

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

Gefrierkonservierung von Salmonidensamen: Adaptierung für die Praxis

1. Einleitung

Kürzlich präsentierten wir eine Methode für Gefrierkonservierung von Spermien von Salmoniden (Regenbogenforelle, Bachforelle, Seeforelle und Renke) (Lahnsteiner et al., 1994, 1995a, 1995b; Weismann et al., 1994). Diese Methode ist für alle bisher untersuchten Arten einheitlich und zeichnet sich durch eine einfache Technik und hohe, konstante Befruchtungsraten aus (90–100% der Kontrollbefruchtung mit Frischsamen).

Die genannte Gefrierkonservierungsmethode wurde unter standardisierten Laborbedingungen entwickelt, die nicht den routinemäßigen Bedingungen in der Teichwirtschaft entsprechen. Um die Handhabung der Technik für den routinemäßigen Gebrauch in der Fischzucht zu adaptieren, wurden die entscheidenden methodischen Parameter (Lagerfähigkeit des Samens vor der Gefrierkonservierung, Äquilibrierungszeit und Verdünnungsraten im Verdünner, Einfrierraten, Lagerungszeit von tiefgefrorenem Samen in Stickstoff, Lagerung von aufgetautem Samen) auf ihre Durchführbarkeit in der Praxis und auf ihre tolerierbare Abweichung vom Standardgefrierprotokoll hin untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Die für die Gefrierkonservierungsversuche verwendeten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), Seeforellen (*Salmo trutta f. lacustris*), Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und Bachsaiblinge (*Salvelinus fontinalis*) stammten aus der Aufzuchtforschungsanlage Kreuzstein am Mondsee; Samen und Eier wurden trocken abgestreift. Samen wurde in Reagenzröhrchen gesammelt und entsprechend dem Versuchsprotokoll weiterverwendet. Von den Eiern wurde die Ovarialflüssigkeit abgegossen; sie wurden maximal 30 Min. nach der Gewinnung zur Befruchtung verwendet. Samen und Eier mehrerer Fische wurden für die Versuche gepoolt.

2.2 Gefrierkonservierung

Die Gefrierkonservierungsversuche basieren auf der Methode von Lahnsteiner et al. (1994), wobei die einzelnen Parameter, wie unter 2.3 beschrieben, variiert wurden. Im folgenden wird die Standardmethode noch einmal zusammengefaßt: Der Samen wurde in einem Zeitraum von 10 Min. nach der Gewinnung gefrierkonserviert. Dazu wurde er im Verhältnis 1:3 mit 4° C kalter Verdünnerlösung gemischt. Diese besteht aus: 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, Hepes-puffer 460 mg / 100 ml H₂O (pH 7,8), Dimethylsulfoxid 5%, Glycerin 1%, Rinderserumalbumin 1,5%, Hühnereidotter 7%, Saccharose 0,5%. Die Äquilibrierungszeit des Samens im Verdünner betrug 3 Min. In diesem Zeitraum wurde der verdünnte Samen in 0,5 ml Pailletten (Minitüb) aufgesaugt und tiefgefroren.

Das Einfrieren erfolgte im offenen System in einer isolierten Kiste (Abb. 1), die bis zu einer Höhe von 4 cm mit Flüssigstickstoff gefüllt war. Die Pailletten wurden horizontal auf einen Rost 1,5 cm über dem Flüssigstickstoffspiegel aufgebracht und 10 Min. gefroren. Anschließend wurden sie in Flüssigstickstoff gelagert.

Das Auftauen erfolgte in einem thermostatregulierten Wasserbad bei 25° C, exakt 30 sec

lang. Anschließend wurde der Samen aus den Pailletten entnommen und sofort zur Befruchtung verwendet.

2.3 Versuche

Die Auswirkung folgender Parameter auf die Befruchtungsfähigkeit von gefrierkonservierten Samen wurde untersucht:

1. Lagerung von Frischsamen vor der Gefrierkonservierung: Dazu wurden 1-ml-Proben von Frischsamen 10 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min in Reagenzglasern auf Eis gelagert und anschließend gefrierkonserviert.

