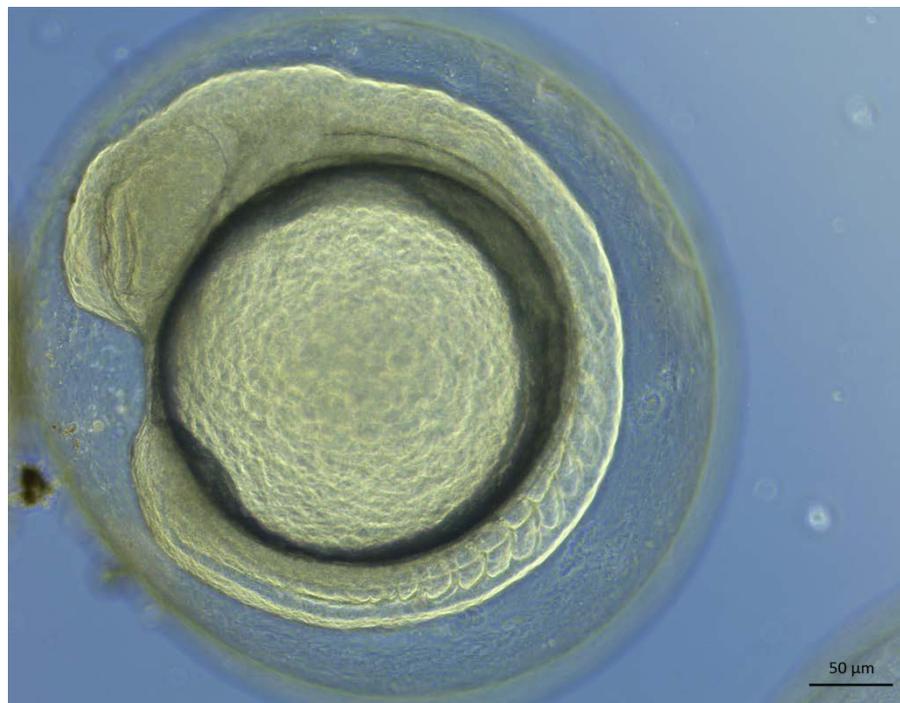


**„KRYOKONSERVIERUNG VON
AQUATISCHEN GENETISCHEN
RESSOURCEN: AUFBAU EINER
ERWEITERTEN ZELLBANK FÜR
KARPfenSTÄMME“
ABSCHLUSSBERICHT**



**Abschlussbericht zum Modell- und Demonstrationsvorhaben
„Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen: Aufbau einer
erweiterten Zellbank für Karpfenstämme“**

ZE: Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB)
Frau Dr. Marina Gebert
Mönkhofer Weg 239a
23562 Lübeck

Förderkennzeichen: 2810BM024

Vorhabenbezeichnung:

„Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen: Aufbau einer
erweiterten Zellbank für Karpfenstämme“

Laufzeit des Vorhabens:

01.10.2012 – 30.09.2015

Berichtszeitraum:

01.10.2012 – 30.09.2015

Berichterstellung:

Dr. Marina Gebert (EMB, Projektleitung)
Dr. Sebastian Rakers (EMB, Projektkoordination)

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungs- und Fremdwörterverzeichnis	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 Aufgabenstellung und Ziel des Vorhabens	7
1.2 Voraussetzungen im Projekt	8
1.3 Umsetzung der Projektziele	8
1.3.1 Planung und Ablauf	8
1.3.2 Methode und Verfahren	11
1.3.2.1 Protokolletablierung und -optimierung Sperma	11
1.3.2.2 Probennahmen	12
2 ERGEBNISSE	15
2.1 Meilenstein 0 – Gewinnung von Karpfenspermien und befruchteten sowie unbefruchteten Karpfeneizellen	15
2.2 Meilenstein 1 – Anpassung der Kryokonservierungsprotokolle von Karpfenspermien	16
2.3 Meilenstein 2 – Testen der Qualität der konservierten Spermien durch Erzeugung und Aufzucht von Karpfenbrut	25
2.4 Meilenstein 3 – Anpassung des Protokolls für den Kerntransfer in entkernte Karpfeneizellen	29
2.5 Meilenstein 4 – Optimierung eines Kryokonservierungsprotokolls für befruchtete und unbefruchtete Kerne aus Karpfeneizellen und Testen der Qualität der konservierten und transferierten Eizellkerne durch Erzeugung und Aufzucht der befruchteten Eizellen	33
2.6 Meilenstein 5 – Gewinnung von Spermien und Eizellkernen von erhaltenswerten Karpfenrassen und deren Kryokonservierung	36
2.7 Über das Projekt hinaus relevante Erkenntnisse	40
3 Konsequenzen für ein sich anschließendes weiteres Vorhaben	42
4 Erfolgskontrolle über die Einhaltung des Finanzierungs-, Zeit- und Arbeitsplans	45
5 Veröffentlichungen aus dem Projekt	48
6 Zusammenfassung	50
6.1 Ergebniskurzfassung	51
6.2 Abstract	52
7 Literatur	53
8 Danksagungen	56
9 Anhang	57

Abbildungsverzeichnis

Abb. 01: <i>Controlled Rate Freezer</i> und Stickstoff-Einfriereinheit für Pailletten.....	9
Abb. 02: Behandlung des Karpfenspermas für die Motilitätsanalyse, Kryokonservierung und Befruchtung.....	12
Abb. 03: Einfrierprofil im <i>Controlled Rate Freezer</i>	14
Abb. 04: Variabilität der Spermiedichte	16
Abb. 05: Einfriervorgang und Auftauen von Karpfensperma.....	18
Abb. 06: Box-Whisker-Plot der Motilität von 29 ausgewählten Spermaproben	19
Abb. 07: Anzahl der gemessenen durchschnittlichen Motilitäten nach Kategorien der FAO (2012).	20
Abb. 08: Box-Whisker-Plot von der Bewegungsdauer aktivierter Spermien.	20
Abb. 09: Aufgetaute Spermaprobe von Männchen 24.....	21
Abb. 10: Viabilität von aufgetauten Karpfenspermien, gemessen über PI/FDA-Färbung.	21
Abb. 11: Viabilität von nativen und aufgetauten Karpfenspermien im Vergleich	22
Abb. 12: Dokumentation der Computer-assistierten Spermienanalyse (CASA).	23
Abb. 13: Ergebnisse der CASA-Analyse	24
Abb. 14: Fotoschema des Befruchtungs- und Entwicklungsvorgangs	25
Abb. 15: Karpfenbrut kurz nach dem Schlupf.....	26
Abb. 16: Unbefruchtete Karpfeneier.....	29
Abb. 17: Hoechst-Färbung fixierter befruchteter Karpfeneier.....	30
Abb. 18: Dissoziierte Zellen von <i>Danio rerio</i>	31
Abb. 19: Zellkerne in Glaskapillare.....	32
Abb. 20: Vorbereitung von dechorionierten Zebrafischeiern im Blastula-Stadium für den Kerntransfer.....	32
Abb. 21: Zellsuspension nach Dechorionierung und Homogenisierung von Karpfeneiern.	33
Abb. 22: PI/FDA/DAPI-Färbung von eingefrorenen und wieder aufgetauten Karpfenezellen	34
Abb. 23: Aufgetaute Karpfenezellen ein Tag nach der Aussaat in eine Zellkulturschale.....	34
Abb. 24: Hoechst-Färbung eines dissoziierten befruchteten Zebrafischeis	35
Abb. 25: Dechorionierung und Zellvereinzelnung nach Calvi und Maise (1999).....	38
Abb. 26: NDR-Fernsehen, Beitrag vom 30.08.2015 im Schleswig-Holstein-Magazin	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Getestete Kryomittel.....	17
Tabelle 2: Befruchtungsraten verschiedener Kombinationen von Männchen und Weibchen	27
Tabelle 3: Bedingungen und Ergebnisse aus den Befruchtungsversuchen mit Karpfensperma	27
Tabelle 4: Anonymisierte Liste der besuchten Zuchtbetriebe mit Laichfischbesatz	37
Tabelle 5: Daten zur Beprobung bei den Zuchtbetrieben	39

Abkürzungs-und Fremdwörterverzeichnis

- CASA Computer-assistierte Spermien-Analyse
- DAPI 4,6-Diamidin-2-phenylindol
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DMA Dimethylacrylamid
- DGZ Dichtegradientenzentrifugation
- FDA Fluoresceindiacetat
- FEM Fisch-Embryo-Medium
- PI Propidiumiodid
- VAP mittlere Wegstreckengeschwindigkeit (engl. Average path velocity)
- VCL kurvilineare Geschwindigkeit (engl. Curvilinear velocity)
- VSL Wegstrecke einer geraden Linie (engl. Straight line velocity)

1 EINLEITUNG

Der gemeine Karpfen (*Cyprinus carpio*, LINNAEUS 1758) kommt in Deutschland überwiegend autochthon vor. Er wird seit Jahrhunderten in Teichwirtschaften domestiziert und ist als Zuchtkarpfen ein gefragter Speise- und Anglerfisch. 2013 produzierten 3885 Betriebe in Deutschland insgesamt 5699 t Speisekarpfen und 2346 t Satzkarpen (Brämick, 2013). Allerdings gibt es immer weniger Betriebe mit eigenen Laichfischbeständen, in 2009 konnten Müller-Belecke et al. insgesamt 113 Betriebe mit Karpfenlaichfischen identifizieren. Der Trend ist jedoch weiter rückläufig, da die *in-situ* Haltung von Aquakulturstämmen sehr große Kapazitäten seitens der Züchter erfordert, die Zuchtbetriebe aber nur noch vereinzelt im Haupterwerb geführt werden, da es finanziell meist nicht attraktiv ist. Die meisten der Betriebe erzeugen stattdessen Setzlinge oder Speisefische, die Brut wird von den wenigen verbleibenden Züchtern bezogen. Dadurch ist der Fortbestand von reinen Linien oder besonderen Karpfenrassen zunehmend gefährdet.

Noch existieren in Deutschland derzeit Karpfenrassen, deren Erhalt laut GAK-Liste (Gemeinschaftsaufgabe „Verbesserung der Agrarstruktur und des Küstenschutzes“) im Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung aquatischer genetischer Ressourcen des BMELV als sinnvoll eingestuft wird.

„Hierbei wird davon ausgegangen, dass es noch reine Linien in den Laichfisch produzierenden Teichwirtschaften gibt. ... Trotzdem ist die genetische Variabilität innerhalb der deutschen Wirtschaftskarpfen sehr gering. Sowohl die bayerischen wie auch die Lausitzer Karpfen sind demnach trotz 40-jähriger getrennter Züchtungsarbeit zwar genetisch unterscheidbar, aber sehr eng miteinander verwandt.“ (BMELV, 2012)

1.1 Aufgabenstellung und Ziel des Vorhabens

Oberstes Ziel des Modell- und Demonstrationsvorhabens „Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen: Aufbau einer erweiterten Zellbank für Karpfenstämme“ war die Sicherung und Kryokonservierung von genetischem Material (Sperma, Eizellkerne, ggf. Eizellen) erhaltenswerter Karpfenlinien, insbesondere von Zuchtstämmen deutscher Züchter, wie die des Aischgründer oder Lausitzer Karpfens. Hierdurch soll die vorhandene genetische Variabilität und Diversität der Karpfenstämme gesichert werden.

Das Vorhaben umfasste folgende Teilziele:

Meilenstein 0 – Gewinnung von Karpfenspermien und befruchteten sowie unbefruchteten Karpfeneizellen

Meilenstein 1 – Anpassung der Kryokonservierungsprotokolle von Karpfenspermien

Meilenstein 2 – Testen der Qualität der konservierten Spermien durch Erzeugung und Aufzucht von Karpfenbrut

Meilenstein 3 – Anpassung des Protokolls für den Kerntransfer in entkernte Karpfeneizellen

Meilenstein 4 – Optimierung eines Kryokonservierungsprotokolls für befruchtete und unbefruchtete Kerne aus Karpfeneizellen und Testen der Qualität der konservierten und transferierten Eizellkerne durch Erzeugung und Aufzucht der befruchteten Eizellen

Meilenstein 5 – Gewinnung von Spermien und Eizellkernen von erhaltenswerten Karpfenrassen (entsprechend der Ergebnisse der Erhebung „Erfassung von genetischen Ressourcen aquatischer Kulturen: Karpfen (*Cyprinus carpio*)“ und deren Kryokonservierung

Die Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie (Fraunhofer EMB) führte von Oktober 2012 bis September 2015 das Modellvorhaben durch. Die Projektmaßnahmen förderten die Optimierung der Protokolle hin zu einer standardisierten Durchführung der Einlagerung von tiefgefrorenem Zellmaterial des Karpfens für den Erhalt und Fortbestand von aquatischen genetischen Ressourcen. Dazu wurden verschiedene Zuchtbetriebe im Frühjahr 2015 besucht und Probenahmen durchgeführt. Es wurden die Kerne befruchteter Eizellen, embryonale Zellen und ganze Spermien eingelagert. Die eingefrorenen Proben wurden dabei einem umfassenden Qualitätscheck unterzogen.

1.2 Voraussetzungen im Projekt

Die Fraunhofer EMB unter der Standortleitung von Prof. Dr. Charli Kruse war Träger des Projektes und wurde vom Bundesministerium für Landwirtschaft und Ernährung (BMEL) durch Ihren Projektträger Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) gefördert. Die Fraunhofer EMB verfügt über langjährige Expertise in den Bereichen Zellbiologie, Aquakultur sowie in verschiedenen Themen der Kryokonservierung (Einfrieren somatischer Zellen oder ganzer Gewebestücke) und war somit als Projektnehmer prädestiniert. Die Kryolagerung und Archivierung erfolgt mit modernster Kryotechnik. Ein bestimmter Grundbestand aller eigens etablierten oder gekauften Zelllinien wird durch Tiefrieren in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Aktuell beinhaltet die Fraunhofer EMB-eigene „Deutsche Zellbank für Wildtiere Alfred Brehm“, kurz Cryo-Brehm, ca. 5000 Proben von unterschiedlichen Geweben und Individuen aus über 100 Spezies, davon etwa 20 verschiedene Fischarten (z.B. Ciba et al., 2008; Grunow et al., 2010; Langner et al., 2011, Rakers et al., 2011). Zudem existiert an der Fraunhofer EMB die einzigartige Möglichkeit in Deutschland, Zellen in einem mobilen Labor beim Züchter vor Ort bearbeiten und einfrieren zu können.

Als wissenschaftliche Unterstützung, insbesondere für die Bereitstellung von Probenmaterial, fungierte das Institut für Fischereiökologie, Außenstelle Ahrensburg (Prof. Dr. Ulfert Focken, Dr. Jochen Trautner), des Bundesforschungsinstituts für Ländliche Räume, Wald und Fischerei (Thünen-Institut, TI-FOE). Beratend und unterstützend tätig waren Dr. Helmut Wedekind von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und Fischerei (IFI) sowie Dr. Gerd Füllner vom Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Referat Fischerei, die die Kontaktaufnahmen zu den Züchtern vereinfachten.

1.3 Umsetzung der Projektziele

1.3.1 Planung und Ablauf

Meilenstein 0 – Gewinnung von Karpfenspermien und befruchteten sowie unbefruchteten Karpfeneizellen

Befruchtete und unbefruchtete Eizellen sowie Spermien von Karpfen sollten zunächst vom TI-FOE in Hamburg für das MuD-Vorhaben zur Anpassung der Kryokonservierungsprotokolle kostenfrei zur Verfügung gestellt werden. Die Vorbereitung der Tiere zum Abstreifen wurde von dem über dieses Projekt angestellten Mitarbeiter der Fraunhofer EMB unterstützt. Die Tiere wurden kurz vor dem Abstreifen betäubt, um möglichst wenig Stress zu erzeugen und die Eier und Spermien geerntet. Die Spermien wurden bis zur weiteren Verwendung gekühlt bei 4°C gelagert, die Eier wurden entweder sofort verwendet oder in Einzelfällen ebenfalls gekühlt gelagert.

Gestreifte Tiere wurden in belüftete Becken gesetzt und anschließend wieder in ihre Tanks zurückgeführt. Die Eier und das Sperma wurden dann schnellstmöglich zur Fraunhofer EMB transportiert und dort weiter verarbeitet. Aufgrund des Mangels an Proben von *Cyprinus carpio*-Eiern in den ersten beiden Berichtsjahren wurde zusätzlich für Vorlaufversuche auf den Zebrafisch *Danio rerio* sowie den Tilapia *Oreochromis niloticus* ausgewichen, deren Hälterung in der EMB bereits im Rahmen anderer Projekte etabliert worden war. Daneben wurden noch zwei kooperationsbereite Züchter im näheren Umkreis (Oeversee und Eschede) gefunden, die bereit waren, jeweils einmal zusätzlich Probenahmen durchführen zu lassen. In Eschede waren die Tiere allerdings zum Zeitpunkt der Probenahme nicht laichbereit und es konnte nicht abgestreift werden. Im gesamten Berichtszeitraum wurden somit außerhalb des Meilensteins 5 einmal Eier von einem Weibchen aus Oeversee erhalten und am Thünen-Institut in Ahrensburg insgesamt 18 Probenahmen durchgeführt wobei 34 Männchen sowie 15 Weibchen beprobt wurden.

Meilenstein 1 – Anpassung der Kryokonservierungsprotokolle von Karpfenspermien

Zunächst wurde in der Fraunhofer EMB die technische Grundausstattung für die Kryokonservierung eingerichtet. Neben dem bereits vorhandenen *Controlled Rate Freezer* wurde eine Gefriereinheit für Pailletten von Kryostrohhalmen angeschafft (Abb. 01) und entsprechende Lagermöglichkeiten in Stickstofftanks eingerichtet. Zur Optimierung der Logistik wurde während der ersten beiden Probenahmen getestet, wie lange sich das Sperma bei 2-4°C lagern lässt.

Nach ausführlicher Literaturrecherche wurden die aktuell erfolgreichsten Kryokonservierungsprotokolle (u.a. Horvath et al. 2003, Altunok et al., 2004, Irawan et al., 2010; Bozkurt et al., 2012) für Karpfenspermien herausgesucht und validiert. Danach wurden alle Protokolle für einen Vergleich herangezogen und teilweise kombiniert oder modifiziert. Zudem wurden verschiedene Probenbehälter (Straws und Kryoröhrchen) und Einfrierraten ausgetestet. Schließlich wurde ein eigenes, optimiertes Verfahrensprotokoll für die Kryokonservierung von Karpfensperma etabliert, das auf den gemachten Erfahrungen beruhte und für die Beprobungen im Meilenstein 5 eingesetzt wurde.



Abb. 01: *Controlled Rate Freezer* (oben) und Stickstoff-Einfriereinheit für Pailletten

Meilenstein 2 – Testen der Qualität der konservierten Spermien durch Erzeugung und Aufzucht von Karpfenbrut

Um die Befruchtungsraten von tiefgefrorenen Spermien zu kontrollieren, sollten aufgetaute Spermien neben frischen Spermien als Kontrolle verwendet werden, um frische Karpfeneier zu befruchten. Die Befruchtungsraten wurden zunächst im 4-8 Zell Stadium, ca. 1-2 Stunden nach der Befruchtung mit einer Subpopulation der Eier ermittelt. Zusätzlich wurde die Entwicklung der Eier und ihr Gesundheitszustand beobachtet und die Schlupfraten ermittelt. Als zusätzliche Kontrolle dienten die im TI-

FOE parallel befruchteten Karpfeneier, die allerdings stets mit frischem Spermia befruchtet wurden. Insgesamt wurden 9 Befruchtungsversuche unternommen.

Meilenstein 3 – Anpassung des Protokolls für den Kerntransfer in entkernte Karpfeneizellen

Haltekapillaren und Transferkanülen wurden mit Hilfe des in der Fraunhofer EMB vorhandenen Mikropipetten-Pullers (Sutter Instruments Co.) hergestellt und zur Manipulation von Eizellen aus Karpfen und Zebrafischen unter dem Mikroskop eingesetzt. Zunächst wurden die Eizellen mit einem DNA-Farbstoff (DAPI oder Hoechst 33342) angefärbt, um die Lage des Kerns zu bestimmen. Anhand dieser gefärbten Kerne wurde die Kernentnahme geübt. Außerdem sollte der Transfer in andere entkernte Eizellen geübt werden. Später sollten die Entnahme und der Transfer mit ungefärbten Zellen durchgeführt werden, da DNA-bindende Farbstoffe mutagene Eigenschaften besitzen und außerdem die DNA-Replikation behindern können. Einige Versuche wurden hierzu am Zebrafisch durchgeführt, um die Methoden zu trainieren. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollten auf den Karpfen übertragen werden.

Meilenstein 4 – Optimierung eines Kryokonservierungsprotokolls für befruchtete und unbefruchtete Kerne aus Karpfeneizellen und Testen der Qualität der konservierten und transferierten Eizellkerne durch Erzeugung und Aufzucht der befruchteten Eizellen

Befruchtete und unbefruchtete Eizellen von normalen Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) sollten entkernt und diese Kerne kryokonserviert werden. Solchermaßen konservierte Kerne sollten dann wieder aufgetaut werden und in frisch entkernte Eizellen eingebracht werden. Zusätzlich wurde ein Protokoll von Ronglin et al. (1997) geprüft, bei dem Nuclei direkt und ohne die Zugabe von Kryoprotektiva in der Kanüle, mit der sie entnommen wurden, eingefroren werden. Nach dem Auftauen sollten die Kerne entsprechend in frisch entkernte Eizellen transferiert und die Entwicklungen ausgewertet werden. Die durch Kerntransfer entstandenen, unbefruchteten Eizellen sollten mit frischem sowie alternativ mit wieder aufgetautem Spermia befruchtet werden. Zusätzlich wurde in diesem Meilenstein über eine Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) eine Separation verschiedener Bestandteile aus dechorionierten, befruchteten Karpfeneiern ausgetestet.

Meilenstein 5 – Gewinnung von Spermien und Eizellkernen von erhaltenswerten Karpfenrassen und deren Kryokonservierung

Nach Adaptation der Protokolle sollte über das TI-FOE, das bereits Kontakte zu einigen Züchtern hat, und den Projektnehmer für das BMELV geförderte Projekt „Erfassung und Dokumentation der genetischen Vielfalt von Zuchtkarpfen sowie der Nebenfische der Karpfenteichwirtschaft, der Zuchtsalmoniden sowie der Nebenfische der Salmonidenhaltung und der weiteren in Aquakultur gehaltenen Arten in Deutschland“ an die entsprechenden Züchter herangetreten werden, um von deren Stämmen Spermien und Zellkerne an der Fraunhofer EMB zu konservieren. Um eine breite genetische Vielfalt zu erhalten, sollte versucht werden, aus jedem der in der Studie beschriebenen Cluster (S.49; Müller-Belecke et al., 2009) mindestens einen, idealerweise drei Stämme für die Kryokonservierung zu verwenden. Pro Linie sollten je mindestens 25 Proben an Spermien und Kernen (befruchtet und unbefruchtet) eingelagert werden. Über die landesbehördlichen Fischereiverbände in Bayern, Sachsen und Schleswig-Holstein konnten Züchterkontakte hergestellt werden und 11 Züchter gefunden werden, die zur Kooperation im Projekt bereit waren. Details des Ablaufs werden im Folgenden beschrieben.

1.3.2 Methode und Verfahren

Kooperationspartner:

Für die grundlegenden Versuche zur Protokolloptimierung und Gewinnung der Gameten wurde mit den Herren Prof. Dr. U. Focken, Dr. J. Trautner und A. Drahotta vom TI-FOE kooperiert.

Für die bundesweite Erfassung von Haupt- und Nebenerwerbsbetrieben mit eigener Laichfischhaltung und die erste Kontaktaufnahme mit den Verantwortlichen der Betriebe war eine enge Kooperation mit den Fischereifachstellen der Bundesländer angestrebt worden. Insbesondere wurden Kollegen hinzugezogen, die enge Kontakte zur Teichwirtschaft und dem Fischereisektor in den entsprechenden Bundesländern pflegen. Unterstützt haben uns dabei in Bayern das Institut für Fischerei in Starnberg (Dr. H. Wedekind), in Sachsen die Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft, Referat Fischerei in Königswartha (Dr. G. Füllner) und in Schleswig-Holstein das Kompetenznetzwerk Aquakultur an der Gesellschaft für Marine Aquakultur in Büsum (Dr. S. Meyer) sowie der Landesfischereiverband Schleswig-Holstein, Sektion Binnenfischerei (Frau S. Schwarten). In einem weiteren Schritt wurden die Betriebsverantwortlichen der Zuchtbetriebe mit einem Schreiben über das Projekt informiert und um Mitarbeit gebeten. Auf verschiedenen Tagungen und Konferenzen (Büsumer Fischtage 2013-15, Fischereitagung Starnberg 2015, Fischereitagung Königswartha 2015) wurde das Projekt vorgestellt und beworben. Per Telefonat wurden dann mit kooperationsbereiten Betrieben konkrete Termine zur Probenahme vereinbart. Die beteiligten Betriebe wurden in einer Liste zusammengefasst und für die Probenahme anonymisiert (Codes zugeordnet).

Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Methoden beschrieben, die während der Probenahmen bei den Züchtern verwendet wurden.

1.3.2.1 Protokolletablierung und -optimierung Sperma

Die Methode der Kryokonservierung von Karpfensperma ist bereits seit den 1950er Jahren (Sneed und Clemens 1956) erprobt und in den letzten Jahrzehnten mehrfach verändert worden. Mittlerweile ist die Spermienkonservierung in der Fischzucht ein weitverbreitetes Verfahren, bei dem es allerdings eine Fülle verschiedener Methodenansätze hinsichtlich Verdünnungslösungen, eingesetzter Chemikalien und Einfrierraten gibt. Zur Optimierung wurden verschiedene Protokolle für die Kryokonservierung von Karpfensperma aus der Literatur entnommen und Extender sowie Kryoprotektanzen ausgetestet (Tab. 1).

Aufgrund der großen Vielfalt an möglichen Kombinationen von Zuckerverbindungen oder Salzen als Extender und die Nutzung von einwertigen oder mehrwertigen Alkoholen sowie organischer Lösungsmittel (DMSO, DMA) als Kryokonservierungsmittel wurde eine Vorauswahl an Kombinationen getroffen. Neben verschiedenen Kryomitteln wurden auch Einfrierraten und Einfriertechniken ausgetestet. Hierbei wurde sowohl das Einfrieren mit dem *Controlled Rate Freezer IceCube* (Sylab) als auch mit einer einfachen Einfriereinheit getestet. Verschiedene Gefrierverfahren (schnelles Einfrieren, langsames, kontrolliertes Einfrieren) konnten somit validiert werden. Außerdem wurden auch verschiedene Behältnisse für die Probenlagerung (Röhrchen, Strohhalme) hinsichtlich Zweckmäßigkeit, Lagermöglichkeit, Kosten, etc. geprüft. Das Protokoll mit den höchsten Motilitäts- und Viabilitätsraten der kryokonservierten Proben wurde als Standard-Protokoll etabliert und für alle folgenden Versuche verwendet.

1.3.2.2 Probennahmen

Nach Etablierung eines einheitlichen Protokolls zur Kryokonservierung wurden die Probenahmen immer nach gleichem Schema (Abb. 02) durchgeführt.

Karpfeneier wurden durch Abstreifen laichreifer Weibchen gewonnen. Durch eine leichte Massage der Bauchdecke konnten die Eier „trocken“ in Becher oder Schalen überführt werden, wonach sie umgehend weiter bearbeitet wurden oder in Einzelfällen bis zur Verwendung kühl (4 °C) gelagert wurden. Für die Verwendung von befruchteten Eiern wurden die Eier innerhalb einer Stunde nach Entnahme befruchtet und anschließend noch 3-4 h bei Raumtemperatur (20°C) bebrütet.

In Ahrensburg wurden jeweils 3-5 laichreife Tiere 24 h vor den Probenahmen hypophysiert. Hierfür wurden getrocknete, kleingemörserte und in physiologischer Salzlösung (0,65%) aufgenommene Karpfenhypophysen intramuskulär (Rücken) injiziert. Männchen erhielten als einmalige Dosis 1-2 mg Hypophysenextrakt je kg Körperfrischmasse. Bei den Züchtern vor Ort (Probensammlung 2015) wurde keine Hypophysierung durchgeführt. Das Karpfensperma wurde durch Abstreifen laichreifer Männchen gewonnen. Durch eine leichte Massage der Bauchdecke konnte die Spermaflüssigkeit aus der Genitalpore gedrückt werden. Das Sperma wurde an der Pore in 5 ml oder 10-ml-Einwegspritzen aufgezogen.

Beim Abstreifen wurde darauf geachtet, dass die Gameten nicht durch Wasser, Kot, Urin oder Schleim verunreinigt wurden.

