©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Triploidisierung von Seeforelle und Seesaibling mittels Druckschock und die Auswirkungen auf die Entwicklung der Fische

Franz Lahnsteiner, Manfred Kletzl, Elias Lahnsteiner

Abstract:

The study tested hydrostatic pressure triploidization methods for *Salmo trutta* f. *lacustris* and *Salvelinus umbla* and investigated effects of triploidization on development of juvenile fish (survival and malformation rate, skeleton morphology, morphometrics and cellular composition of gills, spleen, liver, kidney, intestine, and blood).

Einleitung

Die Chromosomen sind das Erbgut von Lebewesen. Die meisten Lebewesen besitzen die Chromosomen in zweifacher Ausführung, die eine Hälfte vom Vater, die andere von der Mutter. Man bezeichnet sie als diploid. Manche Lebewesen, darunter auch Fische, können einen mehrfachen Chromosomensatz haben. Dies kann natürlich bedingt sein oder durch künstliche Eingriffe erzielt werden. Triploide Lebewesen haben einen dreifachen Chromsomensatz und können sich nicht fortpflanzen. Dies wird auch in der Aquakultur in der Speisefischproduktion genutzt. Triploide Fische weisen ein kontinuierliches Wachstum auf, weil sie keine Energie für die Fortpflanzung aufwenden müssen und laichbedingte Aggressionen und Verletzungen werden vermieden. Aus Zuchtanlagen entkommene triploide Aquakulturfische können sich nicht mit ihren wild lebenden Artgenossen vermehren. Dagegen sind triploide Fische als Besatzfische in natürlichen Gewässern ungeeignet, weil sie nicht fortpflanzungsfähig sind.

Eine Verdreifachung des Chromosomensatzes (= Triploidisierung) wird erreicht, indem die Eier kurz nach der Befruchtung, nämlich während der ersten Zellteilung, einem Temperatur- oder Druckschock ausgesetzt werden. Triploidisierung ist also kein gentechnischer Eingriff, weil das Erbgut nicht verändert sondern nur vervielfacht wird. Sie wird zum Beispiel bei Regenbogenforellen und Lachsen seit Jahren routinemäßig durchgeführt.

Triploidisierung von anderen Salmonidenarten, wie zum Beispiel von Seeforelle oder Seesaibling, könnte in der Fischzucht für die Speisefischproduktion aus den oben angeführten Gründen ebenfalls von Interesse sein, um schnellwüchsige und große Fische zu produzieren. Um die Triploidisierung als Routinemethode in der Aquakultur anwenden zu können, müssen 2 Faktoren erfüllt sein. (1) Die Methode muss effektiv und zuverlässig sein, d. h. alle Fische müssen mit der verwendeten Methode triploid werden. (2) Unter Gesichtspunkten der Nachhaltigkeit, der Tiergesundheit und der Produktqualität muss sichergestellt werden, dass die Triploidisierung keine Schäden am Fisch hervorruft. Mit diesen Problemen beschäftigten wir uns in der Fischzucht Kreuzstein im Rahmen unserer Forschungsarbeiten.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Material und Methoden

Durchführung der Triplodisierung

Zur Triploidisierung wurde eine selbst konzipierte Druckschockmaschine verwendet, die von einer lokalen Firma gebaut wurde (*Abbildung 1*). Sie besteht aus einer Druckkammer und einer elektronischen Kontrolleinheit, mit welcher sich die Zeit bis zum maximalen Druckaufbau, die Höhe des Drucks und die Druckdauer regulieren lassen. Der maximal erreichbare hydrostatische Druck beträgt 1000 bar. Da die Entwicklung der Eier und damit der Beginn der Zellteilung temperaturabhängig sind, ist eine exakte Temperaturkontrolle der Arbeitsschritte notwendig. Bei uns wurden alle Arbeiten bei 9 °C durchgeführt, das entspricht der Wassertemperatur des Grundwassers und der Lufttemperatur des Bruthauses. Die Arbeitsschritte der Triploidisierung werden im folgenden Schema wiedergegeben. Der Zeitpunkt der Druckbehandlung ist artspezifisch.

