

Wissenschaft

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

Gefrierkonservierung von Äschen- und Huchensamen

1. Einleitung

Die Gefrierkonservierung von Huchen- und Äschensamen ist bis jetzt nur ungenügend untersucht, und es existieren keine effizienten, in der Praxis anwendbaren Methoden (Stein, 1980). Gerade bei diesen Arten hat die Gefrierkonservierung von Samen große Bedeutung (1) in fischereiwirtschaftlicher Hinsicht zur Steigerung der Fischproduktion und (2) aufgrund der Gefährdung und Rückläufigkeit dieser Arten zur Sicherung der Reproduktion und zur Erhaltung lokaler Rassen.

Aus diesem Grund testeten und adaptierten wir die von uns entwickelte Gefrierkonservierungsmethode (Lahnsteiner et al., 1994, 1995a) für Huchen- und Äschenspermiem.

2. Material und Methoden

Äschen (*Thymallus thymallus*) wurden aus dem Inn (Laichzeit im April) und am Enzingerboden in Uttendorf, Pinzgau (Laichzeit im Mai), abgefischt. Huchensamen und -eier wurden in der Huchenzucht in Rossatz an der Donau von Herrn Fischer und in Gaming von Herrn Univ.-Prof. Jungwirth zur Verfügung gestellt. Sobald die männlichen Tiere zu laichen begannen (März bis April), wurde bei den Rognern die Ovulation durch Hypophysierung ausgelöst. Dazu wurden ca. 4 mg gefriergetrocknete Karpfenhypophyse/kg Körpergewicht in 0,7% Kochsalzlösung gelöst, intramuskulär injiziert und nach 24 bis 48 Stunden die Eier abgestreift.

Bei Äschen und Huchen wurden Samen und Eier trocken abgestreift und maximal 30 Minuten danach für die Experimente verwendet. Samen und Eier mehrerer Individuen wurden für die Versuche gepoolt.

2.1 Gefrierkonservierung

Die Gefrierkonservierungsmethode von Lahnsteiner et al. (1994) wurde für den Samen von Äsche und Huchen getestet und dabei einzelne Parameter wie folgt variiert:

Ermittlung des optimalen Gefrierschutzes

Entsprechend der Standardmethode wurde Samen im Verhältnis 1 : 3 mit 4° C kalter Verdünnerlösung (Natriumchlorid 602 mg/100 ml Aqua destillata, Kaliumchlorid 300 mg/100 ml H₂O, Magnesiumsulfat 19 mg/100 ml H₂O, Calciumchlorid 25 mg/100 ml H₂O, Hepespuffer 460 mg/100 ml H₂O (pH 7,8), 100 ml Dimethylsulfoxid 5%, Glycerin 1%, Rinderserumalbumin 1,5%, Hühnereidotter 7%, Saccharose 0,5%) gemischt. Die Äquilibrierungszeit des Samens im Verdünner betrug 3 Minuten. In diesem Zeitraum wurde der verdünnte Samen in 0,5 ml Pailletten aufgesaugt und 1,5 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel tiefgefroren.

Im Vergleich zum Standardgefrierschutz (Gemisch aus 5% DMSO und 1% Glycerin) wurde Samen mit 10% Methanol, 10% DMSO, 5% Glycerin und 10% Dimethylacetamid als Gefrierschutz eingefroren.

Ermittlung der optimalen Einfrierrate

Das Einfrieren erfolgte im offenen System in einer isolierten Kiste, die 4 cm hoch mit Flüssigstickstoff befüllt war. Der Samen wurde in einem Verdünnern mit 10% Methanol als Gefrierschutz verdünnt und in Pailletten aufgesaugt. Diese wurden horizontal auf einen Rost entweder 1 cm, 1,5 cm oder 2 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel eingefroren. Die Einfrierdauer im Stickstoffdampf betrug immer 5 Minuten.

Ermittlung der optimalen Auftaumethode

Das Auftauen erfolgte in einem thermostatregulierten Wasserbad bei 25° C für 20 sec, 25 sec, 35 sec oder 40 sec. Anschließend wurde der Samen aus den Pailletten entnommen und sofort zur Befruchtung verwendet.

