



Neue Wege in der Forellenzucht- rein weibliche Bestände mittels temperatursensibler Milchner (xx-Väter)

Abschlussbericht über das Entwicklungsprojekt, gefördert unter dem
Az. 31685/01 von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt

Simon Rosenau, Melanie Westerhold & Prof. Dr. Jens Tetens

Abteilung Aquakultur und Gewässerökologie am
Department für Nutztierwissenschaften der
der Georg-August-Universität Göttingen

Projektlaufzeit: 01.10.2014 bis 30.06.2018.

Göttingen im Januar 2019

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	31685/01	Referat	34	Fördersumme	119.500,- €
----	-----------------	---------	-----------	-------------	--------------------

Antragstitel	Neue Wege in der Forellenzucht- rein weibliche Bestände mittels temperatursensibler Milchner (xx-Väter)
---------------------	--

Stichworte	Forelle, Gynogenese, Neomilchner, Geschlechtsdeterminierung, Monosexpopulationen
-------------------	--

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
3 Jahre 8 Monate	1.10.2014	30.06.2018	

Zwischenberichte

Bewilligungsempfänger	Georg-August-Universität Göttingen Arbeitsgruppe Aquakultur und Gewässerökologie Department für Nutztierwissenschaften Albrecht-Thaer-weg 3 37075 Göttingen	Tel 0551-39 23845 Fax 0551-39 33381	Projektleitung Prof. Dr. Jens Tetens Bearbeiter M. Westerhold, S. Rosenau
------------------------------	---	--	--

Kooperationspartner

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Mit dem Einsetzen der Geschlechtsreife und somit der Gonadenreife, kommt es bei Forellen zu Einbußen in der Leistung und der Produktqualität sowie erhöhten stress-, verletzungs- und krankheitsbedingten Verlusten. Da weibliche Tiere (Rogner) später geschlechtsreif werden, können sie auf höhere Gewichte ausgemästet werden (Lachsforellen), ohne oben beschriebene Effekte in Kauf nehmen zu müssen. Aus diesem Grund sind in der Regenbogenforellenzucht rein weibliche Bestände gefragt, um wirtschaftlichen Aspekten sowie den hohen Qualitätsansprüchen des Verbrauchers gerecht zu werden. Das Ziel dieses Projektes war es daher, eine alternative Methode zur Erstellung rein weiblicher Bestände zu erproben, die einerseits praktikabel ist und andererseits ohne den Einsatz von Hormonen auskommt. Dies ist insofern eine Herausforderung, als dass die Geschlechtsdeterminierung bei Forellen auf einem einfachen XY-System beruht. Es gibt jedoch Belege dafür, dass auch über die Erbrütungstemperatur unter bestimmten Bedingungen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis genommen werden kann, was auch in eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Das vorliegende Projekt wurde in der Regenbogenforellenzuchtanlage der Versuchswirtschaft der Universität Göttingen in Relliehausen durchgeführt.

Ausgehend von verschiedenen Forellenherkünften wurden zunächst durch Gynogenese XX-Ausgangspopulationen erstellt. Im Zuge der Bebrütung dieser Gruppen wurde am Tag 42 nach der Befruchtung (days post fertilization, dpf) eine 30-tägige Temperaturbehandlung bei 18°C durchgeführt. Neben der Behandlungsgruppe wurde auch immer eine Kontrollgruppe mitgeführt. Die Tiere wurden dann bis zur Geschlechtsreife aufgezogen und an Hand der Gonadenentwicklung auf das Vorhandensein funktioneller Milchner (phänotypisches Geschlecht) überprüft. Das genetische Geschlecht wurde mittels eines PCR-Testes molekulargenetisch festgestellt. In der Folge war die Verpaarung funktioneller XX-Milchner mit „normalen“ XX-Rognern geplant.

Ergebnisse und Diskussion

In diesem Projekt konnten erfolgreich zunächst genetisch rein weibliche Ausgangslinien durch meiotische Gynogenese erstellt werden. Durch eine Temperaturbehandlung dieser Gruppen könnte das Auftreten phänotypisch vermännlichter Tiere induziert werden. Die Induzierung einer funktionellen Vermännlichung mit dem Auftreten von XX-Neomilchnern konnte jedoch nicht erreicht werden. Damit wurde leider ein wesentliches Ziel dieses Projektes verfehlt.

Auf Grund der eingangs geschilderten Vorteile sind rein weibliche Populationen bei Forellen sehr interessant. Herkömmliche Verfahren zur Erzeugung weiblicher Monosexpopulationen sind jedoch aufwändig oder von der Verabreichung von Hormonen abhängig. Ein praktikables und einfaches Verfahren, das ohne Hormongaben auskommt, wäre also von besonderer Bedeutung. Dies gilt insbesondere auch für die ökologische Aquakultur. Die Systeme der der Geschlechtsdetermination sind bei Fischen sehr heterogen und es gibt sowohl einfache, geschlechtschromosomale Mechanismen als auch polygene Determination und teilweise existiert ein erheblicher Umwelteinfluss. So ist es bei manchen Fischarten möglich, das Geschlechterverhältnis durch Temperaturbehandlungen zu verschieben. Regenbogenforellen haben ein grundsätzlich ein sehr einfaches System der Geschlechtsdetermination mit einem Paar Gonosomen (X,Y), wobei in diesem Fall wie bei Säugern männliche Heterogamete vorliegt. Allerdings wurde auch eine Temperaturabhängigkeit beschrieben, wobei jedoch die Temperatursensitivität genetisch determiniert ist und somit nicht alle Herkünfte oder Familien gleichermaßen auf eine Temperaturbehandlung ansprechen. Der grundlegende Unterschied besteht darin, dass in den vorherigen Arbeiten nicht auf gynogenetische Ausgangspopulationen zurückgegriffen wurde. Vielmehr wurde an Nachkommengruppen aus verschiedenen Anpaarungen gezeigt, dass sich durch eine Temperaturbehandlung das Geschlechterverhältnis verschiebt. Eine genetische Determinierung konnte durch Selektionsexperimente gezeigt werden, in denen die Temperatursensitivität als Zielmerkmal diente. Der Grund, warum im vorliegenden Projekt gynogenetische Ausgangspopulationen verwendet wurden, ist einfach. In unbehandelten Gruppen liegt i.d.R. ein Geschlechterverhältnis von 50:50 vor, wie auch in der aktuellen Studie beobachtet. Es können also nur 50% der Fische überhaupt in der gewünschten Richtung auf die Behandlung ansprechen. Außerdem sind Neomilchner (XX) phänotypisch nicht von normalen männlichen (XY) Fischen zu unterscheiden. In weiblichen Monosexpopulationen können alle phänotypisch männlichen Tiere als potenzielle Neomilchner betrachtet werden. Ein vergleichbarer Ansatz wurde bereits erfolgreich von Valdivia *et al.* (2014) verfolgt. In jenem konkreten Fall jedoch wurden die Arbeiten an einer Forellenpopulation durchgeführt, in der eine rezessive Mutation, die sog. *mal*-Mutation, segregiert, welche als ein Hauptgen für die Temperatursensitivität beschrieben wurde. Für die von uns verwendeten Herkünfte, lassen die Ergebnisse der vorhergehenden Arbeiten jedoch den Schluss zu, dass eine polygene Determination vorliegt und das Hauptgen keine Rolle spielt. Die Temperaturbehandlung an unseren Tieren hat auch tatsächlich bei einem Teil der Fische phänotypische Vermännlichung hervorgerufen, aber funktionelle Neomilchner wurden nicht beobachtet.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse zu den gynogenetischen Populationen wurden auf der gemeinsamen Vortragsstagung der deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGfZ) und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften (GfT) am 20./21. September 2016 in Hannover vorgestellt. Zudem wurde auf dem Deutschen Fischereitag am 29. Juni 2017 in Bonn das Projekt im Rahmen einer Posterpräsentation vorgestellt und als das beste Poster gewählt (dotiert mit 300,- €).

Fazit

Abschließend lässt sich sagen, dass sich der gewählte Ansatz nur teilweise bewährt hat. Es ist gelungen, eine phänotypische Vermännlichung zu induzieren, ohne jedoch funktionelle XX-Neomilchner produzieren zu können. Dieses Ergebnis war an Hand der Literaturlage und früherer Ergebnisse nicht zu erwarten. Ein modifizierter Ansatz könnte mit doppelt haploiden Tieren arbeiten oder auf gynogenetische Populationen verzichten. Letzterer Ansatz scheint am vielversprechendsten, allerdings insbesondere dann, wenn dem Versuch eine längerdauernde, leider sehr zeitintensive, Selektion auf Temperatursensitivität vorausgehen würde. Derartige Folgestudien sind jedoch derzeit nicht geplant.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	i
II.	Abbildungsverzeichnis	ii
1.	Zusammenfassung.....	1
2.	Anlass und Zielsetzung des Projektes	1
3.	Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden.....	2
3.1.	Ablauf und einzelne Schritte des Projektes.....	2
3.2.	Erstellung der Ausgangspopulationen: Gynogenese & Wärmebehandlung	4
3.3.	Untersuchung der Schlupf-und Überlebensraten.....	7
3.4.	Molekulargenetische Bestimmung des genetischen Geschlechtes	7
3.5.	Screening auf funktionelle Milchner	7
4.	Ergebnisse	9
4.1.	Auswertung der Schlupf- und Überlebensraten	9
4.2.	Molekulargenetische Bestimmung des genetischen Geschlechtes	10
4.3.	Screening auf funktionelle Milchner	11
5.	Diskussion.....	14
6.	Öffentlichkeitsarbeit.....	15
7.	Fazit	16
8.	Literatur.....	17
9.	Anhang.....	18

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fließschema der einzelnen Projektschritte.....	3
Abbildung 2: Schlupf eines gynogenetischen Geleges.....	5
Abbildung 3: Aufzucht (30 Tage) der diploiden Gruppen in Zugergläsern.....	6
Abbildung 4: Temperaturbehandlung der gynogenetischen Gruppen bei 18°C für 30 Tage.....	6
Abbildung 5: äußeres Erscheinungsbild eines genetischen Milchners, beachte den durch einen Pfeil markierten Laichhaken.	8
Abbildung 6: Geschlechtsbestimmung am toten Fisch (weibl. Geno- und Phänotyp) .	9
Abbildung 7: Einfluss der Umwelttemperatur auf das Merkmal Schlupf- und Überlebensrate (LSQ-Mittelwerte). Unterschiedliche Buchstaben bedeuten einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).	10
Abbildung 8: Molekulargenetische Untersuchung auf sdY – Beispiel einer Gelelektrophorese. Männliche Tiere (XY) weisen eine sdY-spezifische Bande bei ca. 300bp auf. Die beiden Milchner rechts sind Standardtiere. Nur eines der untersuchten ist männlich, was den Erfolg der Gynogenese zeigt.....	11
Abbildung 9: Gynogenetische Fische mit sehr männlich ausgeprägten sekundären Geschlechtsmerkmalen. Die obere und unter Zeile zeigen jeweils einen Fisch, links sind die männlich ausgeprägten Papillen zu sehen, auf der rechten Seite sind Ansätze von Laichhaken gezeigt. Beachte auch die Dunkelfärbung.....	13

1. Zusammenfassung

Rein weibliche Forellenbestände bieten enorme Vorteile, da sie später geschlechtsreif werden und sich auf höhere Gewichte ausästen lassen. Herkömmliche Verfahren zur Erzeugung weiblicher Monosexpopulationen sind jedoch aufwändig oder von der Verabreichung von Hormonen abhängig. Ein praktikables und einfaches Verfahren wäre eine Temperaturbehandlung zur Erzeugung funktioneller XX-Neomilchner, deren Verpaarung mit normalen XX-Rognern rein weibliche Bestände ergäbe. Es wurde bereits früher gezeigt, dass eine derartige Temperaturbehandlung funktioniert und das Ziel des Projektes war daher die Erprobung des Verfahrens an gynogenetischen Ausgangspopulationen. Nach erfolgreicher Erzeugung dieser Populationen konnte durch Temperaturbehandlung die Entstehung phänotypisch vermännlichter Fische induziert werden. Jedoch gelang es nicht, funktionelle Neomilchner zu erzeugen, welche die Umsetzung des obigen Ansatzes erlaubt hätten. Die Ursachen dafür lassen sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht zufriedenstellend erklären. Weitere Forschungsarbeiten wären notwendig.