Abbildung 1. *Druckschockmaschine*

1. Druckschockmaschine programmieren
2 Befruchtung der Eier (nass oder trocken, in Wasser oder in Salzlösung)
3 Waschen der Eier
4 Eier gemeinsam mit Wasser in Druckkolben der Druckschockmaschine füllen und Druckkolben verschließen
5 Druckschock starten (30 – 40 min nach der Befruchtung, abhängig von Fischart)
6 Druckbehandlung endet automatisch
7. Druckkolben öffnen, Eier entnehmen
8 Erbrütung der Eier in Brutrahmen

Bestimmung, ob Fische triploid sind

Triploide Fische haben einen Zellkern, der eineinhalbmal so groß ist, wie bei diploiden Fischen. Die Größenbestimmung des Zellkerns kann am einfachsten und verlässlichsten an den roten Blutkörperchen durchgeführt werden. Blut wird den einzelnen Fischen entnommen und die roten Blutkörperchen werden gefärbt und bei 1000-facher Vergrößerung in einem Lichtmikroskop fotografiert. Anschließend wird die Fläche des Zellkerns vermessen (*Abbildung 2*). Mit dieser Methode kann umgekehrt auch überprüft werden, ob zum Beispiel Besatzfische den normalen zweifachen Chromosomensatz haben.

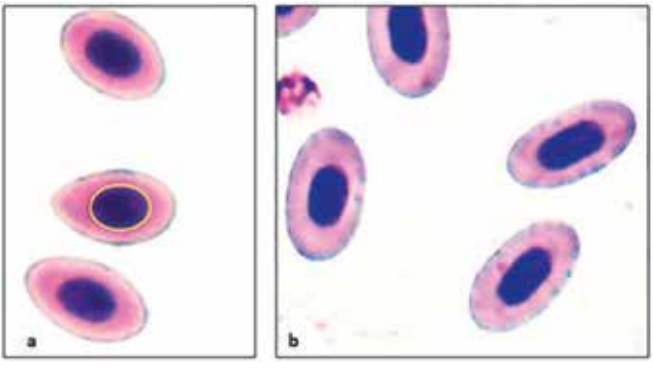
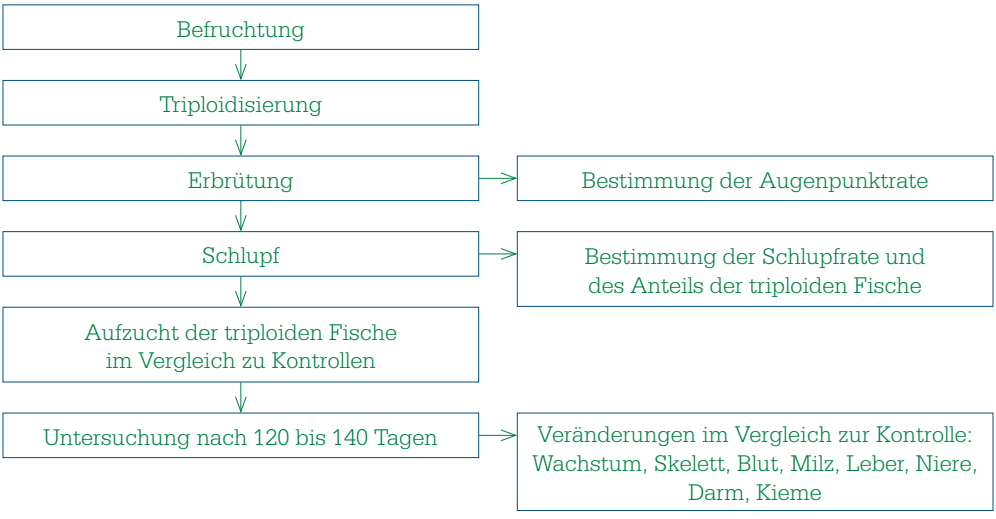


Abbildung 2.
Rote Blutzellen von diploiden (a) und triploiden (b) Seeforellen. Die dunkelblaue Fläche, die an einer Zelle gelb umrahmt wurde, stellt den Zellkern dar. Dessen Fläche wird gemessen.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Unter Gesichtspunkten der Nachhaltigkeit, der Tiergesundheit und der Produktqualität musste sichergestellt werden, dass die Triploidisierung keine Schäden hervorruft. Die Fische wurden daher folgendermaßen untersucht:



Ergebnisse

Der richtige Zeitpunkt der Triploidisierung ist der entscheidende Faktor für den Erfolg der Methode. Wird ein zu früher Zeitpunkt gewählt, sind die Augenpunktrate und Schlupfrate sehr niedrig und der Prozentsatz der triploiden Fische ist kleiner als 60 % (Tabelle 1). Wird ein zu später Zeitpunkt gewählt, wirkt sich das zwar nicht auf die Augenpunktrate und Schlupfrate aus, aber die Fische sind ebenfalls nicht zur Gänze triploid (Tabelle 1). Beim optimalen Zeitpunkt ist die Augenpunktrate etwa gleich hoch wie in der Kontrolle, die Schlupfrate ist gegenüber der Kontrolle um circa 20 % verringert. Der Anteil der triploiden Fische beträgt 100 %. (Tabelle 1)