2. Verdünnungsrate des Samens im Verdüner: Samen wurde im Verhältnis 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5 oder 1 : 7 verdünnt und gefrierkonserviert. Um das Ei-/Samenverhältnis anzugleichen, wurden zur Befruchtung von 12,5 ml Eiern folgende Samenmengen verwendet: Verdünnungsverhältnis 1 : 1 = ½ Paillette, 1 : 2 = ¾ Paillette, 1 : 5 = 1½ Pailletten, 1 : 7 = 2 Pailletten.

3. Äquilibrierungszeit des Samens im Verdüner: Verdünnter Samen wurde in die Pailletten aufgesaugt und vor dem Einfrieren 3 min, 10 min oder 20 min bei 4° C gelagert.

4. Einfrierrate: Die Pailletten wurden entweder 1 cm (-130° C), 1,5 cm (-110° C), 2 cm (-100° C) oder 2,5 cm (-92° C) über dem Flüssigstickstoffspiegel eingefroren. Die Einfrierdauer betrug immer 10 min.

5. Lagerungszeitraum im Flüssigstickstoff: Gefrierkonservierter Samen wurde 30 min oder etwa ein Jahr (340 bis 370 Tage) lang in Flüssigstickstoff gelagert. In diesen Langzeitexperimenten mußten unterschiedliche Samen- und Eiprobe für Gefrierkonservierungsexperimente und Kontrolle verwendet werden.

6. Lagerung des aufgetauten Samens: a) Samen wurde bei 25° C 30 sec aufgetaut und sofort zur Befruchtung verwendet (Standardprozedur); b) die Pailletten wurden 30 sec bei 25° C aufgetaut, aus dem Wasserbad entnommen und 30 sec bei Raumtemperatur gelagert (10 bis 12° C); c) Die Pailletten wurden nur 20 sec bei 25° C aufgetaut (unvollständiges Tauen), aus dem Wasserbad entnommen und wiederum 30 sec bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der Samen zur Befruchtung verwendet.

2.4 Fertilitätskontrolle

Zur Qualitätsbestimmung des gefrierkonservierten Samens wurden Befruchtungsversuche durchgeführt. Dazu wurden 12,5 ml Eier im Verhältnis 1 : 2 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 660 mg / 100 ml H₂O, pH 9) eingebracht. Sofort nach dem Auftauen wurde eine Paillette gefrierkonservierter Samen zugegeben und mit den Eiern gemischt. Die Eier wurden in der Aufzuchtforschungsanstalt Kreuzstein routinemäßig erbrütet und der Befruchtungserfolg als prozentueller Anteil der Eier, die das Augenpunktstadium erreichten, im Verhältnis zur Gesamtzahl der Eier definiert. Das Befruchtungsergebnis des gefrierkonservierten Samens wurde mit der Befruchtungsfähigkeit von Frischsamen verglichen. Um keine Fehlschlüsse durch unterschiedliche Keimzellenqualität zu erzielen, wurden für Kontrollversuche und Gefrierkonservierungsversuche immer gleiche Samen- und Eipools verwendet.

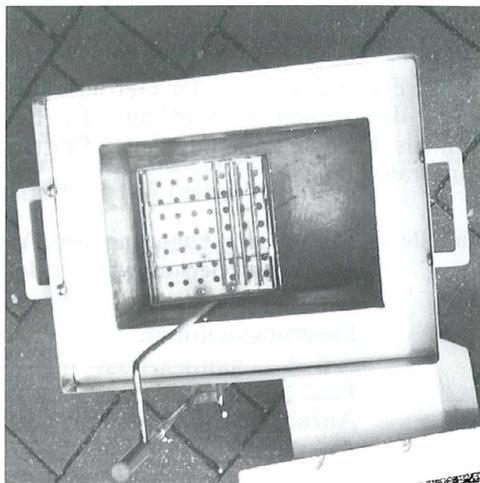


Abb. 1: Einfrierbox für die Konservierung von Fischesamen in Flüssigstickstoff. Konstruktion von Karl Mayrhofer, Scharfling (Foto: Th. Weismann)

3. Ergebnisse

1. Lagerung von Frischsamen vor der Gefrierkonservierung

Wenn Frischsamen vor der Gefrierkonservierung bis zu einer Stunde gelagert wurde, hatte das keinen Einfluß auf die Befruchtungsfähigkeit des gefrierkonservierten Samens. Längere Lagerungszeiten führten zu einer signifikanten Abnahme der Befruchtungsrate (Tabelle 1).