2.2 Befruchtungsversuche

12,5 ml Eier wurden im Verhältnis 2 : 1 in eine 4° C kalte Befruchtungslösung (Natriumhydrogencarbonat 500 mg/100 ml H₂O, Glycin 150 mg/100 ml H₂O, Theophyllin 100 mg/100 ml H₂O, Trispuffer 600 mg/100 ml H₂O, pH 9) eingebracht. Eine Paillette gefrierkonservierter Samen wurde zugegeben und mit den Eiern gemischt. Die Eier wurden gewaschen und in der Fischzuchtanstalt Kreuzstein routinemäßig erbrütet. Der Befruchtungserfolg wurde als prozentueller Anteil der Eier, die das Augenpunktstadium erreichten, im Verhältnis zur Gesamtzahl der Eier definiert. Um keine Fehlschlüsse durch unterschiedliche Keimzellenqualität zu ziehen, wurden für Kontrollversuche mit Frischsamen und Gefrierkonservierungsversuche immer gleiche Samen- und Eipools verwendet. Auch zusammengehörige Experimentalserien wurden immer mit den gleichen Samen- und Eipools durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Gefrierschutz

Sowohl beim Huchen als auch bei der Äsche war die Befruchtungsrate mit gefrierkonserviertem Samen am höchsten, wenn 10% Methanol als Gefrierschutz verwendet wurde. Schlechtere Ergebnisse wurden mit dem Gemisch aus 5% DMSO und 1% Glycerin erzielt, gefolgt von 10% DMSO, 10% Dimethylacetamid und 5% Glycerin (Tab. 1).

Tabelle 1: Einfluß des Gefrierschutzes auf die Befruchtungsrate von gefriergetrocknetem Samen von Huchen und Äsche. Einfrierbedingungen: 1,5 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel, 5 min, Auftaubedingungen: 30 sec bei 25° C, n = 3

Gefrierschutz	Äsche		Huchen	
	% absolut	% von Kontrolle	% absolut	% von Kontrolle
10% DMSO	62,2±2,4 ^a	70,6±2,7 ^e	10,0±0,6 ⁱ	28,5±1,7 ⁿ
5% DMSO, 1% Glycerin	70,5±5,3 ^b	79,6±5,9 ^f	17,5±3,9 ^k	47,2±1,8 ^o
5% Glycerin	51,3±3,3 ^c	58,0±3,0 ^e	7,3±2,6 ⁱ	20,2±9,0 ^o
10% Dimethylacetamid	62,2±2,4 ^a	70,6±2,7 ^e	6,2±2,4 ⁱ	20,6±2,7 ^p
10% Methanol	84,3±7,5 ^d	95,3±8,4 ^h	33,0±2,0 ^l	91,1±5,5 ^q
Kontrolle mit Frischsamen	88,1±2,2 ^d	–	36,2±2,7 ^m	–
Anzahl der Spermien/Ei	1,2×10 ⁶ Spermien/Ei		5,5×10 ⁶ Spermien/Ei	

Werte, die mit dem gleichen Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich nicht signifikant. (p < 0,05).

3.2 Einfrierrate

Bei Huchen und Äsche wurden die höchsten Befruchtungsraten mit gefrierkonserviertem Samen erreicht, wenn dieser 1,5 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel eingefroren wurde (Tab. 2).

Tabelle 2: **Einfluß der Einfriertemperatur auf die Befruchtungsraten von gefrierkonserviertem Samen von Huchen und Äsche.** Gefrierschutz: 10% Methanol, Auftaubedingungen: 30 sec bei 25° C, n = 3

Einfrierniveau	Äsche Befruchtungsraten		Huchen Befruchtungsraten	
	% absolut	% von Kontrolle	% absolut	% von Kontrolle
1 cm	62,3±2,3 ^a	70,9±2,5 ^c	9,9±2,6 ^e	50,2±13,1 ^g
1,5 cm	84,3±7,5 ^b	95,3±8,4 ^d	20,6±4,2 ^f	104,5±21,3 ^h
2 cm	62,7±0,8 ^a	75,3±1,0 ^c	12,4±5,2 ^e	62,9±25,4 ^g
Kontrolle mit Frischsamen	88,1±2,2 ^a		19,7±4,4 ^f	
Anzahl der Spermien/Ei	1,2×10 ⁶ Spermien/Ei		4,3×10 ⁶ Spermien/Ei	

Werte, die mit dem gleichen Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich nicht signifikant. (p < 0,05).

