Wissenschaft

Österreichs Fischerei

Jahrgang 44/1991

Seite 194-200

Franz Lahnsteiner, Thomas Weismann und Robert A. Patzner

Gefrierkonservierung von Spermien am Beispiel der Äsche (Thymallus thymallus)

1. Einleitung und Problemstellung

Die Gefrierkonservierung und Lagerung von Spermien in flüssigem Stickstoff (-196°C) wird in der Haustierzucht seit über 30 Jahren angewandt. Die Haltbarkeit scheint nahezu unbegrenzt zu sein – bei Rindern beträgt sie jedenfalls mehrere Jahrzehnte. Für diese Methode ist entscheidend, daß dem Samen vor dem Einfrieren eine spezielle Einfrierlösung (=»Verdünner«) zugesetzt wird. Dieser Verdünner enthält ein Gefrierschutzmittel, Glyzerin oder DMSO (Dimethylsulfoxid), das den Spermien das Wasser entzieht und so eine Eiskristallbildung verhindert. Die Kristalle würden die Membranen der Spermatozoen so zerstören, daß sie nicht mehr lebensfähig wären. Vielfach wird dem Verdünner noch Eidotter zugegeben, von dem man annimmt, daß er einen zusätzlichen Gefrierschutz bewirkt. Die Anwendung für die Befruchtung erfolgt unmittelbar nach dem Auftauen.

Durch die Gefrierkonservierung von Fischspermien sind in Zukunft folgende Erleichterungen und Fortschritte in der praktischen Fischzucht zu erwarten: Eine Sicherstellung der Befruchtung von Rogen, wenn zu wenig oder keine Milchner gefangen werden, um das vorhandene Eimaterial zu befruchten, die Sammlung von Milch (Samen), wenn am Beginn der Laichsaison noch keine laichreifen Rogner vorhanden sind und schließlich züchterisches Interesse durch zeitlich unbegrenztes Vorhandensein von hochwertigem Samen.

Bisher wurden Untersuchungen zu dieser Methodik durchgeführt, die sich hauptsächlich auf die Regenbogenforellen konzentrierten. Die künstliche Befruchtung mit gefrierkonserviertem Samen ist bei Fischen noch nicht soweit ausgereift, daß sie kommerziell eingesetzt werden könnte; ausreichende Befruchtungsraten werden nur mit großen Samenmengen erzielt (Billard 1988).

Die vorliegende Arbeit testet die Anwendung vor drei gängigen Gefrierkonservierungsmethoden. Die morphologischen Veränderungen der Spermien von und während der Gefrierkonservierung, sowie die Befruchtungsraten werden untersucht.

2. Material und Methoden

Äschen (Thymallus thymallus) wurden aus der Salzach und der Vöckla abgefischt und mit der Hand abgestreift.

2.1. Gefrierkonservierung

Die Methoden von Büyükhatipoglu & Holtz (1978) mit und ohne Rinderserumalbumin (4 mg/ml), von Borchard & Schmidt (1979) (Verdünner V7) und von Stein & Bayrle (1985) wurden untersucht. Der Samen wurde im Verhältnis von 1:3 in den Verdünner eingebracht, in Plastikpailletten über Stickstoffdampf (-70 bis -80°C) tiefgefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Nach der Lagerung wurde der Samen in einer »Auftaulösung« nach Stoss & Holtz (1981) aufgetaut und sofort zur Befruchtung der Eier verwendet. Jeweils 1000 Eier wurden mit 1 beziehungsweise 4 ml

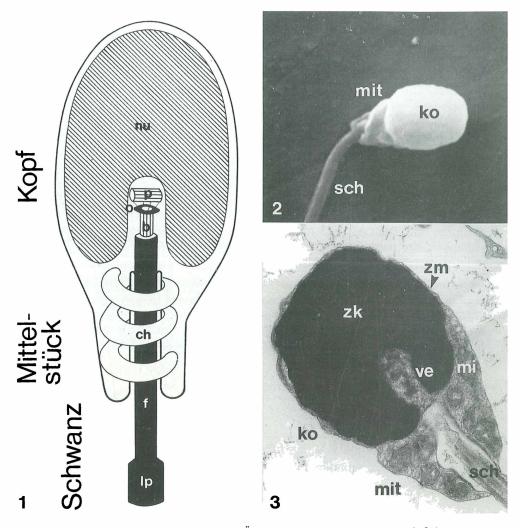


Abb. 1-3: Unbehandelte, intakte Spermien der Äsche. ko Kopf, mit Mittelstück, sch Schwanz.