Tabelle 1: **Einfluß der Lagerung von Frischsamen der Regenbogenforelle vor der Gefrierkonservierung auf die Befruchtungsrate des tiefgefrorenen Samens**

Lagerungszeitraum	% Absolutbefeuchtung	% von Kontrollbefeuchtung
Pool I		
Anzahl der Spermien/Ei: 6×10^6		
10 min	$60,4 \pm 11,4^a$	$97,4 \pm 18,4^i$
60 min	$61,4 \pm 13,8^a$	$99,4 \pm 22,3^i$
120 min	$46,6 \pm 16,6^b$	$75,1 \pm 26,2^k$
Kontrolle (Frischsamen)	$62,0 \pm 11,2^a$	
Pool II		
Anzahl der Spermien/Ei: 5×10^6		
10 min	$82,3 \pm 2,9^c$	$93,6 \pm 3,3^l$
60 min	$81,7 \pm 3,4^c$	$92,2 \pm 3,8^l$
180 min	$33,0 \pm 1,4^d$	$37,5 \pm 1,6^m$
Kontrolle (Frischsamen)	$87,9 \pm 1,1^e$	

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

Tabelle 2: **Einfluß der Verdünnungsverhältnisse auf die Befruchtungsrate des tiefgefrorenen Samens der Regenbogenforelle und des Bachsaiblings**

Verdünnungsverhältnis (Samen : Verdünner)	Spermienkonzentration im Verdünner	% Absolutbefeuchtung	% von Kontrollbefeuchtung
Regenbogenforelle			
Anzahl der Spermien/Ei: 3×10^6			
1 : 1	$3,1 \times 10^9$	$61,6 \pm 3,6^a$	$70,1 \pm 41,1^d$
1 : 3	$1,5 \times 10^9$	$82,3 \pm 2,9^b$	$93,6 \pm 3,3^e$
1 : 5	$1,0 \times 10^9$	$81,5 \pm 4,2^b$	$92,7 \pm 7,3^e$
1 : 7	$7,6 \times 10^8$	$81,9 \pm 3,8^b$	$93,2 \pm 4,3^e$
Kontrolle (Frischsamen)		$87,9 \pm 3,1^b$	
Bachsaibling			
Anzahl der Spermien/Ei: 5×10^6			
1 : 3	$1,2 \times 10^9$	$56,6 \pm 4,3^c$	$93,8 \pm 7,1^f$
1 : 5	$8,0 \times 10^8$	$58,1 \pm 8,4^c$	$96,4 \pm 13,9^f$
Kontrolle (Frischsamen)		$60,3 \pm 2,2^c$	

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

2. Verdünnungsrate des Samens im Verdünner

Bei der Regenbogenforelle, beim Bachsaibling und auch bei der Renke (Daten nicht gezeigt) hatte eine geringere Verdünnungsrate als 1 : 3 einen negativen Einfluß auf die Befruchtungsrate des gefrierkonservierten Samens. Höhere Verdünnungsverhältnisse (1 : 5, 1 : 7) beeinflussten das Befruchtungsergebnis nicht (Tabelle 2).

Bei der Seeforelle und der Bachforelle, deren Samen eine bedeutend höhere Spermien-dichte aufweist, lag die optimale Verdünnungsrate bei 1 : 7 (Tabelle 3).