2. Anlass und Zielsetzung des Projektes

Mit dem Einsetzen der Geschlechtsreife und somit der Gonadenreifung, kommt es bei Forellen zu Einbußen in der Leistung und der Produktqualität sowie erhöhten stress-, verletzungs- und krankheitsbedingten Verlusten. Da weibliche Tiere (Rogner) später geschlechtsreif werden, können sie auf höhere Gewichte ausgemästet werden (Lachsforellen), ohne oben beschriebene Effekte in Kauf nehmen zu müssen. Aus diesem Grund sind in der Regenbogenforellenzucht rein weibliche Bestände gefragt, um wirtschaftlichen Aspekten sowie den hohen Qualitätsansprüchen des Verbrauchers gerecht zu werden. Das Ziel dieses Projektes war es daher, eine alternative Methode zur Erstellung rein weiblicher Bestände zu erproben, die einerseits praktikabel ist und andererseits ohne den Einsatz von Hormonen auskommt. Dies ist insofern eine Herausforderung, als dass die Geschlechtsdeterminierung bei Forellen auf einem einfachen XY-System beruht. Es gibt jedoch Belege dafür, dass auch über die Erbrütungstemperatur unter bestimmten Bedingungen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis genommen werden kann, was

auch in eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Magerhans *et al.* 2009; Magerhans und Hörstgen-Schwark 2010).

Daher wurde in diesem Projekt ein Ansatz gewählt, der auf der Beobachtung beruht, dass sich bei Regenbogenforellen durch eine 30 tägige Wärmebehandlung der Brut bei 18°C die Entstehung phänotypischer Milchner aus genetisch weiblichen Tieren (XX) induzieren lässt. Ausgehend von gynogenetisch erzeugten rein weiblichen Populationen verschiedener Forellenherkünfte wurde die Vermännlichung durch erhöhte Wassertemperatur erprobt, um funktionelle XX-Milchner zu erhalten. Verpaart man diese mit „normalen“ (XX, phänotypisch weibliche) Rognern, erhält man potenziell rein weibliche Bestände.

3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

3.1. Ablauf und einzelne Schritte des Projektes

Das vorliegende Projekt wurde in der Regenbogenforellenzuchtanlage der Versuchswirtschaft der Universität Göttingen in Relliehausen durchgeführt. Zu Beginn wurden die dortigen Haltungseinrichtungen repariert, umgebaut und die entsprechenden Kapazitäten für eine Temperaturbehandlung während der frühen Brütlingsphase bei Forellen geschaffen. Des Weiteren musste das Kreislaufsystem aufgebaut werden, das für die Aufzucht der Behandlungs- und Kontrollgruppen essentiell ist. Es wurde getestet, ob die Becken, die für die Temperaturbehandlung vorgesehen sind, auch einwandfrei funktionieren, sodass eine kontinuierliche Temperatur (18°C) und Durchlüftung während der Behandlung der Forellenlarven gesichert ist.

Ausgehend von verschiedenen Forellenherkünften wurden zunächst durch Gynogenese (s.u.) XX-Ausgangspopulationen erstellt. Im Zuge der Bebrütung dieser Gruppen wurde am Tag 42 nach der Befruchtung (days post fertilization, dpf) eine 30-tägige Temperaturbehandlung bei 18°C durchgeführt. Neben der Behandlungsgruppe wurde auch immer eine Kontrollgruppe mitgeführt. Die Tiere wurden dann bis zur Geschlechtsreife aufgezogen und an Hand der Gonadenentwicklung auf das Vorhandensein funktioneller Milcher (phänotypisches Geschlecht) überprüft. Das genetische Geschlecht wurde mittels eines PCR-Testes molekulargenetisch festgestellt. In der Folge war die Verpaarung funktioneller XX-Milchner mit „normalen“

XX-Rognern geplant. Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Projektschritte.

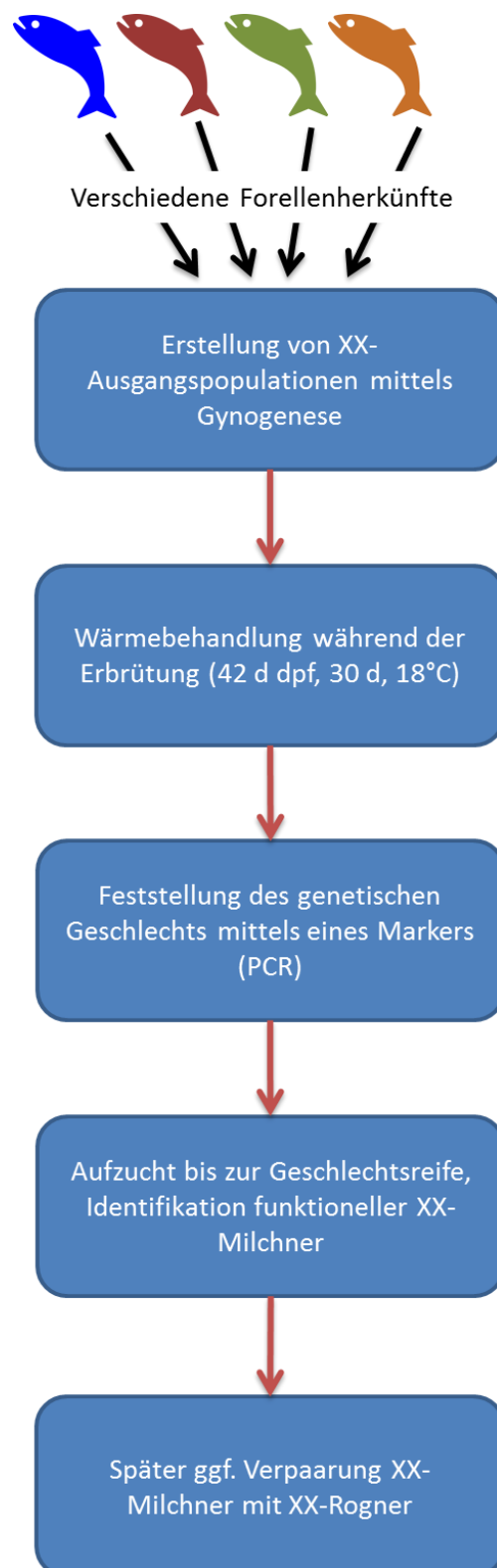


Abbildung 1: Fließschema der einzelnen Projektschritte.

3.2. Erstellung der Ausgangspopulationen: Gynogenese & Wärmebehandlung

Anpaarungen zur Erstellung von Ausgangspopulationen wurden sowohl in der Laichsaison 2015/2016 als auch 2016/2017 durchgeführt. Die nach Herkunft markierten Laichfische wurden in der Laichsaison regelmäßig auf ihre Laichreife untersucht und je nach Laichreife der Elterntiere auf unterschiedliche Laichtermine verteilt (Details dazu finden sich in den jeweiligen Zwischenberichten). Die für die Vermehrung herangezogenen Rogner und Milchner wurden individuell mit einem Mikrochip (Transponder) markiert, damit sie im weiteren Versuchsverlauf für gezielte Einzelanpaarungen genutzt werden konnten. Es wurden die Eiqualität (Anzahl weißer Eier) und die Spermaqualität (Bewegungsfähigkeit der Spermien) vor der Befruchtung geprüft und anhand dessen wurden die Elterntiere ausgewählt.

Die Einzelanpaarungen wurden wie folgt durchgeführt: Die Eimenge eines Rogners wurde in drei Portionen aufgeteilt. Die erste Portion der abgestreiften Eier diente als diploide Kontrollgruppe, was eine Befruchtung mit unbestrahltem Sperma beinhaltete. Mit der zweiten Portion Eier wurde eine meiotische Gynogenese durchgeführt, wozu das Sperma des Milchners mittels einer UV-Lampe (254nm Wellenlänge) inaktiviert werden musste. Das bestrahlte Sperma aktiviert die Eizelle, allerdings werden keine männlichen Chromosomen weitergegeben. Die gynogenetische Gruppen wurden nach der „Scheinbefruchtung“ einem 20 minütigen Hitzeschock (26°C Wassertemperatur) unterzogen, damit das zweite Polkörperchen beibehalten wird. Die Anpaarung, Bestrahlung und der Hitzeschock fanden in den Laboren der Abteilung statt.

Die haploide Kontrollgruppe wurde ebenfalls mit dem UV-bestrahlten Sperma befruchtet, aber es wurde keine Schockbehandlung durchgeführt, und das zweite Polkörperchen wurde somit nicht behalten. Das Mitführen einer haploiden Kontrollgruppe ist ein üblicher Versuchsbestandteil bei der Induzierung einer meiotischen Gynogenese. Die haploiden Embryonen entwickeln sich nicht zu schwimmfähigen Larven und werden nicht behalten. Versuchsgruppen, bei denen in der haploide Gruppe schwimmfähige Brut beobachtet wurde, wurden nicht weiter berücksichtigt.

Die Erbrütung der verschiedenen Gruppen erfolgte in Brutschränken (VECO:AG 8810 HORGEN) in Schalen mit Siebeinsatz (Abbildung 2). Das Wasser wurde im Teilkreislauf rezirkuliert (Wasserdurchfluss 1,5l/min) und durch ein Kühlaggregat auf

10°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) gehalten. Die unterschiedlichen Gelege verblieben dort bis zwei Wochen nach dem Schlupf (320 – 360 T° Schlupf). Um ein Verpilzen der Gelege zu verhindern, mussten unbefruchtete Eier entfernt werden (bis zwei Tage nach der Befruchtung) und ein Auslesen sogenannter „Mondeier“ erfolgte dann erst wieder nach dem Augenpunktstadium. Die Schlupfrate eines jeden Geleges wurde erfasst.