Abb. 1: Schematische Rekonstruktion eines Äschenspermiums nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen. **b** Verankerungsstruktur der Spermiengeißel (= Schwanz), **ch** Mitochondrien, die zu einem spiraligen, sogenannten Chondriosom verschmolzen sind, **f** Spermiengeißel (= Schwanz) mit seitlichen Vorwölbungen (**ip**), **nu** Zellkern (Nukleus), **o**, **p**, Strukturen zu Verankerungen der Geißel am Zellkern.

Abb. 2: Äußere Gestalt eines Spermiums; rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Das gewundene Mittelstück (**mit**) ist gut zu erkennen.

Abb. 3: Längsschnitt durch ein Spermium. transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme. **mi** Mitochondrien, **ve** Verankerungsstrukturen des Schwanzes am Kern, **zm** Zellmembran, **zk** Zellkern.

gefrierkonserviertem Samen in einer Befruchtungslösung nach Hamor (1969) vermischt. Für die Kontrollversuche wurden 1000 Eier mit 0,2 ml nativem Samen im Flußwasser befruchtet, dem 0,75% Natriumchlorid zugegeben wurde. Die Aufzucht der befruchteten Eier erfolgte an der Fischzuchtanstalt Kreuzstein am Mondsee (Salzburg) in Brutrahmen, die mit Quellwasser versorgt wurden. Die Befruchtungsrate wurde als Anzahl derjenigen Embryonen determiniert, die das Augenpunktstadium erreichten.

2.2. Feinstrukturelle Untersuchung

Es wurden folgende Gruppen von Spermien nach Lahnsteiner & Patzner (1991) fixiert: (a) unbehandelte, (b) nach 30 sec beziehungsweise (c) nach 5 min im jeweiligen Verdünner, (d) nach dem Einfrieren, unmittelbar nach dem Auftauen im Verdünner, (e) unmittelbar nach dem Auftauen in einer Auftaulösung sowie (f) nach 60 sec in der Auftaulösung. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte nach gängigen Methoden der Elektronenmikroskopie.

3. Ergebnisse

3.1. Aufbau unbehandelter Spermien

Die Spermien der Äschen gliedern sich in eine Kopf-, eine Hals- und eine Schwanzregion (Abb. 1 bis 3). Der Kopf ist eiförmig, hat eine Länge von etwa 2 μ m (1 μ m = 0,001 mm) und einen Durchmesser von etwa 1,5 μ m. Der Zellkern liegt in der Kopfregion und weist am Kaudalpol eine Einfaltung auf, in der die Verankerung für die Geißel liegt. Das Mittelstück ist spiralig gewunden und beinhaltet die Mitochondrien, die miteinander verschmolzen sind. Die Geißel ist 30 bis 35 μ m lang und hat den typischen Aufbau aus zwei zentralen und neun Paaren peripherer Mikrotubuli. Sie besitzt seitliche Ausstülpungen, die längsverlaufende Bänder bilden.

3.2. Befruchtungserfolge

Spermien wurden nach den 3 oben beschriebenen Methoden tiefgefroren. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden je 1000 Eier mit 1 beziehungsweise 4 ml Spermien (versetzt mit der dreifachen Menge an Verdünner) befruchtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. In den Kontrollversuchen betrug die Befruchtungsrate 90% bei der Verwendung von nur 0,2 ml Samen.

Tabelle 1: Befruchtungsrate (%) mit gefrierkonserviertem Samen

Methode	Befruchtungsrate mit	
	1 ml	4 ml
Büyükhatipoglu & Holtz (1978)	10%	35%
Borchard & Schmidt (1979)	5 %	80%
Stein & Bayrle (1985)	5 %	35%

3.3. Veränderungen und Schädigungen vor und während der Gefrierkonservierung

Feinstrukturelle Untersuchungen zeigen folgendes auf: Durch das Einfrieren und Auftauen des Samens nimmt die Qualität signifikant ab, da bis zu 50% der Spermien zerstört werden (Abb. 4-7). Morphologische Schädigungen treten bereits unmittelbar nach der Verdünnung, noch vor dem Einfrieren, auf (Abb. 8). Diese Schädigungen nehmen – außer im Verdünner von Borchard & Schmidt – mit der Verweildauer im Verdünner noch zu. Erfolgt das Auftauen nach der Lagerung bei -196°C in einer Auftaulösung, zeigt sich keinerlei Veränderung im Prozentsatz der geschädigten Spermien. Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Veränderungen und Defekten von Spermien, die mit den verschiedenen Verdünnern behandelt wurden, sind auf Abb. 8 dargestellt. Die Abbildungen 4 bis 7 zeigen Beispiele von Schädigungen an den Spermien.