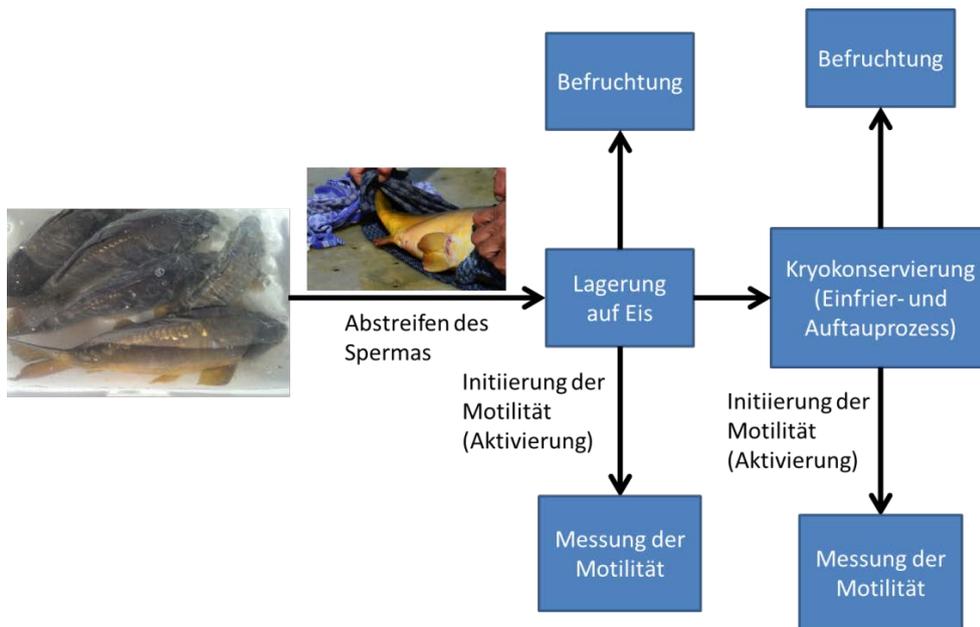


Abb. 02: Behandlung des Karpfenspermas für die Motilitätsanalyse, Kryokonservierung und Befruchtung

Das frisch abgestreifte Sperma wurde sofort auf Eis gelagert. Alle weiteren Spermabehandlungen wurden auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt. Mit zunehmender Lagerungsdauer nahm die Aktivierbarkeit der Spermien stark ab. Daher wurde das nach dem Abstreifen erhaltene Sperma so schnell wie möglich gekühlt in Fraunhofer EMB transportiert und unmittelbar für die nachfolgenden Versuche verwendet. Die Kühlung erfolgte dabei mittels einer an die Fahrzeugbatterie angeschlossenen Kühlbox, die exakt temperiert werden kann (± 1 °C). Eine ausreichend gute Belüftung konnte durch die Verwendung von Zellkulturflaschen gewährleistet

werden, die mit einem luftdurchlässigen Deckel versehen sind. Diese eigneten sich hervorragend für den Transport.

Motilität

Zur Testung der Spermienbeweglichkeit wurde 1 µl des frischen oder aufgetauten Spermas direkt oder versetzt mit einer Immobilisierungslösung auf einen Objektträger platziert und mit 19 µl einer Initiatorlösung (= Aktivierungslösung, s.u.) versetzt. Die aktivierte Probe wurde unter dem Mikroskop (Zeiss AxioVert) angeschaut und mittels Stoppuhr die Motilitätsdauer ermittelt. Zusätzlich wurde eine Abschätzung des prozentualen Anteils der beweglichen Spermien nach der Aktivierung vorgenommen. Dafür wurden fünf Kategorien nach den Empfehlungen der FAO (2012) gebildet, von unbefriedigend (entspricht <30% Motilität) bis hin zu sehr gut (entspricht >70% Motilität).

Kryokonservierung

Die Qualität der Spermaproben wurde vor dem Einfrieren wie oben beschrieben überprüft. Nur Spermaproben mit hohen Motilitätsraten (>70%) wurden für Einfrierversuche verwendet. Die ausgewählte Spermaprobe wurde anschließend erst mit dem Extender versetzt, für 10 min auf Eis equilibriert und danach tropfenweise mit dem Kryomittel versetzt. Nach erneuten 10 min Equilibrierphase wurden die Proben zu je 250 µl, 500 µl oder 1000 µl Portionen (je nach verfügbarer Menge) in Kryoröhrchen oder Kryostraws (ca. 15 cm lange, strohhalm-ähnliche Kunststoffröhrchen) gefüllt. Als bevorzugte Einfriermethode wurden die Röhrchen auf ein Floss auf flüssigen Stickstoff in eine Aluminiumwanne gesetzt, sodass die Proben zunächst in der Gasphase des flüssigen Stickstoffs (ca. -50/-60°C) abkühlen konnten. 10 min danach wurden die Proben in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt und anschließend bis zur weiteren Verwendung in Stickstofftanks gelagert. Mit Hilfe eines automatischen Einfriergerätes (*Controlled Rate Freezer*, Fa. Sylab) wurden Proben testweise nach definiertem Profil (-2°C/min bis 0°C, -1,5°C/min bis -15°C, -6°C/min bis -75°C, Abb. 03) schrittweise eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Da dies jedoch keine signifikanten Verbesserungen der Viabilität und Motilität der Spermaproben ergab, wurde aus praktischen Gründen (Platz für Proben, geringere Kosten, einfachere Durchführung) die zuerst beschriebene Methode bevorzugt. Für das Auftauen wurden die Proben aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein 40°C warmes Wasserbad überführt und für maximal 30-45 s aufgetaut. Anschließend wurden die aufgetauten Proben sofort auf Eis gestellt und innerhalb von 10 min die Motilität und weitere Parameter bestimmt.

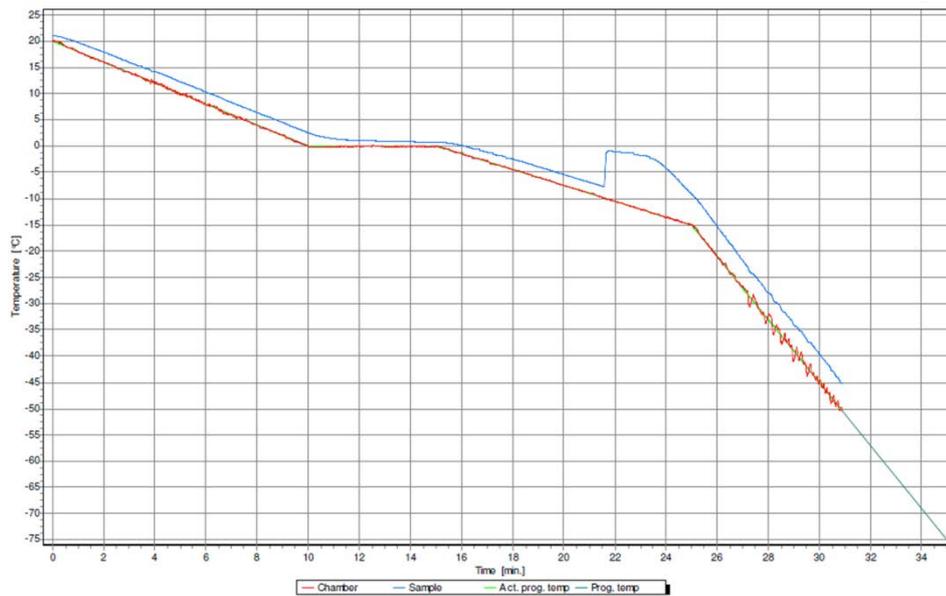


Abb. 03: Einfrierprofil im *Controlled Rate Freezer*. Gezeigt ist ein Vergleich der Temperatur der Kammer des Einfriergeräts (rote Linie) mit der Temperatur innerhalb des Probengefäßes (hellblaue Linie). Der kritische Punkt (Kristallbildung) ist bei etwa $-7,5^{\circ}\text{C}$ erreicht. Hier wird durch die Eiskristallbildung kurzfristig Wärmeenergie frei, die die Temperatur in der Probe (hellblaue Linie) erhöht. Nahezu deckungsgleich mit der roten Linie sind die Temperaturanzeigen für die einprogrammierte Soll-Temperatur (dunkelblaue Linie) und die grüne Linie der aktuell programmierten Temperatur. Y-Achse: Temperatur in $^{\circ}\text{C}$, X-Achse: Zeit in min.

2 ERGEBNISSE

2.1 Meilenstein 0 – Gewinnung von Karpfenspermien und befruchteten sowie unbefruchteten Karpfeneizellen

Dieser Meilenstein diente in den ersten Projektjahren der Gewinnung von Karpfenspermien und Karpfeneiern mit Hilfe des TI-FOE zur Vorbereitung und Durchführung der folgenden Meilensteine. Mit dem TI-FOE wurde zunächst gemeinsam ein detaillierter Beprobungsplan entworfen, der neben der Gewinnung der Gameten auch eine möglichst umfangreiche Probendokumentation einschloss (einschließlich Details zu den Elterntieren und dem Behandlungsverlauf). Da Karpfen natürlicherweise, je nach Verbreitungsgebiet, bei Wassertemperaturen zwischen min. 13°C und max. 20°C in außenliegenden Gewässern in den Monaten April bis spätestens Ende Juni laichen, mussten die Karpfen hier für die Induktion der Laichreife zunächst in geschlossenen Anlagen an die entsprechenden Temperaturen gewöhnt werden. Durch Veränderung der künstlichen Tageslängen in diesen Anlagen wurde zusätzlich der „Frühling“ vorgetäuscht. Im ersten Berichtsjahr konnten 5 Probenahmen durchgeführt werden. Eine erste erfolgreiche Induktion weiblicher Fische wurde Anfang Februar 2013 bei der dritten Probenahme erreicht. Im zweiten Berichtsjahr wurden 8 Probenahmen durchgeführt, im dritten Jahr nochmals 5 Probenahmen. Die Vorbereitung einer großen Anzahl an Tieren war aufgrund der vorliegenden Platzverhältnisse im TI-FOE leider nicht möglich. Aufgrund der limitierten Probenzahl wurden im Lauf des Projekts neben dem TI-FOE weitere Kontakte zu anderen, kommerziellen Fischzüchtern in Norddeutschland hergestellt (z.B. Fischzucht Reese in Sarlhusen, Fischzucht Grambek in Grambek, Fischzucht Kortmann in Hohenwestedt, Krebszucht Jeske in Översee, Fischzucht Hagedorn in Bargstedt). Die Mehrzahl dieser Züchter betreibt ausschließlich eine natürliche Reproduktion in ihren Fischteichen und kann somit außerhalb der Laichsaison nicht an Spermien oder weibliche unbefruchtete Gameten gelangen. Mit Herrn Jeske von der Krebszucht Jeske in Översee wurde im Mai 2014 über Hypophysierung versucht, die Geschlechtsreife bei Karpfen zu steuern und unbefruchtete Eier zu erhalten. Von einem Weibchen wurden dabei Eier gewonnen. Ebenso wurde im Mai Herr Heese an der Teichwirtschaft Aschauteiche besucht, jedoch konnten keine Eier gewonnen werden. Aufgrund des Mangels an Proben von *Cyprinus carpio* wurde deshalb auf den Zebrafisch *Danio rerio* sowie den Tilapia *Oreochromis niloticus* ausgewichen, deren Hälterung in der EMB bereits im Rahmen anderer Projekte etabliert worden war. Anhand dieser beiden Arten wurden die im Antrag beschriebenen Protokolle weiter ausgetestet und schließlich auf den Karpfen übertragen, nachdem 2014 häufiger Proben zur Verfügung standen. Bei insgesamt 18 Probenahmen in Ahrensburg im Zeitraum von 2012-2015 wurden schließlich 34 Karpfen-Männchen sowie 15 Karpfen-Weibchen beprobt. Die beprobten Männchen hatten ein durchschnittliches Gewicht von rund 2200 g, die Weibchen lagen bei etwa 2500 g, bei einer Altersstruktur von 3-9 Jahren. Im Durchschnitt gaben die Männchen etwa 5 ml Sperma ab, die Weibchen etwa 140 g Eier, wobei einmal auch deutlich mehr Eier (1260 g) abgestreift wurden. Allerdings wurden in diesem Fall „nur“ 210 g der Eier mit ins EMB transportiert, der Rest wurde für Befruchtungen direkt im TI-FOE verwendet. Die durchschnittliche Spermiedichte lag bei etwa $8,5 \times 10^9$ Spermien/ml, wobei die Standardabweichung sehr hoch war, sie lag etwa bei einer Zehnerpotenz. Solche starken Abweichungen werden jedoch auch bei anderen Arten, wie etwa dem Atlantischen Lachs beobachtet (Garber et al., 2015). Exemplarisch zeigt Abb. 04 die Spermiedichte von 20 Karpfen-Männchen, die zwischen dem 12.06.2014 und 19.03.2015 beprobt wurden.

Eine wichtige Komponente bei den Probenahmen, insbesondere später im Projekt bei den Züchtern, waren die jeweiligen lokalen klimatischen Bedingungen. So waren die Frühlingsmonate im Jahr 2014 relativ warm, im Norden Deutschlands fiel jedoch 2014

im Mittel relativ viel Niederschlag, während es im Süden im Vergleich mit den Vorjahren zu trocken war. Damit korrelierend waren die Stunden Sonnenschein im Süden deutlich höher als im Norden, wodurch die Geschlechtsreife der Laichfische eventuell entscheidend beeinflusst wurde. 2015 waren die Temperaturmittel im Norden deutlich geringer, sodass die Geschlechtsreife der Laichfische sehr spät einsetzte. Dies hatte auch Folgen für die Probenahme bei den Züchtern (siehe Meilenstein 5).

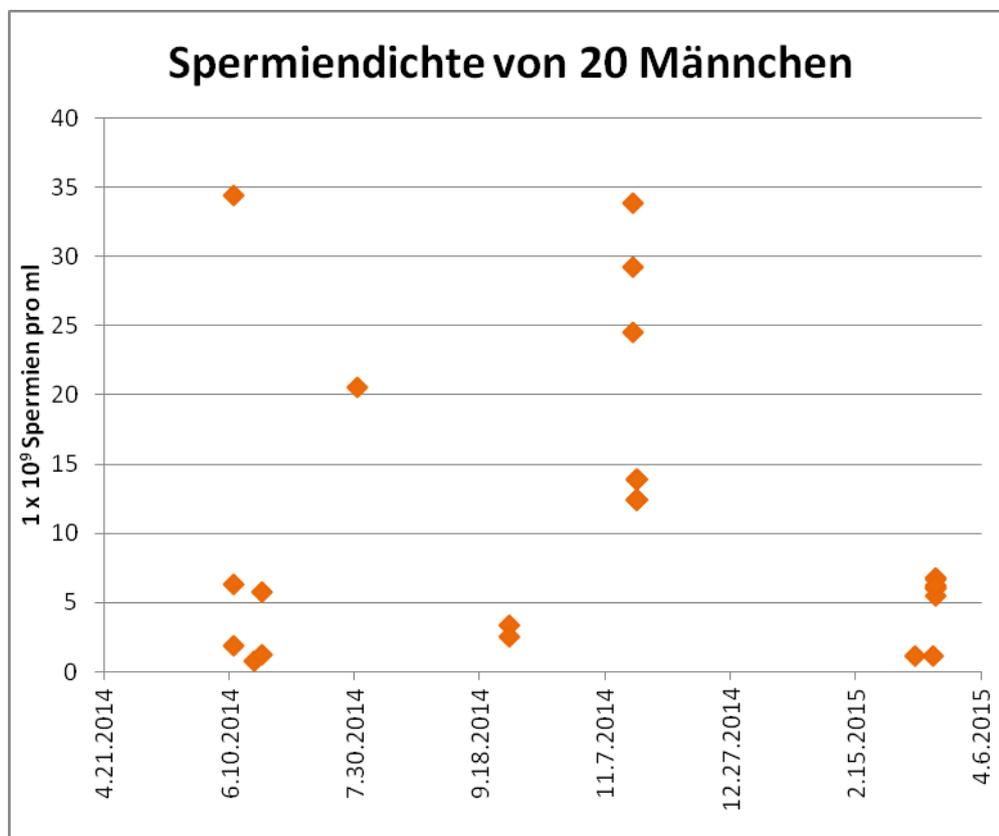


Abb. 04: Variabilität der Spermiendichte von 20 beprobten Männchen während 9 verschiedenen Probenahmen am Standort Ahrensburg im Projektzeitraum vom 12.06.2014 bis 19.03.2015.

2.2 Meilenstein 1 – Anpassung der Kryokonservierungsprotokolle von Karpfenspermien

In diesem Meilenstein sollten existierende Kryokonservierungsprotokolle an Karpfenspermien erprobt und nach Bedarf angepasst werden. Alle Arbeitsschritte, die die Gefahr eines möglichen Kontaktes mit Wasser, Urin oder Faeces bargen, wurden mit größter Vorsicht und Sorgfalt durchgeführt, um die Qualität der Spermaproben nicht negativ zu beeinflussen. Mit den erhaltenen nativen Spermaproben wurden verschiedene Kombinationen von Extender und Kryoprotektanz als Kryokonservierungsmittel ausgetestet um valide Aussagen zu erhalten. Die verwendeten Kombinationen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Vergleicht man einschlägige Literatur zur Kryokonservierung von Karpfenspermien, so existiert eine große Vielfalt an möglichen Kombinationen von Zuckerverbindungen oder Salzen als Extender und von einwertigen oder mehrwertigen Alkoholen sowie organischen Lösungsmittel (DMSO, Methanol, DMA) als Kryokonservierungsmittel. Für die im Projekt vorgesehene

Züchterprobenahme (Meilenstein 5) sollte ein möglichst einfaches Verfahrensprotokoll (im Anhang) entwickelt werden, anhand dessen der Einfriervorgang aber verlässlich und reproduzierbar durchgeführt werden konnte. Dabei sollte möglichst ein einziges Kryoprotektanz mit einer einzigen Zuckerart als Extender verwendet werden. Aus den getesteten Kombinationen von Extendern und Kryokonservierungsmitteln (Tab. 1) wurde die Kombination Kryo 4 gewählt, die die besten Ergebnisse hinsichtlich Dauer der Aktivität der Spermien (bis zu 6 min Aktivität) und Viabilität (PI/FDA-Färbung, Ø 40% viable Zellen) nach dem Auftauen lieferte und zum anderen sehr einfach herzustellen war. Kryo4 besteht aus 151 mM Sucrose + 93 mM Natriumchlorid + 18 mM Natriumhydroxid + Penicillin/Streptomycin (1:100) + DMSO 10%, bei einem pH von 7,49 und einer Osmolarität um 350 mOsm/kg.

Kryomittel	Extender, Zusatz	Kryoprotektanz	Referenz
Kryo 1	Sucrose, NaCl, NaOH	DMSO 10%	Irawan et al. 2010
Kryo 2	Sucrose, NaCl, NaOH	DMSO 10%	Irawan et al. 2010
Kryo 3	Sucrose, NaCl, NaOH	Methanol 10%	Irawan et al. 2010
Kryo 4	Sucrose, NaCl, NaOH	DMSO 10%	Irawan et al. 2010
Kryo 5	Trehalose, NaCl, NaOH	DMSO 10%	Irawan et al. 2010
Kryo 6	Glucose, Eigelb	DMSO 10%	Bozkurt et al. 2012
Kryo 7	Glucose, Eigelb	Methanol 10%	Horvath et al. 2003, Bozkurt et al. 2012
Kryo 8	Sucrose	Methanol 10%	Altunok et al. 2004
Kryo 9	Sucrose + Milch	DMSO 10%	Altunok et al. 2004
Kryo 10	Fructose	Methanol 10%	-
Kryo 11	Fructose	DMSO 10%	-
Kryo 12	Sucrose, Manitol, NaCl, NaHCO ₃ , KCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , Tris-HCl	Ethylenglykol 16%	Li et al. 2010
Kryo 13	NaCl, NaHCO ₃ , KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂	DMSO 10%	Kurokura et al. 1984, Warnecke 2002
Kryo 14	Trehalose, NaCl, NaHCO ₃ , KCl, CaCl ₂ , MgCl ₂	DMSO 10%	Kurokura et al. 1984, Warnecke 2002

Tabelle 1:
Getestete Kryomittel. Kryo 1, 2
und 4 haben unterschiedliche
Extender-Konzentrationen.
In grün unterlegt: im
Verfahrensprotokoll
verwendetes Kryomittel.

Enorm bedeutend waren zudem die Mischungsverhältnisse von Extender zu Probe. Hier konnte ein optimales Mischungsverhältnis von 1:1 bei dem gewählten Kryomittel 4 ermittelt werden. Höhere Anteile von Extendern wirkten sich negativ auf die Motilität und Aktivierungsrate aus. Nach Testung verschiedener Einfrierprozesse konnte die Einfrierstrategie mit Stickstoff, wie unter 1.3.2.2. beschrieben, als die beste und dabei praktischste Methode identifiziert werden. Das bedeutete, dass die Probe nach Erhalt sofort auf Eis gekühlt gelagert wurde, ehe sie weiter verwendet wurde. Die Probe wurde zunächst hinsichtlich ihrer Qualität (Aktivität, Anzahl motiler Spermien, Spermiedichte) bewertet und dann portionsweise mit dem Extender versetzt und 10 min auf Eis equilibriert. Danach wurde das Kryoprotektanz tröpfchenweise hinzugegeben und erneut 10 min equilibriert, ehe die Probe auf ein Floss auf flüssigen Stickstoff gesetzt wurde (Abb. 05a). Es folgte das Halten der Probe in der Gasphase 2 cm oberhalb des flüssigen Stickstoffs für 10 min und danach das Eintauchen in flüssigen Stickstoff.

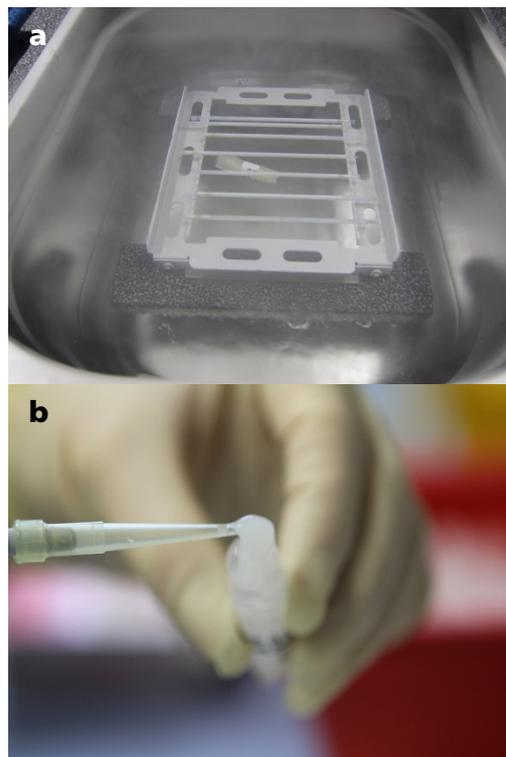


Abb. 05: Einfriervorgang und Auftauen von Karpfensperma. a: Die Proben werden auf einem Floß 2 cm über dem flüssigen Stickstoff für 10 min in der Gasphase heruntergekühlt. b: Nach dem Auftauen war die Spermprobe bei einigen getesteten Kryomitteln teils flüssig, teils agglutiniert.

Neben den Einfrierprozessen bereitete vor allem der Auftauvorgang die größten Probleme für eine erfolgreiche spätere Befruchtung. Eingefrorene Spermien wurden nach 1-7 Tagen aufgetaut und aktiviert. Hier war es sehr wichtig, schnell (d.h. innerhalb weniger Sekunden) bei 40°C aufzutauen, um die Spermien nicht zu schädigen. Wird dies beachtet, so lassen sich reproduzierbar gute Ergebnisse erzielen. Die verwendeten Kryotubes (Volumen 2 ml) wurden hierfür maximal 30-45 Sekunden im Wasserbad angetaut, die Kryostaws (Volumen 0,5 ml) wurden maximal 10-15 Sekunden angetaut. Danach war der flüssige Anteil der Probe sofort zu entnehmen und zu verwenden. Für das spätere Verfahrensprotokoll wurden nur Kryotubes verwendet, da diese eine größere Menge Spermaflüssigkeit aufnehmen konnten. Einige getestete Extender (wie z.B. Extender 5) wiesen nach dem Auftauen eine erhöhte Viskosität auf, wodurch es zu unerwünschten Verklumpungen der Spermien kam

(Abb. 05b). Dieser agglutinierte Anteil des Spermias reduzierte die Qualität bzw. den prozentualen Anteil an vitalen Spermien und war hinsichtlich einer Aktivierung der Spermien nicht geeignet. Eine in der Literatur empfohlene Belüftung der Spermaproben nach dem Auftauen für eine gute Aktivierbarkeit der Spermien (Kopeika et al. 2007) ist nur bis maximal 5 min zu empfehlen. Das Verfahrensprotokoll sieht allerdings keine Belüftung der Proben vor, da keine signifikant verbesserte Aktivierbarkeit beobachtet werden konnte und das finale Protokoll so einfach wie möglich gehalten werden sollte. Eine leichte Bewegung der Spermien, die nach dem Auftauen häufig beobachtet werden kann, noch bevor Aktivierungslösung zugegeben wird, kann durch Zugabe einer Immobilisierungslösung (ImmoS, nach Warnecke 2002) unterbunden werden, um einen Energieverlust zu verhindern. In unseren Versuchen kam es bei einzelnen Proben zwar trotzdem zur Spontanaktivierung der Spermien, diese Proben ließen sich mit Aktivierungslösung dennoch vollständig aktivieren. Eine Langzeit-Kryokonservierung zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Qualität der Spermien. Auch über 2 Jahre (853 Tage) nach dem Einfrieren konnten Proben wieder aufgetaut und aktiviert werden.

Insgesamt betrug die durchschnittliche Motilität von 29 vollständig getesteten Spermaproben nach dem Verfahrensprotokoll $92\% \pm 19\%$ für native Spermienproben und $53\% \pm 28\%$ für kryokonservierte Proben. Der Box-Whisker-Plot (Abb. 06) zeigt anschaulich die Verteilung der verschiedenen Proben: der Median bei nativen Proben lag bei 100%, während das untere Quartil bei 95% lag. Bei kryokonservierten Proben lag der Median bei 50%, mit 40% für das untere Quartil und 75% für das obere Quartil. Teilt man die erzielten Motilitäten in Kategorien nach den Empfehlungen der FAO ein, so ergibt sich ein ebenso heterogenes Bild zwischen nativen und kryokonservierten Proben (Abb. 07). Hier liegen 27 von 29 nativen Proben im sehr guten Bereich ($>70\%$, \bar{x} 4,79 über alle Proben), während nur 11 von 29 kryokonservierten Proben im sehr guten Bereich liegen (\bar{x} 3,52 über alle Proben). Die durchschnittliche Bewegungsdauer nach der Aktivierung, bis zu dem Zeitpunkt, an dem mehr als 90% der Spermien nicht mehr motil waren, betrug 4:28 min für die nativen Proben, wobei die Standardabweichung hier sehr hoch war, und 2:30 min für die kryokonservierten Proben. Der Median lag bei 2:05 min (nativ) und 2:30 min (kryo) (Abb. 08). Hier gab es also hinsichtlich der Dauer der Motilität von Spermien keinen deutlichen Unterschied. Die meisten der Spermienköpfe hatten nach dem Kryokonservierungsprozess keine sichtbaren Deformationen, sondern wiesen eine typische runde Form auf (Abb. 09).

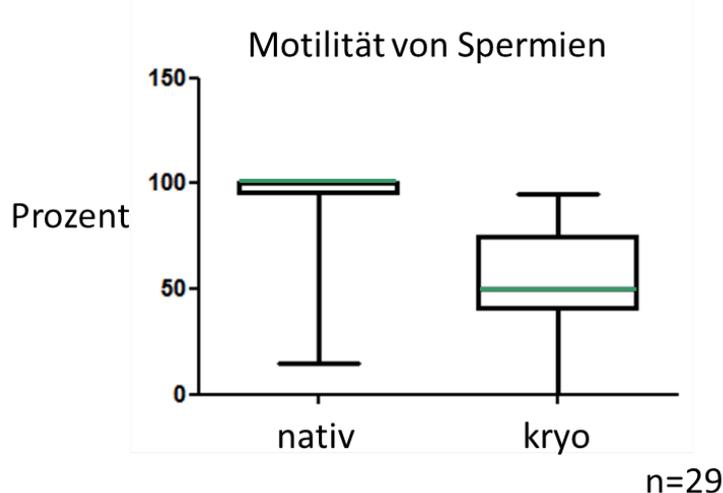


Abb. 06: Box-Whisker-Plot der Motilität von 29 ausgewählten Spermaproben vor (nativ) und nach dem standardisierten Einfrierprozess (kryo). Dargestellt sind die minimalen und maximalen Werte, die 25% und 75%-Quartile sowie der Median (grüner Balken). Die Motilitäten wurden durch Beobachtungen am Mikroskop ermittelt.