Abbildung 2: Schlupf eines gynogenetischen Geleges.

Zwei Wochen nach dem Schlupf, d.h. 42 dpf, sind rund 80% der Larven freischwimmend. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Larven von Göttingen zur Versuchswirtschaft Relliehausen transportiert. Die diploiden Kontrollgruppen (500 Stück) einer jeder Anpaarung wurden in Zugergläser umgesetzt und angefüttert (Abbildung 3).



Abbildung 3: Aufzucht (30 Tage) der diploiden Gruppen in Zugergläsern

Die gynogenetischen Behandlungsgruppen wurden für die Temperaturbehandlung in einen kleinen Kreislauf überführt, der mit 10°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) warmen Wasser gefüllt. Da die Brut vorab schon bei einer Wassertemperatur von 10°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) gehalten wurde, konnte der durch das Umsetzen bedingte Stress minimiert werden. Das Heizsystem des Kleinkreislaufes wurde allmählich über einen Zeitraum von zwei Tagen auf 18°C erwärmt. Die Larven verblieben 30 Tage in der Wärmebehandlung (Abbildung 4) und wurden währenddessen angefüttert. Nach Beendigung der Temperaturbehandlung wurden die Behandlungsgruppen ebenfalls in Kleinbecken der Aufzuchtanlage gesetzt. Zuvor wurde das Heizsystem des Kleinkreislaufes der Temperaturbehandlungseinheit nach Ablauf der Behandlung ausgeschaltet, sodass das Überführen von dem einem Temperaturregime in das andere über einen Zeitraum von zwei Tagen durchgeführt werden konnte.



Abbildung 4: Temperaturbehandlung der gynogenetischen Gruppen bei 18°C für 30 Tage

Zufällig wurden 200 Fische aus jeder Behandlungsgruppe entnommen und in 80 l fassende Kleinbecken umgesetzt, sodass eine separate und standardisierte Aufzucht von Behandlungs- und Kontrollgruppen möglich war. Das Kreislaufverfahren, mit kontinuierlicher Frischwasserzufuhr, ermöglicht standardisierte Haltungs- und Umweltbedingungen in jedem der 36 Becken. Die Wasserwerte (Ammonium, Nitrit und pH-Wert) der Aufzuchtanlagen wurden wöchentlich kontrolliert. Die individuelle Markierung mit einem Transponder ist erst ab einem Körpergewicht von 20g möglich, so dass die ersten Fische jeweils bis zum Sommer, getrennt nach Familien, in den Becken verbleiben mussten. Die diploiden Gruppen wurden auf 50 Fische pro

Familie/Anpaarung reduziert. Die Stückzahl in den 80 l Becken wurde monatlich reduziert, um ein zu starkes Auseinanderwachsen zu verhindern. Die Futterration der einzelnen Becken wurde der Stückzahl und Körpergröße angepasst, sodass eine optimale Futtermenge gewährleistet ist.

3.3. Untersuchung der Schlupf- und Überlebensraten

Zur vergleichenden Bewertung der Schlupf- und Überlebensraten bei Behandlungs- und Kontrollgruppen wurde die Anzahl der Larven, die nach ca. 320 Tagesgraden tatsächlich geschlüpft waren (Schlupfrate) erfasst. Die Überlebensrate der Larven wurde 30 Tagen nach der Temperaturbehandlung bestimmt. Bei der statistischen Analyse der Schlupf- und Überlebensdaten der Fische wurde eine Binomialverteilung zugrunde gelegt. Sowohl Schlupf- als auch die Überlebensdaten sind mittels eines logistischen Modells (GLMMs) mit der Glimmix Prozedur des SAS Systems (SAS-Institut, 2000) analysiert worden.

3.4. Molekulargenetische Bestimmung des genetischen Geschlechtes

Zur Validierung des genetischen Geschlechts, d.h. zur Bestätigung einer erfolgreichen Gynogenese wurde bei den Fischen im Alter von eineinhalb Jahren ein molekulargenetischer Test durchgeführt. Zuerst wurde dazu die DNA aus den Schwanzflossen (Finncips) extrahiert. Mittels eines PCR-basierten Ansatzes wie von Yano *et al.* (2013) beschrieben, wurde ein gonosomenspezifisches Genfragment (sdY Marker) amplifiziert, das nach Durchführung einer Gelelektrophorese eine eindeutige Diagnose des genetischen Geschlechtes zulässt. Diese Untersuchung lässt jedoch noch keine Schlüsse auf den Erfolg der temperaturinduzierten Vermännlichung zu, die erst bei Eintritt der Geschlechtsreife an Hand des sichtbaren Phänotyps oder an Hand der Gonaden festgestellt werden kann.

3.5. Screening auf funktionelle Milchner

Im Berichtszeitraum 2016 / 2017 sowie gegen Ende des Projektes wurden nach Eintritt der Geschlechtsreife die temperaturbehandelten Gruppen aus den beiden aufeinanderfolgenden Laichperioden auf funktionelle Milchner untersucht. Da es in der

Literatur kein Protokoll gibt, wie funktionelle Milchner zu erkennen sind, wurde zunächst versucht, das phänotypische Geschlecht am betäubten Fisch und an den primären und sekundären Geschlechtsmerkmalen zu erkennen. Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) erreicht ihre Geschlechtsreife im zweiten bzw. dritten Lebensjahr. Die Laichzeit beginnt bei Wassertemperaturen von 6° - 7° C. Als primäres Geschlechtsmerkmal dient die Gewinnung männlicher Geschlechtsprodukte (Milch) durch Abstreifen. Sekundäre Geschlechtsmerkmale treten meist bei männlichen Fischen (z. B. Laichhaken am Unterkiefer der Salmoniden, verlängerte Rückenflosse der Äsche, Laichausschlag auf der Haut vieler Karpfenartiger, verstärkte Bauchflossen der Schleie) auf (Harder 1964; Lehmann 1991). Besonders wurde auf die Ausbildung eines sogenannten Laichhakens geachtet. Der Laichhaken, eine hakenförmige Verformung des Unterkiefers, tritt bei Milchnern während der Laichzeit auf und dient als eindeutiges Geschlechtsmerkmal. Bewertet wurde als erstes das Gesamterscheinungsbild (Abbildung 5 zeigt dies am Beispiel eines genetischen Milchners). Tiere, die zumindest eines der typisch männlichen phänotypischen Erkennungsmerkmale (Laichhaken, Dunkelfärbung, langgestreckter Körperbau, männliche Papille) aufwiesen, wurden als potenzielle funktionelle XX-Milchner eingestuft.



Abbildung 5: äußeres Erscheinungsbild eines genetischen Milchners, beachte den durch einen Pfeil markierten Laichhaken.

Ende Oktober 2016 wurden alle zweijährigen Behandlungsfische (613 Stück) und Kontrollfische (147 Stück) aus der ersten Laichsaison genau begutachtet. Ende 2017 wurden nochmals 761 Fische aus dem 2. Durchgang untersucht. Hierzu wurden alle Fische aus dem Teich geholt, betäubt, identifiziert, gewogen, vermessen und sortiert.

Beim Handling wurde darauf geachtet, die Fische so wenig als möglich Stress auszusetzen.

Wie später im Ergebnisteil dargestellt und im Detail auch den Zwischenberichten zu entnehmen, konnten genetische Rogner identifiziert, die phänotypisch als potenziell männlich bzw. nicht als klar weiblich einzustufen waren. Es ließ sich jedoch trotz vorliegender Laichreife von keinem dieser Tiere Milch gewinnen, so dass der Verdacht nahe lag, dass es sich nicht um funktionelle Milchner handelt. Zur Validierung wurden die Tiere fachgerecht getötet, um an Hand der Gonaden eine eindeutige Diagnose stellen zu können. Abbildung 6 zeigt zur Veranschaulichung den typischen Situs nach Eröffnung der Bauchhöhle beim weiblichen Fisch.



Abbildung 6: Geschlechtsbestimmung am toten Fisch (weibl. Geno- und Phänotyp)

4. Ergebnisse

4.1. Auswertung der Schlupf- und Überlebensraten

Aus Abbildung 7 geht hervor, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen hinsichtlich der Merkmale Schlupfrate und Überlebensrate gibt. Die Gynogenese und die anschließende Behandlung führen zu einer Reduktion der Schlupf- und Überlebensfähigkeit. Dieses Ergebnis stimmt gut mit einer früheren Publikation von Chourrout und Quillet (1982) überein, welche die meiotische Gynogenese bei Regenbogenforellen untersuchten und ebenfalls geringere Schlupf- und Überlebensraten bei behandelten Tieren beschrieben.

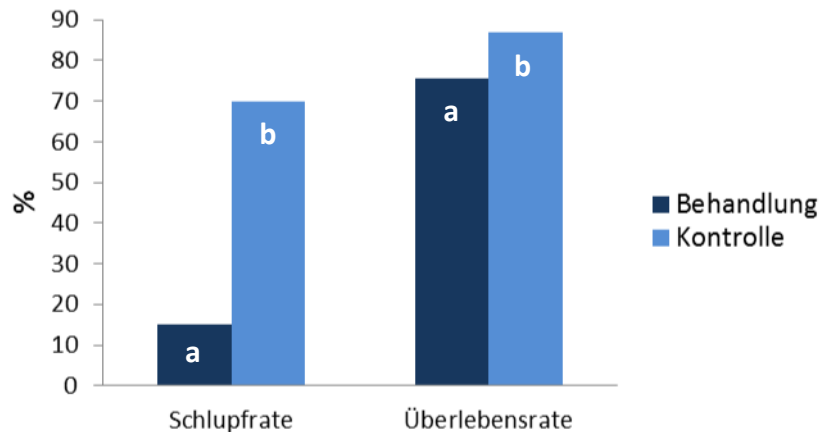


Abbildung 7: Einfluss der Umwelttemperatur auf das Merkmal Schlupf- und Überlebensrate (LSQ-Mittelwerte). Unterschiedliche Buchstaben bedeuten einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Die Schlupf- und Überlebensraten werden neben genetischen auch von umwelt- und technologisch bedingten Faktoren stark beeinflusst. Unterschiede zwischen den Familien zeigen, dass sich einige Familien besser für die Behandlungen eignen als andere.

4.2. Molekulargenetische Bestimmung des genetischen Geschlechtes

Durch die genetische Untersuchung lassen sich genetische Männchen (XY) eindeutig identifizieren (Yano *et al.* 2013). Die Untersuchung der gynogenetischen Gruppen auf den sdY-Marker (Abbildung 8) hat gezeigt, dass 99,4% dieser Tiere genetisch weiblich sind, was den Erfolg der durchgeführten meiotischen Gynogenese eindrucksvoll belegt. Das Geschlechterverhältnis der getesteten Kontrollgruppen beträgt nahezu 50:50 (42,86% ♂ und 57,14% ♀), wobei stichprobenweise jeweils 10-12 Tiere aus jeder Kontrollgruppe auf ihr genetisches Geschlecht untersucht. Weitere Einzelheiten können auch den entsprechenden Zwischenberichten entnommen werden.