4. Diskussion

Die Spermien von Äschen (Unterfamilie Thymallinae) weisen eine gegenüber den Forellen (Unterfamilie Salmoninae) abweichende Organisation des Mittelstückes auf. Die Äschen besitzen eine besser entwickeltes Mittelstück, das größere Mengen an

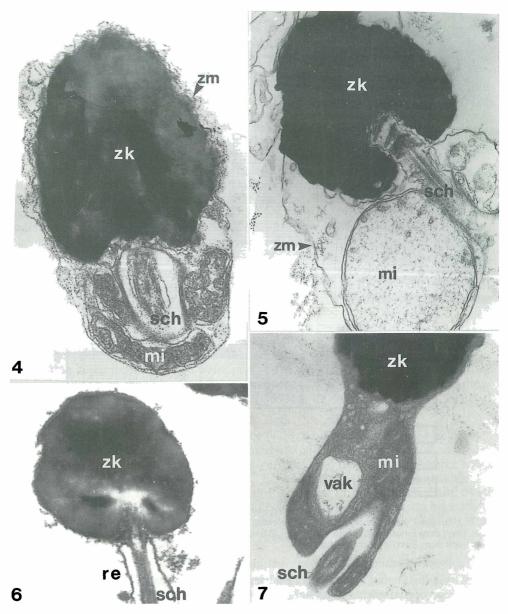


Abb. 4-7: Schädigungen an Spermien während der Gefrierkonservierung. **mi** Mitochondrien, **sch** Schwanz, **zm** Zellmembran, **zk** Zellkern.

Abb. 4: Leichte Schädigungen unmittelbar nach dem Einbringen in den Verdünner V6 von Borchard & Schmidt. Die Zellmembran (zm) ist stark aufgefaltet.

Abb. 5: Starkes Anschwellen der Spermien nach dem Einfrieren und Auftauen nach der Methode von Stein & Bayrle.

Abb. 6: Spermium mit zerstörtem Mittelstück nach dem Einfrieren und Auftauen mit der Methode von Büyükhatipoglu & Holtz. **re** Reste der Zellmembran des Mittelstücks.

Abb. 7: Deformiertes Mittelstück unmittelbar nach dem Einbringen des Spermiums in den Verdünner V7 von Bochard & Schmidt. **vak** durch Wassereinstrom entstandene Vakuole im Mittelstück.

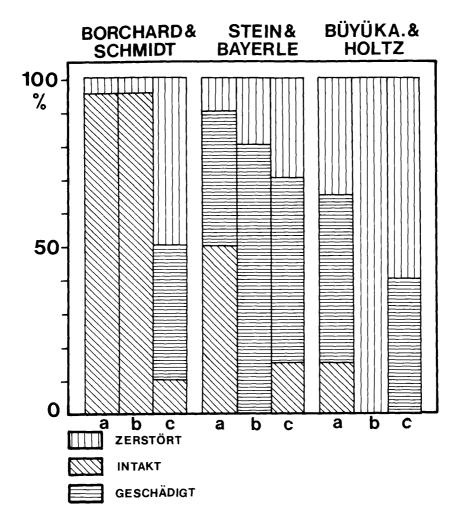


Abb. 8: Häufigkeit von Schädigungen und Defekten an Spermien während der Gefrierkonservierung. A 30 sec nach dem Einbringen in den Verdünner, B 5 min nach dem Einbringen in den Verdünner, C unmittelbar nach dem Einfrieren und Auftauen.

Cytoplasma beinhaltet. Die Mitochondrien der Äschenspermien sind spiralig angeordnet, jene der Forellen zylindrisch.