Tabelle 3: **Einfluß der Verdünnungsverhältnisse auf die Befruchtungsrate des tiefgefrorenen Samens bei der Seeforelle und der Bachforelle**

Verdünnungsverhältnis (Samen : Verdünner)	Spermien- konzentration im Verdünner	% Absolut- befruchtung	% von Kontroll- befruchtung
Seeforelle			
Pool I			
Anzahl der Spermien/Ei: 8×10^6			
1 : 3	$3,3 \times 10^9$	$21,5 \pm 10,6^a$	$51,2 \pm 24,4^k$
1 : 5	$2,2 \times 10^9$	$41,0 \pm 4,0^b$	$97,6 \pm 9,8^l$
1 : 7	$1,6 \times 10^9$	$44,1 \pm 1,1^b$	$107,3 \pm 4,2^l$
Kontrolle (Frischsamen)		$41,0 \pm 6,1^b$	
Pool II			
Anzahl der Spermien/Ei: 9×10^6			
1 : 3	$5,3 \times 10^9$	$50,1 \pm 4,4^c$	$62,3 \pm 5,5^m$
1 : 5	$3,5 \times 10^9$	$64,9 \pm 2,8^d$	$80,7 \pm 3,4^n$
1 : 7	$2,6 \times 10^9$	$73,1 \pm 1,0^e$	$91,0 \pm 4,6^o$
Kontrolle (Frischsamen)		$80,4 \pm 4,1^f$	
Bachforelle			
Anzahl der Spermien/Ei: 5×10^6			
1 : 3	$2,9 \times 10^9$	$77,0 \pm 2,5^g$	$83,5 \pm 2,7^p$
1 : 5	$2,0 \times 10^9$	$85,9 \pm 1,6^h$	$93,1 \pm 1,7^q$
Kontrolle (Frischsamen)		$92,2 \pm 1,4^i$	

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

Tabelle 4: **Einfluß der Äquilibrierungszeit im Verdünner auf die Befruchtungsrate des gefrierkonservierten Samens bei der Regenbogenforelle**

Äquilibrierung	% Absolut- befruchtung	% von Kontroll- befruchtung
Pool I		
Anzahl der Spermien/Ei: 6×10^6		
3 min	$82,3 \pm 2,9^a$	$93,6 \pm 3,3^c$
10 min	$80,8 \pm 3,6^a$	$91,9 \pm 4,0^c$
20 min	$79,4 \pm 5,4^a$	$90,1 \pm 6,1^c$
Kontrolle (Frischsamen)	$87,9 \pm 1,1^b$	

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

3. Äquilibrierungszeit des Samens im Verdünner

Äquilibrierungszeiten bis zu 20 min hatten keinen Einfluß auf die Befruchtungsfähigkeit des gefrierkonservierten Samens (Tabelle 4).

4. Einfrierrate

Bei der Regenbogenforelle, der Seeforelle und der Bachforelle wurde das höchste Befruchtungsergebnis erzielt, wenn der Samen 1,5 cm (-110° C) über dem Flüssigstickstoffspiegel eingefroren wurde (Tabelle 5). Wurde der Samen auf dem 1,0-cm-Niveau

Tabelle 5: **Einfluß der Einfrierrate auf die Befruchtungskapazität von gefrierkonserviertem Samen der Regenbogenforelle und des Bachsaiblings**

Einfrierniveau Einfriertemperatur	% Absolut- befruchtung	% von Kontroll- befruchtung
Regenbogenforelle		
Anzahl der Spermien/Ei: $3,5 \times 10^6$		
1 cm (-130° C)	63,2 ± 9,9 ^a	74,1 ± 11,6 ^f
1,5 cm (-110° C)	83,8 ± 7,1 ^b	98,2 ± 8,3 ^f
2 cm (-100° C)	62,8 ± 12,1 ^c	73,7 ± 14,2 ^f
Kontrolle (Frischsamen)	85,3 ± 5,5 ^b	
Salvelinus fontinalis		
Anzahl der Spermien/Ei: $3,9 \times 10^6$		
1,5 cm (-110° C)	54,6 ± 3,3 ^d	90,5 ± 5,5 ^g
2 cm (-100° C)	54,4 ± 3,4 ^d	90,3 ± 5,7 ^g
2,5 cm (-92° C)	62,1 ± 2,4 ^e	103,1 ± 4,1 ^h
Kontrolle (Frischsamen)	60,3 ± 2,2 ^e	

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

Tabelle 6: **Einfluß der Lagerung in Flüssigstickstoff auf die Befruchtungsfähigkeit des gefrierkonservierten Samens**