3.3 Auftaubedingungen

Die besten Befruchtungserfolge wurden in beiden Arten erreicht, wenn der Samen bei 25° C für 30 sec aufgetaut wurde. Längeres oder kürzeres Tauen brachte eine signifikante Reduktion des Befruchtungserfolges (Tab. 3).

Tabelle 3: **Einfluß der Auftaubedingungen auf die Befruchtungsraten von gefrierkonserviertem Samen von Huchen und Äsche.** Gefrierschutz: 10% Methanol, Einfrierbedingungen: 1,5 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel, 5 min, n = 3

Auftauzeit	Äsche Befruchtungsraten		Huchen Befruchtungsraten	
	% absolut	% von Kontrolle	% absolut	% von Kontrolle
25° C, 20 sec	52,4±7,2 ^a	59,3±8,2 ^d	15,5±2,6 ^f	42,8± 7,2 ^k
25° C, 25 sec	67,6±8,4 ^b	76,5±8,9 ^e	21,1±5,2 ^g	58,3±14,3 ^l
25° C, 30 sec	89,4±4,7 ^c	101,1±5,3 ^f	33,0±2,0 ^h	91,1± 5,5 ^m
25° C, 35 sec	67,0±1,2 ^b	75,8±1,4 ^e	20,1±4,8 ^g	55,5±13,2 ^l
25° C, 40 sec	60,6±8,3 ^{a,b}	68,5±9,3 ^{d,e}	–	–
Kontrolle mit Frischsamen	88,4±1,2 ^c		36,2±2,7 ⁱ	
Anzahl der Spermien/Ei	1,6×10 ⁶ Spermien/Ei		5,5×10 ⁶ Spermien/Ei	

Werte, die mit dem gleichen Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich nicht signifikant. (p < 0,05).

3.4 Einfrierprotokoll

Verdünner- zusammensetzung:	Natriumchlorid	602 mg/100 ml H ₂ O ¹⁾
	Kaliumchlorid	300 mg/100 ml H ₂ O
	Magnesiumsulfat	19 mg/100 ml H ₂ O
	Calciumchlorid	25 mg/100 mg H ₂ O
	Hepespuffer	460 mg/100 ml H ₂ O
	pH	7,8
	Methanol	10 %
	Rinderserumalbumin	1,5 %
	Hühnereidotter	7 %
	Saccharose	0,5 %
	Verdünnertemperatur	4° C
Verdünnungsverhältnis:	Samen : Verdünner	1 : 3
Einfrierbedingungen:	Pailletten	0,5 ml
	offenes System	1,5 cm über Flüssig- stickstoffspiegel
Auftaubedingungen:	Auftautemperatur	25°C-Wasserbad
	Auftauzeit	30 sec

1) Aqua destillata

4. Diskussion

Die Gefrierkonservierungsmethode für Salmonidensamen von Lahnsteiner et al. (1994, 1995a) ist auch für Äschen- und Huchensamen anwendbar. Die hohen Befruchtungsraten im Bereich von 90 % bis 100 % von der Kontrollbefruchtung mit Frischsamen zeigen, daß diese Methode sehr effizient ist und somit nicht nur zur Genkonservierung, sondern auch in der Fischereiwirtschaft eingesetzt werden kann.

Die Adaptierungsversuche ergaben, daß für Äschen- und Huchensamen eine Modifikation des Gefrierschutzes notwendig ist. Während zur Gefrierkonservierung von Samen der Regenbogenforelle, Bachforelle, Seeforelle, des Bachsaiblings und der Renke ein Gemisch aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerin am besten geeignet ist (Lahnsteiner et al., 1995a), ist für Samen von Huchen und Äsche Methanol ein signifikant besserer Gefrierschutz. Andere Gefrierschutzmedien, wie DMSO, Glycerin und Dimethylacetamid, die häufig zur Gefrierkonservierung von Salmonidensamen verwendet werden (Holtz, 1993, McNiven et al., 1993, Piironen, 1993), haben nur eine geringe kryoprotektive Wirkung. Einfrieraten und Auftaubedingungen für Samen von Huchen und Äsche entsprechen den Standardparametern, die auch für die anderen Salmonidenarten beschrieben wurden (Lahnsteiner et al., 1994). Insgesamt sind nun also drei artspezifische Modifikationen in der Gefrierkonservierung von Salmonidensamen bekannt: (1) Die angeführte Gefrierschutzmodifikation bei Äsche und Huchen, (2) unterschiedliche Einfriertemperatur bei Bachsaibling und Seesaibling (Niveau 2,5 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel) (Lahnsteiner et al., 1995b, 1996), (3) höhere Verdünnungsraten des Samens im Verdünner (1 : 7) bei Bachforelle und Seeforelle (Lahnsteiner et al., 1995b, 1996). Alle übrigen Parameter sind einheitlich.

