 8,4	4,8 $\pm$ 1,4	12

4. Diskussion

Unsere Ergebnisse stellen die höchsten Befruchtungsraten mit gefrierkonserviertem Samen dar, die bisher bei Salmoniden publiziert wurden. Die hohen Befruchtungsraten beruhen a) auf einer hier nicht veröffentlichten Optimierung der Verdünnerzusammensetzung und des Einfrierverfahrens mittels Motilitätsstudien und b) auf einem speziellen Auftauverfahren. Spermien der Regenbogenforelle und anderer Salmoniden haben ein

Tabelle 4: Einfluß von verschiedenem Ei-/Samenverhältnis auf die Befruchtungsrate von gefrierkonserviertem Samen bei der Regenbogenforelle

ml Samen/ 25 ml Eier	Spermien/ Ei ($\times 10^6$)	% Absolut- befruchtung	% von Kontroll- befruchtung	n
0,50	3,35 $\pm$ 0,45	72,8 $\pm$ 9,9*	93,7 $\pm$ 21,9*	10
0,25	1,67 $\pm$ 0,22	76,4 $\pm$ 5,2*	94,4 $\pm$ 14,0*	10
0,12	0,83 $\pm$ 0,11	66,3 $\pm$ 14,0	88,4 $\pm$ 27,9	10
Kontrolle 0,12–0,25	1,67 $\pm$ 0,22	80,0 $\pm$ 12,6		6

* Werte unterscheiden sich nicht signifikant, *t*-test $p \leq 0,01$.

physiologisches Temperaturoptimum, das zwischen 4 und 10° C liegt (Billard 1988). Dementsprechend wurden die Pailletten in bisherigen Untersuchungen auch nur bis zu dieser Temperatur aufgetaut. In der vorliegenden Arbeit jedoch werden die Spermien während des Auftauens über dieses Optimum hinaus erwärmt, und die Samentemperatur beträgt innerhalb der Paillette bei Beendigung des Auftauvorganges 20° C. Diese Überwärmung der Spermien ist notwendig, um ihre Befruchtungskapazität zu reaktivieren: Hier nicht dargestellte Versuche zeigten, daß die geringsten Befruchtungsraten erreicht wurden, wenn der Samen nur bis 4° C erwärmt wurde (Lahnsteiner et al., 1994). Die Befruchtungsraten nahmen stetig zu, wenn der Samen auf 10 oder 15° C erwärmt wurde, und hatten ihr Maximum bei 20° C. Eine weitere Erwärmung auf 25° C resultierte wieder in einer Erniedrigung der Befruchtungsrate (Lahnsteiner et al., 1994). Unmittelbar nach der Erwärmung auf 20° C wurde der Samen durch das Einbringen in die 4° C kalte Befruchtungslösung wieder auf klassisch-physiologische Temperaturen abgekühlt.

Experimente bezüglich der zur Befruchtung notwendigen minimalen Samenmenge zeigten, daß bei Verwendung von 0,25 ml gefrierkonserviertem Samen/25 ml Eier (2 Pailletten) verlässliche Ergebnisse erzielt werden können. Die verwendete Samenmenge (aufgerechnet 10 ml/1000 ml Eier) liegt deutlich über der in der Praxis verwendeten Samenmenge, da während der Gefrierkonservierung etwa 50% der Spermien so stark geschädigt werden (Lahnsteiner et al. 1991, Lahnsteiner, unveröffentlicht), daß sie ihre Befruchtungsfähigkeit verlieren.

Die Befruchtungsergebnisse werden auch von der Samenqualität beeinflusst: Der Samen der Salmoniden weist intraspezifische Qualitätsunterschiede auf, verändert sich in seiner Zusammensetzung im Lauf der Laichsaison und ist möglicherweise in der Mitte der Laichsaison am besten zur Gefrierkonservierung geeignet (Legendre und Billard 1980, Stoss 1983). Kontrollverfahren für die Qualitätsprüfung von Samen sind in Bearbeitung.