Lagerungsdauer	% Absolut- befruchtung	% von Kontroll- befruchtung	% Kontrolle mit Frischsamen
Bachsaibling			
Anzahl der Spermien/Ei: 4×10^6			
0,5 Stunden	60,0 ± 6,1 ^a	95,2 ± 9,6 ^f	63,0 ± 10,7 ^a
370 Tage	62,7 ± 2,3 ^a	104,1 ± 3,8 ^f	60,3 ± 2,2 ^a
Bachforelle			
Anzahl der Spermien/Ei: $8,5 \times 10^6$			
0,5 Stunden	79,3 ± 2,4 ^b	88,9 ± 2,7 ^g	89,2 ± 3,4 ^k
370 Tage	66,9 ± 7,6 ^c	85,2 ± 9,7 ^g	75,7 ± 3,2 ^l
Seeforelle			
Anzahl der Spermien/Ei: $6,7 \times 10^6$			
0,5 Stunden	85,4 ± 4,8 ^d	87,7 ± 7,5 ^h	97,4 ± 5,4 ^m
370 Tage	50,6 ± 0,7 ^e	123,4 ± 1,7 ⁱ	41,0 ± 6,1 ⁿ

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

(-130° C) oder 2,0-cm-Niveau (-100° C) eingefroren, war das Befruchtungsergebnis signifikant niedriger. Hingegen wurden beim Bachsaibling die höchsten Befruchtungserfolge erzielt, wenn der Samen 2,5 cm (-92° C) über dem Flüssigstickstoffspiegel eingefroren wurde (Tabelle 5).

5. Lagerungszeitraum im Flüssigstickstoff

Der Lagerungszeitraum im Flüssigstickstoff hatte keinen Einfluß auf die Befruchtungsfähigkeit (Tabelle 6).

6. Lagerung des aufgetauten Samens

Lagerung des aufgetauten Samens für 30 sec führte zu einer signifikanten Abnahme der Befruchtungsrate gegenüber dem Samen, der nach dem Auftauen sofort zur Befruchtung verwendet wurde (Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluß der Lagerung von aufgetautem Samen der Regenbogenforelle auf die Befruchtungsrate. Anzahl der Spermien/Ei: 5×10^6

Auftautechnik	% Absolutbefeuchtung	% von Kontrollbefeuchtung
25° C, 30 sec	83,8 ± 7,1 ^a	98,2 ± 8,3 ^c
25° C, 30 sec, 30 sec an der Luft (8-10° C) gelagert	58,5 ± 20,7 ^b	68,5 ± 24,3 ^d
25° C, 20 sec, 30 sec an der Luft (8-10° C) gelagert	64,0 ± 8,1 ^b	75,1 ± 9,4 ^d
Kontrolle (Frischsamen)	85,3 ± 5,5 ^a	

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

4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Reproduzierbarkeit und den hohen Befruchtungserfolg der beschriebenen Methode. Die erfolgreichen Gefrierkonservierungsversuche an Samen des Bachsaiblings zeigen, daß die Methode neben der Regenbogenforelle, Seeforelle, Bachforelle und Renke auch für diese Salmonidenart anwendbar ist. Zur Erlangung des hohen Befruchtungserfolges sind beim Bachsaibling artspezifische Adaptationen in der Einfrierrate und bei der Seeforelle und Bachforelle im Verdünnungsverhältnis der Spermien im Verdünner notwendig (siehe auch Weismann et al., 1995, Lahnsteiner et al., 1996).

1. Lagerung von Frischsamen vor der Gefrierkonservierung

Die Möglichkeit der Lagerung von Frischsamen vor der Gefrierkonservierung hat Bedeutung a) zur Samengewinnung und zum meist notwendigen Poolen der Einzel ejakulate; b) zur Qualitätskontrolle von Samen vor der Gefrierkonservierung; c) zum Samentransport zu einer für die Gefrierkonservierung eingerichteten Institution. Die vorliegenden Daten zeigen, daß Samen vor dem Tieffrieren ohne Qualitätsverlust bis zu einer Stunde gelagert werden kann. Dies ist konform mit älteren Ergebnissen von Stoss und Holtz (1983) und Holtz (1993). Längere Lagerungszeiten bewirken in jedem Fall einen Qualitätsverlust. Bei Verschmutzung mit Harn oder Wasser nimmt die Samenqualität aufgrund osmotische Schädigungen der Samenzellen und teilweiser Mortilitätsaktivierung schneller ab (Lahnsteiner et al., 1995c). Eine Stunde ist zur Ejakulatsammlung und zur Durchführung der genannten Prozeduren meist ausreichend.