Die vorliegenden Gefrierkonservierungsversuche am Samen der Äschen zeigen, mit Ausnahme der Methode von Borchard & Schmidt, eine deutliche Erniedrigung der Fertilitätsrate gegenüber der Regenbogenforelle, was möglicherweise durch unterschiedliche Ansprüche des Samens von Äsche und Forellen an die Gefrierkonservierung bedingt ist.

Generell konnten zwei Typen von Schädigungen an den Spermien der Äsche festgestellt werden: Ein starkes Anschwellen der Spermien im Verdünner nach Stein & Bayrle, beziehungsweise eine Deformation des Mittelstückes in den Verdünnern nach Büyükhatipoglu & Holtz und Borchard & Schmidt. Für die Schwellungen kommen Veränderungen in Frage, die die intrazelluläre Osmoregulation hemmen, oder das Eindringen von Verdünnerbestandteilen, die einen sekundären Wassereinstrom indu-

zieren, oder Veränderungen im Molekulargefüge der äußeren Zellmembran, was ein »Undichtwerden« zur Folge hat. Deformationen und Veränderungen im Mittelstück können durch eine starke Dehydratation der Zellen verursacht werden. Ein leichter Wasserentzug erhöht jedoch in manchen Fällen die Überlebensfähigkeit von Zellen während der Gefrierkonservierung (Grout & Morris 1987). Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Instabilität der Spermien in den Verdünnern korrielieren mit früheren Untersuchungen, die einen negativen Einfluß einer Äquilibrierungsperiode im Verdünner auf die Fertilitätsrate ergaben (Scott & Baynes 1980, Stoss & Holtz 1983, Stein & Bayrle 1985).

Nach dem Wiederauftauen der Spermien ist, unabhängig von der Gefrierkonservierungsmethode, eine starke Zunahme an Schädigungen festzustellen. Das Anschwellen nach dem Auftauen, dürfte Schädigungen der äußeren Zellmembran zuzuschreiben sein, da Zellmembranen im allgemeinen sehr empfindlich auf Tieffrieren und Wiederauftauen reagieren (Grout & Morris 1987).

Rinderserumalbumin steigert zwar generell die Vitalität von Spermien (Billard 1986), die morphologischen Schädigungen werden jedoch dadurch nicht verringert. Spermien der Äsche, die entweder direkt im Verdünner oder in einer »Auftaulösung« aufgetaut wurden, zeigen ein gleiches Ausmaß von Schädigungen. Auftaulösungen induzieren jedoch die Motilität der Spermien (Stoss & Holtz 1981, Stein & Bayrle 1985) und stabilisieren so wahrscheinlich physiologische und metabolische Parameter intakter und nur leicht geschädigter Spermien.

Aufgrund der starken strukturellen Veränderungen, die an Äschenspermien im Verlauf der Gefrierkonservierung entstehen, muß eine Veränderung des Chromatinmaterials in Betracht gezogen werden. In der Larvalentwicklung der Fische konnte jedoch keine Veränderung festgestellt werden (Weismann, nicht publiziert). Dennoch sollte – vor allem in Hinblick auf die kommerzielle Anwendung der Gefrierkonservierungsmethode – die Weiterentwicklung der Fische überprüft werden.

Zusammenfassung

Die Morphologie der Spermatozoen der Äsche (*Thymallus thymallus*) wird beschrieben. Der Samen wird nach den Methoden von Büyükhatipoglu & Holtz (1978), Borchard & Schmidt (1979) und Stein & Bayrle (1985) tiefgefroren und die Befruchtungsrate sowie morphologische Veränderungen untersucht. Schädigungen an der Feinstruktur der Spermien treten bereits unmittelbar nach dem Einbringen in die Verdünner auf. Nach dem Auftauen kommt es zu einer drastischen Erniedrigung der Qualität, da bis zu 50% der Spermien zerstört sind.