Zusammenfassung

Eine neue Methodik zur Gefrierkonservierung von Samen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Bachforelle (*Salmo trutta trutta f. fario*), Seeforelle (*Salmo trutta f. lacustris*) und Renke (*Coregonus sp.*) wird beschrieben. Aufgrund einer speziellen Auftautechnik werden mit dieser Methode Befruchtungsraten von 80–100% der Kontrollbefruchtung mit Frischsamen erzielt.

Summary

New aspects of cryopreservation of semen of salmonids

A cryopreservation method for semen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), "lake trout" (*Salmo trutta f. lacustris*), brook trout (*Salmo trutta trutta f. fario*) and whitefish

(*Coregonus sp.*) is described. Using a specialized thawing technique fertilization rates of 80–100% of controls with fresh semen are obtained.

Danksagung

Finanziert vom Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft. Hr. Achleitner, Hr. Ebner, Hr. Hartl und das Konsortium Irrsee stellten in großzügiger Weise Laichmaterial zur Verfügung. Die Mitarbeiter der Fischzuchtanstalt Kreuzstein unterstützten uns bei den Befruchtungsversuchen und der Erbrütung der Eier.

LITERATUR

- Baynes, S. M. & A. P. Scott, 1987: Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: The influence of sperm quality, egg quality and extender composition on postthaw fertility. *Aquaculture* 66: 53–67.
- Billard, R., 1988: Artificial insemination and gamete management in fish. Holtz, W., 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture* 110: 97–100.
- Holtz, W., 1993: Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture*, 110, 97–100.
- Jamieson, B. G. M., 1991: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge, University Press, 319 pp.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1992: Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei) during routine cryopreservation. *Aquaculture* 103: 73–84.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1993: New aspects in cryopreservation of semen of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta trutta* f. *fario*, *Salmo trutta* f. *lacustris*, *Coregonus sp.*). *Aquaculture and Fishery Management*, in Vorbereitung.
- Legendre, M. & R. Billard, 1980: Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep freezing. *Reprod. Nutr. Develop.* 20: 1859–1868.
- Mounib, M. S., 1978: Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 53: 13–18.
- Piironen, J. & H. Hyvärinen, 1983: Cryopreservation of spermatozoa of the whitefish (*Coregonus muksun Pallas*). *J. Fish Biol.* 22: 159–163.
- Piironen, J., 1993: Cryopreservation of sperm from the brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture* 116: 275–285.
- Stein, H. & H. Bayle, 1985: Gameten und Embryonenkonservierung bei Salmoniden. *Bayer. Landwirtsch. Jahrb.* 2: 236–244.
- Stoss, J., 1983: Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: W. J. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson (Editors). *Fish Physiology*, Vol. 9, part B. Academic Press, Orlando, FL, pp. 305–350.

Anschrift der Autoren:

Mag. Dr. Franz Lahnsteiner und Univ.-Doz. Dr. Robert Patzner: Zoologisches Institut der Universität Salzburg, Hellbrunner Straße 34, A-5020 Salzburg
Dipl.-Tzt. Thomas Weismann: Bundesanstalt für Fischereiwirtschaft, Scharfling 18, A-5310 Mondsee

Otfried Wüstemann und B. Kammerad

Ökologische Auswirkungen der allochthonen Fischarten Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) und Silberkarpfen (*Hypophthalmichthys molitrix*) auf Gewässerbiotope – dargestellt am Beispiel von Gewässerökosystemen im Naturpark Drömling in Sachsen-Anhalt (Deutschland)

1. Einleitung

Kanalartiger Ausbau der Fließgewässer, die Melioration ganzer Landstriche, die Zerstörung der natürlichen Ufervegetation (fehlende Beschattung) und eine gestiegene Belastung der Gewässer mit Pflanzennährstoffen förderte in den letzten Jahrzehnten er-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Österreichs Fischerei](#)

Jahr/Year: 1994

Band/Volume: [47](#)

Autor(en)/Author(s): Lahnsteiner Franz, Patzner Robert A., Weismann Thomas

Artikel/Article: [Neue Gesichtspunkte bei der Gefrierkonservierung von Salmonidensamen 84-89](#)