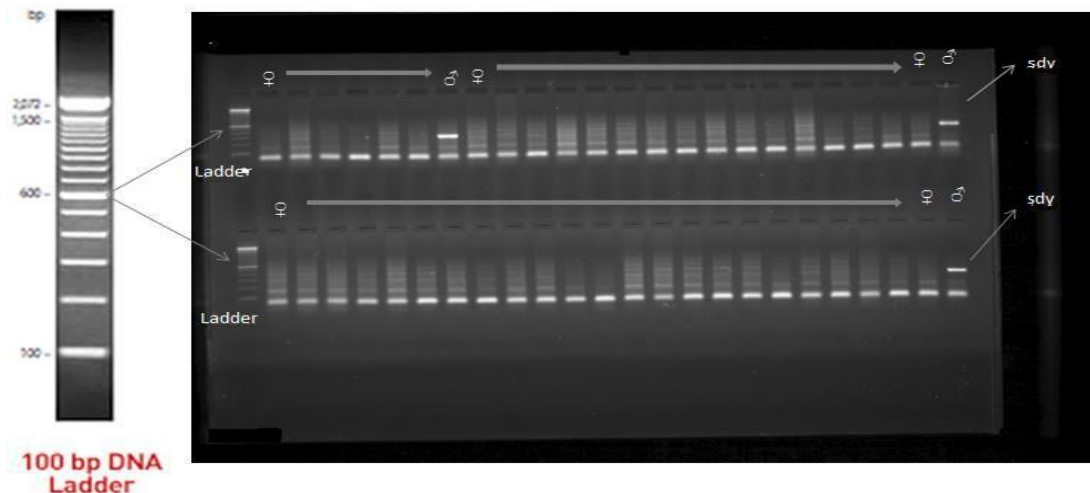


Abbildung 8: Molekulargenetische Untersuchung auf sdY – Beispiel einer Gelelektrophorese. Männliche Tiere (XY) weisen eine sdY-spezifische Bande bei ca. 300bp auf. Die beiden Milchner rechts sind Standardtiere. Nur eines der untersuchten ist männlich, was den Erfolg der Gynogenese zeigt.

4.3. Screening auf funktionelle Milchner

Bei den Fischen in den Kontrollgruppen war eine phänotypische Geschlechtsbestimmung immer eindeutig möglich. Sowohl primäre als auch sekundäre Geschlechtsmerkmale beider Geschlechter waren stets eindeutig erkennbar. Ein Vergleich zwischen phänotypischen und, soweit vorliegend, genetischem Geschlecht ergab eine Übereinstimmung von 100%.

Der Großteil der gynogenetischen Behandlungstiere wies einen eindeutig weiblichen Phänotyp auf. In den ersten Durchgängen war der Phänotyp lediglich bei 43 gynogenetischen Fischen nicht klar als weiblich zu bestimmen. Von diesen „potentiellen funktionellen Milchnern“ wurden Fotoaufnahmen zur Dokumentation gemacht. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel nicht eindeutiger Geschlechtsmerkmale bei einem potenziellen XX-Neomilchner. Diese Tiere wurden separat in einen Abschnitt des Fließkanals gesetzt. Dort waren die Haltungsbedingungen optimal (geringe Besatz-dichte, hoher Durchfluss). Allerdings ließ sich von keinem „potentiellen funktionellen Milchner“ Milch gewinnen. Die aus diesem Grund durchgeführte Diagnose an Hand der Gonaden am toten Fisch zeigte, dass alle phänotypisch vermännlichten gynogenetischen XX-Tiere tatsächlich auch gonadale Weibchen

darstellten, d.h. es wurden trotz phänotypischer Vermännlichung ausschließlich weibliche Geschlechtsorgane gefunden. Weitere 8 potenziell funktionelle Neomilcher wurden im letzten Durchgang (Laichsaison 2017/2018) beobachtet. Von diesen Tieren ließ sich Milch gewinnen und sie wurden entsprechend mit XX-Rognern angepaart. Bei der scY-Marker-Untersuchung stellten sich die Milchner jedoch später leider als "normale" XY-Milcher heraus, d.h. hier hatte die Gynogenese nicht funktioniert.

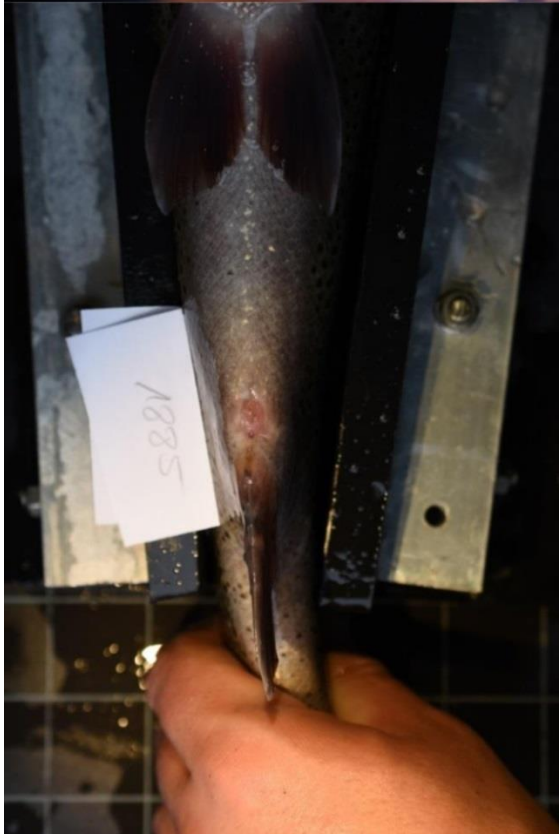


Abbildung 9: Gynogenetische Fische mit sehr männlich ausgeprägten sekundären Geschlechtsmerkmalen. Die obere und untere Zeile zeigen jeweils einen Fisch, links sind die männlich ausgeprägten Papillen zu sehen, auf der rechten Seite sind Ansätze von Laichhaken gezeigt. Beachte auch die Dunkelfärbung.

5. Diskussion

In diesem Projekt konnten erfolgreich zunächst genetisch rein weibliche Ausgangslinien durch meiotische Gynogenese erstellt werden. Durch eine Temperaturbehandlung dieser Gruppen könnte das Auftreten phänotypisch vermännlichter Tiere induziert werden. Die Induzierung einer funktionellen Vermännlichung mit dem Auftreten von XX-Neomilchnern konnte jedoch nicht erreicht werden. Damit wurde leider ein wesentliches Ziel dieses Projektes verfehlt.

Auf Grund der eingangs geschilderten Vorteile sind rein weibliche Populationen bei Forellen sehr interessant und konventionelle Anbieter wie Trout Lodge bieten z.B. vornehmlich rein weibliche Brut an. Herkömmliche Verfahren zur Erzeugung weiblicher Monosexpopulationen sind jedoch aufwändig oder von der Verabreichung von Hormonen abhängig. Ein praktikables und einfaches Verfahren, das ohne Hormongaben auskommt, wäre also von besonderer Bedeutung. Dies gilt insbesondere auch für die ökologische Aquakultur. Die Systeme der der Geschlechtsdetermination sind bei Fischen sehr heterogen und es gibt sowohl einfache, geschlechtschromosomale Mechanismen als auch polygene Determination und teilweise existiert ein erheblicher Umwelteinfluss. So ist es bei manchen Fischarten möglich, das Geschlechterverhältnis durch Temperaturbehandlungen zu verschieben. Regenbogenforellen haben ein grundsätzlich ein sehr einfaches System der Geschlechtsdetermination mit einem Paar Gonosomen (X,Y), wobei in diesem Fall wie bei Säugern männliche Heterogamete vorliegt. Allerdings wurde auch eine Temperaturabhängigkeit beschrieben, wobei jedoch die Temperatursensitivität genetisch determiniert ist und somit nicht alle Herkünfte oder Familien gleichermaßen auf eine Temperaturbehandlung ansprechen. Dies wurde u.a. auch in der hiesigen Arbeitsgruppe gezeigt (Magerhans *et al.* 2009; Magerhans und Hörstgen-Schwark 2010) und das hier beschriebene Projekt baut auf diesen Arbeiten auf. Der grundlegende Unterschied besteht darin, dass in den vorherigen Arbeiten nicht auf gynogenetische Ausgangspopulationen zurückgegriffen wurde. Vielmehr wurde an Nachkommengruppen aus verschiedenen Anpaarungen gezeigt, dass sich durch eine Temperaturbehandlung das Geschlechterverhältnis verschiebt (Magerhans *et al.* 2009). Eine genetische Determinierung konnte durch Selektionsexperimente gezeigt werden, in denen die Temperatursensitivität als Zielmerkmal diente (Magerhans und Hörstgen-Schwark 2010).

Der Grund, warum im vorliegenden Projekt gynogenetische Ausgangspopulationen verwendet wurden, ist einfach. In unbehandelten Gruppen liegt i.d.R. ein Geschlechterverhältnis von 50:50 vor, wie auch in der aktuellen Studie beobachtet. Es können also nur 50% der Fische überhaupt in der gewünschten Richtung auf die Behandlung ansprechen. Außerdem sind Neomilchner (XX) phänotypisch nicht von normalen männlichen (XY) Fischen zu unterscheiden. In weiblichen Monosexpopulationen können alle phänotypisch männlichen Tiere als potenzielle Neomilchner betrachtet werden. Ein vergleichbarer Ansatz wurde bereits erfolgreich von Valdivia *et al.* (2014) verfolgt. In jenem konkreten Fall jedoch wurden die Arbeiten an einer Forellenpopulation durchgeführt, in der eine rezessive Mutation, die sog. *mal*-Mutation, segregiert, welche als ein Hauptgen für die Temperatursensitivität beschrieben wurde (Quillet *et al.* 2002). Für die von uns verwendeten Herkünfte, lassen die Ergebnisse der vorhergehenden Arbeiten jedoch den Schluss zu, dass eine polygene Determination vorliegt und das Hauptgen keine Rolle spielt. Die Temperaturbehandlung an unseren Tieren hat auch tatsächlich bei einem Teil der Fische phänotypische Vermännlichung hervorgerufen, aber funktionelle Neomilchner wurden nicht beobachtet. Dies war nicht zu erwarten, da in den Studien von Magerhans und Hörstgen-Schwark (2010) die Geschlechtsdiagnose an Hand mikroskopischer Untersuchungen der Gonaden erfolgte und tatsächlich XX-Tiere mit männlichem gonadalen Geschlecht aufgetreten sind. Möglich wäre, dass der Prozess der Gynogenese hier mit der Maskulinisierung interferiert hat. Zwar haben Valdivia *et al.* (2014) auch gynogenetische Populationen verwendet, aber wie oben bereits erwähnt, war in den Tiere die „*mal*“-Mutation vorhanden. Außerdem verwendeten die Autoren doppelt haploide Tiere, während in unserer Studie mit meiotischer Gynogenese gearbeitet wurde. Auf Basis der verfügbaren Literatur und den aktuellen Ergebnissen, kann das Fehlschlagen des Vermännlichungsansatzes nicht zufriedenstellend erklärt werden.