Tabelle 1. Auswirkung des Triploidisierungszeitpunktes auf Augenpunktrate, Schlupfrate und Prozentsatz der triploiden Fische bei der Seeforelle. Triploidisierungsprozedur: 5 minütiger Druck von 660 bar. Augenpunktrate und Schlupfrate der Experimente sind in Prozent zur Kontrolle gerechnet. Probenanzahl n = 5, Daten sind Mittelwert ± Standardabweichung, jene mit unterschiedlichem Superskript sind signifikant unterschiedlich ($P \leq 0.05$).

Zeit nach der Befruchtung	Augenpunktrate (%)	Schlupfrate (%)	Anteil triploider Fische (%)
Kontrolle	100 ± 0^{a}	100 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}
15 min	6 ± 4^{b}	1 ± 4^{b}	13 ± 0^{b}
20 min	20 ± 11^{c}	12 ± 5^{c}	57 ± 11^{c}
25 min	46 ± 7^{d}	39 ± 8^{d}	57 ± 6^{d}
30 min	75 ± 8^{e}	65 ± 17^{e}	73 ± 6^{e}
35 min	88 ± 9^{e}	82 ± 16^{f}	100 ± 0^{f}
40 min	99 ± 9^{f}	84 ± 8^{f}	100 ± 0^{f}

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Die Druckhöhe hatte dagegen einen geringeren Einfluss auf den Erfolg der Methode. War der Zeitpunkt der Druckbehandlung nicht optimal, konnte auch durch Druckerhöhung der Anteil der triploiden Fische nicht auf 100 % gesteigert werden (Tabelle 2). Bei Verringerung des Drucks sank der Anteil der triploiden Fische, die Schlupfrate konnte aber nicht erhöht werden (Tabelle 2).

Tabelle 2. Auswirkung der Druckhöhe auf Augenpunktrate, Schlupfrate und Prozentsatz der triploiden Fische bei der Seeforelle. Die Triploidisierung erfolgte durch einen 5 minütigen Druck mit 660 bar 30 min nach der Befruchtung. Augenpunktrate und Schlupfrate der Experimente sind in Prozent zur Kontrolle gerechnet. Probenanzahl n = 3, Daten sind Mittelwert ± Standardabweichung, jene mit unterschiedlichem Superskript sind signifikant unterschiedlich ($P \leq 0.05$).

Höhe des Drucks	Augenpunktrate (%)	Schlupfrate (%)	Anteil triploider Fische (%)
Kontrolle	100 ± 0.0 [a]	100 ± 0 [a]	0 ± 0 [a]
610 bar	99 ± 2 [a]	85 ± 11 [a]	44 ± 18 [b]
660 bar	100 ± 0 [a]	82 ± 13 [a]	69 ± 27 [c]
710 bar	98 ± 1 [a]	79 ± 9 [a]	91 ± 32 [d]

Der optimale Zeitpunkt für die Druckschocktriploidisierung war bei einer Wassertemperatur von 9 °C für die Seeforelle 40 min nach der Befruchtung, für den Seesaibling 30 min nach der Befruchtung und für den Bachsaibling 35 min nach der Befruchtung. Die notwendige Druckhöhe war 660 bar und die Dauer der Druckbehandlung 5 min. Dies war für alle Arten gleich.

Auswirkungen der Triploidisierung auf die Entwicklung der Fische

Die 120 bis 140 Tage alten triploiden Seeforellen und Seesaiblinge wurden untersucht und mit »normalen« diploiden Kontrollen verglichen.

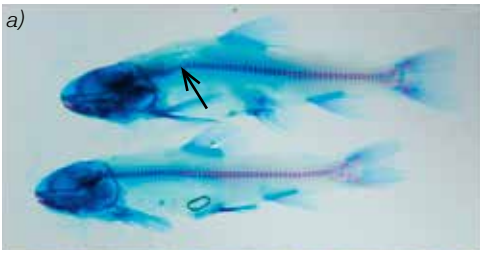
Auswirkung auf Wachstum und Vitalität

Zwischen den normalen, diploiden und den triploiden Fischen konnten keine Unterschiede in der Längen- und Gewichtszunahme und im Konditionsfaktor festgestellt werden. Die Mortalitätsrate war kleiner als 3 % und der Anteil der missgebildeten Fische kleiner als 5 %. Auch hier bestanden keine Unterschiede. Es konnten auch keine Veränderungen im Skelett der Fische festgestellt werden, die auf die Triploidisierung zurückzuführen waren. Beispiele für Skelettuntersuchungen sind in *Abbildung 3* zu sehen.