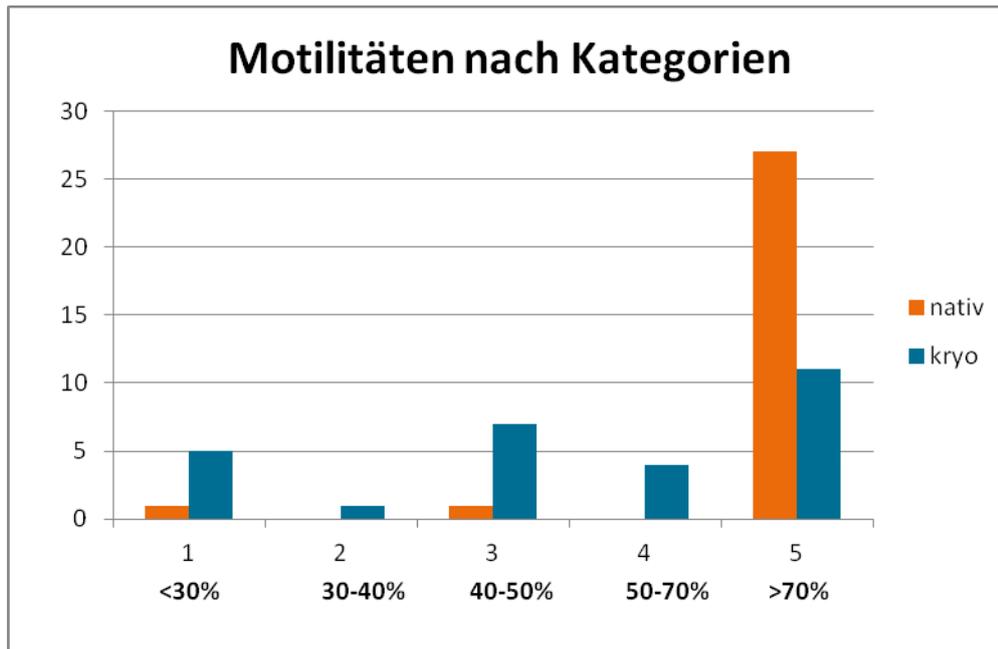


Abb. 07: Anzahl der gemessenen durchschnittlichen Motilitäten nach Kategorien der FAO (2012) von 29 ausgewählten Spermaproben vor (nativ) und nach dem standardisierten Einfrierprozess (kryo).

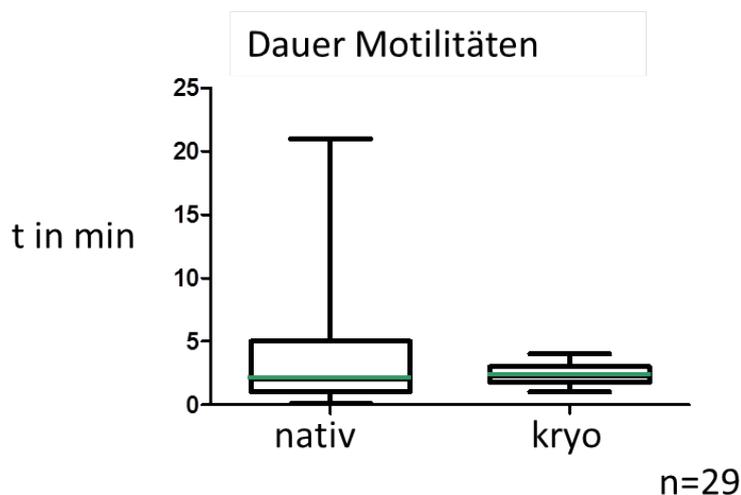


Abb. 08: Box-Whisker-Plot von der Bewegungsdauer aktivierter Spermien. Es wurden 29 ausgewählte Spermaproben vor (nativ) und nach dem standardisierten Einfrierprozess (kryo) analysiert. Dargestellt sind die minimalen und maximalen Werte, die 25% und 75%-Quartile sowie der Median (grüner Balken). Die Bewegungsdauer wurde durch Beobachtungen am Mikroskop ermittelt.

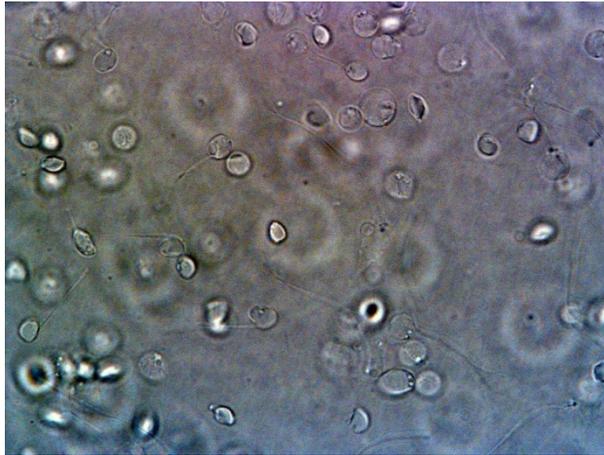


Abb. 09: Aufgetaute Spermprobe von Männchen 24. Die meisten Spermienköpfe zeigen keine Deformierungen sondern eine typische runde Form. 1000-fache Vergrößerung.

Die Viabilitätsanalyse sieben ausgewählter nativer und kryokonservierter Spermienproben wurde mit einem Propidiumiodid-Fluoresceindiacetat (PI-FDA) Assay durchgeführt, der die Unterscheidung von toten (rote Fluoreszenz) und lebenden Spermien (grüne Fluoreszenz) ermöglicht. Die Anteile toter zu lebenden Spermien lassen Rückschlüsse auf die Qualität des Spermas zu.

Der PI-FDA Assay wurde zunächst für den Vergleich einzelner Kryo-Kombinationen genutzt (Abb. 10) und später für den Vergleich von nativem und mit Kryomittel 4 kryokonserviertem Sperma herangezogen.

Der Vergleich der verschiedenen Kryomittel zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen einzelnen Kryo-Kombinationen. Während das Kryomittel 4 hohe Anteile an FDA-positiven Spermienköpfen aufwies (Abb. 10a), wurden bei anderen Kryomitteln, wie beispielsweise Kryo 12 (Kombination aus Sucrose, Salzen und Ethylenglycol) hohe Anteile an PI-positiven Spermien gefunden. Zudem konnte hier eine Aggregatbildung nach dem Auftauen festgestellt werden, die sich offensichtlich nachteilig auf die Überlebensrate der Spermien auswirkte (Abb. 10b, Pfeile).

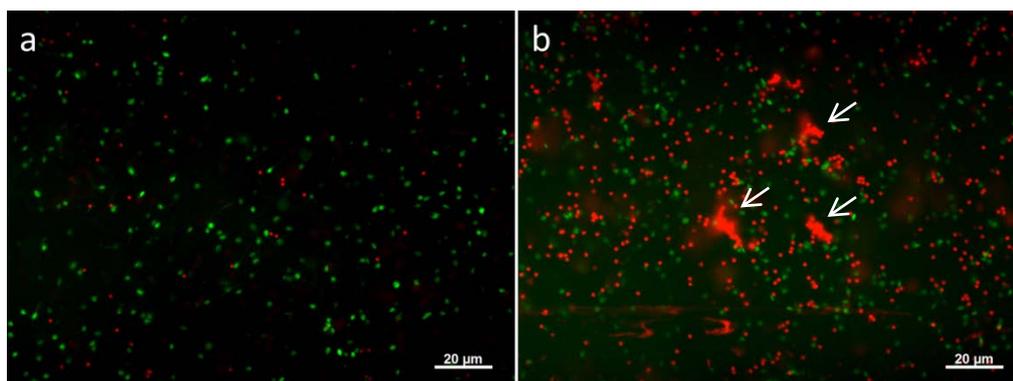


Abb. 10: Viabilität von aufgetauten Karpfenspermien, gemessen über PI/FDA-Färbung. a) Aufgetaute Karpfenspermien in Kryomittel 4. Der Anteil an vitalen, grün leuchtenden Spermien ist gegenüber den toten (= roten) Spermien sehr hoch. b) Aufgetaute Karpfenspermien in Kryomittel 12. Der Anteil an toten Spermien liegt bei mehr als 50%. Zudem sind deutlich Aggregate von toten Spermien erkennbar (Pfeile).

Der Vergleich von kryokonservierten und nativen Spermien zeigte einen sehr deutlichen Unterschied in der Viabilität (Abb. 11): Der Anteil viableler Spermien lag bei den nativen Proben zwischen 91% und 98%, die Viabilitäten der korrespondierenden

eingefrorenen Proben der sieben Männchen lagen mit Raten zwischen 26% und 53% viablen Spermien wesentlich niedriger.

Aufgrund der längeren Lagerzeit der kryokonservierten Proben von 10-14 Monaten könnte es hier individuell zu Einbußen gekommen sein. Bei Proben, die über 2 Jahre gelagert wurden, konnten allerdings noch viele motile Spermien (65% Motilität) gefunden werden. Ob und wie die Langzeitlagerung die Viabilität der Spermien beeinflusst, gilt es noch im Detail zu untersuchen. Die Auswertung ist teilweise mit Schwierigkeiten verbunden, da es bei dem PI-FDA-Assay nicht möglich war, stets die gleiche Ebene bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen einzustellen. Insofern ergab sich häufig das Problem, dass bereits tote Spermien auf dem Objektträgerboden zu finden waren, während noch vitale Spermien eher in Ebenen darüber vorhanden waren. Mit Hilfe der Analysesoftware ImageJ wurde versucht, diese Problematik einzudämmen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse aus dem PI-FDA-Assay jedoch die bereits bei den Motilitäten gefundenen Tendenzen, dass die Anzahl funktionstüchtiger Spermien oft um mindestens die Hälfte reduziert war. Im folgenden Meilenstein wurde deshalb näher untersucht, ob sich die niedrigeren Raten auch auf die Befruchtungsfähigkeit der Spermien auswirken.

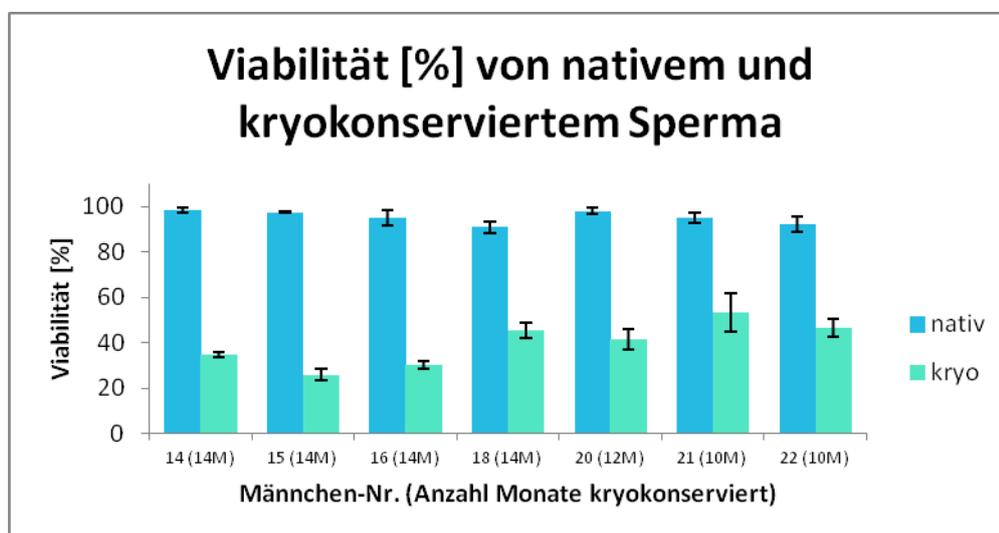


Abb. 11: Viabilität von nativen und aufgetauten Karpfenspermien im Vergleich, gemessen über PI/FDA-Färbung. Der Anteil an vitalen Spermien von nativen Proben ist gegenüber den kryokonservierten Spermien mehr als doppelt so hoch. Mittelwerte von mindestens 3 Proben je Männchen.

Mit Hilfe des computerbasierten, frei zugänglichen Plug-In CASA (Computer-assistierte Spermien-Analyse) der Software ImageJ (Wilson-Leedy and Ingermann, 2007) konnte bei den Spermaproben eine verbesserte Qualitätsabschätzung durchgeführt werden (Abb. 12). Dazu wurde am Mikroskop (Nikon Ti eclipse, 400-fache Vergrößerung) 1 µl einer Spermaprobe auf einen Objektträger überführt und ein Video von 1 min aufgenommen. Kurz nach dem Videostart wurde die Spermaprobe mit 19 µl Wojnarovich-Lösung aktiviert. Eine Bildserie von 200 Einzelbildern aktivierter Spermien (Sequenz von 10 Sekunden, 2-10 Sekunden nach der Aktivierung) wurde aus der Videodatei ausgewählt und in das Programm ImageJ geladen. Im Programm wurde zunächst eine Konvertierung in ein 8-Byte-Bildformat durchgeführt und basierend auf einem Ausgangsbild zunächst durch Kontrast und Belichtungszeit die Bildserie so bearbeitet, dass einzelne Spermienköpfe nur noch als schwarze Kreise zu erkennen sind (Abb. 12). Das Hintergrundrauschen wurde über die Threshold-Funktion eliminiert. Bei Aktivierung des Plugins CASA wurde dann ein Sperm Tracker-Fenster aufgerufen, in dem verschiedene Qualitäts-Parameter wie Spermengröße, Dauer der

Spermienverfolgung (in Anzahl Bildern), der prozentuale Anteil an motilen Spermien (MOT, %), kurvilineare Geschwindigkeit (curvilinear velocity, VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$), mittlere Wegstreckengeschwindigkeit (average path velocity, VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$), der Wobbling index (kennzeichnet trudelndes Verhalten von Spermien, WOB, %), und die Bewegungslinearität (movement linearity, LIN, %) voreingestellt, beziehungsweise berechnet werden können.

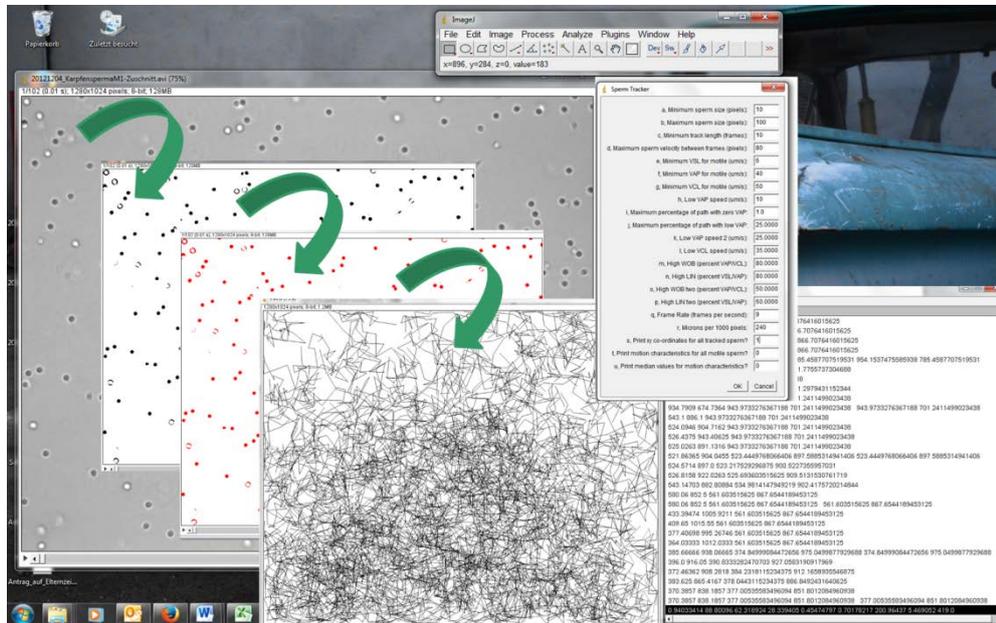


Abb. 12: Dokumentation der Computer-assistierte Spermienanalyse (CASA). Zunächst wird die Videosequenz der aktivierten Spermien in Graustufen umgewandelt und anschließend weiter bearbeitet (Kontrast/Belichtung), sodass die Spermienköpfe als schwarze Kreise auf weißem Hintergrund zu sehen sind. Anschließend werden Schwellenwerte festgelegt (Threshold) und dann das CASA-plugin angewendet (Parameter rechter oberer Kasten). Als Ergebnis erhält man die einzelnen nachgezeichneten Wegstrecken der Spermien sowie Durchschnittswerte von Parametern wie beispielsweise der Motilität in %.

Aktuelle Veröffentlichungen von Cejko et al., 2013 griffen das Potential von CASA als weiteres Messinstrument zur Qualitätsbewertung von Karpfenspermien auf. Die dort angegebenen Werte (82,7% MOT, 50,9–61,0% LIN, 75,4–83,1% WOB, 180 $\mu\text{m}/\text{sec}$ VCL und 170 $\mu\text{m}/\text{sec}$ VAP) wurden als Vergleichswerte herangezogen. Die von uns ermittelten Werte unterschieden sich allerdings deutlich von den Werten aus der zitierten Literatur, mit Ausnahme der Daten von Warnecke (2002), die ähnliche Ergebnisse lieferten. Boryshpolets et al. (2013) untersuchten kürzlich den Einfluss von unterschiedlichen CASA-Systemen und Auswertesoftware, sowie den verwendeten Einstellungen (z.B. Bildfrequenz während der Aufnahme, Aufnahmezeit) auf die erhaltenen Parameter und stellten fest, dass diese selbst bei gleichen Proben stark von den gewählten Einstellungen abhängen. Um direkte Vergleiche zwischen unterschiedlichen Aktivierungsprotokollen ziehen zu können, müssen diese mit exakt den gleichen Einstellungen und der gleichen Software untersucht wurden. Unter den fünf von Cejko et al. (2013) getesteten Aktivierungslösungen erwies sich ein Puffer mit einem pH von 9,0 und einer Osmolarität von 200 mOsm/kg als bestgeeignet. Dieser Aktivierungspuffer wurde mit aufgetauten Spermproben unter den von uns gewählten Einstellungen mit CASA ImageJ ausgetestet. Auffällig war hier, dass sich vor allem die vom Programm ermittelte prozentuale Motilität der aufgetauten Spermien pro Probe bei jeder neuen Aktivierung sehr stark unterschied (Abb. 13). Der höchste gemessene Mittelwert für die Motilitätsrate der Karpfenspermien lag bei 58%.

Die Werte für die VCL und VAP variierten hingegen kaum, die Werte für die VSL nur in Einzelfällen. Eine Erklärung für die ungenaue Analyse der Motilitäten der Spermien könnte auch hier wieder die bereits beschriebene Problematik der variierenden Einstellungen am Mikroskop sein. Wird bei einer Messung die Ebene direkt über dem Objektträger scharf gestellt, befinden sich in diesem Bereich vor allem tote Spermien, die dementsprechend keine Motilität zeigen, bei einer Fokussierung auf eine höhere Ebene werden vor allem die aktiven Spermien erfasst. Die Ermittlung der Wegstreckengeschwindigkeiten erfolgt jedoch anhand der beweglichen Spermien und wird daher unabhängig von der eingestellten Ebene immer ähnliche Werte ergeben. Daher wurden für den Vergleich der nativen und kryokonservierten Proben nur die VCL, VAP und VSL Werte herangezogen. Naturgemäß sind die VCL-Werte am höchsten und die VSL-Zahlen (straight line velocity) am niedrigsten.

Da die beiden untersuchten Aktivierungslösungen vergleichbar gute Ergebnisse für VCL, VAP und VSL zeigten, wurde das Verfahrensprotokoll an dieser Stelle nicht geändert.

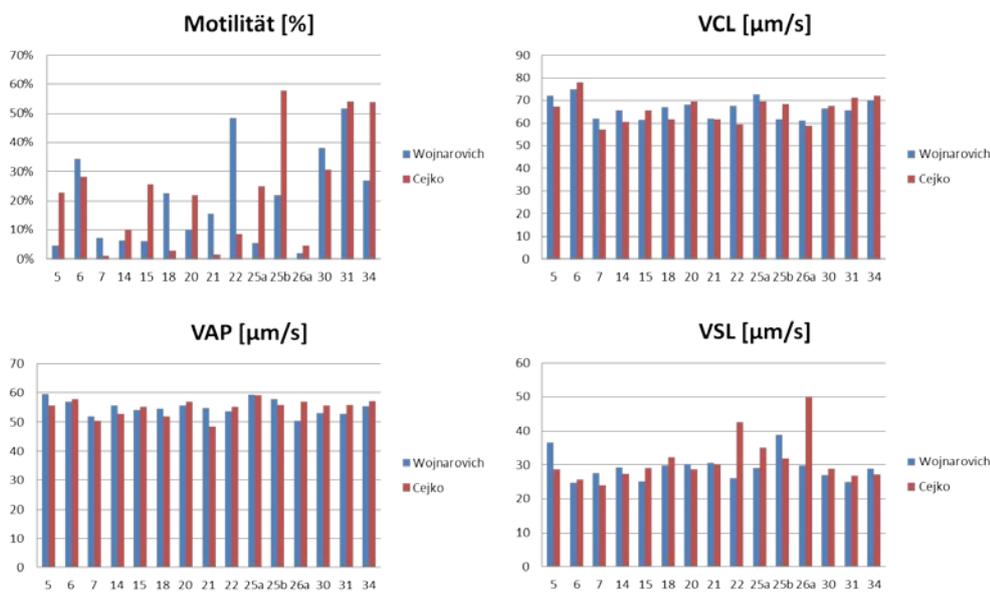


Abb. 13: Kryokonserviertes Spermia wurde mit zwei unterschiedlichen Aktivierungslösungen behandelt und die Motilität, kurvilineare Geschwindigkeit (VCL; curvilinear velocity), mittlere Wegstreckengeschwindigkeit (VAP; average path velocity) und Wegstrecke einer geraden Linie (VSL; straight line velocity) mit dem CASA-Plugin von ImageJ ausgewertet. Vor allem die Bestimmung der Motilität weist extreme Unterschiede auf. Die fortlaufenden Nummern der Einzelproben sind in der X-Achse dargestellt.

Bisher wird bei der Beurteilung der Spermienqualität in der Praxis aus Zeit- und Kostengründen, wenn überhaupt, hauptsächlich die Motilität gemessen, nur in Einzelfällen werden CASA-Systeme außerhalb der Forschung eingesetzt. Hier werden jedoch, wie bereits erwähnt, verschiedene Systeme verwendet. Um eine spätere Standardisierung bei der Messung der Spermienqualität zu ermöglichen, sind nach unseren Ergebnissen zusätzliche Bestimmungen der Spermengeschwindigkeiten wichtig und sollten für die Beurteilung der Qualität ebenfalls herangezogen werden. Um dies in der Praxis umsetzen zu können, bedarf es jedoch der Entwicklung von einfachen, kostengünstigen und zeitsparenden Geräten für die genannten Messungen.

2.3 Meilenstein 2 – Testen der Qualität der konservierten Spermien durch Erzeugung und Aufzucht von Karpfenbrut

In diesem Meilenstein sollten in erster Linie die Befruchtungsraten von kryokonservierten Spermien kontrolliert werden. Dazu wurden kryokonservierte Spermien kurz vor der Befruchtung aufgetaut und dann wie native Spermienproben für die Befruchtung verwendet. Abbildung 14 zeigt schematisch in Fotos Befruchtung und Entwicklung eines Eis. Für die Qualitätsabschätzung wurden die Eier etwa 2 h nach der Befruchtung kontrolliert und die Anzahl befruchteter Eier und unbefruchteter oder beschädigter Eier notiert.

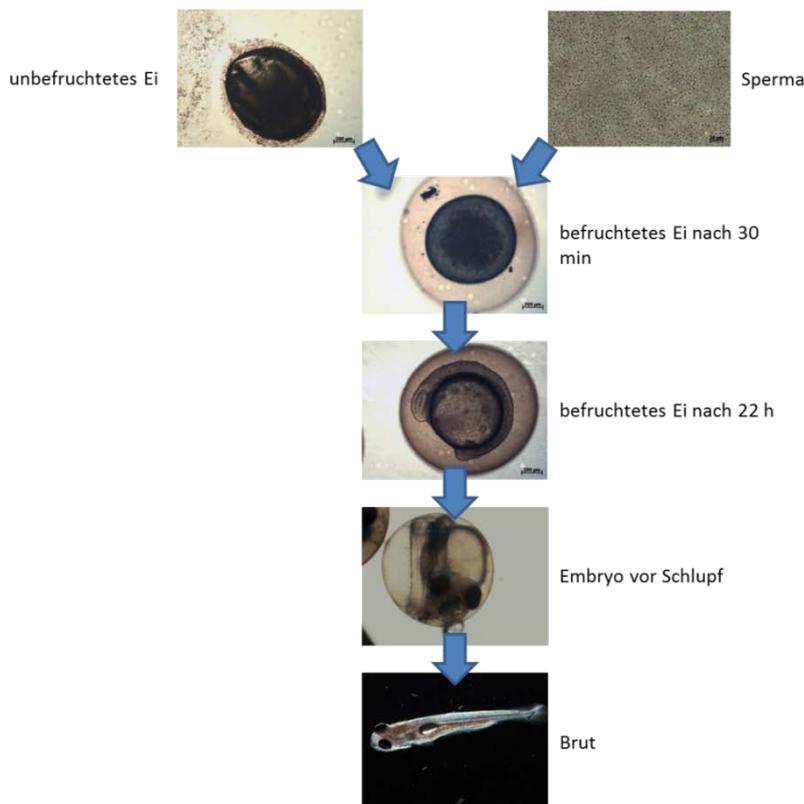


Abb. 14: Fotoschema des Befruchtungs- und Entwicklungsvorgangs. Ein unbefruchtetes Ei wird in einem Verhältnis von 1:8.000-200.000 mit Spermien befruchtet. Nach 30 min lassen sich befruchtete Eier deutlich von unbefruchteten/kaputten Eiern unterscheiden, 1-2-Zell-Stadien sind zu sehen. Nach etwa 1 Tag sind die Embryonen im Somitenstadium, kurz vor dem Schlupf bewegt sich der voll ausgebildete Embryo schon im Ei. Die Brut ist zunächst durchsichtig und noch ein Dottersack vorhanden, ehe sie fressfähig wird.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an weiblichen Gameten von *Cyprinus carpio* in den ersten beiden Berichtsjahren konnten insgesamt nur wenige Befruchtungsvorgänge mit kryokonservierten Spermien durchgeführt werden. Es gelang jedoch, in den letzten anderthalb Berichtsjahren bei 10 Probenahmen unbefruchtete Eier von 15 Weibchen (zwischen 15 und 550g Eier pro Weibchen) zu bekommen und 9 Mal Befruchtungsversuche mit verschiedenen eingefrorenen Spermaproben durchzuführen. Es wurden verschiedene Proben von Männchen (nativ und kryo) mit frischen Eiern verschiedener Weibchen ausgetestet. 2 Stunden nach der Befruchtung war die Anzahl befruchteter Eier sehr hoch, die Befruchtungsraten lagen bei 97-99% (Tabelle 2). Die Lagerungsdauer der kryokonservierten Spermiproben hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Befruchtungsrate. Ein Tag nach der

Befruchtung wurden deutlich geringere Zahlen an überlebenden Eiern gemessen. So hatte sich die Anzahl überlebender Eier mit nativem Spermium von Männchen 18 und 19 nach 19 Stunden bereits auf 11-22% reduziert. Hierbei ist es wahrscheinlich, dass die initiale Eiqualität einen wesentlichen Einfluss auf die Anzahl befruchteter Eier nach der Befruchtung hat, da beispielsweise Männchen 19 mit nativem Spermium geringere Befruchtungsraten aufwies als die kryokonservierte Probe dieses Männchens. Allerdings wurden diese Spermaproben zur Befruchtung unterschiedlicher Eier eingesetzt, wodurch es bei gleicher Spermaqualität von nativer und kryokonservierter Probe aufgrund der Eiqualität zu unterschiedlichen Befruchtungsraten kommen konnte. Es ist deshalb wichtig, sowohl die Spermaqualität als auch die Eiqualität vor der Befruchtung zu untersuchen.