Ein möglicher zukünftiger Ansatz wäre die Verwendung nicht gynogenetischer Herkünfte, wobei solche mit hoher Temperatursensitivität zu bevorzugen sind.

6. Öffentlichkeitsarbeit

Da der eigentliche Vermännlichungsansatz nicht realisiert werden konnte, gibt es keine Publikationen in referierten Fachzeitschriften, diese sind auch zukünftig nicht zu

erwarten. Der Ansatz und die Ergebnisse im Hinblick auf die gynogenetischen Population wurden jedoch der Öffentlichkeit präsentiert. Im Einzelnen liegen folgende Veröffentlichungen vor:

- Zum 50 jährigen Jubiläum des Versuchsgutes Relliehausen fand am 10./11. Juni 2016 ein „Tag der Agrarwissenschaften“ sowie ein „Tag der offenen Tür“ statt. Zu diesem Anlass wurde ein Poster (A0) angefertigt (siehe Anlage) und von Frau Westerhold wurde ein diesbezüglicher Vortrag auf dem „Tag der Agrarwissenschaften“ am 10. Juni 2016 gehalten.
- Am 20./21. September 2016 stellte Frau Westerhold auf der gemeinsamen Vortragstagung der deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde (DGfZ) und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften (GfT) in Hannover die Ergebnisse zu den gynogenetischen Populationen vor. Der Beitrag ist ebenfalls im Anhang beigefügt.
- Auf dem Deutschen Fischereitag am 29. Juni 2017 in Bonn hat Frau Westerhold das Projekt im Rahmen einer Posterpräsentation vorgestellt (Zusammenfassung s. Anhang) Sie gewann damit Preis für das beste Poster (dotiert mit 300,- €, siehe <http://www.vdff-fischerei.de/index.php?id=192>).

7. Fazit

Abschließend lässt sich sagen, dass sich der gewählte Ansatz nur teilweise bewährt hat. Es ist gelungen, eine phänotypische Vermännlichung zu induzieren, ohne jedoch funktionelle XX-Neomilchner produzieren zu können. Dieses Ergebnis war an Hand der Literaturlage und früherer Ergebnisse nicht zu erwarten. Ein modifizierter Ansatz könnte mit doppelt haploiden Tieren arbeiten oder auf gynogenetische Populationen verzichten. Letzterer Ansatz scheint am vielversprechendsten, allerdings insbesondere dann, wenn dem Versuch eine längerdauernde, leider sehr zeitintensive, Selektion auf Temperatursensitivität vorausgehen würde. Derartige Folgestudien sind jedoch derzeit nicht geplant.

8. Literatur

- Chourrout, D. und Quillet, E. (1982): Induced gynogenesis in the rainbow trout: Sex and survival of progenies production of all-triploid populations. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* **63**. S. 201–205.
- Harder, Wilhelm (1964): Anatomie der Fische, Stuttgart, Germany Schweizerbart Science Publishers. Online verfügbar unter www.schweizerbart.de/publications/detail/isbn/9783510410040/Handb_d_Binnenfischerei_Band_II_A_bro.
- Lehmann, Jens (1991): Der Körperbau der wichtigsten mitteleuropäischen Süßwasserfische ein Leitfaden, Kirchhudem-Albaum Landesanst. für Fischerei Nordrhein-Westfalen.
- Magerhans, Andreas und Hörstgen-Schwark, Gabriele (2010): Selection experiments to alter the sex ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by means of temperature treatment. *Aquaculture* **306**. S. 63–67.
- Magerhans, Andreas; Müller-Belecke, Andreas und Hörstgen-Schwark, Gabriele (2009): Effect of rearing temperatures post hatching on sex ratios of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. *Aquaculture* **294**. S. 25–29.
- Quillet, E.; Aubard, G. und Queau, I. (2002): Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout: detection and genetic analysis. *The Journal of heredity* **93**. S. 91–99.
- Valdivia, Karina; Jouanno, Elodie; Volff, Jean-Nicolas; Galiana-Arnoux, Delphine; Guyomard, René; Helary, Louise et al. (2014): High temperature increases the masculinization rate of the all-female (XX) rainbow trout „Mal“ population. *PloS one* **9**. S. e113355.
- Yano, Ayaka; Nicol, Barbara; Jouanno, Elodie; Quillet, Edwige; Fostier, Alexis; Guyomard, René und Guiguen, Yann (2013): The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary applications* **6**. S. 486–496.

9. Anhang

Poster, Tag der offenen Tür in Relliehausen, 2016



Universität Göttingen

Abteilung Aquakultur und Gewässerökologie
Department für Nutztierwissenschaften

Projekt: „Neue Wege in der Forellenzucht - rein weibliche Bestände mittels temperatursensibler Milchner“ Melanie Westerhold und Gabriele Hörstgen-Schwark

gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt im Rahmen der Förderinitiative „Nachhaltige Aquakultur“ der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) AZ 31685/01



1. Problemstellung

Das Ziel dieses Projektes ist es, eine alternative Form (zum sonst üblichen Hormoneinsatz) für die Erzeugung von rein weiblichen Forellenbeständen zu erproben, die in Deutschland umgesetzt werden kann und neben wirtschaftlichen Aspekten den hohen Qualitätsansprüchen, die der deutsche Verbraucher an Fischprodukte stellt, entspricht. Der hier verfolgte neue Ansatz, die Geschlechtsausprägung bei Regenbogenforellen zu beeinflussen, beruht auf der gezielten Veränderung der Haltungstemperatur während der frühen Brüttingsphase.

2. Material und Methoden

Die Ausprägung eines männlichen Phänotyps kann bei Regenbogenforellen auch bei genetisch weiblichen Geschlechtsfaktoren (XX) durch eine 30 tägige Wärmebehandlung der Brut bei 18° C erreicht werden. Im ersten Schritt werden rein weibliche Populationen (mittels Gynogenese) verschiedener Forellenherkünfte erstellt. In der Folge wird das genetische Geschlecht anhand eines genetischen Sexmarkers (sdY) festgestellt. Der Erfolg einer temperaturinduzierten Vermännlichung (XX Männchen) kann anhand der Gonaden, mit Eintritt der Geschlechtsreife, festgestellt werden. Anschließend wird die Reproduktionsfähigkeit (Spermabildung) der identifizierten funktionellen Milchner (XX Männchen) mit den Fruchtbarkeitsleistungen genetischer Milchner (XY) verglichen. Abschließend werden die identifizierten funktionellen Milchner zur Erzeugung rein weiblicher Nachkommen (XX) mit genetisch weiblichen Regenbogenforellen (XX) verpaart.



3. Ergebnisse

Die Überlebensraten von Behandlungs- und Kontrollgruppen sind zum Zeitpunkt des jeweiligen Behandlungsendes (30 Tage) erfasst worden. Wassertemperaturen von 18° C liegen im Haltungsspektrum von Regenbogenforellen; ein Einfluss der Wassertemperatur auf die Überlebensrate der Brut in den Kontroll- und Versuchsgruppen ist nicht festzustellen. Die Überlebensrate der behandelten Gruppen bis zur Probenahme (April 2016) beträgt durchschnittlich 78%. Die molekular genetische Untersuchung (sdY) hat gezeigt, dass 99,4% der behandelten Gruppen genetisch weiblich sind. Durch die genetische Untersuchung (sdY) lassen sich genetische Männchen (XY) eindeutig identifizieren. Das Geschlechterverhältnis der getesteten Kontrollgruppen beträgt nahezu 50:50 (42,86% ♂ und 57,14% ♀).

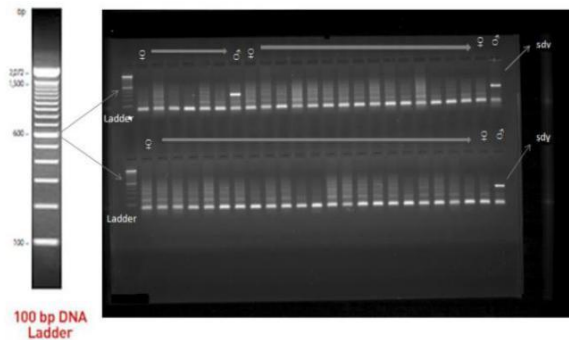


Abb.1: Molekular genetische Untersuchungen auf sdY. Die genetischen Männchen (XY) weisen zwei Banden (siehe sdY) auf. Die sdY Bande ist etwas größer als 300bp (Basenpaare).

4. Ausblick

Über die erfolgreiche Induktion der phänotypischen Geschlechtsumwandlung kann erst im Herbst (Untersuchung der Gonaden) eine verlässliche Aussage getroffen werden. Sollten anschließende Anpaarungsversuche mit den funktionellen Männchen rein weibliche Nachkommenschaften erbringen, wäre dies ein Nachweis für den Erfolg der Methode. Derartige Verpaarungen würden es Praxisbetrieben ermöglichen, ihre rein weiblichen Bestände selbst zu erzeugen.

5. Fazit

Das vorliegende Projekt zeichnet sich durch seine positiven umweltrelevanten Aspekte wie bspw. die Hinfälligkeit des Hormoneinsatzes für die Erstellung von eingeschlechtlichen weiblichen Regenbogenforellenbeständen aus. Darüber hinaus fördert es eine Schonung der Süßwasserressourcen durch eine effiziente Forellenerzeugung sowie einen möglichen Erhalt der genetischen Vielfalt von Populationen, da die heimischen Fischzüchter in diesem Ansatz auf ihre eigenen Laichfischbestände zurückgreifen könnten.

Neue Wege in der Forellenzucht - rein weibliche Bestände mittels temperatursensibler Milchner

gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt im Rahmen der Förderinitiative „Nachhaltige Aquakultur“ der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) AZ 31685/01

M. Westerhold¹, A.R. Sharifi², G. Hörstgen-Schwark¹

¹Abteilung Aquakultur und Gewässerökologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

²Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

mwester@gwdg.de

Das Hauptziel dieses Projektes ist eine alternative Form für die Erzeugung von rein weiblichen Forellenbeständen zu entwickeln. Diese Methode sollte neben wirtschaftlichen Aspekten den hohen Qualitätsansprüchen des deutschen Verbrauchers entsprechen. In der Regenbogenforellenzucht sind weibliche Bestände gefragt, da diese später geschlechtsreif werden als männliche Tiere und somit auf höhere Gewichte (Lachsforellen) ausgemästet werden können ohne Einbußen hinsichtlich der Produktqualität sowie hinsichtlich erhöhter stress-, verletzungs- und krankheitsbedingter Verluste hinnehmen zu müssen.