Summary

Cyopreservation of semen of a salmonid fish, the grayling (Thymallus thymallus)

The morphology of the spermatozoa of the grayling (*Thymallus thymallus*) is described. The milt is cryopreserved by the methods of Büyükhatipoglu & Holtz (1978), Bochard & Schmidt (1979) and Stein & Bayrle (1985), and fertilization rates as well as morphological changes are described. Generally, for all tested methods, fine structural damages in spermatozoa occur already immediatly after dilution in the extender. After freezing and thawing a drastical decrease in quality is observed, as about 50% of spermatozoa are damaged.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch das österreichische Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft (Projektnr. FW4. 5/78) und durch das Bundesanstalt für Fortpflanzung und Besamung der Haustiere in Wels gefördert. Wir danken der Peter-Pfenninger-Schenkung (Salzburg) für einen Beitrag zu den Materialkosten, den Herren Köttl und Hochfilzer für die großzügige Bereitstellung von Fischen, sowie den Mitarbeitern der Fischzuchtanstalt Kreuzstein (Mondsee) für die Aufzucht des Eimaterials. Weiters sind wir Frau Petra Lahnsteiner-Oberndorfer für die graphischen Arbeiten zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

Billard, R., (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Repod. Nutr. Develop. 26: 887-920.

Billard, R., (1988). Artifical insemination and gamete management in fish. Mar. Behav. Physiol. 14: 3-21.

Bochard, B. & Schmidt G. W. (1979). Versuche mit Regenbogenforellensperma. IV. Die Tiefkühlkonservierung. Beobachtungen zum Einsatz bei praktischen und wissenschaftlichen Arbeiten. Zeitschr. Binnenfisch. 7: 49-51.

Büyükhatipoglu, S. & W. Holtz (1978). Preservation of trout sperm in liquid and frozen state. Aquaculture 14: 49-56.

Grout, B. W. W. & G. J. Morris (1987). The effects of low temperature on biological systems. Richard Clay Ltd, Bungay, Suffolk.

Hamor, T., (1969). Über Versuche zur Größe, Lebensdauer und Befruchtungsfähigkeit von Fischsperma sowie Geschlechtsdetermination bei Fischen. Fischw. 19: 170–172.

Lahnsteiner, F. & R. A. Patzner (1991). A new method for electron microscopical fixation of spermatozoa of fresh water teleosts. Aquaculture, in Druck.

Scott, A. P. & S. M. Baynes (1980). A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish Biol. 17: 707-739.

Stein, H. & H. Bayrle (1985). Gameten- und Embryonenkonservierung bei Salmoniden. Bayrisches landwirtschaft. Jb. 2: 236-244.

Stoss, J. & W. Holtz (1981). Cryopreservation of rainbow trout (Salmo gaidneri) sperm I: Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. Aquaculture 22: 97-104.

Stoss, J., & W. Holtz (1983). Cryopreservation of rainbow trout (Salmo gaidneri) sperm IV: The effect of DMSO concentration an equilibration time on sperm survival; succrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. Aquaculture 32: 321-330.

Anschrift der Verfasser:

Mag. Dr. Franz Lahnsteiner, Univ.- Doz. Dr. Robert A. Patzner, Zoologisches Institut der Universität Salzburg, Hellbrunner Str. 34, 5020 Salzburg

Dr. Thomas Weismann, Bundesanstalt für Fischereiwirtschaft, Scharfling 18, 5310 Mondsee.

Österreichs Fischerei

Jahrgang 44/1991

Seite 200-205

Wolfgang Bittermann

Der Steinkrebs (Astacus torrentium SCHRANK) in Wien: Vorkommen und (Wieder) Ansiedlungsmöglichkeiten

1. Einleitung

Im Auftrag der Gemeinde Wien wurden die folgenden 20 Wiener Bäche bezüglich eines Vorkommens von Astacus torrentium überprüft: Arbesbach, Dornbach, Eckbach, Grenzbach, Grünauerbach, Gütenbach, Hainbach, Halterbach, Kräuterbach, Lainzerbach, Liesing, Mauerbach, Petersbach, Rosenbach, Rotwasser, Schreiberbach, Steinbach, Waldbach, Wienfluß, Wurzbach.

Zwischen April 1987 und April 1988 wurden monatlich Wasserproben analysiert und die Bachstruktur erhoben, um die Möglichkeit einer Wiederansiedlung von A. torrentium zu erkunden.

2. Durchführung

2.1. Populationserhebungen

Um Steinkrebspopulationen nachzuweisen, wurden folgende Vorgangsweisen gewählt: Begehen der Bäche, um ihre Eignung als Lebensraum für A. torrentium zu überprüfen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Österreichs Fischerei

Jahr/Year: 1991

Band/Volume: 44

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

Α.

Artikel/Article: Gefrierkonservierung von Spermien am Beispiel der Äsche (Thymallus thymallus) 194-200