In drei Versuchen konnten die Eier dennoch bis zum Schlupf beobachtet werden und so neben Befruchtungsraten auch Schlupfraten ermittelt werden (Tabelle 3). Die geschlüpften Larven (Abb. 15) wurden an der EMB weiter aufgezogen. Insgesamt konnten jedoch in den Ansätzen am EMB nur sehr geringe Schlupfraten erreicht werden, während in parallelen Kontrollansätzen am FOE (nicht gezeigt) die Schlupfraten deutlich höher lagen. In den anderen Versuchen kam es sowohl im nativen als auch im kryo-Ansatz nach der zunächst erfolgreichen Befruchtung zu drastischen Verlusten, sodass kein Embryo bis zum Schlupf beobachtet werden konnte. Dies kann zum einen mit dem Haltungswasser zusammenhängen, da das Wasser in Lübeck (14°dH bis zu 20°dH) deutlich härter war als das Haltungswasser in Ahrensburg, zum anderen konnten auch einige Hürden bei der Befruchtung festgestellt werden, die einen starken Einfluss auf die Befruchtungsrate bzw. eine nachfolgende Schlupfrate nehmen können: 1.) Der Befruchtungsvorgang muss einem genauen Schema folgen – Abweichungen in der Reihenfolge oder der Menge eingesetzter Aktivierungslösungen führen zur Reduzierung der Befruchtungsrate. Hierfür waren Erfahrungswerte und Hinweise seitens der Züchter und von Herrn Drahotta in Ahrensburg sehr hilfreich und wichtig. 2.) Die Befruchtung der Eier muss relativ schnell nach Entnahme der Eier erfolgen – mit längerer Standdauer sinkt die Qualität der Eier und damit mögliche Befruchtungsraten. 3.) Insbesondere bei induzierter Laichreife ist die biologische Varianz nochmals höher als während der natürlichen Laichzeit, sodass häufig selbst nach erfolgreicher Befruchtung unter Umständen keine weitere Entwicklung stattfindet.



Abb. 15: Karpfenbrut kurz nach dem Schlupf.

Tabelle 2:
Befruchtungsraten
verschiedener
Kombinationen von
Männchen und Weibchen

Ansatz Männchen + Weibchen	Mittelwerte Anzahl Eier	Mittelwerte Anzahl befruchteter Eier nach 2h	Befruchtungsrate [%]	n
M18 nativ + W8	500	56*	11,20*	3
M19 nativ + W8	500	108*	21,60*	3
M20 nativ + W9	438	427	97,49	4
M20 nativ + W10	419	407	97,14	2
M21 nativ + W11	646	644	99,69	6
M18 kryo + W8	500	11*	2,20*	3
M19 kryo + W8	500	4*	0,80*	3
M19 kryo + W9	405	401	99,01	2
M19 kryo + W10	395	388	98,23	2
M20 kryo + W11 (Ahrensburg-H2O)	669	668	99,85	3
M20 kryo + W11 (Lübeck-H2O)	654	435	66,51	3

*erst nach 19h bestimmt

Tabelle 3:
Bedingungen und
Ergebnisse aus den
Befruchtungsversuchen
mit Karpensperma

MännchenNr	M18	M18	M19	M19	M20	M20
Spermaqualität / Prozent Mot.	nativ / 100%	kryo / 40%	nativ / 99%	kryo / 95%	nativ / 100%	kryo / 80%
Kryomittel	-	Ext. 1/DMSO	-	Ext. 1/DMSO	-	Ext. 1/DMSO
Equilibrierdauer [min]	-	10 min	-	10 min	-	10 min
Lagerungsdauer [d]	-	38	-	38	-	61
beste Motilitätsrate vor Befruchtung	100	n.d. ¹	99	95	100	80
VAP [µm/s]	n.d.*	53	n.d.*	56	n.d.*	56
Befruchtungsrate [%]	11	2	22	98	96	99
Schlupfrate [%]²	1	1	3	0	1	1

*Nicht bestimmt für die frischen Proben, Vergleichsproben anderer frischer Proben lagen bei $66 \pm 2 \mu\text{m/s}$

¹ keine Motilität bestimmt

² Raten aufgrund von schlechtem Haltungswasser so gering

2.4 Meilenstein 3 – Anpassung des Protokolls für den Kerntransfer in entkernte Karpfeneizellen

In diesem Meilenstein sollte der Prozess des Kerntransfers, also die Entnahme des Karpfeneizellkerns aus einem Ei und die Übertragung in eine entkernte Karpfeneizelle etabliert und nach Bedarf modifiziert werden. Dies wurde mit unbefruchteten Karpfeneiern vom 28.03.2013 erstmalig getestet. Die Eier waren zunächst noch inaktiviert, das heißt, das Chorion war noch sehr weich (Abb. 16a). Erst durch die Zugabe einer Aktivierungslösung (z.B. Wasser) wird spontan eine zunehmende Verhärtung der Eihülle induziert (Abb. 16b). Hier wurde zunächst versucht, die Eizellkerne inaktivierter wie aktivierter Eier direkt mit dem DNA-Farbstoff DAPI anzufärben, da bei Cypriniden die Eizellkerne unbefruchteter Eier relativ dekondensiert (Metaphase 2) vorliegen und sich nicht klar vom Zytoplasma abgrenzen (Sun et al, 2005, Siripattaraprat et al 2009). In beiden Fällen konnte nur eine relativ schwache Färbung gefunden werden, die eine sichere Lokalisation des Eizellkerns verhinderte.

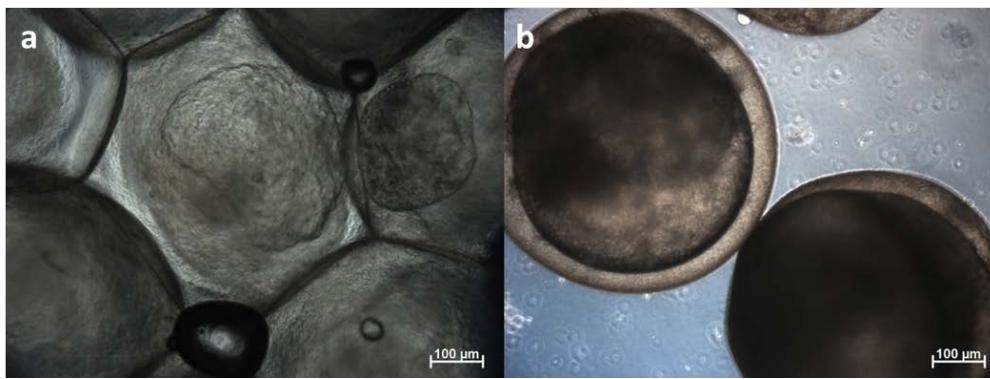


Abb. 16: Unbefruchtete Karpfeneier in a) eigener Ovarflüssigkeit (inaktiver Zustand) oder in b) Wasser (aktivierter Zustand).

Aufgrund der geringen und diskontinuierlichen Verfügbarkeit von Karpfeneiern kam es im Anschluß an diesen ersten Versuch zu Verzögerungen bei der Umsetzung von Meilenstein 3. Um die gesetzten Ziele dennoch zeitnah erreichen zu können, wurden Eier vom Zebrafisch (*Danio rerio*) und Tilapia (*Oreochromis niloticus*), zwei Fischarten, die an der EMB bereits gehalten im Rahmen anderer Projekte gehalten wurden, als Ersatzmaterial zur ersten Erprobung der geplanten Methoden verwendet. Die Eier von *O. niloticus* sind zwar deutlich größer als Karpfeneier, aufgrund ihres opaken Chorions und der großen Menge Fetttröpfchen im Dotter ähneln sie jedoch Karpfeneiern strukturell. Daher wurden diese Eier verwendet um die Lokalisation der Eizelle und die anschließende Eizellkernentnahme per Mikromanipulation zu üben. Es stellte sich sehr schnell heraus, dass es unmöglich war, die unbefruchtete Eizelle, geschweige denn die Zellkerne unbefruchteter Tilapia-Eier zwischen den vielen Fett Tröpfchen des Eigelbs zu lokalisieren. Daher wurden als nächstes Zebrafischeier als Trainingsmaterial verwendet. Diese haben ungefähr die gleiche Größe wie Karpfeneier (ca.1,2 mm), sind jedoch komplett durchsichtig und enthalten kaum Fetttröpfchen. Leider stellte sich heraus, dass die Entnahme von einzelnen Eizellkernen sehr kompliziert ist und einen hohen technischen Aufwand benötigt. Durch die Arbeiten an den Zebrafisch- und Tilapia-Eiern konnte somit frühzeitig festgestellt werden, dass die geplanten Versuche am Mikromanipulator zur Entnahme von unbefruchteten Eizellkernen zeitaufwendiger sind als erwartet.

Daher wurde bereits im zweiten Projektjahr parallel eine alternative Methode zur Gewinnung von Zellkernen etabliert. Hierfür wurden zunächst Zebrafischeier genutzt, später wurde die Methode entsprechend auf Karpfen übertragen. Dank der Vorarbeiten mit den Tilapia- und Zebrafischeiern wurde so frühzeitig eine in der Praxis

einfach umsetzbare Methode zur Sicherung des weiblichen genetischen Materials etabliert.

Um die Kerne befruchteter Karpfeneier sicher lokalisieren zu können, wurden diese erst mit verschiedenen Fixierungsmethoden (Paraformaldehyd, Formalin) besser für eine Kernfärbung zugänglich gemacht. Für die Färbung selbst wurden sowohl DAPI als auch Hoechst 33342 als DNA-Farbstoff eingesetzt. Abbildung 17 zeigt die fixierten Eier im Mehrzell-Stadium (4-bis 32-Zell-Stadium), die für die Färbung zum Teil dechorioniert wurden. Aufgrund der starken Eigenfluoreszenz der Eier und der Zellen sind die DNA-Bestandteile bzw. die Kerne schwer abzugrenzen. Bei dechorionierten Eiern konnten jedoch kleinere Bereiche gefunden werden, die positiv für die Färbung waren und sich vom Hintergrund abhoben. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um Kerne, die sich in verschiedenen Stadien der Teilung, vor allem der Metaphase, befinden. Da sich die Zellen während dieser Entwicklungsphase mit sehr hoher Frequenz teilen, ist nur ein geringer Anteil der Zellkerne in der Interphase und damit der Kern mit Kernmembran sichtbar.

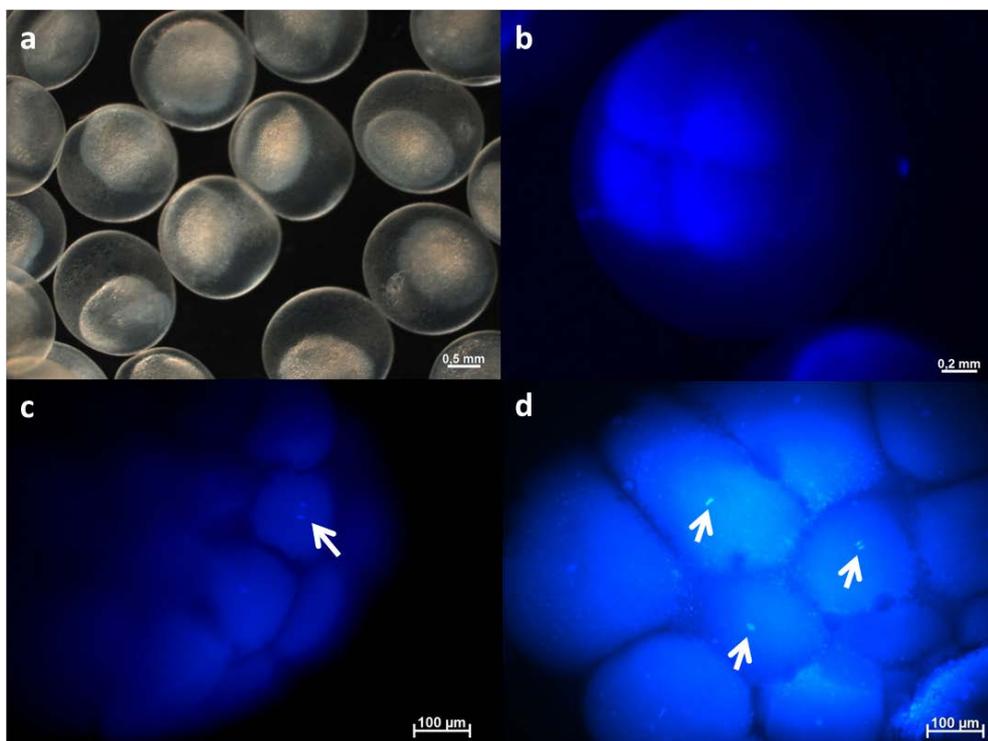


Abb. 17: Hoechst-Färbung fixierter befruchteter Karpfeneier. a) Mit Paraformaldehyd (PFA) wurden die Eier fixiert. b) PFA-fixierte Eier mit Chorion. c) und d) Bei einem dechorionierten und PFA-fixierten Ei sind in den Zellen einzelne Strukturen auszumachen, wobei es sich um Metaphaseplatten handeln könnte (Pfeile).

Die in der EMB hergestellten Haltekapillaren und Transferkanülen wurden genutzt, um Eizellen von zunächst Zebrafischen und später Karpfen nach den Protokollen von Calvi und Maise (1999) und Sun et al. (2005) zu manipulieren. Zunächst wurden die Fischeier im späten Blastozystenstadium (etwa 5-6 h nach Befruchtung) in Pronase-Lösung (1 mg/ml Pronase in Fisch Embryo Medium (FEM)) dechorioniert und anschließend der Eidotter von der Blastozyste mit Hilfe von Federstahlpinzetten und Pipetten getrennt. Dem Protokoll von Calvi und Maise folgend wurden die Zellen der Blastozyste danach in Dissoziationsmedium (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freies FEM) gegeben und 20 Minuten inkubiert (Abb. 18).

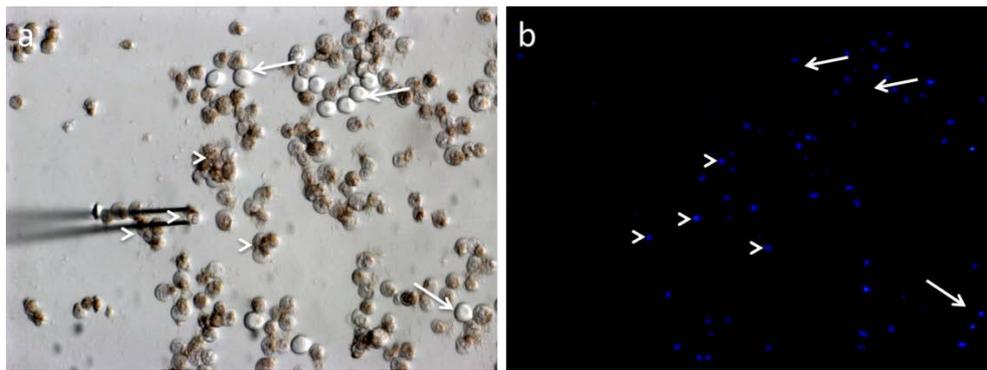


Abb. 18: Dissoziierte Zellen von *Danio rerio* werden mittels Kanüle aufgesaugt. a) Durchlichtbild. b) Hoechst-Färbung der Zellkerne. Die Hoechst-Färbung verdeutlicht, wo Zellkerne vorliegen und lässt dadurch Unterscheidungen von Zellen (Pfeilspitzen) zu anderen Partikeln, wie Dotterresten, Verschmutzungen oder ähnlichem zu (Pfeile). Protokoll nach Sun et al. (2005). Vergrößerungen: 225x.

Anschließend wurde der Calciumwert im Medium erhöht und schrittweise 1,4 M 1,2-Propandiol zum FEM zugegeben. Danach wurde die Suspension in „Cryostraws“ aufgezogen. Im Einfrierautomaten „IceCube“ wurden die Zellen sukzessive auf -80 °C heruntergekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Parallel wurden Zellen direkt in Zellkulturmedium (Dulbeccos modified eagle medium mit 15 % inhiertem fötalem Kälberserum) gegeben, auf Zellkulturschalen ausgesät und die morphologische Integrität geprüft. Dabei zeigte sich, dass Zellen bereits nach kurzer Zeit begannen, kleine Ausläufer, sogenannte Filopodien (Zellfortsätze) auszubilden. Zusätzlich wurden Versuche zur Kryokonservierung von vereinzelt Zellkernen mit frischen Zebrafischeiern durchgeführt. Das Blastoderm wurde wie bei Calvi und Maisse (1999) mit Hilfe einer Pipette vom Eidotter getrennt und in Holtfreter-Dissoziationslösung (Ca²⁺-freie Holtfreter Lösung mit EDTA versetzt) überführt. Die Zellen lagen nach etwa 10 Minuten dissoziiert vor, wurden zur besseren Vereinzeltung aber ebenfalls mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einer Glaskanüle vorsichtig hin- und her pipettiert, bis sie aufplatzten und den Kern entließen (Abb. 19).

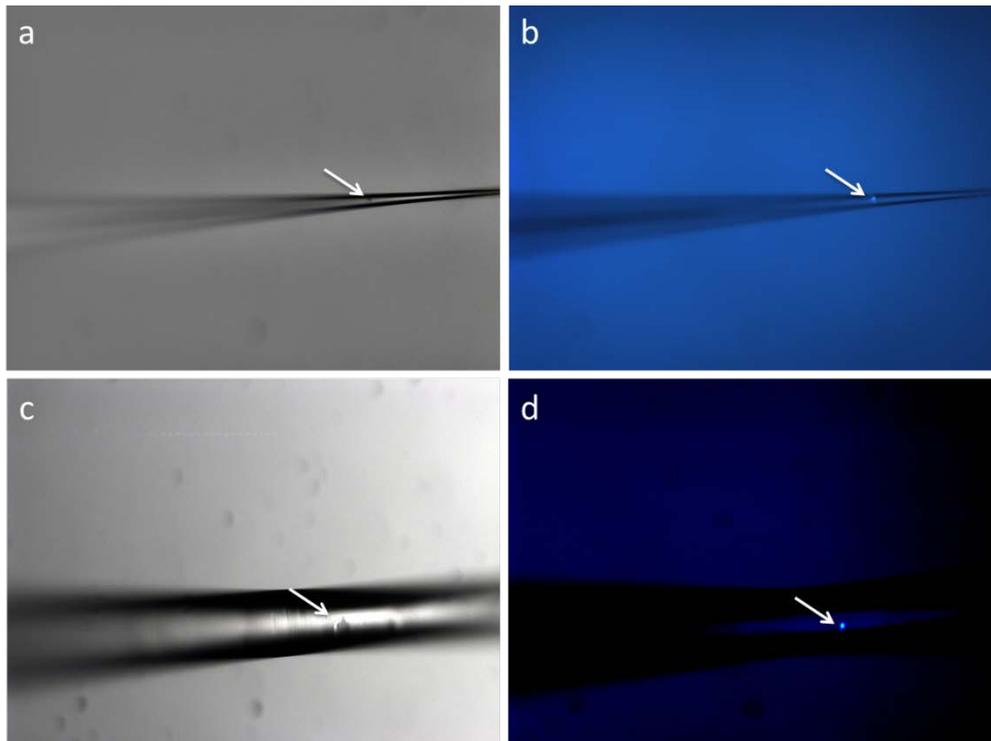


Abb. 19: Zwei unterschiedliche Zellen werden in eine Glaskapillare aufgenommen und zerplatzen dort (Pfeile, a und c). Dadurch wird der Zellkern frei und ist im Mikroskop durch die Hoechst-Färbung nachweisbar (Pfeile, b und d). Vergrößerungen: 225x.

Glaskanülen, die einen einzelnen Kern enthielten wurden eingefroren und sollten nach dem Auftauen hinsichtlich der Viabilität der Kerne untersucht werden. Allerdings konnten nach dem Auftauen die Kerne nur sehr selten wiedergefunden werden (Abb. 20), sodass ein Transfer vieler Kerne in entkernte Eizellen nicht praktikabel war. Für die praktischen Anwendungen in diesem Meilenstein ergab sich dadurch eine Fokussierung auf die Kryokonservierungsmethode nach Calvi und Maisse (1999), die anschließend in Meilenstein 4 umgesetzt wurde. Hierbei wurden Zellen von befruchteten Karpfeneiern ab dem späten Blastula-Stadium bis hin zu frühen Somitenstadien (8-Somiten) eingefroren. Hier liegt der Vorteil darin, dass stets einige tausend Zellen eingefroren werden und damit genügend Zellen für einen späteren Transfer zur Verfügung stehen.



Abb. 20: Vorbereitung von dechorionierten Zebrafischeiern im Blastula-Stadium für den Kerntransfer. a) Bei den dechorionierten Eiern muss die Zellmasse (Pfeile) vom Eidotter (Sterne) getrennt werden, damit die Zellen über die Glaskanüle aufgenommen und eingefroren werden können (b). c) Wiedergefundene Kerne aus der Kanüle können nach dem Auftauen über Propidiumiodid angefärbt werden.

2.5 Meilenstein 4 – Optimierung eines Kryokonservierungsprotokolls für befruchtete und unbefruchtete Kerne aus Karpfeneizellen und Testen der Qualität der konservierten und transferierten Eizellkerne durch Erzeugung und Aufzucht der befruchteten Eizellen

Dieser Meilenstein war zur verstärkten Recherche im Bereich der Entwicklung neuer Protokolle zum Kerntransfer von Eizellen und der Etablierung des Kerntransfers als Methodik vorgesehen. Dazu wurden zunächst embryonale Zellen des Zebrafisches (*Danio rerio*) im Blastula- bis Somitenstadium durch das Protokoll von Calvi und Maisse (1999) vereinzelt und eingefroren. Die Zellkerne müssen für den Transfer und das Einfrieren von Verunreinigungen wie Zytoplasma und Dotterresten weitestgehend befreit sein. Zusätzlich werden beim Einfrierprozess stets größere Mengen an Zellkernen benötigt, da beim Transfer in und aus Kryogefäßen einige Kerne verloren gehen können. Um eine größere und saubere Menge an Zellkernen gewinnen und verarbeiten zu können, wurde an der Fraunhofer EMB daher ein neues Protokoll etabliert. Dabei werden Eier vom Zebrafisch und vom Karpfen zunächst im befruchteten Blastulastadium mittels Enzymbehandlung (Pronase) vom Chorion befreit. Die dechorionierten Eier werden anschließend homogenisiert und die erhaltene Zell-Dotter-Suspension über einen Zentrifugationsschritt getrennt. Die Zellsuspension (Abb. 21) ist damit von ersten Verunreinigungen befreit und kann bei Bedarf über weitere Zentrifugationsschritte aufgereinigt werden.

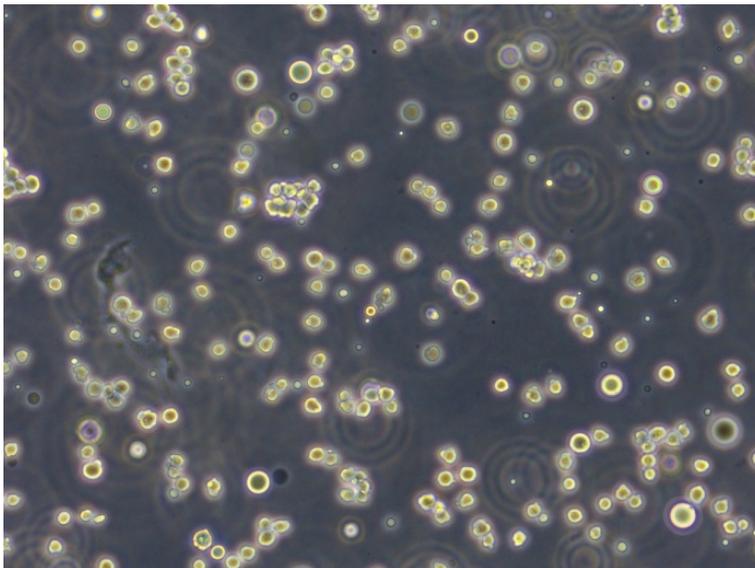


Abb. 21: Zellsuspension nach Dechorionierung und Homogenisierung von Karpfeneiern. Vergrößerung 320x.

Die Viabilität der noch vollständigen Zellen nach der Zentrifugation wurde mittels PI/FDA-Färbung bestimmt. Zu einem Großteil konnte die Viabilität der Zellen erhalten werden (Abb. 22), sodass sich diese Methode als geeignete Vorarbeit für einen späteren Kerntransfer eignen würde.

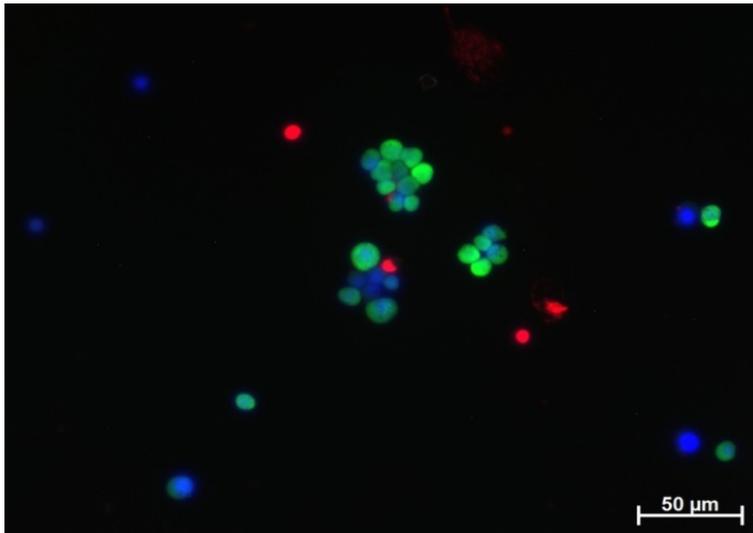


Abb. 22: PI/FDA/DAPI-Färbung von eingefrorenen und wieder aufgetauten Karpfenezellen. Der Großteil der Zellen ist nach dem Einfrieren noch vital erhalten (FDA-positiv, grüne Fluoreszenz). Einige wenige Zellen sind tot (PI-positiv, rote Fluoreszenz).

Um neben der Viabilität auch den Erhalt einer Funktionalität der eingefrorenen Zellen zu prüfen, wurden die aufgetauten Zellen in Zellkulturschalen kultiviert und beobachtet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Zellen nach einem Tag an der Oberfläche der Zellkulturschale anhafteten und Filopodien bildeten (Abb. 23). Dies kann als Beweis für eine aktive Migration durch den Umbau von Aktinfilamenten innerhalb der Zelle gedeutet werden, und zeugt somit von der Fähigkeit der Zelle, sich nach dem Auftauen bewegen und später vermutlich auch teilen zu können.

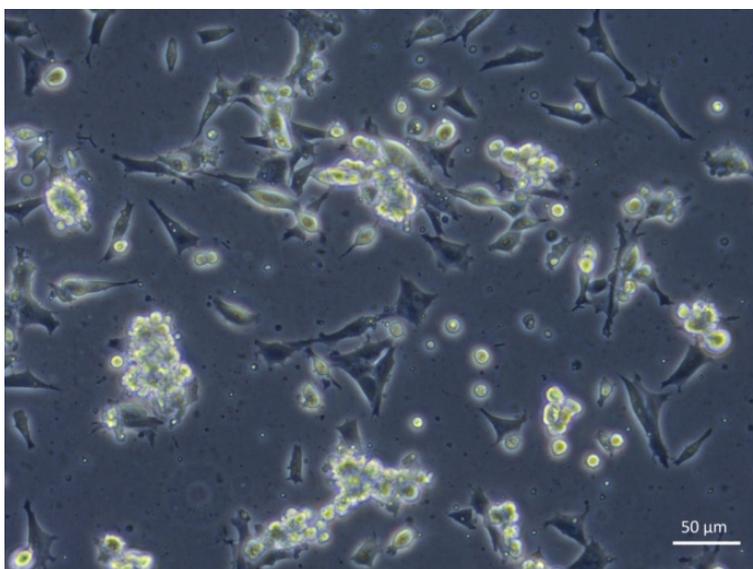


Abb. 23: Aufgetaute Karpfenezellen ein Tag nach der Aussaat in einer Zellkulturschale. Die Vitalität und erhaltene Funktionalität wird hier durch das Anwachsen der Zellen und der Ausbildung von Zellausläufern auf der Zellkulturplastik deutlich.