Die Ausprägung eines männlichen Phänotyps kann bei Regenbogenforellen auch bei genetisch weiblichen Geschlechtsfaktoren (XX) durch eine 30 tägige Wärmebehandlung der Brut bei 18°C erreicht werden. Im ersten Schritt werden rein weibliche Populationen (mittels Gynogenese) verschiedener Forellenherkünfte erstellt. Die erhöhte Wassertemperatur führt zu einer Vermännlichung von genetischen Weibchen (XX), sodass diese einen männlichen Phänotyp ausbilden (funktionelle Milchner). Der Erfolg einer temperaturinduzierten Vermännlichung (XX Männchen) kann anhand der Gonaden, mit Eintritt der Geschlechtsreife, festgestellt werden. Anschließend wird die Reproduktionsfähigkeit (Spermabildung) der identifizierten funktionellen Milchner (XX Männchen) mit den Fruchtbarkeitsleistungen genetischer Milchner (XY) verglichen. Abschließend werden die identifizierten funktionellen Milchner zur Erzeugung rein weiblicher Nachkommen (XX) mit genetisch weiblichen Regenbogenforellen (XX) verpaart.

Vortragstagung der DGfZ und GfT am 20./21. September 2016 in Hannover

Neue Wege für die Erstellung rein weiblicher Populationen in der Regenbogenforellenzucht

M. Westerhold¹, A.R. Sharifi², F. Krieg³, E. Quillet³, G. Hörstgen-Schwark¹

¹Abteilung Aquakultur und Gewässerökologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

²Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

³Animal Genetics and Integrative Biology INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich

1 Einleitung

Das Hauptziel dieses Projektes ist es zum sonst üblichen Hormoneinsatz eine alternative Form für die Erzeugung von rein weiblichen Forellenbeständen zu entwickeln. Diese Methode sollte neben wirtschaftlichen Aspekten den hohen Qualitätsansprüchen des deutschen Verbrauchers entsprechen. In der Regenbogenforellenzucht sind weibliche Bestände gefragt, da diese später geschlechtsreif werden als männliche Tiere und somit auf höhere Gewichte (Lachsforellen) ausgemästet werden können ohne Einbußen hinsichtlich der Produktqualität sowie hinsichtlich erhöhter stress-, verletzungs- und krankheitsbedingter Verluste hinnehmen zu müssen.

Der neue Ansatz basiert auf der Beeinflussung der Geschlechtsdeterminierung bei Regenbogenforellen durch die gezielte Veränderung der Haltungstemperatur während der frühen Brütlingsphase (Magerhans & Hörstgen-Schwark, 2010). In vorangegangenen Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Haltung von Forellenbrut bei 18°C für 30 Tage, beginnend zwei Wochen nach dem Schlupf, zu einer Änderung des phänotypischen Geschlechts der Fische führen kann (Magerhans et al., 2009). Die erhöhte Wassertemperatur führt zu einer Vermännlichung von genetischen Weibchen (XX), sodass diese einen männlichen Phänotyp ausbilden (funktionelle Milchener). Es werden temperaturbehandelte Nachkommenschaften und nicht behandelte Kontrollen von unterschiedlichen Regenbogenpopulationen erstellt.

Eins der Ziele dieser Studie ist es, den Effekt der Temperaturbehandlung auf die Schlupf- und Überlebensfähigkeit von behandelten und nicht behandelten Regenbogenforellen zu untersuchen. Eine weitere Forschungsaufgabe ist die Validierung des genetischen Geschlechts anhand eines Sexmarkers, hierzu werden temperaturbehandelte Nachkommenschaften auf funktionelle männliche Fische (Genotyp weiblich, Phänotyp männlich) geprüft. Ausblickend auf weiterführende Untersuchungen werden die identifizierten funktionellen Milchener zur Erzeu-

gung rein weiblicher Nachkommen (XX Weibchen) mit genetisch weiblichen Regenbogenforellen (XX Weibchen) verpaart.

2 Material und Methoden

Tiere und Daten

Die nach Herkunft markierten Laichfische wurden in der Laichsaison regelmäßig auf ihre Laichreife untersucht. Die laichreifen Tiere wurden in der Laichsaison 2014/2015 und in der Laichsaison im Winter 2015, basierend auf einer vorgeschalteten Ei- bzw. Spermaqualitätsanalyse, für 19 verschiedene Einzelanpaarungen ausgewählt. Zur individuellen Identifikation wurden die Fische mit einem Transponder markiert und gemeinsam im Teich gehalten.

Mittels einer meiotischen Gynogenese wurden im ersten Schritt rein weibliche Populationen verschiedener Forellenherkünfte erstellt. Das Sperma des Milchners wurde mittels einer UV-Lampe (254nm Wellenlänge) inaktiviert. Zur Validierung der Ergebnisse wurden beide Geschlechter einer normal reproduzierten diploiden Kontrollgruppe mitgeführt.

Durch die meiotische Gynogenese entstehen rein weibliche Nachkommen, die zwei Wochen nach dem Schlupf bei 18°C für 30 Tage gehalten werden. Die Schlupfrate ist die Anzahl der Larven, die nach ca. 320 Tagesgraden tatsächlich geschlüpft sind. Die Überlebensrate der Larven wurde 30 Tagen nach der Temperaturbehandlung (30 Tagen) bestimmt. Zur Validierung des genetisch determinierten Geschlechts wurde anhand eines genetischen Sexmarkers, des sogenannten „sdY“-Marker, bestimmt. Der Erfolg einer temperaturinduzierten Vermännlichung zu sogenannten funktionellen Milchner (XX-Männchen) kann erst bei Eintritt der Geschlechtsreife (Winter 2016/2017) anhand der Gonaden festgestellt werden.

Bei der statistischen Analyse der Schlupf- und Überlebensdaten wurde eine Binomialverteilung zugrunde gelegt. Sowohl Schlupf- als auch die Überlebensdaten sind mittels logistischem Modell (GLMMs) mit dem Prozedur Glimmix des SAS Systems (SAS-Institut, 2000) analysiert worden.

Berücksichtigt wurden in dem statistischen Modell der fixe Effekt der Temperaturbehandlung, der fixe Effekt der genetischen Gruppe (Linie) und die Wechselwirkung zwischen diesen beiden fixen Faktoren.

3 Ergebnisse und Diskussion

Aus der Abbildung 1 geht hervor, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Gruppen hinsichtlich der Merkmale Schlupfrate und Überle-

bensrate gibt. Chourrout & Quillet (1982) untersuchten die meiotische Gynogenese bei Regenbogenforellen und beschreiben geringere Schlupf- und Überlebensraten bei behandelten Tieren, was auch in unserem Versuch bestätigt werden kann.

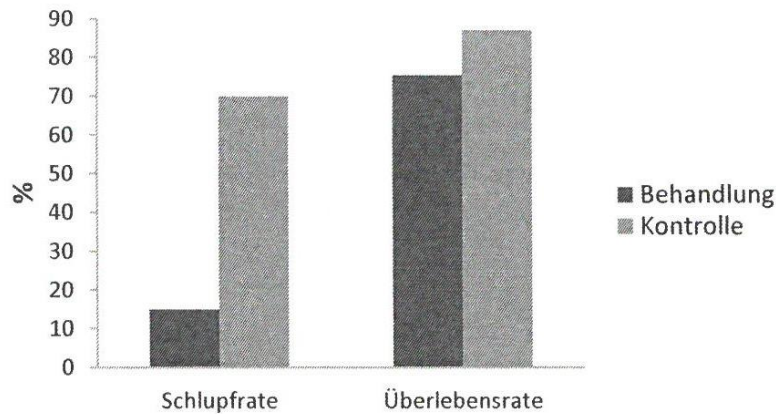


Abb.1: Einfluss der Umwelttemperatur auf das Merkmal Schlupf- und Überlebensrate (LSQ-Mittelwerte)

Die Schlupf- und Überlebensraten werden neben genetischen (wie z.B. Eltern) auch von umwelt- und technologisch bedingten Faktoren generell stark beeinflusst.

Der Effekt der Anpaarungsgruppen auf Schlupf- und Überlebensrate der behandelten und nicht behandelten Gruppen wird hier nicht dargestellt. Es besteht außerdem eine signifikante Differenz hinsichtlich der mütterlichen Herkunft und der Temperaturbehandlung. Die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

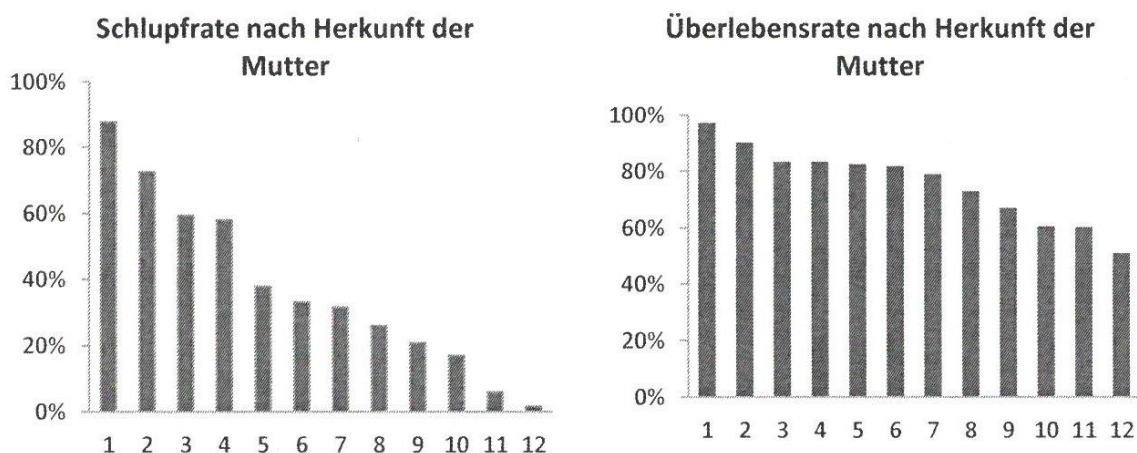


Abb. 2: Unterschiede in der Schlupf- und Überlebensrate der verschiedenen Anpaarungen im Vergleich für sechs verschiedene mütterliche Herkünften

In Abbildung. 2 sind für verschiedene Mütterherkünfte die Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Gruppen für die Schlupfrate (links) und die Überlebensrate (rechts) dargestellt. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Schlupf- bzw. Überlebensrate in Abhängigkeit von der Herkunft der Mutter. Es ist zu vermuten, dass sich einige Herkünfte besser für eine Temperaturbehandlung eignen als andere. Der Vaternereffekt wurde hier nicht getestet, da es bei den gynogenetischen Gruppen nur zu einer „Scheinbefruchtung“ durch das bestrahlte Spermium kommt. Bei einer Scheinbefruchtung wird die Eizelle aktiviert, es werden aber keine männlichen Chromosomen weitergegeben.