Die durchgeführten Versuche weisen weiters auf die Bedeutung von zwei methodischen Parametern hin: Die Einfrierniveaus müssen im offenen System sehr exakt eingestellt werden, da Unterschiede im Niveau um 0,5 cm bereits eine signifikante Abnahme der Befruchtungskapazität bedingen. Die Auftaubedingungen müssen genau eingehalten

werden. Schwankungen in der Auftauzeit um nur 5 sec führen ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung des Befruchtungserfolges.

Zusammenfassung: Eine Gefrierkonservierungsmethode für Samen von Äsche (*Thymallus thymallus*) und Huchen (*Hucho hucho*) wird beschrieben. Bei einem Ei-/Samenverhältnis von $1,2 \times 10^6$ Spermien/Ei für die Äsche und von $4,3 \times 10^6$ Spermien/Ei für den Huchen betragen die Befruchtungsraten 90–100% der Kontrolle mit Frischsamen.

Summary: A cryopreservation method for semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube Salmon (*Hucho hucho*) is described. Fertilization rates obtained with this method are 90–100% of control fertilization with fresh semen at a sperm egg ratio of 1.2×10^6 spermatozoa/egg in the grayling and of 4.3×10^6 spermatozoa/egg in the Danube Salmon.

Danksagung

Gefördert vom Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft. Wir bedanken uns bei Herrn Fischer (Rossatz), Herrn Hochfilzer (Uttendorf) und Herrn Univ.-Prof. Jungwirth (Universität für Bodenkultur, Wien) für die Bereitstellung von Material. Die Betreuung und Auswertung der Befruchtungsversuche wurde in der Fischzuchtanstalt Kreuzstein von Herrn Pfeiffer und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

LITERATUR

- Holtz, W., 1993: Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture* 110: 97–100.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1994: Neue Gesichtspunkte zur Gefrierkonservierung von Salmonidensamen. *Österr. Fisch.* 4: 84–89.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1995a: A uniform method for cryopreservation of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus sp.*). *Aquaculture Research* 26, in Druck.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1995b: Gefrierkonservierung von Salmonidensamen: Adaptierung für die Praxis. *Österr. Fisch.*, in Druck.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1996: Semen cryopreservation of salmonid fishes. Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research*, in Druck.
- McNiven, M. A., Gallant, R. K. & G. F. Richardson, 1993: Dimethyl-acetamide as cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. *Theriogenology* 40: 943–948.
- Pironen, 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., 1980: Die künstliche Besamung bei Salmoniden Mitteleuropas. Habilitationsschrift. Universität München-Weihenstephan.

Anschrift der Autoren:

Mag. Dr. Franz Lahnsteiner und Univ.-Doz. Dr. Robert A. Patzner: Institut für Zoologie, Universität Salzburg, Hellbrunner Straße 34, A-5020 Salzburg
Dipl.-Tzt. Thomas Weismann: Bundesamt für Wasserwirtschaft, Institut für Gewässerökologie, Fischereibiologie und Seenkunde, Scharfling 18, A-5310 Mondsee

Österreichs Fischerei

Jahrgang 48/1995

Seite 261–263

Jürgen Hartmann

Zum Index der Belastung des Seebodens, abgeleitet aus Tubifizidendaten

Einleitung und Material

Nach Wagner und Zahner (1964) und Zahner (1981) zeigt die Besiedlungsdichte der Tubifiziden (Schlammröhrenwürmer) den Grad der Belastung des Sediments durch die dem See – z. B. mit Abwässern – zugeführten organischen Stoffe an. Entsprechend bemerken

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Österreichs Fischerei](#)

Jahr/Year: 1995

Band/Volume: [48](#)

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

Artikel/Article: [Gefrierkonservierung von Äschen- und Huchensamen
257-261](#)