Veränderungen in den Organen

Triploide Fische verfügen über größere rote Blutkörperchen als ihre diploiden Artgenossen. Die Konzentration der roten Blutkörperchen ist dagegen bei den triploiden Fischen verringert, ebenso wie das Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen (Tabelle 3). Die letztgenannten Faktoren bestimmen, wieviel Sauerstoff ein Fisch aufnehmen kann. Je höher die Anzahl der roten Blutkörperchen und je größer das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, desto besser die Sauerstoffaufnahme. Bei triploiden Fischen war das blutbildende Gewebe der Niere (prozentueller Anteil des blutbildenden Gewebes im Vergleich zum Nierengewebe) und der Milz (Größe der Milz, Anzahl der Erythroblasten pro definierter Gewebefläche) verringert (Tabelle 3).

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at



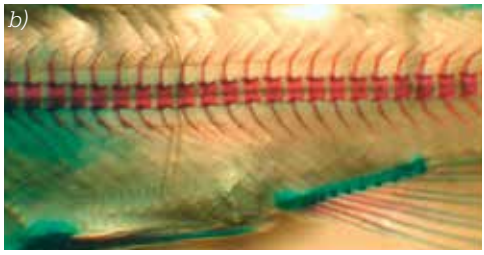


Abbildung 3. *Skelettfärbung von Seesaiblingen mit Alzianblau und Alizarinrot.*

Abbildung 3a. *Gesamtansicht. Der obere Fisch weist eine Veränderung der Wirbelsäule auf (siehe Pfeil).*

Abbildung 3b. *Wirbelsäule. Rote Strukturen sind Knochen, blau gefärbte Strukturen Knorpel*

Die Kiemen der triploiden Fische waren vergrößert. So waren die Primärlamellen breiter und die Sekundärlamellen länger als bei normalen, diploiden Fischen (Tabelle 3). Dies ist möglicherweise ein Kompensationsmechanismus für die verringerte Konzentration von roten Blutkörperchen und das ungünstigere Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen. Der zelluläre Aufbau der Kiemen (Dicke des Kiemenepithels, Anteil der Chloridzellen) zeigte keine Unterschiede zwischen diploiden und triploiden Fischen.

Ebenso bestanden zwischen den diploiden und triploiden Fischen keine Unterschiede im zellulären Aufbau der Leber (Leberindex, Durchmesser der Gallengänge, Anzahl von Makrophagen [Fresszellen] und abgestorbenen Zellen pro Gewebsfläche) und des Darmes (Länge des Darmes, Größe der Darmfalten, Aufbau und Struktur des Darmepithels).

Tabelle 3. Auswirkung des Druckschocktriploidisierung auf Blut, Milz, Niere und Kiemen bei der Seeforelle. Triploidisierungsprozedur: 40 min nach der Befruchtung 5 minütiger Druck von 660 bar. Probenanzahl n = 10, Daten sind Mittelwert ± Standardabweichung. Alle Werte sind signifikant unterschiedlich ($P \leq 0.05$).

Parameter	Diploid	Triploid
Anzahl der roten Blutkörperchen pro ml Blut in Millionen Zellen	970 ± 280	710 ± 140
Volumen eines roten Blutkörperchens, μm^3	96 ± 18	139 ± 23
Oberfläche eines roten Blutkörperchens, μm^2	236 ± 41	335 ± 51
Verhältnis Oberfläche zu Volumen bei den roten Blutkörperchen	2,47 ± 0,03	2,43 ± 0,03
Prozentueller Anteil des blutbildenden Gewebes in der Niere	40,3 ± 6,6	28,4 ± 5,9
Milzindex	0,08 ± 0,05	0,04 ± 0,01
Anzahl der Erythroblasten (Vorstadien von roten Blutkörperchen) pro 0.1 mm^2 Milzgewebe	905 ± 149	524 ± 220
Breite der Primärlamellen der Kiemen in µm	190 ± 14	241 ± 28
Länge der Sekundärlamellen der Kiemen in µm	95 ± 9	110 ± 6

Diskussion

Triploide Fische sind steril und haben in der Aquakultur aufgrund des kontinuierlichen Wachstums Vorteile gegenüber den diploiden Fischen. Da sie nicht fortpflanzungsfähig sind, stellen entkommene Aquakulturfische für natürliche Ökosysteme nur ein geringes Risiko dar. Dagegen sind triploide Fische als Besatzfische natürlicher Gewässer ungeeignet.