Validierung der Verwendung molekularer Marker zur Sexdeterminierung

Durch die genetische Untersuchung lassen sich genetische Männchen (XY) eindeutig identifizieren (Yano et al., 2012). Die molekular genetische Untersuchung mit dem sdY Marker hat gezeigt, dass 99,4% der behandelten Gruppen genetisch weiblich sind (n=807). Das Geschlechterverhältnis der getesteten Kontrollgruppen beträgt nahezu 50:50 (42,86% ♂ und 57,14% ♀).

Über die erfolgreiche Induktion der phänotypischen Geschlechtsumwandlung kann erst im Winter 2016/2017 bei der Untersuchung der Gonaden eine verlässliche Aussage getroffen werden. Sollten anschließende Anpaarungsversuche mit den funktionellen Männchen rein weibliche Nachkommenschaften ergeben, wäre dies ein Nachweis für den Erfolg der eingangs beschriebenen Methode. Derartige Verpaarungen würden es Praxisbetrieben ermöglichen ihre rein weiblichen Bestände selbst zu erzeugen.

Danksagung: Wir danken für die finanzielle Unterstützung des Projekts durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt.

4 Literatur

Chourrout, D., Quillet E. 1982: Induced gynogenesis in the rainbow trout: sex and survival progenies. Production off all-triploid population. *Theor Appl Genet* 63:201-205.

Magerhans, A., Müller-Belecke, A., Hörstgen-Schwark, G., 2009: Effect of temperature treatment on sex ratio of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations. *Aquaculture*, 294, 25-29.

Magerhans, A., Hörstgen-Schwark, G., 2010: Selection experiments to alter the sex ratio in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by means of temperature treatment. *Aquaculture*, 306, 63-67.

Yano A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., Guiguen, Y., 2012: The sexually dimorphic on Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications* 6, 486-496.

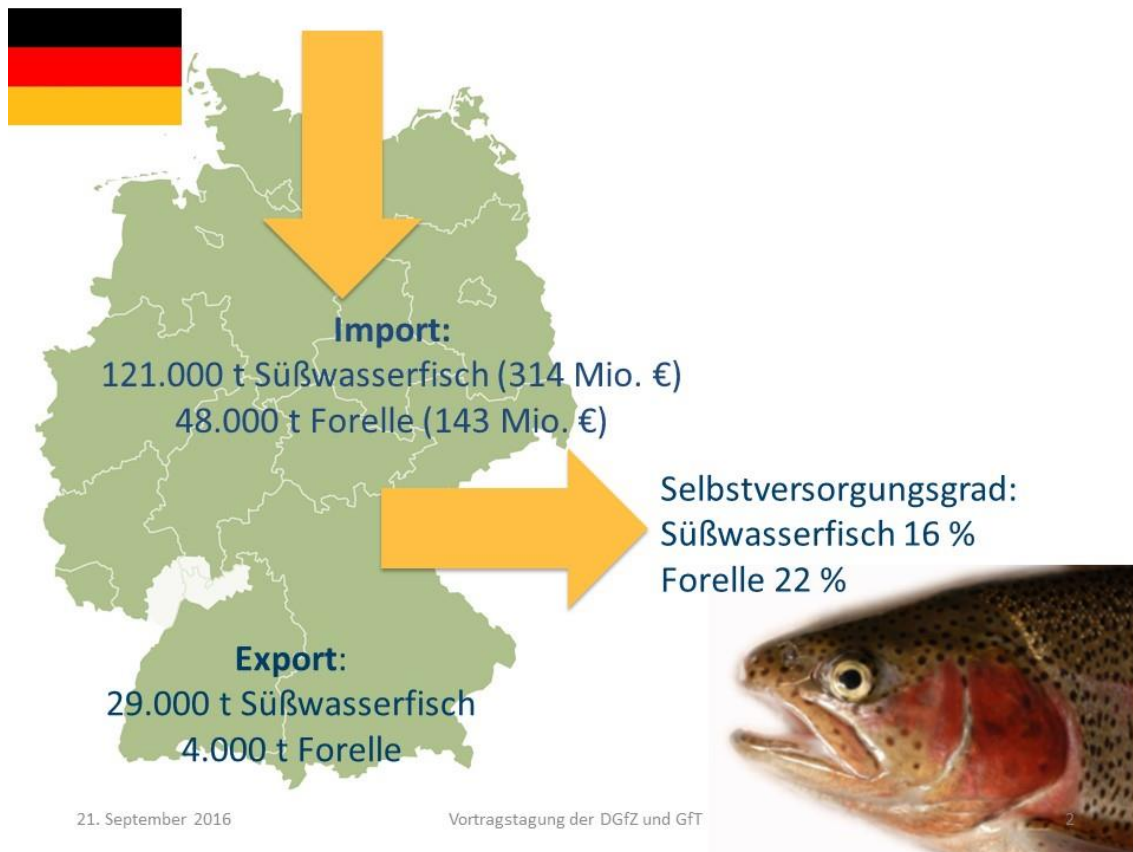
Neue Wege für die Erstellung rein weiblicher Populationen in der Regenbogenforellenzucht

M. Westerhold¹, A.R. Sharifi², F. Krieg³, E. Quillet³, G. Hörstgen-Schwark¹

¹Abteilung Aquakultur und Gewässerökologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

²Abteilung Tierzucht und Haustiergenetik, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen

³Animal Genetics and Integrative Biology INRA, Jouy-en-Josas, Frankreich



Problematik

- **Problem:** Früher Eintritt der Geschlechtsreife bei Milchnern (bereits ab 18 Monaten)
- für sogenannte „Lachsforellen“ werden Rogner bevorzugt
 - gemischtgeschlechtliche Bestände
 - Rivalität, Stress und Aggressivität unter Artgenossen
 - reduzierte Futteraufnahme und schlechte Zunahmen
 - erhöhte Empfänglichkeit der Milchner für bakterielle und pilzartige Krankheiten
 - erhöhte Mortalität
 - Ineffizienz und erhöhte Kosten der Mast

Lösungsansätze

Ausland:

- Verabreichung mit Testosteron versetztem Futter während der juvenilen Phase von Regenbogenforellen zur Erstellung funktioneller Milchner

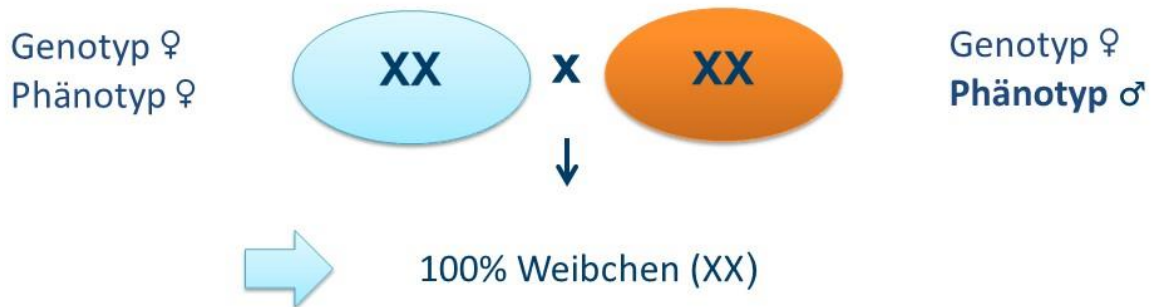


Deutschland:

- kein Hormoneinsatz zugelassen!
- neue Wege in der Forellenzucht mittels kurzfristiger Veränderung der Wassertemperatur zu Beginn der ersten Futteraufnahme (Anfütterung)



Was ist ein funktioneller Milchner?

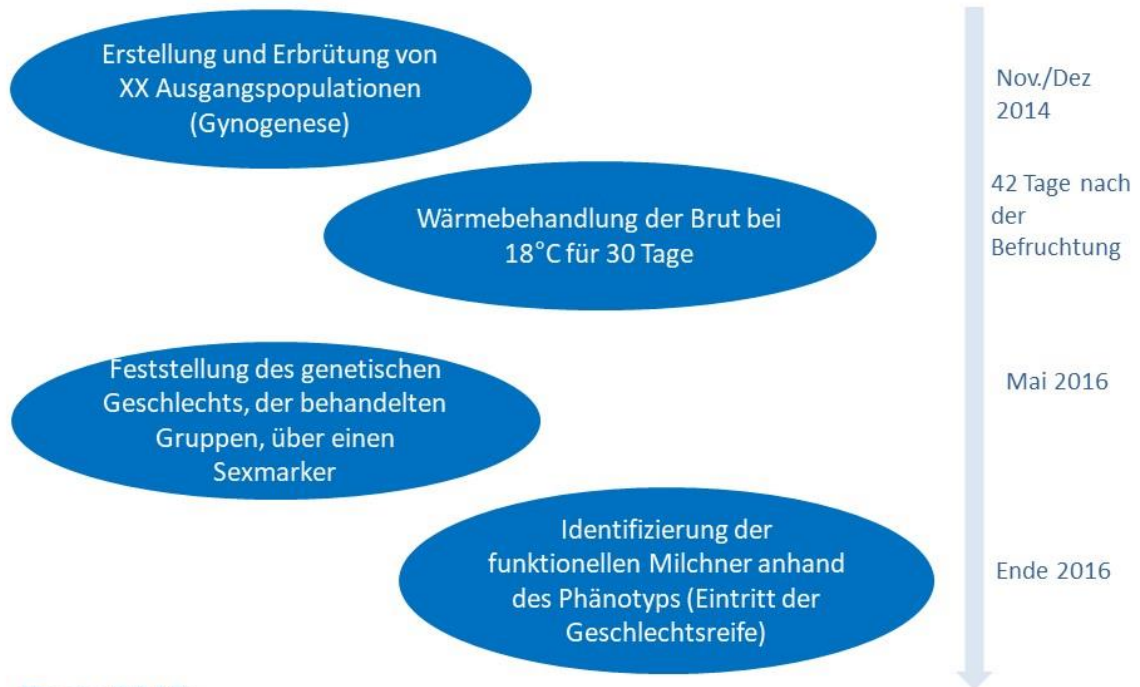


Vermännlichung von genetischen Weibchen (XX), sodass diese einen männlichen Phänotyp ausbilden und Sperma bilden

21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

7



Ende 2016:
Anpaarung der funktionellen Milchner (Genotyp XX, Phänotyp männlich) mit genetischen Weibchen (Genotyp XX) zur Erstellung rein weiblicher Regenbogenforellenbestände (Genotyp und Phänotyp ♀)