Um die Aufreinigung der Zellen so weit zu treiben, dass einzelne Zellbestandteile (Kerne, Mitochondrien) voneinander getrennt werden, wurden die in Suspension befindlichen Zellen in einem weiteren Verfahren lysiert und erneut zentrifugiert. Dabei wurden größere Zellkompartimente wie die Zellwand abgetrennt. Das Pellet bestand

nur noch aus Zellkernen und kleineren Zellbestandteilen, wie z.B. Mitochondrien. Um diese Bestandteile voneinander zu trennen, wurde mit Hilfe eines Sucrose-Gradienten eine Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) durchgeführt. Dabei sollten sich die verbliebenen Zellbestandteile, ihrer jeweiligen Dichte nach sortiert, in verschiedenen Schichten des Gradienten ansammeln, wobei sich die Zellkerne als schwerste Kompartimente zwischen den untersten Sucrose-Schichten befinden. Die oberen Schichten könnten demnach abgesaugt werden. Wie in Abbildung 24 dargestellt, konnten die Eizellkerne von den restlichen Zellbestandteilen getrennt werden, klebten jedoch durch die Sucrose zusammen. Da dies weitere Aufreinigungsschritte bedeuten würde und das gesamte Protokoll bereits sehr komplex ist, wurde im Hinblick auf ein möglichst einfach zu handhabendes Protokoll die DGZ als einzusetzende Methode im folgenden Meilenstein nicht weiter verfolgt, sondern das Protokoll nach Calvi und Maisse (1999) verwendet. Dank der Vorarbeiten mit Zebrafischeiern konnte dieses Protokoll sofort bei Verfügbarkeit von frischen Karpfeneiern auf die Zielart übertragen werden.

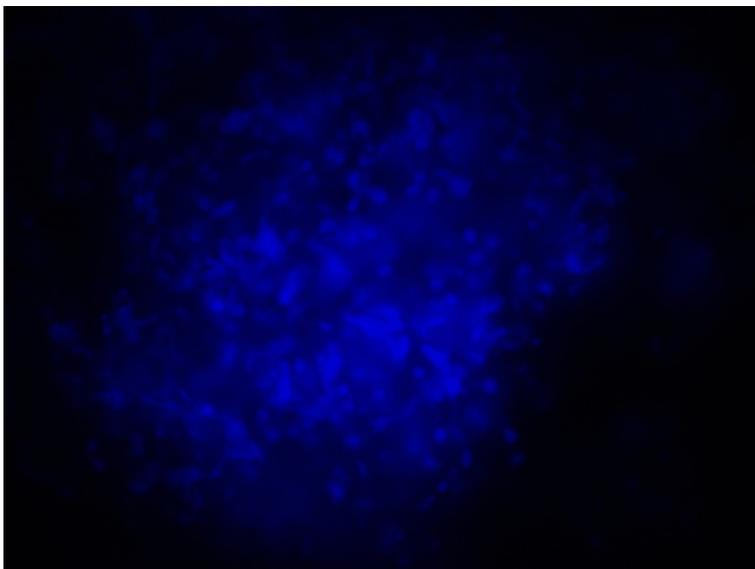


Abb. 24: Hoechst-Färbung von Eizellkernen eines dissoziierten befruchteten Zebrafischeis (Blastula-Stadium) nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die Eizellkerne sind in einer größeren Sucrose-Masse verklebt. Vergrößerung 400x.

Für die Erreichung des Ziels unbefruchtete Eizellkerne zu erhalten hätte ein neues Protokoll mit unbefruchteten Eiern etabliert werden müssen, da wie oben beschrieben die hierfür eigentlich vorgesehenen Methoden nicht anwendbar waren. Hier sind weitere Arbeiten nötig, die im Rahmen des Projektes jedoch nicht mehr bewerkstelligt werden konnten. Insbesondere ist es ein enormer zeitlicher Aufwand (lang andauernde Schulung zur sicheren Lokalisation der Eizellkerne, hoher händischer Aufwand mit technischen Hilfsmitteln) bis die Technik beherrscht wird. Die diskontinuierliche Verfügbarkeit von Karpfeneiern erschwerte zusätzlich die ausreichende Menge an Wiederholungsversuchen, sodass meist nur ein Versuch pro Probenahme möglich war. Im Frühjahr 2015, der letzten Saison während der Projektlaufzeit in der Eier erhältlich waren, wurde ferner dem Meilenstein 5 die höchste Priorität zugeteilt. Hierbei war das oberste Ziel die Sicherung der genetischen Information, welche durch die Kryokonservierung der Zellen aus befruchteten Karpfeneiern erreicht werden konnte. Nach Beendigung des Meilensteins 5 standen keine weiteren Karpfeneier zur weiteren Bearbeitung der unbefruchteten Eier mehr zur Verfügung (Ende der Saison). Aus demselben Grund konnten die Teilbereiche Transfer und Qualitätsabschätzung durch Erzeugung und Aufzucht der befruchteten Eizellen nicht mehr bearbeitet werden, da hierfür ebenfalls frische Eier hätten entkernt und verwendet werden müssen.

2.6 Meilenstein 5 – Gewinnung von Spermien und Eizellkernen von erhaltenswerten Karpfenrassen und deren Kryokonservierung

Der letzte Meilenstein diente der Sammlung von Karpfengameten und deren Kryokonservierung nach den zuvor etablierten Protokollen. Hierzu sollten möglichst viele Züchter in Deutschland zur Mitarbeit bewogen werden. Zunächst sollten diejenigen Stämme prioritär behandelt werden, die in einem vorigen vom BMELV geförderten Projekt als besonders erhaltenswürdig eingestuft wurden (Müller-Belecke et al., 2009). Um eine breite genetische Vielfalt zu gewährleisten, sollten möglichst aus jedem der in der Studie beschriebenen Cluster idealerweise drei, jedoch mindestens ein Karpfenstamm beprobt werden. Da keine genetischen Untersuchungen vorgesehen waren, konnte die Cluster-Zuordnung nur aufgrund der geografischen Lage vermutet werden. Sicherlich sind Stämme der Cluster 1 („führt vornehmlich die sächsischen Karpfenbestände zusammen“, aus Müller-Belecke et al. 2009) und 2 („beinhaltet vornehmlich hochrückige, bayrische Karpfenbestände“, aus Müller-Belecke et al. 2009, Beispiel Herkunft Aischgrund) unter den beprobten Betrieben. Ob das kleine Cluster 3 (Herkunft Aischgrund) erfasst wurde, kann aufgrund der Anonymisierung in beiden Projekten nicht genau abgeschätzt werden. Das kleine Cluster 4 kann allerdings aufgrund der geografischen Angabe im Bericht („Bestände aus dem Osnabrücker Raum“, aus Müller-Belecke et al. 2009) eher ausgeschlossen werden. Von den 113 in 2009 aufgeführten Zuchtbetrieben mit Laichfischbeständen (Müller-Belecke et al. 2009) wurden mit Hilfe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und Fischerei (IFI, Dr. Wedekind) und der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Referat Fischerei (Dr. Füllner) insgesamt 78 Betriebe in Bayern und 30 Betriebe in Sachsen sowie 2 Betriebe in Schleswig-Holstein und je 1 Betrieb in Baden-Württemberg, Brandenburg und Niedersachsen identifiziert, angeschrieben und schriftlich oder per Telefon kontaktiert. Insgesamt gab es 1/3 an Rückläufern, sodass trotz mehrmaligen Kontaktierens und Bekanntmachungen über Tagungen (Dr. Rakers in Starnberg und Büsum, Dr. Gebert in Königswartha) nur 11 Züchter für die Probenahme gewonnen werden konnten. Vielfach wurde als Grund der Ablehnung seitens der Züchter genannt, dass keine eigenen Nachzuchten generiert werden, die Zahl der Nachzuchtbetriebe seit 2009 also weiter geschrumpft ist. Dennoch war die Zahl an Züchtern für den zeitlichen Rahmen der Probenahmen (natürliche Karpfenreife im Jahr 2015 von Ende April bis Mitte Juni) und die geplanten Arbeiten angemessen, da es insbesondere im Norden im Frühling 2015 nicht warm genug wurde um eine Reifung der Elterntiere zu induzieren und sich daher Termine immer wieder verschoben. Hierbei wurde der Einfluss der lokalen Bedingungen sehr deutlich. Die erste Probenahme konnte bereits Ende April in Bayern durchgeführt werden, da sich die Teiche aufgrund der warmen Bedingungen früh aufwärmten. Im Norden waren insbesondere die Monate Mai und Juni vergleichsweise kühl, sodass sich die Laichreife der Tiere stark verzögerte. Bei einem Züchter in Schleswig-Holstein konnten aus diesem Grund gar keine Proben gewonnen werden. Insgesamt standen im gesamten potentiellen Laichreife-Zeitraum etwa 60 Tage zur Verfügung. Pro Züchter wurden 2 Tage Probenahme veranschlagt, sodass bei idealem Ablauf ohne Pause maximal 30 Züchter hätten besucht werden können. Da es aber durch verschiedene Gründe (Wetterlage und -veränderungen, Tiere laichen nicht ab, Wege zwischen den Züchtern teilweise sehr lang, hohes Verkehrsaufkommen, technische Probleme, etc.) zu Verzögerungen im Ablauf kam, muss hier künftig ebenfalls eine Pufferzeit eingebaut werden, sodass nach unserer Einschätzung in Zukunft maximal 15 Züchter pro Laichsaison mit dem geplanten Personalaufwand (1 Fahrer, 1 Wissenschaftler, 1 technischer Angestellter) besucht werden können. Durch die Einplanung des mobilen Labors konnte etwas Pufferzeit eingespart werden, da die Proben immer direkt vor Ort ohne Zeitverluste verarbeitet werden konnten. Mit den kooperierenden Betrieben wurden Materialüberlassungsvereinbarungen getroffen, in denen die weitere Verwendung der Proben geregelt wurde. Demnach bleibt der

Züchter Eigentümer seiner Proben, er stellt jedoch die Hälfte der Proben für wissenschaftliche Forschungszwecke an der EMB zur Verfügung. Er kann für die Dauer des Projektes und darüber hinaus jederzeit Zugriff auf seine Proben nehmen. Die EMB wird die Proben, solange es möglich ist und Kapazitäten vorhanden sind, innerhalb ihrer CryoBrehm-Zellbank aufbewahren.

Über ein kleines Datenblatt wurden durch Interviews mit den Züchtern am Tag der Probenahme weitere Informationen zum Betrieb generiert. So lag die Größe der gehaltenen Laichfischbestände bei Stückzahlen zwischen 20 bis 1000 adulten Tieren. Die 5 Laichfische von Züchter DSH01 (Tab. 4) sind lediglich Restbestände, die nur noch nach Bedarf eingesetzt werden. Die Zuchtbetriebe wiesen eine recht unterschiedliche Betriebsstruktur auf, wobei es sich meistens um eher kleine Betriebe mit Karpfenzucht als Nebenerwerb und kleiner Teichfläche handelt. Nur ein besuchter Betrieb führt die Karpfenteichwirtschaft im Vollerwerb. Die Teichflächen der Betriebe reichten von 1,6 ha bis hin zu 1500 ha (Tab. 4). Genauere Angaben über die Basispopulation der Laichfischbestände wurden nicht erhoben. Der Großteil der Züchter verfügte jedoch über ein viele Jahre angesammeltes Know-how zur Bewirtschaftung der von ihnen gehaltenen Karpfen. Häufig wurden auch die beprobten Laichfischbestände bereits seit Jahrzehnten im Betrieb gehalten. Aufzeichnungen zu bestimmten Linien oder anderen zuchtrelevanten Informationen wie Züchtungsarbeit oder Zuchtfortschritt konnten jedoch nicht eingesehen werden, oder werden vom Züchter nicht durchgeführt. Ebenso wurde während der Probenahmen deutlich, dass es für den Züchter meist ausreichend war nur wenige Laichtiere zu verpaaren, da bei Karpfen sehr hohe Nachkommenzahlen generiert werden können. So wurden in vielen Fällen nur 1-2 Rogner mit einigen Milchnern verpaart. Die nach allgemeinen Züchtungsempfehlungen (FAO 1981; Hallermann 2003) aufrecht zu erhaltenen effektiven Populationsgrößen von mindestens 50 Individuen wurde deswegen häufig nicht erreicht. Meist gaben die Züchter an, aus wirtschaftlichen Gründen keine große Zahl an Laichfischen vorhalten zu können. Dies deckt sich mit den gefundenen Aussagen der Erhebung von Müller-Belecke et al. (2009).

Von den elf Laichfischbeständen waren 9 Bestände ausschließlich mit Spiegelkarpfen besetzt, nur zwei Betriebe wiesen neben Spiegelkarpfen noch Schuppenkarpfen (Wildkarpfen) als Laichfischbestände auf.

Nummer	Anzahl Laichfische	Teichfläche in ha	Cluster (geografisch*)
DBY02	30-40	k. A.	2
DBY03	ca. 120	18	2
DBW01	10-20	40	keine Zuordnung
DSN01	100	132	1
DSN02	120	250	1
DSN04	20	3,5	1
DBB01	1200	1500	1
DSH01	5	1,6	2
DSH02	k. A.	20	2
DNI01	10-20	86	2

Tabelle 4:
Anonymisierte Liste der besuchten Zuchtbetriebe mit Laichfischbesatz

*vermutete Zuordnung des Clusters nach geografischen Angaben aus Müller-Belecke et al. 2009

Bis auf eine Probenahme bei einem Züchter in Schleswig-Holstein konnten bei allen Zuchtbetrieben Proben von männlichen Laichfischen gewonnen werden. Insgesamt konnten somit von 77 unterschiedlichen Männchen 453 Einzelspermaproben generiert und kryokonserviert werden (Tabelle 5). Bei der Hälfte der Probenahmen ließen sich keine weiblichen Gameten gewinnen und bei einer Probenahme in Niedersachsen kam es zudem durch einen Stromausfall zu einem Verlust von weiteren Proben zweier Weibchen, sodass nur 7 Weibchen insgesamt für die Kryokonservierung zur Verfügung standen. Gameten dieser Weibchen, darunter auch ein Schuppenkarpfen-Weibchen, wurden im mobilen Labor mit frischen Spermien befruchtet und Zellen 18 h nach der Befruchtung (frühes Somitenstadium) nach dem etablierten Protokoll eingefroren (Abb. 25). Somit konnten insgesamt 42 Einzelproben weiblicher Eizellkerne im CryoBrehm eingelagert werden. Bis auf den Zuchtbetrieb DBW01 wurden jeweils nur eine Zuchtlinie pro Züchter (mit mehreren Männchen) beprobt. DBW01 wies neben einer Spiegelkarpfenlinie noch eine Schuppenkarpfenlinie auf. Insgesamt konnte somit das Ziel, mindestens einen Stamm pro Cluster in 25 Einzelproben zu kryokonservieren für die Cluster 1 und 2 für die Spermaproben realisiert werden. Ob sich unter den beprobten Betrieben auch der Betrieb aus Cluster 3 befand, kann nicht abschließend beurteilt werden, da eine genetische Analyse nicht vorgesehen war. Für das Cluster 4 kann die Maßgabe aufgrund der geografischen Angabe in Müller-Belecke et al. (2009) ausgeschlossen werden. In unserem Vorhaben war kein Betrieb aus dem Osnabrücker Raum beteiligt. Aus Ermangelung an weiblichen Individuen konnte das Ziel 25 Einzelproben an Kernen einzulagern für keines der Cluster erreicht werden.

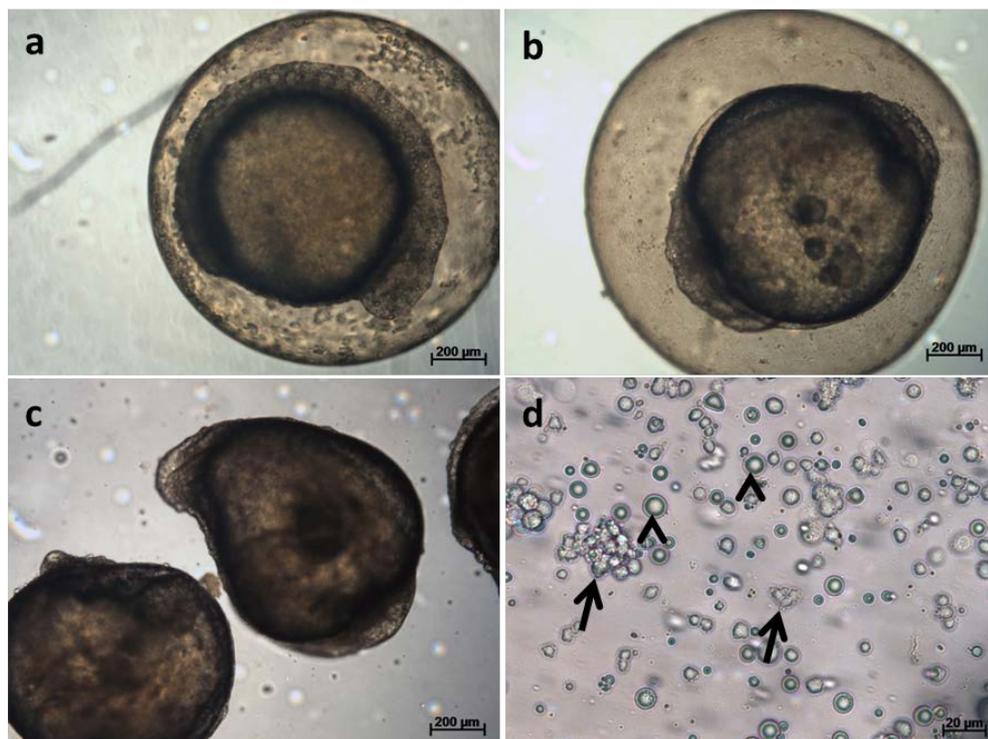


Abb. 25: Dechorionierung und Zellvereinzelung nach Calvi und Maisse (1999). a) Schuppen- und b) Spiegelkarpfen 18 h nach der Befruchtung. Beide Eier sind im Somitenstadium. Die Eier wurden 18 h nach Befruchtung mittels des Enzyms Protease dechoriniert (c) und anschließend in Embryomedium ohne Calcium und Magnesium dissoziiert. d) Die Zellen (Pfeile) wurden durch Zentrifugieren von den Fetttropfen (Pfeilspitzen) des Dotters getrennt und anschließend eingefroren.

Züchter	Anzahl Männchen	Anzahl Spermaproben	Anzahl Weibchen	Anzahl Proben Eizellkerne
DBY02	12	55	1	6
DBY03	10	68	1	6
DBW01	10	72	3	9
DSN01	5	30	-	-
DSN02	10	65	1	18
DSN04	10	34	-	-
DBB01	10	78	-	-
DSH01	3	10	-	-
DSH02	-	-	-	-
DNI01	7	41	1	3
Gesamt	77	453	7	42

Tabelle 5:
Daten zur Beprobung
bei den
Zuchtbetrieben

2.7 Über das Projekt hinaus relevante Erkenntnisse

Durch Gespräche mit den Züchtern vor Ort können an dieser Stelle einige Einschätzungen zu Entwicklungen und Trends in der deutschen Karpfennachzucht gegeben werden:

Die Karpfenteichwirtschaft ist geprägt durch ihre regionale Fischerzeugung und Verarbeitung vor Ort und wird hierfür von den Verbrauchern sehr geschätzt. Die Teichwirte identifizieren sich mit dieser Regionalität und schaffen durch ihre sehr nachsichtige und nachhaltige Zucht einen in der Öffentlichkeit meist unterschätzten kulturhistorischen Wert. Jedoch üben globale und mit steigender Intensität verlaufende Konzentrationsprozesse in der Agrarwirtschaft ihren Einfluss sehr deutlich auch auf die Karpfenzucht aus. Bei der starken Konkurrenz aus Fernost und dem damit verbundenen Preisdruck sind höhere Absatzmengen nicht zu erwarten.

Im Bereich der Karpfenteichwirtschaft ist die Entwicklung eher stagnierend bzw. sogar rückläufig. Viele der Karpfenzüchter, die noch Laichfische vorhalten, sehen sich zunehmend mit ungünstigen Rahmenbedingungen konfrontiert. Diese sind insbesondere durch Naturschutzauflagen, das teils abnehmende Interesse an Karpfen als Speisefisch und regional durch das Auftreten von Fischkrankheiten (u.a. Koi-Herpes-Virose, v. a. in Sachsen) bedingt, andererseits wird die Aufzucht eigener Brut aus ökonomischen Aspekten häufig eingestellt oder zum Teil nur noch aus rein wissenschaftlichem Interesse durchgeführt. Vielfach verschlimmern auch Schäden insbesondere durch Räuberfraß durch fischfressende Vögel wie Kormorane und Graureihern sowie durch Fischotter die wirtschaftliche Situation der Züchter, die versuchen, diesen Verlusten durch Bruthäuser oder regulierten Abschuss entgegenzuwirken. Neben der insgesamt schwierigen wirtschaftlichen Situation der Karpfenteichwirtschaft führen diese genannten Probleme mittlerweile zur Aufgabe von Betrieben bzw. von Betriebsteilen.

Deshalb wird es vermutlich in den kommenden Jahren einen weiteren Rückgang an Karpfensatzbetrieben mit eigenen Nachzuchten geben. In den Regionen Aischgrund, Lausitz und Holstein konnten wir jedoch als regionale Ausnahme erleben, dass die Karpfenzucht integraler Bestandteil der regionalen Identifikation ist. Dies wird nicht zuletzt durch die erfolgreiche Vermarktung im Rahmen der g.g.A. (geschützte geografische Angabe) von Aischgründer, Oberpfälzer und Holsteiner Karpfen vermittelt. Doch auch hier sind viele Züchter auf die Erzeugung von Nebenfischen in Karpfenteichen angewiesen, um wirtschaftlich bleiben zu können.

Daher ist durch dieses Projekt nicht nur ein wichtiger Beitrag zum Erhalt der bisher vorhandenen Laichfischbestände geleistet worden, vielmehr zeigte sich das Potenzial der Kryokonservierung für künftige Zuchtziele (verschiedenster Rassen) zur Steigerung der Leistungsfähigkeit und Qualität der Nutzfische. Seitens der Züchter wurde auch nach Möglichkeiten der Kryokonservierung weiterer Arten (u.a. Schleie, Zander) gefragt. Hier gibt es weiteren Bedarf, auch jetzt schon zu Züchtungszwecken zumindest Sperma einzufrieren. Durch die Kryokonservierung können Beschränkungen durch unterschiedliche Laichzeiten der einzelnen Bestände überwunden werden und genügend Nachkommen für die dauerhafte Aufrechterhaltung effektiver Populationsgrößen aufbewahrt werden.

Weiterhin sind während der Projektlaufzeit weitere, internationale Kooperationen entstanden, die sich vor allem auf die Möglichkeiten zur Standardisierung der Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen (EU-COST AQUAGAMETE) und die Erforschung des Kerntransfers somatischer wie embryonaler Kerne in Fischeier beziehen. Im Rahmen einer Short-Term Scientific Mission von Dr. Sebastian Rakers an das INRA in Rennes, Frankreich konnten erste internationale Zusammenarbeiten auf diesem Gebiet gestartet werden. Hier soll künftig die Zusammenarbeit intensiviert werden, wobei als Forschungsobjekte neben dem Karpfen Goldfische und Zebrafische in Frage kommen. Die Europäische Kommission sieht die Kryokonservierung von Keimgewebe nicht nur als nützliches Werkzeug zur Erhaltung und dem Management genetischer Diversität an, sondern auch als Möglichkeit zur Re-Etablierung von

Zuchtlinien. Dabei ist das Einfrieren von Sperma eine kosteneffiziente Methode um genetische Variation zu sichern (European Commission, 2013). Um die Kryokonservierung als Methodik zu verankern, müssen jedoch mehr ökonomische Informationen einfließen. Die Kosten und Nutzen von Kryokonservierung zur Bewahrung von bedrohten und gefährdeten Arten zu evaluieren, birgt ein großes ökologisch-ökonomisches Potential (Caffey und Tiersch, 2012).

3 Konsequenzen für ein sich anschließendes weiteres Vorhaben

Die Grundlagen für den Aufbau der erweiterten Zellbank sind innerhalb der dreijährigen Laufzeit des Modell- und Demonstrationsvorhabens geschaffen worden und haben darüber hinaus Bestand. Erste Kooperationsvereinbarungen mit Züchtern, Forschungs- und Netzwerkpartnern garantieren die Zusammenarbeit über das Ende der Projektlaufzeit hinaus. Der Abschluss weiterer bilateraler Vereinbarungen ist aufgrund der internationalen Kooperationen zu erwarten. Die Erhaltung seltener Karpfenstämme und weiterer, bestandsgefährdeter Rassen benötigt jedoch konsequente und dauerhafte Maßnahmen. Dazu muss auch für den Züchter die Haltung von Laichfischen wieder attraktiv werden. Aus Sicht der Kryokonservierung könnte hier durch eine bundesweite Züchterberatung und dem Angebot einer Züchterreserve beigetragen werden. Durch den intensiven Austausch von Züchtern, Fischereiverbänden und –behörden und den Forschungsinstituten wäre es möglich, ein zeitgemäßes Erhaltungszuchtprogramm seltener Karpfenlinien (ähnlich dem Erhaltungsprogramm seltener Nutztierassen, z.B. die GEH) zu initiieren. Dabei kann die erweiterte Zellbank für Karpfenstämme als Grundlage dienen.

Die langfristige Absicherung der für den Fortbestand einer Zellbank zu leistenden fachlich-inhaltlichen Arbeiten kann nur durch die Unterstützung des CryoBrehm und die Verstetigung einer Forschungsstelle im CryoBrehm gewährleistet werden. Die künftige monetäre Unterstützung der Forschungspartner und Züchter über öffentliche Mittel ist durch den Charakter der Gemeinnützigkeit ihrer Arbeit in Bezug auf die Erhaltung aquatischer genetischer Ressourcen gerechtfertigt und für die dauerhafte Sicherstellung der am Standort Lübeck zu leistenden Erhaltungs- und Dokumentationsarbeiten notwendig. Ebenso sollten die entstandenen Netzwerkstrukturen für künftige Arbeiten erhalten bleiben. Die Pflege der zurzeit sehr guten Züchterkontakte bildet die Basis für eine erfolgreiche Erhaltungsarbeit. 11 von vermutlich noch rund 90 Züchtern sind bereits integriert, in Folgeprojekten könnten sicherlich aufgrund der positiven Erfahrungen in diesem Projekt weitere Züchter gewonnen werden.

Wichtige Maßnahmen in der Zukunft wären die Durchführung bundesweiter Züchterworkshops zum Thema Sicherung aquatischer genetischer Ressourcen, um die Züchter einerseits umfassend über die Technologien zu informieren und andererseits in die Umsetzung angepasster Sicherungsprogramme wie beispielsweise die Schaffung einer „Nationalen Kryoreserve“ zu integrieren.

Die seit vielen Jahren bestehende Kontinuität der Strategie des Sammelns und Bewahrens verschiedener Wildtierproben und der praktizierten Nutzungsarbeit für Stamm- und Progenitorzellen der Zellbank CryoBrehm bildete die essenzielle Grundlage für die im Rahmen des Modellvorhabens erzielten Ergebnisse zur Bewahrung der biologischen Vielfalt der Karpfenstämme *ex situ*.

Die Aktivitäten können bei entsprechender Förderung intensiviert und ausgeweitet werden, sodass weitere, auch andere Fischarten innerhalb des CryoBrehm archiviert werden könnten. Bestrebungen für eine Zellbank aquatischer genetischer Ressourcen gibt es national wie international (z.B. EU-COST AQUAGAMETE). Es wäre daher ratsam, die Anstrengungen konstruktiv auf verschiedenen Ebenen zu bündeln. Verbindliche Vereinbarungen zwischen Züchtervereinigungen und Besamungsorganisationen sowie weiteren Beteiligten (Wissenschaft, Verwaltung) wären nötig, um eingelagertem Material (Sperma, Embryonen, Eizellen bzw. somatischen Zellen) den Status einer „Nationalen Kryoreserve“ zu verleihen.