2. Verdünnungsrate des Samens im Verdünner

Je geringer das Verdünnungsverhältnis des Samens ist, um so mehr Spermien befinden sich in den Pailletten und um so weniger Pailletten sind zur Befruchtung einer bestimmten Eimenge notwendig. Dies ist mit einer Kostenreduktion verbunden, da geringere Verdünnermengen und weniger Pailletten benötigt werden, erleichtert aber vor allem die Befruchtungstechnik, da mit einer geringeren Paillettenzahl gearbeitet werden kann. Die vorgelegten Daten zeigen, daß die Verdünnungsrate bei der Regenbogenforelle, beim Bachsaibling und bei der Renke 1 : 3 nicht unterschreiten darf, bei der Seeforelle und Bachforelle, deren Samen eine höhere Spermiedichte aufweist, 1 : 7. Dies entspricht einer Zellkonzentration von $2,0$ bis $2,5 \times 10^9$ Spermien/ml Verdünner. Die Spermiedichte beträgt bei der Regenbogenforelle, beim Bachsaibling und bei der Renke etwa 5 bis 10×10^9 Spermien/ml Samen (Stein, 1980), bei der Seeforelle und Bachforelle ist sie etwa 10mal höher (Stein, 1980). Zu hohe Zellkonzentrationen im Verdünner führen wahrscheinlich zu Kompressionsschädigungen während des Einfrier- und Auftauvorgangs.

3. Äquilibrierungszeit des Samens im Verdünner

Äquilibrierung der Spermien bis zu 20 min im Verdünner ist vor dem Einfrieren möglich. Eine lange Äquilibrierungszeit steigert im Vergleich zu kurzer Äquilibrierung von 3 bis 5 min zwar nicht die Befruchtungskapazität des Samens, hat aber dem Vorteil, daß größere Samenmengen verdünnt und in Pailletten abgefüllt werden können. Dies erleichtert das routinemäßige Einfrieren großer Samenmengen.

4. Einfrierrate

Im offenen System liegt die optimale Einfrierrate von Samen der Regenbogenforelle, der Seeforelle, der Bachforelle und der Renke bei -110°C , das ist 1,5 cm über dem Stickstoffspiegel. Beim Bachsaibling beträgt sie -92°C (2,5 cm über dem Stickstoffspiegel). Die Einfriertemperatur (das Einfrierniveau) weist somit artspezifische Unterschiede auf. Unsere Versuchsserie zeigt aber auch, daß Veränderungen im Einfrierniveau um nur 0,5 cm einem Temperaturgradienten von 10°C entsprechen und eine signifikante Erniedrigung der Befruchtungsrate zur Folge haben. Dies ist ein kritischer Punkt unter Praxisbedingungen. Das Einfrierniveau im Einfrierbehälter muß exakt eingestellt und der Stickstoffspiegel überwacht werden, da im offenen System laufend eine Abdampfung erfolgt.

5. Lagerungszeitraum im Flüssigstickstoff

Bei den Befruchtungsergebnissen mit gefrierkonserviertem Samen vom Bachsaibling waren die Befruchtungsraten gleich hoch, wenn Samen 30 min oder 1 Jahr gelagert wurde. Bei der Seeforelle und der Bachforelle waren die absoluten Befruchtungsraten zwar niedriger, wenn Samen statt 30 min 1 Jahr gelagert wurde, die Befruchtungsraten im Verhältnis zur Kontrollbefruchtung mit Frischsamen waren aber gleich hoch bzw. sogar höher. Dies zeigt, daß die Unterschiede in der Befruchtungsrate nicht auf einen Verlust der Samenqualität während der Lagerung, sondern auf Unterschiede in der Eizellqualität zurückzuführen sind. Entgegen früherer Versuche (Kurokura und Hirano, 1980), bei denen Samenqualitätsverluste während der Lagerung beobachtet wurden, zeigen unsere Ergebnisse, daß gefrierkonservierter Fischesamen wie Säugersamen über längeren Zeitraum gelagert werden kann.