Unterscheidung der Geschlechter anhand des Phänotyps



♀



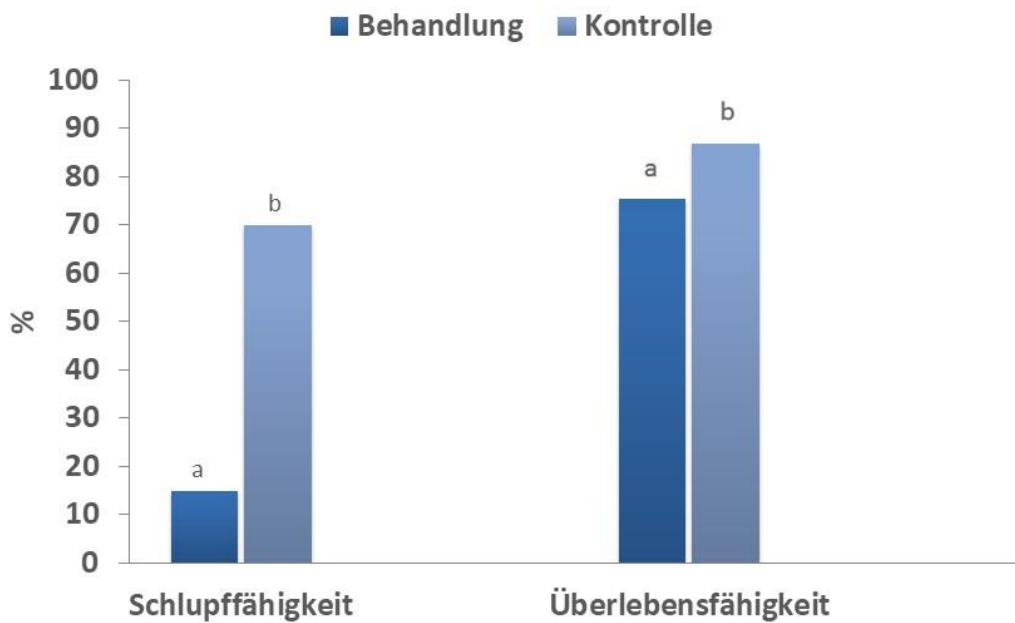
♂

21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

10

Einfluss der Umwelttemperatur auf das Merkmal Schlupf- und Überlebensfähigkeit (LSQ-Mittelwerte)

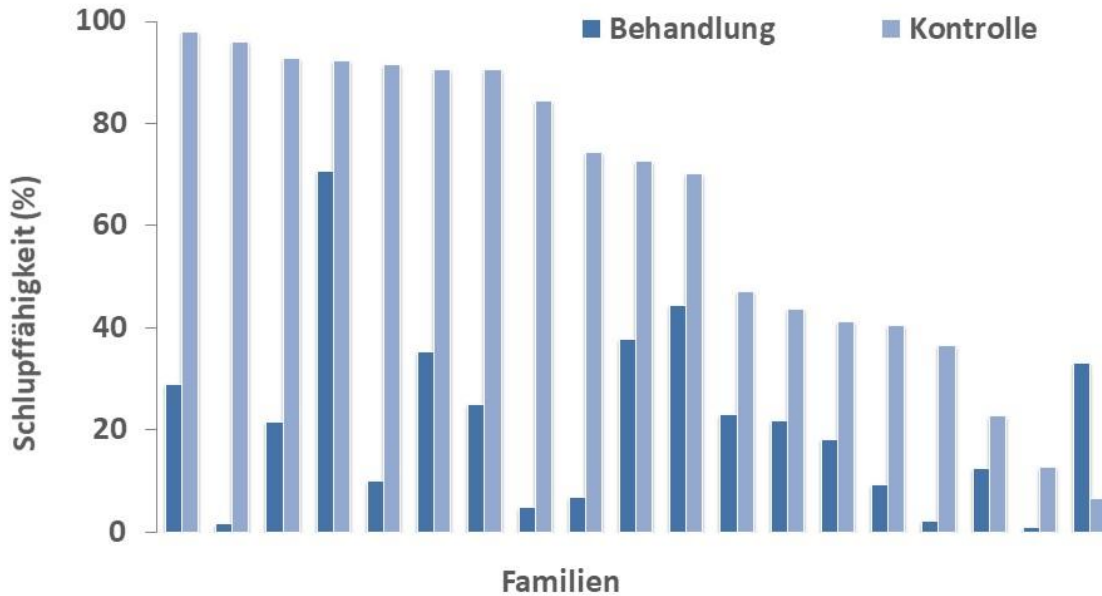


21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

11

Zufällige Effekte innerhalb der Familie genetisch innerhalb der Behandlung

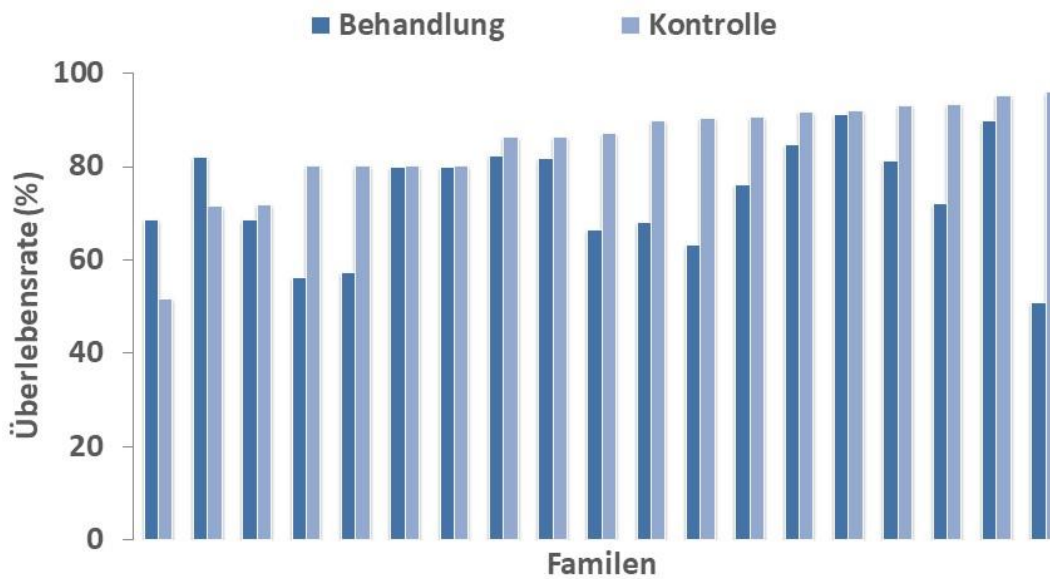


21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

12

Zufällige Effekte innerhalb der Familie genetisch innerhalb der Behandlung

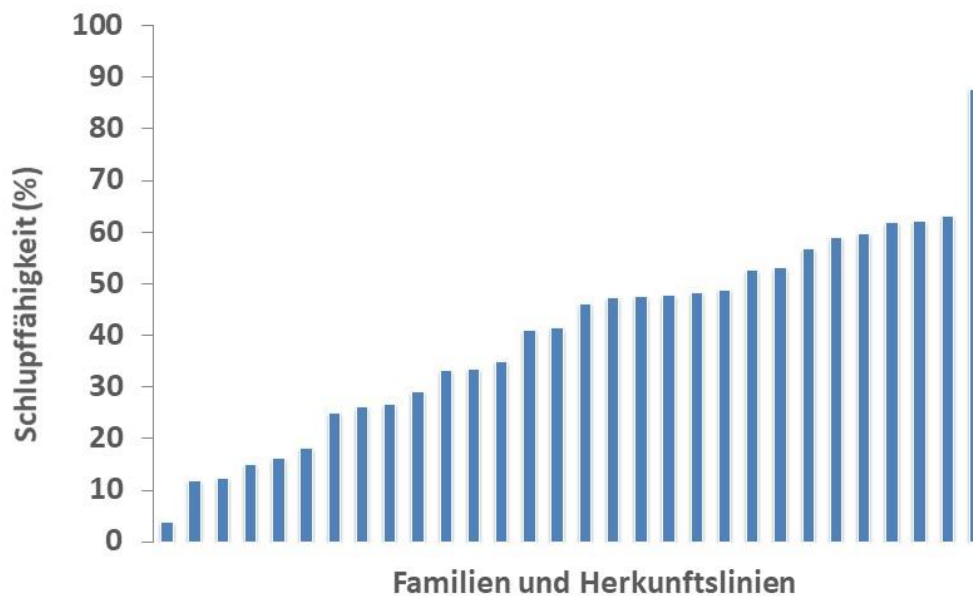


21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

13

Zufälliger Effekt der Familien im Merkmal Schlupffähigkeit

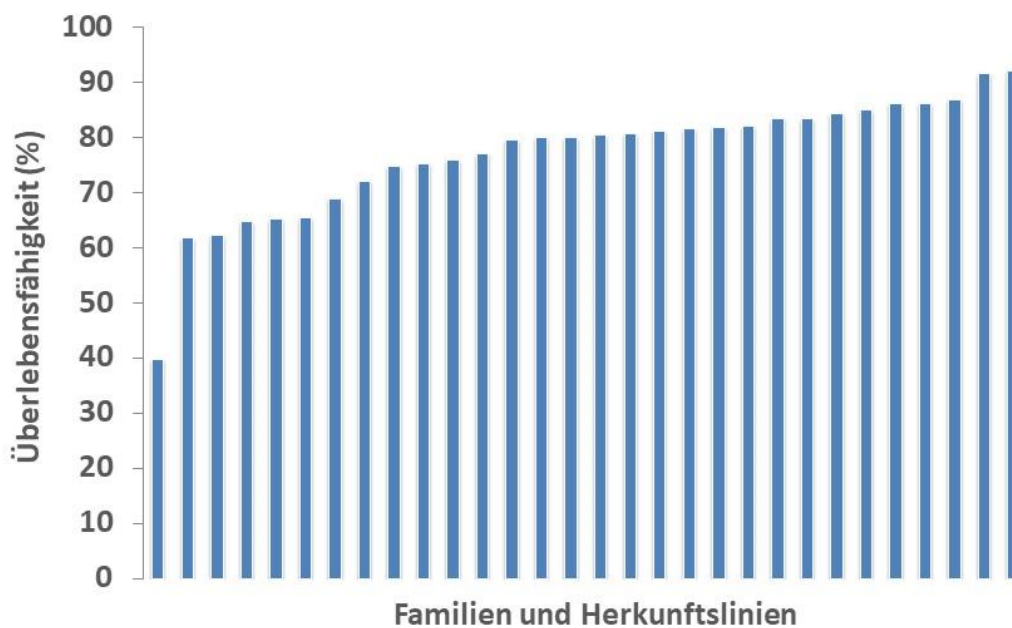


21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

14

Zufälliger Effekt der Familien im Merkmal Überlebensfähigkeit



21. September 2016

Vortragstagung der DGfZ und GfT

15

Schlussfolgerungen

- die molekular genetische Untersuchung (*sdY*) hat gezeigt, dass 99,4% der behandelten Gruppen genetisch weiblich sind (n=807)
- das Verhältnis der Geschlechter (genetischen Männchen zu genetischen Weibchen) aufgrund der *sdY*-Testung in den Kontrolle beträgt 43,97% ♂ und 56,03% ♀ (n=119)
- signifikante Reduktion der Schlupf- und Überlebensfähigkeit durch die Gynogenese und anschließende Temperaturbehandlung
- eine ausgeprägte Familienvariation in Abhängigkeit der Behandlung im Merkmal Schlupf- und Überlebensfähigkeit