Die Ergebnisse der Forschungsarbeiten zur Erhaltung der Karpfendiversität bilden aber auch eine gute Grundlage für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen:

- Weiterführende Optimierungen der in diesem Projekt etablierten Protokolle sind hinsichtlich der weiblichen Genetik nötig. Hierbei sollten insbesondere Alternativen zum Einfrieren von unbefruchteten Eizellkernen gefunden werden.
- Die genetische Charakterisierung von verschiedenen Karpfenstämmen zweifelhafter Herkunft könnte durch den Einsatz von Mikrosatelliten durchgeführt werden. Auf diese Weise erhielte man zahlreiche Genotypen und damit Identitätsnachweise für die Charakterisierung der genetischen Vielfalt der Karpfen.
- Die Sicherung genetisch unterschiedlicher Stämme könnte zum Erkenntnisgewinn von Krankheitsausbrüchen (v.a. in Sachsen, KHV) beitragen und dabei helfen genetische Vielfalt auch im Hinblick auf Resistenzen zu fördern. Der KHV-Virus stellt nach wie vor eine der Hauptgefahren für einen vollständigen Verlust von Laichfischen dar. Hier sind insbesondere Forschungen zu Virusdetektion, -replikation und Impfschutz nötig. Der Genetik der verschiedenen Karpfenstämme könnte hierbei eine entscheidende Rolle zukommen.
- Nach mündlicher Aussage des Geschäftsführers eines Industriepartners aus Norwegen werden dort bis zu 50 Lachs-Männchen besonders guter Zuchtlinien (es gibt nur wenige unter den 450 Linien) pro Jahr beprobt, um ausreichend (80-90%) genetische Biodiversität zu generieren. Hier wäre es interessant, inwiefern dies auch bei Karpfen möglich ist, um eine ausreichende genetische Biodiversität zu gewährleisten. Ziel wäre zunächst die Einlagerung von Spermien von mindestens 25 unverwandten Vatertieren aller heimischen gefährdeten Karpfenstämme, welche die genetische Breite der Gesamtpopulation repräsentieren.
- Entlang der Entwicklungsstadien bei der Karpfenaufzucht gibt es einige Optimierungsmöglichkeiten, zum Beispiel bei der Artemienanzucht für die erste fressfähige Karpfenbrut oder bei der Abtrennung der Eischalen von der geschlüpften Brut zur Vermeidung von Kontaminationen.
- Durch die verstärkte Erzeugung traditioneller Nebenfische, wie Schleie, Wels, Hecht oder Zander gibt es seitens der beteiligten Zuchtbetriebe ebenfalls Interesse an einer Sicherung dieses genetischen Materials, insbesondere der Spermien für Nachzuchtprogramme.
- Die Akzeptanz und das Bewusstsein für den Nutzen der Kryokonservierung aquatischer Nutztiere muss verstärkt geschaffen werden. Neben den Vorteilen durch den unproblematischen weltweiten Versand von Fischspermien und Erhaltung der Diversität verschiedener Stämme, spielen auch ökonomische Aspekte eine zunehmend wichtige Rolle für den Züchter. In anderen Teilen der Landwirtschaft hat sich die Nutzung eingefrorener Spermien längst etabliert. So wurden beispielsweise Ende der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts weltweit mehr als 250.000.000 Spermien-Chargen von genetisch als besonders wertvoll erachteten Bullen eingefroren. Mit diesen Spermien wurden mehr als 100.000.000 Kühe besamt (Thibier & Wagner 2002).
- Generell werden häufig nur wenige Laichfische eingesetzt, da aufgrund der hohen Nachkommenzahlen die Aufrechterhaltung von effektiven Populationsgrößen von mindestens 50 möglichst unverwandten Tieren (FAO, 1981, Müller-Belecke et al. 2009) nicht als notwendig erachtet wird, oder sich vordergründig wirtschaftlich nicht rentiert. Die Vorbereitung von Ablichteichen und Ablichtsubstrat für zusätzliche Elternfische, deren Nachkommen nicht zwangsläufig für Eigenbesatz oder Vermarktungszwecke gebraucht werden, ist flächen- und arbeitsintensiv. Deshalb setzen Züchter nur

wenige Elterntiere für die Bereitstellung der wirtschaftlich benötigten Setzlinge ein. Dieser zusätzliche Aufwand ist jedoch für die Aufrechterhaltung hoher genetischer Diversität unumgänglich.

- Eine Verarmung der in Form von Laichfischbeständen vorliegenden genetischen Diversität droht unter Umständen durch die vermehrte Nutzung oft ausländischer Laichfischbestände, da mittel- und langfristig Betriebsaufgaben oder Umstrukturierungen infolge mangelnder Wirtschaftlichkeit auftreten können. Dadurch kann der Verlust genetischer Ressourcen verstärkt werden. Aus ökologischer und züchterischer Sicht wäre daher die dauerhafte Erhaltung möglichst vieler Laichfischbestände in Deutschland wünschenswert und sollte unterstützt werden.

4 Erfolgskontrolle über die Einhaltung des Finanzierungs-, Zeit- und Arbeitsplans

Mit dem Zuwendungsbescheid vom 17.09.2012 des Projektträgers Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) erhielt die Fraunhofer Einrichtung für Marine Biotechnologie (EMB) die für das Projekt vorgesehene Vollfinanzierung als nicht rückzahlbare Zuwendung aus den Haushaltsmitteln der Bundesrepublik Deutschland auf Grundlage der „Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV, heute BMEL) zur Förderung von Modell- und Demonstrationsvorhaben im Bereich der Erhaltung und innovativen nachhaltigen Nutzung der Biologischen Vielfalt“ vom 01.08.2012. Mit dem Thünen-Institut für Fischereiökologie (TI-FOE) wurde vorab am 01.09.2012 eine Kooperationsvereinbarung getroffen, wonach das FOE die Fraunhofer EMB bei der Gewinnung von Karpfenspermien und Karpfeneiern kostenfrei unterstützt. Dem FOE entstanden dadurch keine zusätzlichen Kosten.

Nach Arbeitsgesprächen im Oktober 2012 in Lübeck wurden Veränderungen in der Mittelbewilligung vereinbart. Der daraufhin am 05.11.2012 seitens der Fraunhofer EMB eingereichte Änderungsantrag zur Umwidmung von Mitteln aus der Position „Material“ in Position „Vorhabensspezifische Abschreibungen“ führte zum Abschluss eines am 28.11.2012 erhaltenen Änderungsbescheid des Projektträgers. Weiterhin wurde der Beschaffung einer 3D-Software aus Materialmitteln am 30.07.2013 zugestimmt. Der Antrag einer Mittelaufstockung aus Gründen gestiegener Gemeinkostensätze der Fraunhofer EMB wurde am 27.02.2014 abgelehnt, da dies vorab und unverzüglich hätte angezeigt werden müssen. Die Arbeiten wurden dennoch in der Fraunhofer EMB unter erheblichen finanziellen Anstrengungen erfolgreich fortgesetzt. Ein weiterer Änderungsbescheid erging am 03.11.2014 aufgrund der vom Fraunhofer EMB angezeigten Engpässe bei der Bereitstellung von biologischem Probenmaterial und der daraus resultierenden, im Haushaltsjahr 2014 nicht verbrauchten Mittel, die zusätzlich im Jahr 2015 zur Verfügung gestellt wurden. Ein letzter Änderungsbescheid erfolgte dann am 15.04.2015 aufgrund des Einsatzes des mobilen Labor-LKW der Fraunhofer EMB für die Probenahme bei den Züchtern. Hierzu wurden Mittel aus Position Material in die Position „Reisen“ umgewidmet. Die Gesamtsumme aus den Angaben des Zuwendungsbescheides blieb auch nach den Änderungsbescheiden unverändert.

Die im Zuwendungsbescheid entsprechend Punkt 9 festgelegte verwaltungsmäßige und fachliche Berichtspflicht wurde vom Projektleiter wahrgenommen. Der realisierte Arbeitsstand des Projektes und die daraus resultierenden Auswirkungen auf den weiteren Arbeitsverlauf wurden seitens des Projektleiters in den jährlichen Zwischenberichten dargestellt und bei Nachfragen seitens des Projektträgers zeitnah kommuniziert.

Die Aufgaben eines Projektcontrollings sowie der Rechnungsprüfung wurden seitens der Fraunhofer Zentrale wahrgenommen. Die Vorgaben des Finanzierungsplanes wurden abschließend eingehalten.

Bezüglich des Zeit- und Arbeitsplans kann folgendes festgehalten werden:

Meilenstein 0 – Gewinnung von Karpfenspermien und befruchteten sowie unbefruchteten Karpfeneizellen

Karpfenspermien konnten in genügender Menge für alle weiteren Meilensteine gewonnen werden. Karpfeneier von unserem Kooperationspartner in Ahrensburg wurden erst in den letzten 1,5 Projektjahren in größeren Mengen gewonnen, Probleme entstanden hier vor allem aufgrund geringer personeller Kapazitäten sowie Problemen bei der künstlichen Reifung der Weibchen. Trotz intensiver Bemühungen, Proben von

anderen Karpfenzüchtern zu erhalten, blieb der Engpass bestehen. Wie oben erläutert, wurde daraufhin für Vorarbeiten und Technikerlernung auf Eier anderer, verwandter Cypriniden (Zebrafisch, *Danio rerio* und Tilapia, *Oreochromis niloticus*) zurückgegriffen. Von diesen beiden Arten konnte zusammen zu jeder Zeit genügend Material für die folgenden Meilensteine gewonnen werden.

Meilenstein 1 – Anpassung der Kryokonservierungsprotokolle von Karpfenspermien

Die Ziele des Meilensteins konnten innerhalb des vorgesehenen Zeitrahmens vollständig erreicht werden. Es wurde ein standardisiertes Protokoll zur Kryokonservierung von Karpfenspermien etabliert.

Meilenstein 2 – Testen der Qualität der konservierten Spermien durch Erzeugung und Aufzucht von Karpfenbrut

Die Qualität der konservierten Spermien war zufriedenstellend und für die Befruchtung frischer Karpfeneier geeignet. So konnten bis zu 99% Befruchtungserfolg erzielt werden. Die anschließende Aufzucht der Karpfenbrut war aufgrund schlechter Wasserqualitäten und anderer Umweltparameter sowohl an der Fraunhofer EMB als auch bei unserem Kooperationspartner schwierig. Hierbei wurde ebenfalls festgestellt, dass insbesondere die Qualität der Eier künstlich induzierter Weibchen offenbar leidet und sich dies auf die Entwicklung der Eier und Larven negativ auswirkt. Dennoch konnte zumindest 1 Mal erfolgreich eine Charge Eier mit kryokonserviertem Sperma befruchtet werden. Die daraus entstandenen Nachkommen befinden sich bis heute in den Aquarienanlagen der EMB.

Meilenstein 3 – Anpassung des Protokolls für den Kerntransfer in entkernte Karpfeneizellen

Ein erstes Teilziel im Meilenstein 3 bestand darin, das weibliche genetische Material durch Kryokonservierung zu sichern. Im zweiten Schritt sollte dieses dann in frische, entkernte Karpfeneier transferiert werden. Vor allem durch die Verwendung des alternativen Materials von Zebrafisch und Tilapia konnte ein auch in der Praxis leicht durchzuführendes Protokoll zur Gewinnung von Zellen befruchteter Karpfeneier entwickelt werden. Das Teilziel, unbefruchtete Eizellkerne zu gewinnen, konnte aufgrund der Probleme bei der Lokalisation und Anfärbung des Eizellkerns nicht erreicht werden. Das im Antrag formulierte Ziel eines Kerntransfers für Fischeier ist wissenschaftlich hochrelevant, allerdings aus unserer Sicht für die Praxis bisher noch nicht einsetzbar, da hier ein hoher technischer Aufwand und eine sehr spezifische Expertise benötigt werden. Dieser Aufwand wurde vor Beginn der Arbeiten unterschätzt.

Meilenstein 4 – Optimierung eines Kryokonservierungsprotokolls für befruchtete und unbefruchtete Kerne aus Karpfeneizellen und Testen der Qualität der konservierten und transferierten Eizellkerne durch Erzeugung und Aufzucht der befruchteten Eizellen

Die Qualität der eingefrorenen Zellen aus befruchteten Karpfeneiern konnte mittels Vitalitätsuntersuchungen positiv bewertet werden. Die Kerne aus diesen Zellen könnten in Folgeprojekten als Material für einen Kerntransfer eingesetzt werden. Dieses Teilziel wurde allerdings im Rahmen des Projektes nicht mehr erreicht. Dies lag wie bereits dargelegt an der geringen Menge verfügbarer Karpfeneier und der Fokussierung der Arbeiten zum Ende des Projektes (letzte Laichsaison, 2015) auf den Meilenstein 5.

Meilenstein 5 – Gewinnung von Spermien und Eizellkernen von erhaltenswerten Karpfenrassen (entsprechend der Ergebnisse der Erhebung „Erfassung von genetischen

Ressourcen aquatischer Kulturen: Karpfen (*Cyprinus carpio*)“ und deren Kryokonservierung

Insgesamt konnte das Ziel, mindestens einen Stamm pro Cluster in 25 Einzelproben zu kryokonservieren für die Cluster 1 und 2 für die Spermaproben realisiert werden. Ob sich unter den beprobten Betrieben auch der Betrieb aus Cluster 3 befand, kann nicht abschließend beurteilt werden, da eine genetische Analyse nicht vorgesehen war. Für das Cluster 4 kann die Maßgabe aufgrund der geografischen Angabe in Müller-Belecke et al. (2009) ausgeschlossen werden, da kein Betrieb aus dem Osnabrücker Raum beteiligt war. Aus Ermangelung an weiblichen Individuen konnte das Ziel 25 Einzelproben an Kernen einzulagern für keines der Cluster erreicht werden. Hier konnten allerdings insgesamt 42 Einzelproben von Zellen befruchteter Karpfeneier eingelagert werden. Darunter befinden sich aus dem Cluster 1 sicher 18 Proben und aus Cluster 2 sicher 12 Proben (siehe Tabelle 5). Als Hauptgrund für die geringere Anzahl an eingelagerten Proben sehen wir die starke Abnahme an Zuchtbetrieben mit eigenem Laichfischbestand innerhalb Deutschlands in den letzten Jahren.

Erfolgskontrolle über die
Einhaltung des
Finanzierungs-, Zeit- und
Arbeitsplans

5 Veröffentlichungen aus dem Projekt

Artikel zu Projektaktivitäten und –ergebnissen

- Kurzbeitrag „Überleben im Eis durch Kryokonservierung“ in Blaue Biotechnologie – Aufbruch in eine neue Dimension, Broschüre des Fraunhofer Life Sciences Verbund, Seite 9.
- „Nutzung aquatischer Ressourcen für die Lebens- und Futtermittelindustrie, Kosmetik und Medizin“ in Jahresbericht 2014/2015 der Fraunhofer EMB, Seite 56.
- „Zellmaterial zum Erhalt von aquatischen genetischen Ressourcen aus Grillenburger Karpfen entnommen“ in Fischer&Angler in Sachsen, Dresden 22 (3), ISSN 1434-3428, Seiten 111-112.

Beiträge in Zeitungen und Fernsehen

- Zeitungsbeitrag „Ettenheimer Karpfen liefern Sperma für die Forschung“ in der Badischen Zeitung vom 08.05.2015
- Zeitungsbeitrag „Tiefgefrorenes vom Karpfen für die Nachwelt“ in der Sächsischen Zeitung vom 19.05.2015
- Zeitungsbeitrag „Forscher sind dem Karpfen auf der Spur“ in den Lübecker Nachrichten vom 14.08.2015
- Fernsehbeitrag „Gendatenbank für Karpfen angelegt“ im Schleswig-Holstein-Magazin NDR Fernsehen vom 30.08.2015

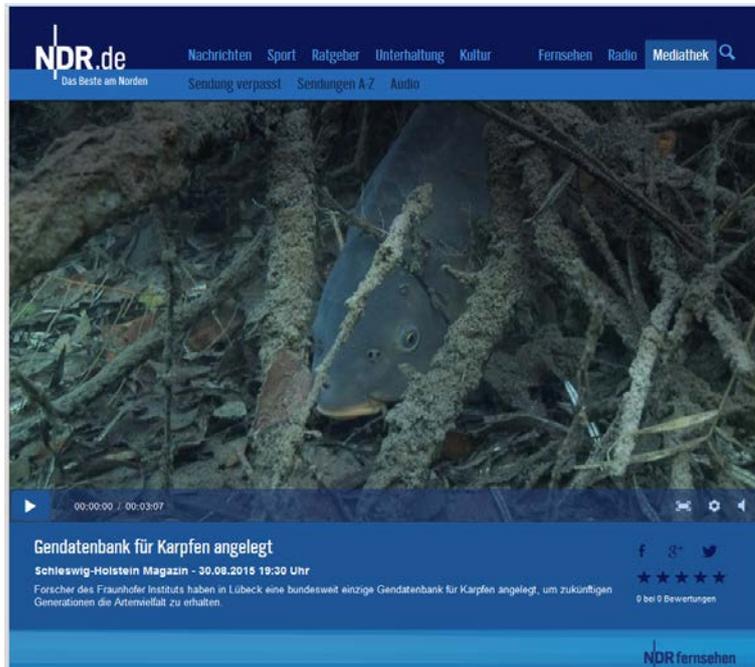


Abb. 26: NDR-Fernsehen, Beitrag vom 30.08.2015 im Schleswig-Holstein-Magazin

Vorträge, Poster

- Fachtag Aquakultur & Fischerei Königswartha, 10.03.2015: Vortrag: „Möglichkeiten und Nutzen der Kryokonservierung von Karpfenzellen“
- Short-term Scientific Mission (STSM) in Rennes, Frankreich 06.03.2015, gefördert durch das EU-COST Programm AQUAGAMETE: Vortrag „Fish cell culture and other Technologies at Fraunhofer“
- Fortbildungstagung für Fischhaltung und Fischzucht Starnberg, 14.01.2015: Vortrag „Möglichkeiten und Nutzen der Kryokonservierung von Karpfenzellen“
- Konferenz 6th edition of the Rendez-Vous de Concarneau, Frankreich 10.10.2014: Vortrag „Fish cell cultures and cell cryopreservation – towards sustainable reproduction of aquatic species“
- Kooperationstreffen am INRA, Rennes, Frankreich 08.10.2014: Vortrag „Aquatic Cell Technologies at Fraunhofer“

6 Zusammenfassung

Der gemeine Karpfen (*Cyprinus carpio*, LINNAEUS 1758) zählt weltweit zu den wichtigsten und gefragtesten Süßwasserfischen. In der Vergangenheit kam es allerdings zur Vermischung und vielfach zum Verschwinden der alten Karpfenrassen bzw. -stämme in Deutschland, vor allem in der bayerischen Karpfenteichwirtschaft. Das Modell- und Demonstrationsvorhaben „Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen: Aufbau einer erweiterten Zellbank für Karpfenstämme“ konnte zur Sicherung und Kryokonservierung von genetischem Material (Sperma und Eizellen) erhaltenswerter Karpfenlinien, insbesondere von Zuchtstämmen deutscher Züchter, wie die des Aischgründer oder Lausitzer Karpfen beitragen. Die Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie führte von Oktober 2012 bis September 2015 das Modellvorhaben durch. Die Projektmaßnahmen führten zunächst zu einer Optimierung der Protokolle zur Einlagerung von tiefgefrorenen Karpfenspermien. Dies war insbesondere wichtig, da es bislang keine einheitlichen Standards für die Kryokonservierung von Fischgameten gibt. Es wurde nun ein standardisiertes Verfahren zum Erhalt und zur Konservierung von gefährdeten und seltenen Karpfenstämmen oder -linien erstellt. Da bisher noch keine Techniken bekannt sind, die eine Kryokonservierung von ganzen Fischeiern in vitaler Form erlauben, wurden neben den Spermien auch Zellen befruchteter Karpfeneier eingelagert. Die Kerne der embryonalen Zellen können nach dem Auftauen beispielsweise wieder in entkernte Eizellen aus normalen Karpfen eingepflanzt werden. Tests für beide Protokolle wurden mit Karpfen des Kooperationspartners Thünen-Institut für Fischereiökologie in Ahrensburg durchgeführt. Die eingefrorenen Proben wurden dabei einem umfassenden Qualitätscheck unterzogen. So konnte selbst nach über 2 Jahren noch Sperma erfolgreich aufgetaut werden, welches sich für Befruchtungen eignet. Im Frühjahr 2015 wurden 11 ausgewählte Zuchtbetriebe mit eigenen Laichfischen mit einem mobilen Labor besucht und nach dem einheitlichen Verfahren insgesamt über 500 Einzelproben bearbeitet und eingefroren. Dafür wurden über 4000 km zurückgelegt und die Spermien von insgesamt 107 Männchen und 42 Einzelproben von Kernen befruchteter Eizellen eingelagert. Diese bilden nun den Grundstock einer erweiterten Zellbank für aquatische genetische Ressourcen, die in die Deutsche Zellbank für Wildtiere Alfred Brehm (kurz: CryoBrehm) integriert wurde. Im gesamten Projektzeitraum sind insgesamt über 1000 Proben kryokonserviert worden. Durch die Lagerung von Gameten bzw. Gametenkernen wird die genetische Information seltener und erhaltenswerter Karpfenstämme bewahrt und für die Zukunft gespeichert. Genetische Ressourcen bleiben somit erhalten, um auch künftig besondere Karpfenstämme in ihrem natürlichen Lebensraum aufziehen zu können. Zusätzlich wird der Austausch von genetischem Material zwischen verschiedenen Züchtern vereinfacht, da die kryokonservierten Proben leicht per Post verschickt werden können und ein für die Fische stressiger Lebendtransport entfällt. Dies kann zu einer Aufwertung der biologischen Vielfalt führen, da dank der Kryokonservierung einfacher und schneller alte Karpfenrassen und -stämme gezüchtet werden können. Die hier erarbeiteten Methoden können ferner auf andere Fischarten übertragen werden und dienen somit als Anregung und Vorlage für ähnliche Projekte zum Erhalt der biologischen Vielfalt.

6.1 Ergebniskurzfassung

Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen: Aufbau einer erweiterten Zellbank für Karpfenstämme

Sebastian Rakers, Aileen Reichel, Tanja Zuhl, Kerstin Wendt, Marina Gebert

Einleitung

Das Modell- und Demonstrationsvorhaben wurde zur Sicherung und Kryokonservierung von genetischem Material erhaltenswerter Karpfenlinien initiiert. Die Fraunhofer EMB führte von Oktober 2012 bis September 2015 das Vorhaben durch.

Methoden

Verschiedene Kryokonservierungsprotokolle für Karpfensperma wurden für die Erstellung eines standardisierten Protokolls ausgetestet. Die eingefrorenen Proben wurden einem umfassenden Qualitätscheck unterzogen und Befruchtungsversuche durchgeführt. Für die Gewinnung von Zellen aus befruchteten Karpfeneiern wurde ein neues Protokoll etabliert. 11 Züchter mit eigenen Laichfischen aus verschiedenen Regionen Deutschlands wurden im Frühjahr 2015 besucht und Proben seltener Karpfenstämme eingefroren.

Ergebnisse

Es wurde ein standardisiertes Protokoll erstellt, das erfolgreiche Befruchtungen mit kryokonservierten Spermien erlaubt. Neben den Spermien wurden Zellen befruchteter Karpfeneier eingelagert. Ausgewählte Zuchtbetriebe wurden mit einem mobilen Labor besucht und insgesamt 453 Einzelproben von Spermien und 42 Einzelproben von Kernen befruchteter Eizellen eingelagert. Diese bilden den Grundstock einer erweiterten Zellbank für aquatische genetische Ressourcen, die in die Zellbank CryoBrehm integriert wurde.

Schlussfolgerung

Durch die Lagerung von Gameten bzw. Gametenkernen wird die genetische Information seltener und erhaltenswerter Karpfenstämme bewahrt und für die Zukunft gespeichert. Genetische Ressourcen bleiben somit erhalten, um auch künftig besondere Karpfenstämme in ihrem natürlichen Lebensraum aufziehen zu können.

Danksagung

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Förderkennzeichen 2810BM024.

6.2 Abstract

CRYOPRESERVATION OF AQUATIC GENETIC RESOURCES: SET-UP OF AN EXTENDED CELL BANK FOR CARP STRAINS

Sebastian Rakers, Aileen Reichel, Tanja Zuhl, Kerstin Wendt, Marina Gebert

Introduction

The Model and Demonstration project was initiated for the protection and cryopreservation of genetic material from carp strains worth to be maintained, like the Aischgründer carp or the Lausitzer carp. The Fraunhofer EMB performed the project from October 2012 until September 2015.

Methods

Several existing protocols for freezing carp sperm have been performed and compared for a set-up of one standard cryoconservation protocol. Frozen-thawed samples have been subjected to a comprehensive quality check and fertilization trials have been performed. For the preparation of cells from fertilized carp eggs a new protocol was established. 11 breeders from different German regions with own breeding fish have been visited and samples from rare carp strains have been taken.

Results

A standard protocol was established that allows successful fertilization with cryopreserved carp sperm. Beside the sperm, cells of fertilized carp eggs were cryopreserved and stored. Selected breeding farms have been visited by a mobile laboratory and 453 single samples of sperm and 42 single samples of nuclei from fertilized egg cells have been stored within the cell bank. Characterized and documented embryonic cells as well as sperm samples form the cadre of aquatic genetic resources within the cryobank Cryo-Brehm (www.cryobrehm.de).

Conclusion

By storage of carp gametes and gamete nuclei the genetic information of rare carp strains that are worth to preserve is kept and secured for the future. Hence, genetic resources are preserved to be able to breed rare or extraordinary carp strains within their natural habitat.

Acknowledgements

The authors would like to thank Frank Grabowski for his help with the mobile lab, Andreas Drahotta, Jochen Trautner, Ulfert Focken for their support with carp gametes and Dr. Helmut Wedekind and Dr. Gert Füllner for their general support. Especially we would like to thank the carp breeders who participated in the sampling 2015. This work was financially supported by the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) through the federal Office for Agriculture and Food (BLE), grant number 2810BM024.

7 Literatur

Altunok, M., Müller-Belecke, A. and Hörstgen-Schwark, G. (2004). Cryopreservation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm. *Deutscher Tropentag Berlin*, Poster, October 5-7 2004.

AQUAGAMETE Food and Agriculture COST Action FA 1205.
<http://aquagamete.webs.upv.es/>

BMELV (2012). Aquatische genetische Ressourcen. Nationales Fachprogramm – zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung. Herausgeber: Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) 11055 Berlin

Boryshpolets, S, Kowalski, R.K., Dietrich G.J., Dzyuba B., Ciereszko A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80 (2013) 758–765.

Bozkurt, Y., Yavas, I. and Karaca, F. (2012) *Current Frontiers in Cryopreservation*, chapter Cryopreservation of Brown Trout (*Salmo trutta macrostigma*) and Ornamental Koi Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm. InTech, pp. 293–304.

Brämick, U. (2013). Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2013. Hrsg.: Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow. 52 S.

Caffey R.H. und Tiersch, T.R. (2012). Economics and Marketing of Cryopreserved Fish Sperm. In: Tiersch, T.R. and C.G. Green, editors. 2011. *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. pp. 896-916.

Calvi SL and Maise G (1999). Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres. *Aquat. Living Resour.* 12(1): 71-74.

Cejko BI, Sarosiek B, Kowalski RK, Krejszef S, Kucharczyk D (2013) Application of computer-assisted sperm analysis in selecting the suitable solution for common carp, *Cyprinus carpio* L. sperm motility. *J World Aquacult Soc* 44(3):466–472.

Ciba, P., Schicktanz, S., Anders, E., Siegl, E., Stielow, A., Klink, E., Kruse, C., 2008. Long-term culture of a cell population from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head kidney. *Fish Physiol Biochem* 34 (4), pp 367-372

European Commission (2013). Preserving genetic resources in agriculture. Achievements of the 17 projects of the Community Programme 2006-2011. 2013 — 124 pp.

FAO (1981): Conservation of the genetic resources of fish. FAO Fisheries Technical Paper No. 217. 43 pp.

FAO (2012). Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome.

Garber, A.F., Hodkinson, S.E. and C.J. Bridger (2015). Photometer Usage and AquaBoost Product Line Assessment on Male Saint John River Strain Atlantic Salmon. Huntsman Marine Science Centre project completed for Canada Cryogenetics Inc. within National Research Council Canada IRAP Member Network Contribution Agreement No: 828713, 15 pp.

Grunow B., Ciba, P., Rakers, S., Klinger, M., Anders, E., Kruse, C., 2010. *In vitro* expansion of autonomously contracting, cardiomyogenic structures from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology* 76, 427-434

Hallermann, E.M. (2003): Population genetics: Principles and applications for fisheries scientists. Bethesda, Maryland, USA, American Fisheries Society, 458 pp.

Horváth, Á., Miskolczi, E., Urbány, B., 2003. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources* 16, 457- 460

Irawan H, Vuthiphandchai V, and Nimrat S (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Anim Reprod Sci*, 122(3-4):236–243.

Kopeika, E., Kopeika, J. and Zhang, T. 2007. Cryopreservation of Fish Sperm. In: Day, J. G. and Stacey, G. N. (eds.). *Methods in Molecular Biology*, vol. 368: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Kurokura, H., Hirano, R., Toita, M. & Iwahashi, M. (1984). Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37, 267-273.

Langner S., Rakers, S., Ciba, P., Petschnik, A. E., Rapoport, D.H. and Kruse, C. (2011). New cell line from adipopancreatic tissue of Atlantic herring *Clupea harengus*. *Aquatic Biology*, Vol. 11: 271–278. doi: 10.3354/ab00317

Li, P., Hulak, M., Koubek, P., Sulc, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D., Manaskova-Postlerov, P., Peknicov, J., Linhart O. (2010). Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Theriogenology* 74 (2010) 413–423.