©Österr. Fischereiverband u. Bundesamt f. Wasserwirtschaft, download unter www.zobodat.at

Die Triploidisierung von Fischen ist nicht unumstritten. Durch Triploidisierung hervorgerufene Veränderungen wurden in zahlreichen Studien untersucht (Zusammenfassungen siehe in Maxime 2008; Benfey 2016). An triploiden Lachsen wurden Verkrümmungen der Wirbelsäule und Fehlbildungen des Unterkiefers festgestellt (Benfey 2016). Bei allen triploiden Salmoniden war die Anzahl der roten Blutkörperchen verringert, in einigen Fällen war auch die Anzahl von abnormen Blutzellen erhöht. Dies kann – wie beim Lachs bewiesen – zu einer erniedrigten Sauerstoffkonzentration des Bluts führen (Benfey 2016). In weiterer Folge könnten diese Faktoren die Überlebensfähigkeit unter Extrembedingungen und unter Stress verringern, was aber de facto bis jetzt nicht bewiesen wurde (Benfey und Biron 2000). An triploiden Lachsen und Bachsaiblingen wurden auch Stoffwechselveränderungen festgestellt. Aufgrund dieser Veränderungen haben sie ein niedrigeres und engeres Temperaturoptimum als diploide Fische (Atkins und Benfey, 2008). Bei triploiden Lachsen wurden auch Veränderungen des Verdauungstraktes beschrieben (Peruzzi et al., 2015). Die hier zusammengefassten Veränderungen wurden an unterschiedlichen Salmonidenarten festgestellt, die mit unterschiedlichen Methoden triploidisiert wurden (Wärmeschock, Druckschock und dabei wieder unterschiedliche Druckhöhe, Druckdauer und Zeitspanne nach der Befruchtung). Deshalb ist es schwierig, die Daten zu generalisieren.

Aus unseren eigenen Untersuchungen an Seeforellen und Seesaiblingen kann folgendes geschlossen werden: Durch geeignete Druckschockbehandlung können 100%ig triploide Fische produziert werden. Es ist aber notwendig, die Druckbehandlung für jede Fischart zu standardisieren. Andernfalls ist mit erhöhten Ausfällen oder einem verringerten Prozentsatz an triploiden Fischen zu rechnen. In unseren Untersuchungen wurden weder eine erhöhte Sterblichkeitsrate der Fische noch eine erhöhte Missbildungsrate oder Deformationen des Skeletts festgestellt. Auch der Darm und die Leber wiesen keine Veränderungen auf. Wie in den oben zitierten Studien, war auch in unserer Untersuchung die Anzahl der roten Blutkörperchen verringert und in der Folge auch das blutbildende Gewebe der Niere und Milz. Die vergrößerten Kiemenlamellen führen zu einer Oberflächenvergrößerung der Kiemen. Dies könnte den Gasaustausch erhöhen und damit die Veränderungen im Blut kompensieren.

In der Fischzuchtroutine unterschieden sich die triploiden Fische nicht von den normalen, diploiden. Es konnte weder erhöhte Stressempfindlichkeit beobachtet werden, noch Anfälligkeit gegenüber Krankheiten oder Ausfälle unter grenzwertigen Bedingungen, wie bei erhöhter Wassertemperatur. Somit zeigten sich bis zum jetzigen Zeitpunkt keine signifikant negativen Effekte für den Organismus. Möglicherweise treten Veränderungen nur dann vermehrt auf, wenn die Triploidisierungsbedingungen nicht optimal sind. Die triploiden Fische werden weiter untersucht und über den Fortgang der Entwicklung wird berichtet.

LITERATUR

Atkins, M.E., Benfey, T.J., 2008. Effect of acclimation temperature on routine metabolic rate in triploid salmonids. Comp. Biochem. Physiol. 149A: 157–161.

Benfey, T. J., Biron, M., 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brook trout *Salvelinus fontinalis*. Aquaculture 184: 167–176.

Benfey, T. J., 2016. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. Rev Aquacult, 8: 264–282.

Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. Fish Fish 9: 67–78.

Peruzzi, S., Hagen, Ø., Jobling, M., 2015. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Inter. 23: 1105–1108.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Österreichs Fischerei

Jahr/Year: 2018

Band/Volume: 71

Autor(en)/Author(s): Lahnsteiner Franz, Kletzl Manfred, Lahnsteiner Elias

Artikel/Article: Fischereibiologie & Aquakultur. Triploidisierung von Seeforelle und Seesaibling mittels Druckschock und die Auswirkungen auf die Entwicklung der Fische 15-20