6. Lagerung des aufgetauten Samens

Wie bereits beschrieben (Lahnsteiner et al., 1994; Weismann et al., 1994), ist das Auftauen der Pailletten der empfindlichste Arbeitsschritt der Gefrierkonservierung von Salmonidensamen. Die Auftaubedingungen (Wasserbad 25°C , 30 sec lang) müssen exakt eingehalten werden. Bereits eine Verlängerung oder Verkürzung der Auftauphase um 5 sec hat eine signifikante Erniedrigung der Befruchtungsrate zur Folge. Die jetzt

vorliegenden Daten zeigen, daß der aufgetaute Samen unverzüglich zur Befruchtung verwendet werden muß. Auch eine Lagerung von Samen für so kurze Zeiträume wie 30 sec oder ein unvollständiges Auftauen vor der Lagerung erniedrigt die Befruchtungsrate signifikant. Für die Praxis bedeutet dies, daß die zur Befruchtung notwendige Paillettenzahl exakt und gleichzeitig aufgetaut und der Inhalt sofort nach dem Auftauen mit den Eiern vermischt werden muß. Gerade bei Verwendung größerer Paillettenmengen können hier Schwierigkeiten im exakten Arbeitsablauf entstehen. Aus diesem Grund wird von uns eine Vorrichtung entwickelt, die das exakte Auftauen großer Stückzahlen ermöglicht (Abb. 2).

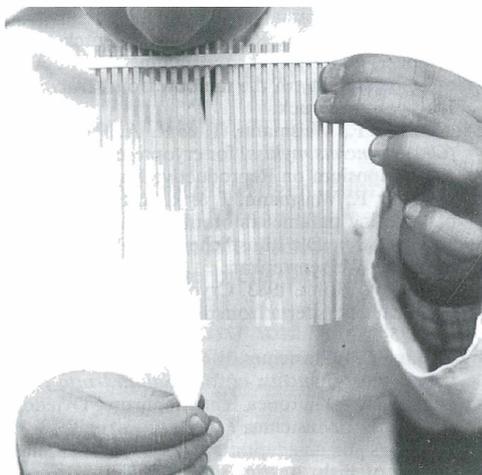


Abb. 2: Aufsaugen von Samen (inkl. Verdüner und Gefrierschutz) in die Pailletten

(Foto: Th. Weismann)

Zusammenfassung

Die von Lahnsteiner et al. (1994, 1995a) entwickelte Gefrierkonservierungsmethode für Spermien von *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Salmo trutta f. fario* und *Coregonus sp.* wird auf ihre Eignung für den routinemäßigen Gebrauch geprüft. Dazu werden die entscheidenden Arbeitsschritte (Lagerfähigkeit des Samens vor der Gefrierkonservierung, Äquilibrierungszeit und Verdünnungsraten im Verdüner, Einfrierraten, Lagerungszeit von tiefgefrorenem Samen in Stickstoff, Lagerung von aufgetautem Samen) auf ihre Durchführbarkeit unter Praxisbedingungen und auf ihre tolerierbaren Abweichungen hin untersucht.

Summary

Cryopreservation of semen of salmonid fishes: Workability in practice.

The uniform cryopreservation method for semen of salmonid fishes of Lahnsteiner et al. (1994, 1995a) is investigated in aspects of suitability under routine aquacultural conditions. The workability of important handling parameters in practice (storage of untreated semen before cryopreservation, equilibration period and dilution ratio in extender, freezing and thawing conditions, storage of deep frozen semen in liquid nitrogen) and their allowable variations are determined.

Danksagung

Gefördert vom Österreichischen Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft. Wir bedanken uns bei der Aufzuchtforschungsanlage Kreuzstein, Herrn Pfeiffer und seinen Mitarbeitern, für die Bereitstellung von Material, die Mithilfe bei den Experimenten und für die Betreuung und Auswertung der Befruchtungsversuche. Wir danken weiters Herrn Dr. Fischerleitner und Frau Dr. Berger (Bundesanstalt für künstliche Befruchtung und Fortpflanzung von Haustieren in Wels) für ihre Unterstützung und Zusammenarbeit bei der Entwicklung der Methodik.

LITERATUR

- Holtz, W., 1993: Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture* 110: 97-100.
- Kurokura, H. & R. Hirano, 1980: Cryopreservation of rainbow trout sperm. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 46: 1493-1495.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1994: Neue Gesichtspunkte zur Gefrierkonservierung von Salmonidensamen. *Österr. Fischerei* 47: 84-89.

- Lahnsteiner F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1995a: A uniform method for cryopreservation of salmonid fishes. *Aquaculture Research* 26, in Druck.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1995b: The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *Appl. J. Ichthyol.*, in Druck.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1995c: Evaluation of semen fitness of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for cryopreservation by physiological and biochemical parameters. 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Austin, Texas, 1995.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & R. A. Patzner, 1996: Semen cryopreservation of salmonid fishes. Influences of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research*, in Druck.
- Stein, H. (1980): Die künstliche Besamung bei Salmoniden Mitteleuropas. Habilitationsschrift. Universität München-Weihenstephan.
- Stoss, J. & W. Holtz, 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of protein in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. *Aquaculture* 31: 275-282.
- Weismann, T., Lahnsteiner, F. & R. A. Patzner, 1994: A new cryopreservation method for semen of salmonid fishes (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus sp.*). VIII. Congress Societas Europea Ichthyologorum, Oviedo, Spain, 1994.
- Weismann, T., Lahnsteiner, F. & R. A. Patzner, 1995: A uniform cryopreservation method for semen of salmonid fishes and its adaptation for practical application. 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Austin, Texas, 1995.

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

Fischereiwirtschaft und Fischereibiologie

Christian Mitterlehner

Selektivität der Fliegenfischerei auf Salmoniden

Einleitung

Relativ wenig ist über die unterschiedliche Fängigkeit von Salmoniden mit der Flugangel bekannt. Im Rahmen eines Besatzprojektes, durchgeführt von der Abteilung für Hydrobiologie, Fischereiwirtschaft und Aquakultur der Universität für Bodenkultur, wurde der Oberlauf der Traisen, deren Fischbestand gut dokumentiert ist, mit der Angel befischt. Im folgenden wird die Artenzusammensetzung der gefangenen Fische mit jener des Gesamtbestandes verglichen, und es wird überprüft, ob einzelne Stämme oder Größenklassen selektiv mit der Angel erbeutet worden sind.

Die Fängigkeit eines Fisches mit der Angel ist ein wichtiger Aspekt des Fischverhaltens, der bei Bewirtschaftungsfragen berücksichtigt werden sollte (Behnke, 1980). Während in »Put-and-Take-Gewässern« ein leicht zu fangender Fisch erwünschter ist, ist ein Abwachsen zu kapitaler Größe bei »mißtrauischen« Fischen leichter möglich. Nicht nur zwischen einzelnen Salmonidenarten (Cooper, 1951), sondern auch zwischen unterschiedlichen Stämmen derselben Art kann sich das Beißverhalten unterscheiden. Dwyer (1990) vergleicht die unterschiedliche Fängigkeit einzelner Stämme der Cutthroat-Forelle (*Oncorhynchus clarki*) miteinander. Es wurden fangfähige Nachkommen eines Wildfischstammes bzw. von Fischzuchtstämmen besetzt. Die einzelnen Stämme waren um so leichter mit der Angel zu fangen, je länger sie intensiven Aufzuchtbedingungen ausge-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Österreichs Fischerei](#)

Jahr/Year: 1997

Band/Volume: [50](#)

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

Artikel/Article: [Gefrierkonservierung von Salmonidensamen: Adaptierung für die Praxis 20-28](#)