Müller-Belecke, A., Füllner, G., Klinger, H., Rösch, R., Tiedemann, R., Wedekind, H., Brämick, U. (2009): Aquatische genetische Ressourcen - Laichfischbestände von Wirtschaftsfischarten in Deutschland. *Schriften des Instituts für Binnenfischerei e.V. Potsdam- Sacrow*, Bd. 25. Hrsg.: Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow. 74 S.

Rakers, S., Klinger, M., Kruse, C., Gebert, M. (2011). Pros and cons of fish skin cells in culture: Long-term full skin and short-term scale cell culture from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *European Journal of Cell Biology* 90 (2011) 1041– 1051.

Ronglin Y., Hagen A., Omholt S. W. 1997. Cryopreservation of Totipotent Nuclei from Honeybee (*Apis mellifera*) Embryos by Rapid Freezing. *Cryobiology* 35 (1), 41-45

Siripattaraprat, K., Pinmee, B., Venta P. J., Chang, C., Cibelli, J. B. (2009). Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. *Nature Methods* 6 (10), 733-736.

Sneed, K.E. and H.P. Clemens (1956). Survival of fish sperm after freezing and storage at low temperatures. *Progressive Fish-Culturist* 18, 88-103.

Sun YH, Chen SP, Wang YP, Hu W, Zhu ZY (2005). Cytoplasmic Impact on Cross-Genus Cloned Fish Derived from Transgenic Common Carp (*Cyprinus carpio*) Nuclei and Goldfish (*Carassius auratus*) Enucleated Eggs. *Biology of Reproduction* 72, 510-515.

Thibier M Wagner H-G (2002) World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Production Science* 74: 203-212.

Wilson-Leedy JG and Ingermann RL (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*, pp. 661—72.

Warnecke 2002. Motilität, ATP-Gehalt und Membranintegrität nativer und kryokonservierter Spermatozoen von Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) als Endpunkte zur Bewertung aquatischer Umweltchemikalien. Entwicklungsansätze zu neuen ökotoxikologischen Testverfahren als Fertilitätstests und Ersatzmethoden zu Tierversuchen. Inaugural-Dissertation. Freie Universität Berlin, 168 pp.

8 Danksagungen

Wir bedanken uns herzlich bei dem Thünen-Institut für Fischereiökologie in Hamburg bei Dr. Jochen Trautner aus der Abteilung Fischgenetik, der bei der Konzepterstellung und der Antragstellung von Fördermitteln unterstützt und die Grundvoraussetzung für die Durchführung des Modellvorhabens geschaffen hat.

Unser Dank gilt ebenso der Außenstelle des TI in Ahrensburg, vertreten durch den Leiter, Herrn Prof. Dr. Ulfert Focken, der uns bei der Bereitstellung von Karpfengameten nachhaltig unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt hierbei Andreas Drahotta, der als technischer Angestellter die Karpfen in Ahrensburg umsorgt und für uns präpariert hat.

Unser Dank gilt besonders dem Bundesministerium für Ernährung, und Landwirtschaft, verantwortlich für die Bereitstellung von Bundesmitteln zur Vollfinanzierung des Modell- und Demonstrationsvorhabens.

Für ihr Engagement und Unterstützung danken möchten wir Dr. Helmut Wedekind von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und Fischerei (IFI) sowie Dr. Gerd Füllner vom Sächsischen Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Referat Fischerei, die uns die Kontakte zu den Züchtern ermöglicht haben.

Auch das Kompetenznetzwerk Aquakultur an der GMA in Büsum (Dr. Stefan Meyer) sowie der Landesfischereiverband Schleswig-Holstein, Sektion Binnenfischerei (Frau Sabine Schwarten) haben uns durch ihr Netzwerk mit Kontakten bereichert und somit zum Erfolg des Projektes beigetragen.

Allen beteiligten Züchtern sei besonders gedankt. Sie haben durch ihre Bereitschaft der Kooperation dem Projekt Daten geliefert, Ideen eingebracht und vor allem erste Proben zum Aufbau der erweiterten Zellbank für Karpfenstämme bereitgestellt. Wir freuen uns auf die Vertiefung der Zusammenarbeit in der Zukunft, von der alle Mitwirkenden profitieren können.

Ein besonderes Dankeschön gilt dem gesamten Personal des Projektteams, welches durch seinen aktiven Einsatz maßgeblich an der Durchführung des Modellvorhabens mitwirkte.

Lübeck im November 2015

Dr. Marina Gebert
Dr. Sebastian Rakers

9 Anhang

- Materialüberlassungsvereinbarung (MÜV)
- Verfahrensprotokoll Probenahmen Züchter
- Datenblatt Probenahmen Züchter
- Protokoll CASA-Auswertungen
- Protokoll PI/FDA-Auswertungen

Materialüberlassungsvereinbarung

zwischen

Züchter

Adresse

vertreten durch *Züchtername* (nachfolgend **Züchter** genannt)

und der

Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V.

Hansastraße 27c, 80686 München, Deutschland

(nachfolgend **FhG** genannt)

für ihre

Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie

Paul-Ehrlich-Straße 1-3, 23562 Lübeck, Deutschland

(nachfolgend **EMB** genannt)

Bezeichnung der Proben:

Probenbezeichnung

(nachfolgend **Material** genannt)

Datum der Probenahme: *Datum*

Datum der Kryokonservierung: *Datum*

Aufgetaut am: _____

Die Vertragspartner sind sich über Folgendes einig:

1. Das oben genannte Material ist Eigentum des Züchters und wird zu 50% für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt, zu 50% wird es für den Züchter kryokonserviert gelagert. Das Eigentum an dem Material verbleibt beim Züchter und die Überlassung des Materials an die FhG hat keinen Einfluss auf diesen Eigentumsstatus.
2. Das Material darf weder für diagnostische noch therapeutische Zwecke verwendet werden.

3. Das Material ist ausschließlich für das durch die BLE geförderte Projekt mit dem Förderkennzeichen 2810BM024 und dessen Nachfolgeprojekten zu verwenden.
4. Das Material darf ohne die schriftliche Zustimmung des Züchters nicht an Dritte weitergegeben werden.
5. Die EMB ist dem Züchter gegenüber jederzeit zur Auskunft über die hier vereinbarten Punkte verpflichtet.
6. Die EMB verpflichtet sich, die Herkunft des Materials in sämtlichen Veröffentlichungen, die über den Einsatz und dessen Ergebnisse berichten, anzugeben, falls vom Züchter gewünscht.
7. Die EMB verpflichtet sich, sämtliche Veröffentlichungen die in Zusammenhang mit der Verwendung dieses Materials stehen, mit dem Züchter im Voraus abzustimmen.
8. Jedwedes Material, das in Verbindung mit dieser Vereinbarung überlassen wird, ist unter experimentellen Bedingungen gewonnen worden und kann daher gesundheitsgefährdende Eigenschaften aufweisen. Zusicherungen und Garantien jedweder Art, ausdrücklich oder stillschweigend, werden vom Züchter ausgeschlossen. Die EMB kann keine Zusicherungen oder Garantien, ausdrückliche oder stillschweigend, im Hinblick auf die wirtschaftliche Tauglichkeit oder Verwertbarkeit des Materials übernehmen noch garantieren. Es wird keinerlei Zusicherung oder Haftung übernommen, dass die Verwendung des Materials keine Patent-, Urheber-, Marken- oder andere Eigentümerrechte verletzt.
9. Die EMB verpflichtet sich, das Material nur gemäß den geltenden Regularien, Richtlinien und gesetzlichen Bestimmungen für dessen Behandlung, Nutzung oder Veräußerung einzusetzen.

10. Das Material wurde unentgeltlich zur Verfügung gestellt.

Das Einverständnis mit dieser Vereinbarung wird durch die nachfolgende rechtsverbindliche Unterzeichnung des Materialüberlassungsvertrags bestätigt.

(Ort), (Datum)

(Ort), (Datum)

(Züchtername)

(EMB)

Verfahrensprotokoll Kryokonservierung Sperma und Calvi-Protokoll

Materialien: Probe, Kryoröhrchen, Eis, Eisbehälter, flüssigen Stickstoff, Wasserbad, Petrischalen, Mikroskop, Zellzähler (Neubauer oder NucleoCounter), Pipetten und Pipettenspitzen (alle Größen), Eppendorf-Tubes, Wasser, Objektträger und Deckgläschen, Falconröhrchen mit Wasser, Stoppuhr, Ständer (blau), kleine Plastischalen, Etiketten und Drucker, DMSO, Pronase Styroporbehälter mit Floß, Extender, RNA later, Behälter für Spermaproben (Zellkulturflaschen oder Schraubgefäße (Plastik)), Auto-Kühlbox, (Ersatz)Glasgefäße für Lösungen o.ä., programmierbarer Freezer (-1°C/min)

kühl stellen auf Eis: Extender, Einfrierröhrchen, Plastischalen

vorbereiten: Fluoreszenzmikroskop starten, Arbeitsplatz Zählung/Motilität aufbauen

Arbeitslösungen:

anti-Eikleber

Tannic acid solution: 7,5 g Tannin verdünnt in 1L H₂O

Extender 1 (modifiziertes CCSE2-Medium nach Irawan et al 2010)

151 mM Sucrose (342 g/mol)

93 mM NaCl (58 g/mol)

18 mM NaOH (40 g/mol)

1:100 P/S

pH 7,49

Osmolarität um 346 ± 50 mOsmol/kg

zB für 100 ml: 5,164 g Sucrose, 0,539 g NaCl und 0,072 g NaOH auf 100 ml mit A. dest. auffüllen, steril filtrieren, Lagerung bei 4°C

FEM 1 / FEM⁻ (aber ohne CaCL₂ und Mg SO₄ ansetzen !)

Rezept Leveroni Calvi

106 mM NaCl

3 mM KCl

3 mM CaCl₂

1 mM MgSO₄

100 mM Sucrose

3 g/l BSA

5 mM Hepes sodium salt

15 mM Bicine

pH: 7,5 Osmolarität um 320 mOsmol/kg

3,09 g NaCl , 0,112g KCl , 0,22 g CaCl₂ x 2 H₂O , 0,03 g MgSO₄ , 17,1 g Sucrose , 1,5 g BSA, 0,595 g Hepes , 1,22 g Bicine auf 500 ml mit A.dest auffüllen, steril filtrieren, aliquotieren, Lagerung bei 4° C

Aktivierungslösungen:

- a) Woynarovich: 4g NaCl + 3g urea auf 1L H₂O
- b) Wasser: Aquarienwasser

Verfahren

Tag 1

Schritt 1: **Vorbereitung** der Fische (max. 10 Tiere), Abstreifen, etc (macht Züchter, oder selbst nach Vorbild Ahrensburg)

Schritt 2: Sammeln der Milch: **Sammeln der Spermien** von reifen Männchen (gut: 3-5 ml/Tier) in saubere und trockene Behälter, Vermeiden von Kontaminationen durch Faeces, Urin oder Wasser!

Sammeln der Eier: **Sammeln der Eier** von reifen Weibchen (~300 Eier minimum)

Sammeln von Flossenstücken (Fin-Clips) und direkt einfrieren (in RNA-later)

Schritt 3: **Inspektion der Sperma-Qualität** unter dem Mikroskop:

- Aktivierung der Spermien ermitteln mit Wojnarovich: 1µl Sperma mit 19 µl Wojna
- Motilität ermitteln durch Zeitmessung (bis >50% der Spermien sich nicht mehr bewegen) und Menge aktivierter Spermien zu Beginn
- [ggf. Vitalität durch PI/FDA-Färbung (Sperma zu PI/FDA = 1:20)]
- Spermiedichte ermitteln: Neubauer Kammer - Zählung der inneren Quadrate bei Verdünnung 1:1000-10.000 in Wasser/Wojna. Stehen lassen, bis Spermien nicht mehr beweglich, dann zählen.

→ nur bei geeigneten Proben (Mot >70%, Akt > 30 s, ausreichende Menge >3ml, Vit >70%) fortfahren mit Schritt 4!

Schritt 4: **Befruchtung:** Unverdünnte Eiprobe + Sperma vermischen (1min). Sperma - Eier Ratio = 8.000-200.000 : 1. Anschließend etwas Aktivierungsmedium (Wojna) hinzugeben und für 1 min vermischen. Danach mehr Wojna zugeben und stets schwenken (mindestens 1,5 h!). Sobald Probe zu dickflüssig wird oder verklumpt etwas Wojna zugeben.

Nach ca 1,5 h 1-2x mit Tanninlösung waschen für je 20 s und danach mit Wojna wieder waschen, bevor man die Eier in Zugergläser überführt. Geringe Sauerstoffbelüftung (1.5-2.5L/min).

Wichtig: Eier zu Tanninlösung geben NICHT umgekehrt!

Schritt 5: **Kryokonservierung Sperma:** Verdünnung der Spermien mit Extender 1 in der Ratio 1:1 (Ext.1) in Petrischalen, bei 2- 4°C (auf Eis!). Langsam, Tropfen für Tropfen **Kryoprotektanz DMSO hinzufügen (finale Konzentration 10% v/v), niemals direkt vermischen**. Petrischale schwenken bei 4°C, anschließend mit 1000 µl – Eppendorf Pipette vorsichtig vermischen. Equilibrierung für mindestens 10 min bei 4°C!

Formel für Menge DMSO:

$$V_{\text{Probe}} + V_{\text{Extender}} = 90 \% = „V_{\text{Lösung}}“$$

$$V_{\text{DMSO}} = (100\%/90\% * V_{\text{Lösung}}) - V_{\text{Lösung}}$$

Schritt 6: **Einfrieren.** Am Besten in Kryotubes (vials: 500-1000 µl Probe in 2 ml vial) einfüllen, nach Equilibrierung auf Floß überführen: in Styropor-Box mit flüssigem Stickstoff: 10 min auf Floß 2 cm über der Flüssigkeit, anschließend in Stickstoff werfen, danach überführen.

Maximal 10 Proben à 500-1.000 µl natives Sperma pro Tier

Beschriftung Züchternkürzel – M (laufende Nummer für jeden Betrieb bei 1 beginnend) – (Nummer des Extenders – Kryoprotektanz >> nur wenn abweichend vom Standardprotokoll!) – Volumina (ml), Datum, Namenskürzel des Mitarbeiters

Beispiel DSH01 – M14 – 1 – D

Datum

Kürzel

Schritt 7: Messung Fertilität (Befruchtungsrate in %) durch Zählung befruchteter und unbefruchteter Eier nach ca 1,5 h (4-8-Zellstadium)

Tag 2

Schritt 8: **Calvi-Protokoll:** befruchtete Eier im Epiboly- frühem Somiten-Stadium (12-24 h nach Befruchtung) in vorgewärmten (28 °C) FEM-Medium in 6-Well Platte (jeweils 30 Eier pro Well) überführen. Ansetzen von Pronase: 2 mg/ml Pronase (Protease) in vorgewärmten FEM. FEM vollständig aus Wells entfernen und Pronase-Lösung (ca. 3 ml pro Well) zugeben. Inkubation: 60-70 min. auf dem Schüttler bei 80 rpm und 28°C. Sobald Großteil der Eier dechorioniert sind, 2-3 x in FEM waschen um leere Eihüllen zu entfernen. Anschließend Embryonen/Zellen in 15ml-Falcon überführen, absetzen lassen. FEM entfernen und FEM⁻ (Calcium und Magnesium-frei) hinzugeben und resuspendieren (mit blauer Pipette beginnen und bis zu weißer Pipette vorarbeiten). Zentrifugation für 5 min. bei 850 rpm, Überstand verwerfen, mit FEM⁻ waschen, erneut zentrifugieren, Überstand verwerfen. Anschließend Pellet in EM aufnehmen und -1°C/min einfrieren. Anschließend in Kühlbox (-20°C) überführen.

Karpfenbeprobung im Rahmen des MuD-Vorhabens „Kryokonservierung von aquatischen genetischen Ressourcen“

Datum

Name des Karpfenzüchters

Anschrift

Name des Probennehmers

Infos zum Karpfenzuchtbetrieb

Größe (Fläche, Mitarbeiter, etc.)

Anzahl Fische

Tabelle 1. Informationen zu beprobten Tieren (Züchter: _____)

Datum	Art, Stamm	Tiernummer*	Größe, Gewicht	Alter in Jahren	Halterungsbedingungen					Probenmerkmale		
					T (°C)	Sal.	Lichtzyklus	Futter	Induktion durch	Lagerung (T in °C und t in h)	Qualität / Bemerkungen	Volumen
									-			
									-			-
									-			
									-			
									-			
									-			
									-			

*Fortlaufend, (M=Männchen, W=Weibchen)

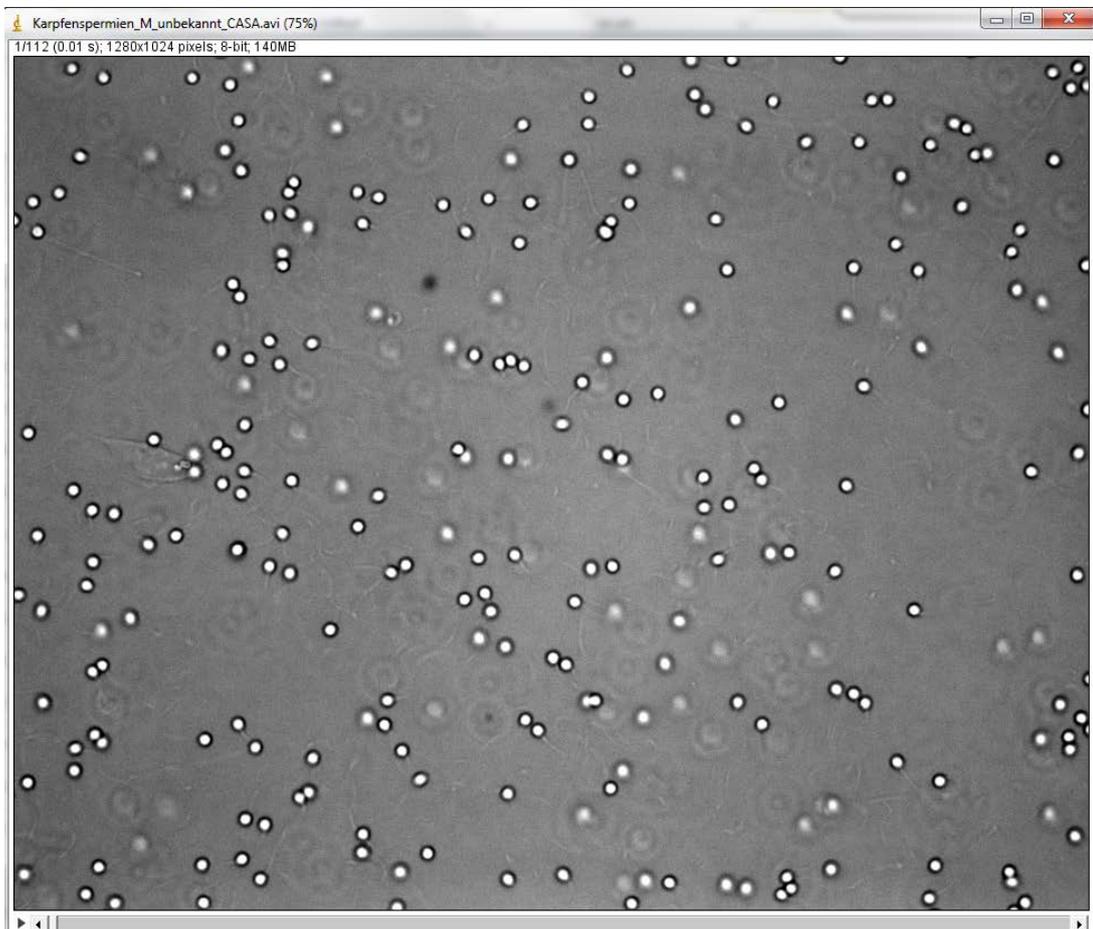
Computer-assistierte Spermienanalyse (CASA)

1. Kürzen Sie Ihre Videoaufnahme (zum Beispiel nd2-Datei im Nikon Programm) auf 6 – 10 sec Länge, möglichst kurz nach der Aktivierung der Spermien
2. Stellen Sie sicher, dass die Spermienköpfe im Programm als dunkle Kreise dargestellt werden, nicht weiß.
3. Speichern Sie das Video als avi-Datei.

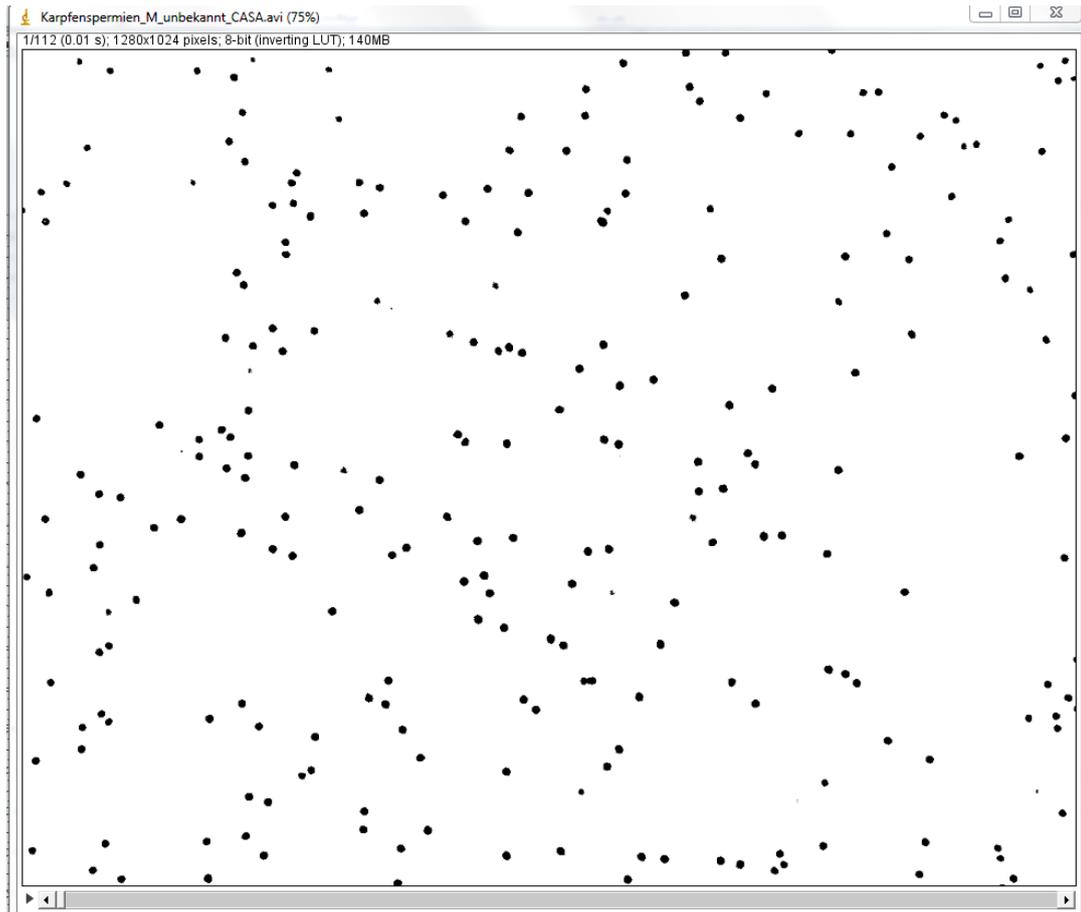
Beispiel:

Karpfenspermien_M_unbekannt_CASA.avi

4. Öffnen Sie die avi-Datei in ImageJ und transformieren Sie die avi-Datei (uncompressed) in 8-bit Grau-Format



5. Setzen Sie die Helligkeit und den Kontrast, so, dass der Hintergrund gleichmäßig ist, am besten helle Kreise auf dunklem Untergrund oder umgekehrt. Danach stellen Sie den threshold so ein, dass nur noch rote Kreise auf weißem Untergrund angezeigt werden.
6. Wenden Sie den threshold an – Sie werden wieder schwarze Kreise erhalten:



7. Wenden Sie den CASA Sperm Tracker an, mit den folgenden Einstellungen:

Sperm Tracker	
a, Minimum sperm size (pixels):	10
b, Maximum sperm size (pixels):	100
c, Minimum track length (frames):	10
d, Maximum sperm velocity between frames (pixels):	80
e, Minimum VSL for motile (um/s):	6
f, Minimum VAP for motile (um/s):	40
g, Minimum VCL for motile (um/s):	50
h, Low VAP speed (um/s):	10
i, Maximum percentage of path with zero VAP:	1.0
j, Maximum percentage of path with low VAP:	25.0000
k, Low VAP speed 2 (um/s):	25.0000
l, Low VCL speed (um/s):	35.0000
m, High WOB (percent VAP/VCL):	80.0000
n, High LIN (percent VSL/VAP):	80.0000
o, High WOB two (percent VAP/VCL):	50.0000
p, High LIN two (percent VSL/VAP):	60.0000
q, Frame Rate (frames per second):	10
r, Microns per 1000 pixels:	240
s, Print xy co-ordinates for all tracked sperm?	1
t, Print motion characteristics for all motile sperm?	0
u, Print median values for motion characteristics?	0
<input type="button" value="OK"/> <input type="button" value="Cancel"/>	

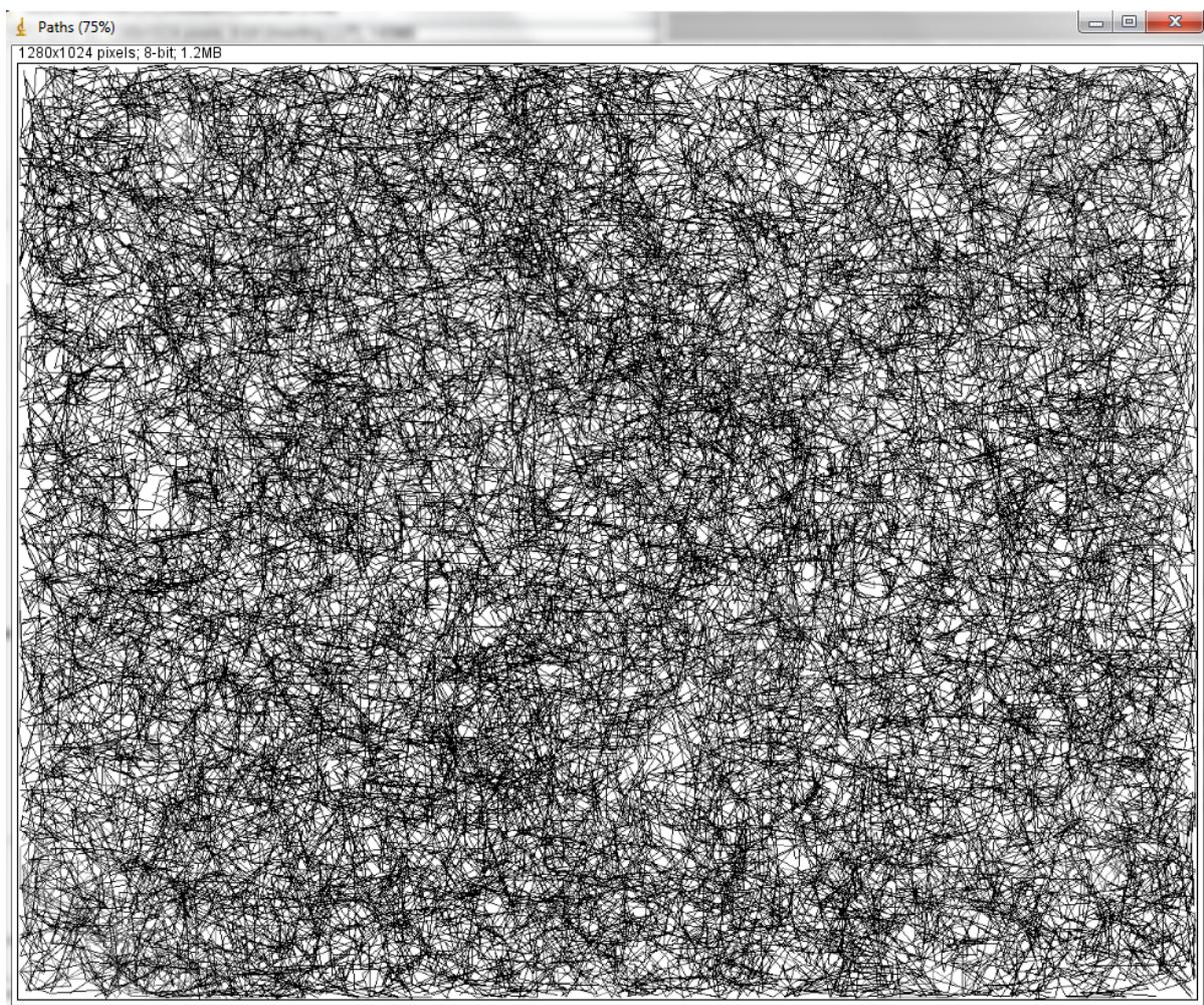
8. CASA wird Ihnen 2 Fenster anzeigen:

Ein Fenster mit den Statistiken, wobei die letzte Zeile die Durchschnittswerte anzeigen wird:

%mot	VCL	VAP	VSL	LIN	WOB	PROG	BCF	Number of sperm tracked
------	-----	-----	-----	-----	-----	------	-----	-------------------------

0.94329333	84.87949	62.98868	26.289154	0.41736317	0.74209535	278.53052	5.9170647	917.0
------------	----------	----------	-----------	------------	------------	-----------	-----------	-------

Das zweite Fenster wird Ihnen die Spermiennachverfolgung anzeigen:



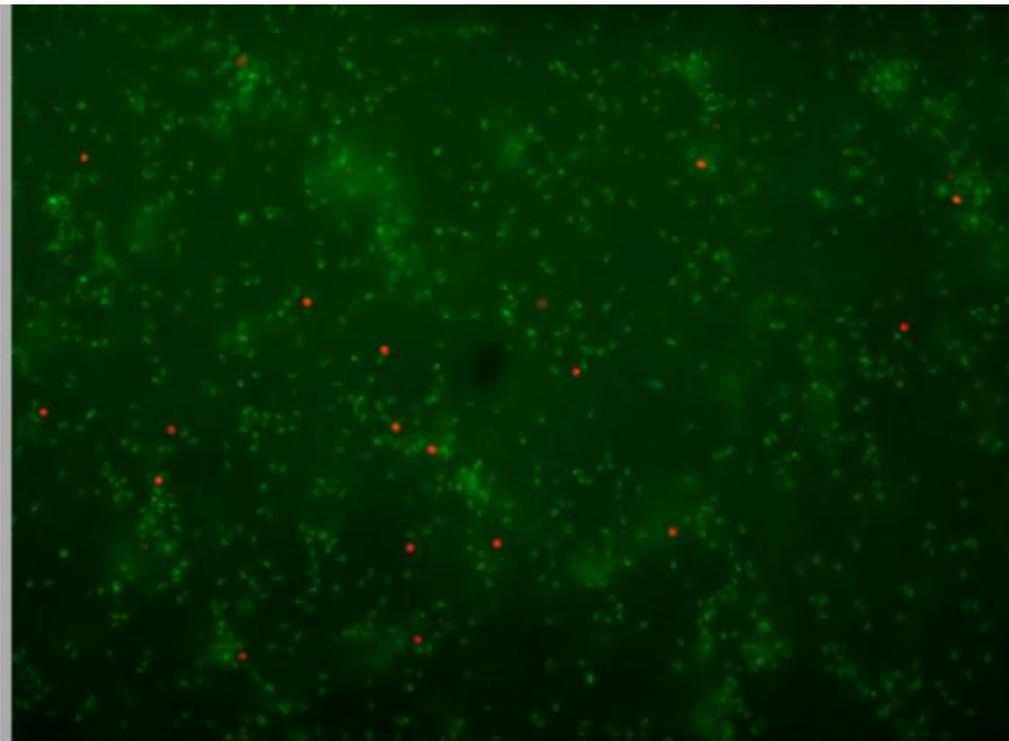
Auswertung/Erfassung PI-FDA-Färbung von Karpfenspermien mittels ImageJ

Generell für die Aufnahmen beachten:

- Bei Mikroskopaufnahmen darauf achten, dass Spermien möglichst vereinzelt und scharf zu sehen sind, **40x-Vergrößerung!**
- Ggf. höhere PI/FDA-Verdünnung, **1:20**

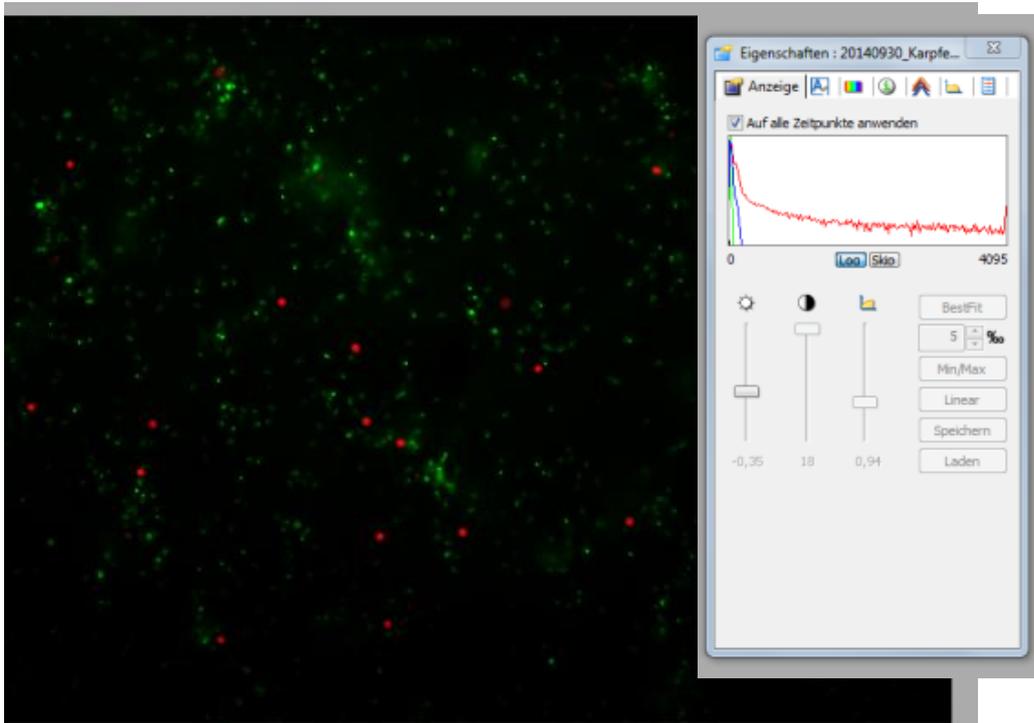
Für die Auswertung (Bsp.: M21 nativ 40x3):

1. Originaldokument (.zvi) mit Axio Vision öffnen

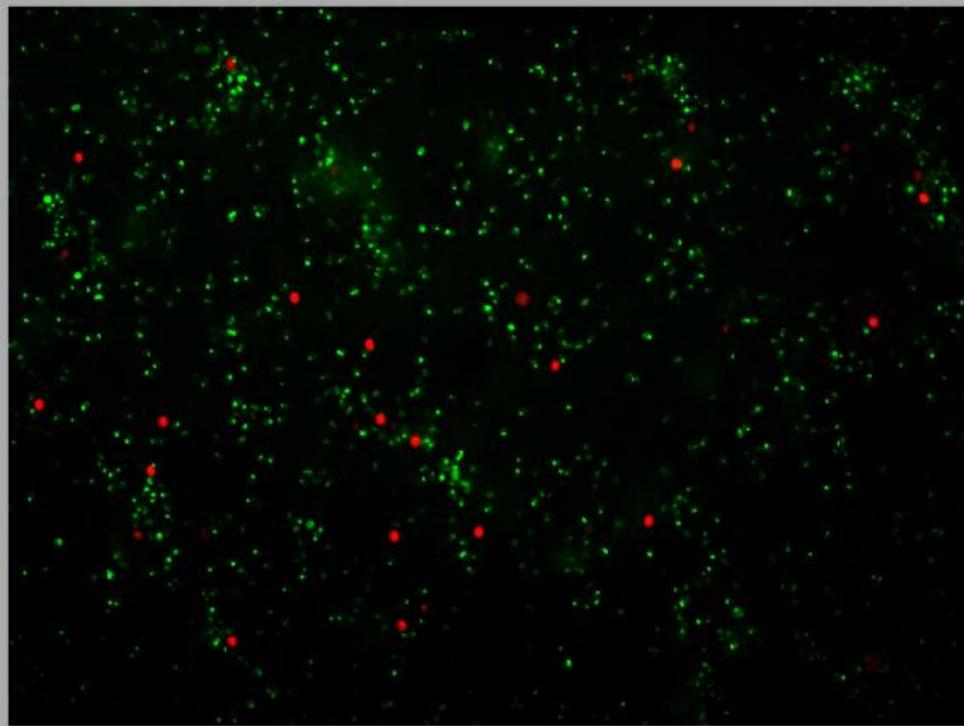


2. Bearbeitung je nach Qualität der Aufnahme wie folgt:

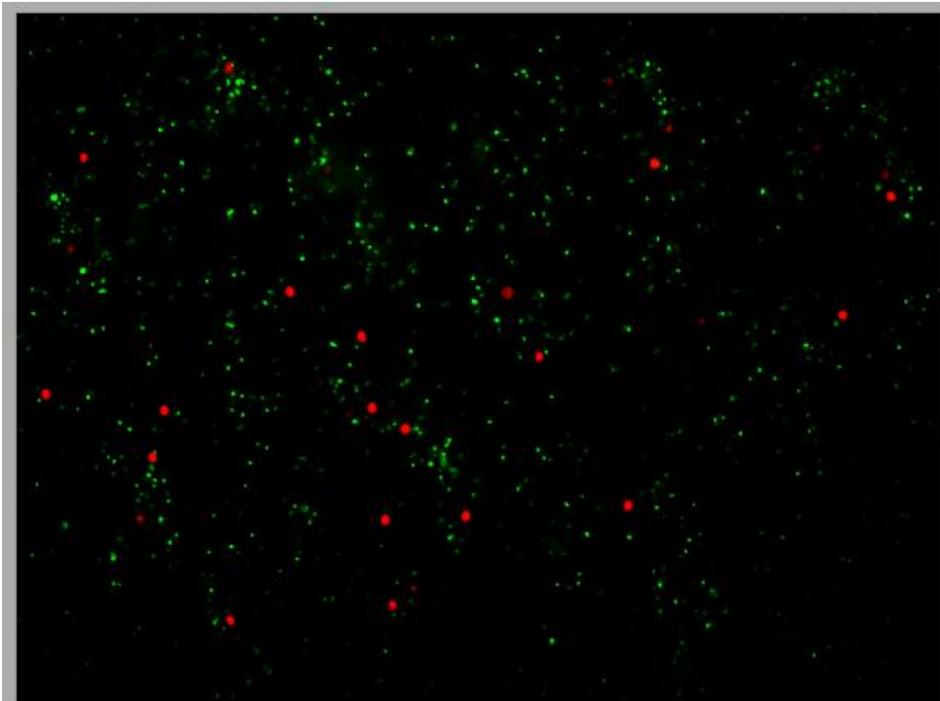
a. **Rot/Grün-Anpassung**



- b. Bildschärfe (Konturanhebung, Stufe 7) + anschließend Bildglättung (Gauss-Binomial, Stufe 9)



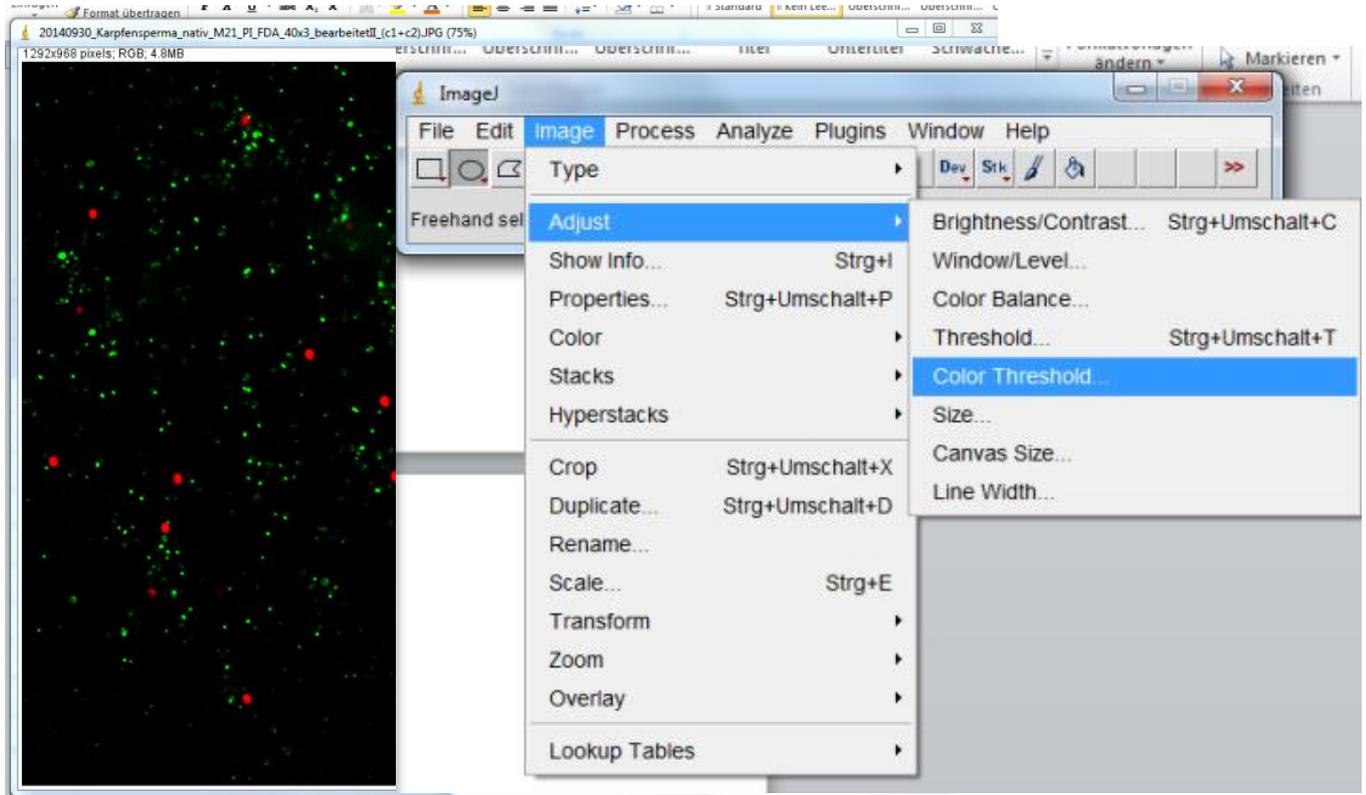
- c. Farbbalance (evtl. grün reduzieren, hier: 0.88) + anschl. Kontrast/Helligkeit einstellen (hier: Helligkeit -0.46, Kontrast 1.1, Gamma 0.96)



3. Bild „Speichern unter“ >> immer noch als .zvi Datei, Dateiname wie Original mit Erweiterung „_bearbeitet.zvi“ bzw. „_bearbeitetII.zvi“
4. Exportieren in gleichen Ordner, ohne Projektordner, nur Mischbilder, JPEG-Datei „...bearbeitetII_(c1+c2).jpg“

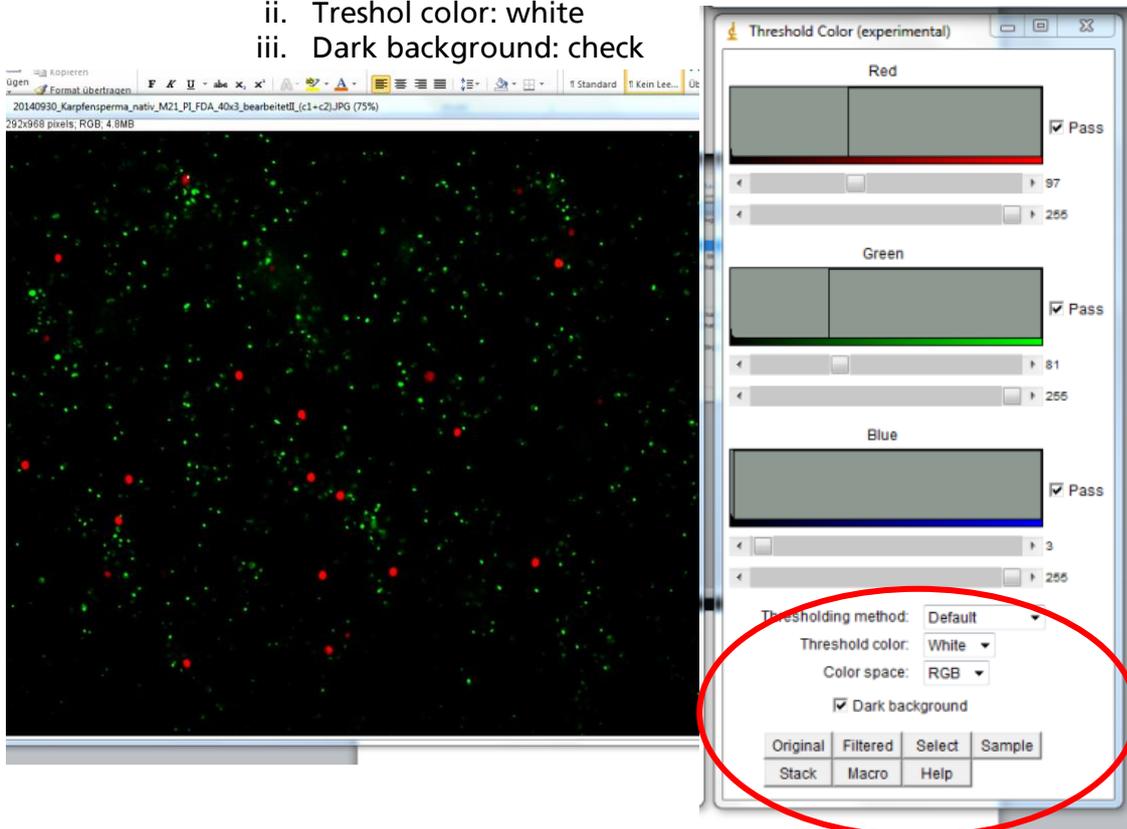
5. ImageJ öffnen

- a. „File“ >> „Open“ >> bearbeitete jpeg-Datei öffnen
- b. „Image“ >> „Adjust“ >> „Color Treshold“



c. Umstellen der „Color space“ von „HSB“ auf „RGB“

- i. Tresholding method: Default
- ii. Treshol color: white
- iii. Dark background: check



d. **Separate** Erfassung von FDA bzw. PI- gefärbten Punkten; dazu:

i. **Für FDA:**

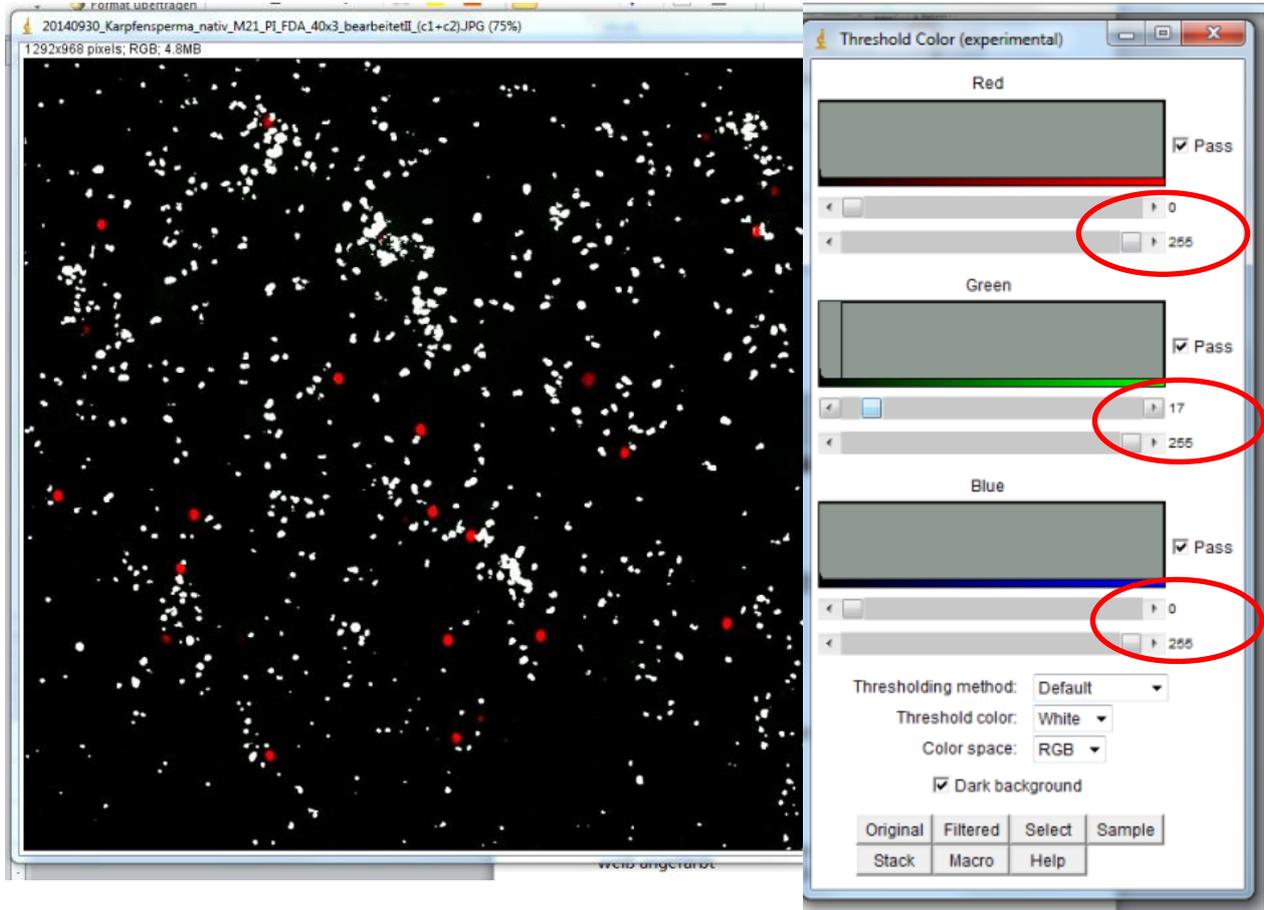
1. **Rot + Blau: 0 - 255**

2. **Grün: 17 - 255**

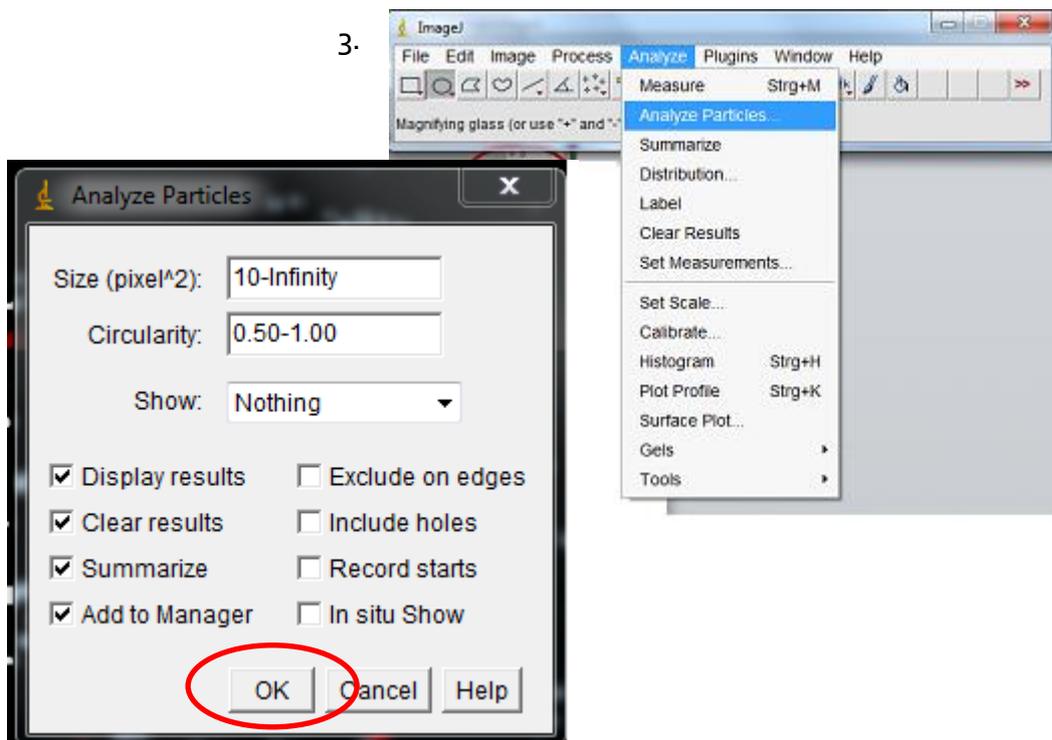
>> bei allen 3 Farben muss „Pass“ angeklickt sein

>> mit der o.g. Einstellung werden alle Rot- und Blautöne nicht mit erfasst

>> die im ausgewählten Bereich liegenden grünen Punkte werden für die Erfassung weiß angefärbt



3.



4. „OK“ >> Analyse läuft, **mehrere Fenster öffnen sich:**

Results:

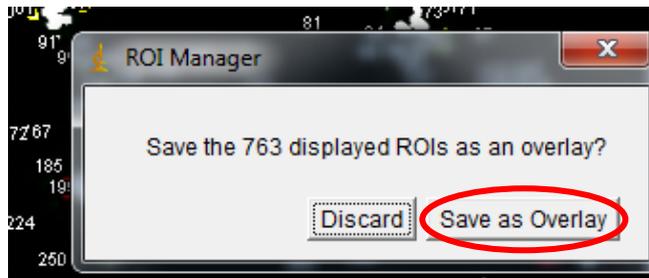
schließen ohne zu speichern

Summary:

„File“ >> „Save as...“ >> im gleichen Ordner wie Originaldokument abspeichern,
Dateizusatz: „... (c1+c2)_ZählungFDA_Summary.xls“ (Excel-Dokument)

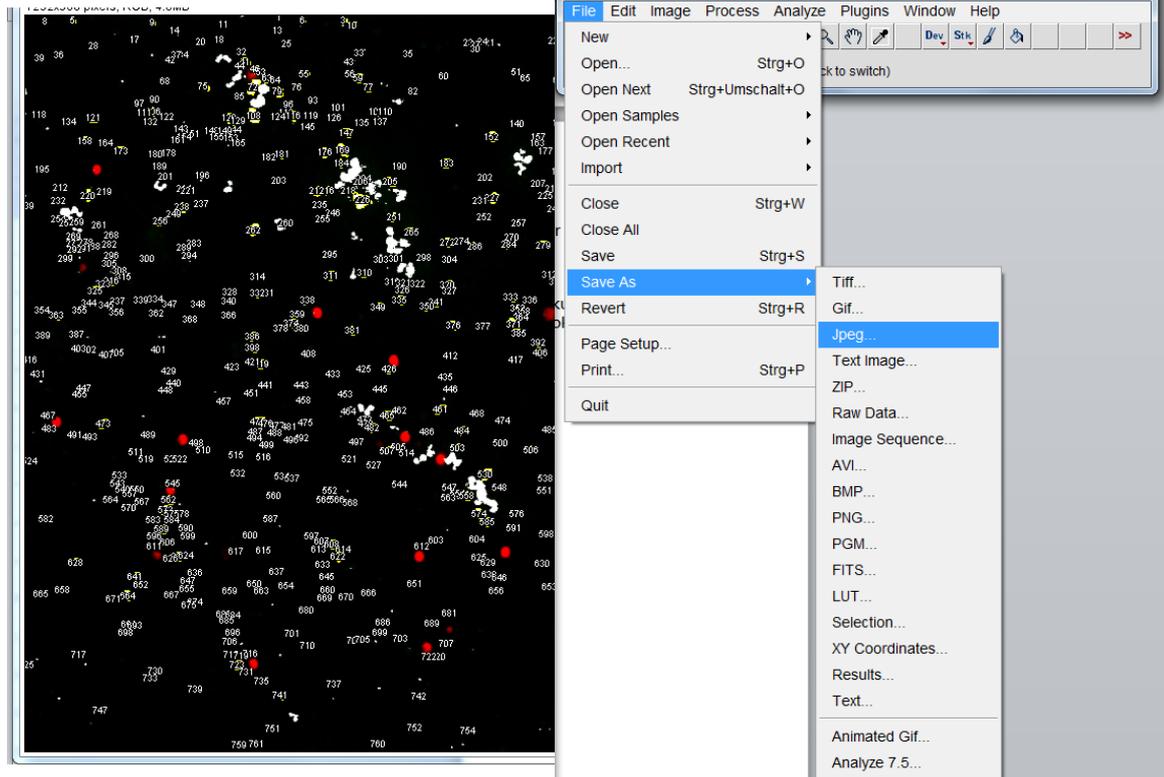
ROI-Manager:

Schließen **ABER „Save as Overlay“!**



ImageJ:

„File“ >> „Save as“ >> „JPEG“
„... (c1+c2)_ZählungFDA.jpg“



>> Datei + Color Treshold schließen

>> „originale“ bearbeitete jpeg-Datei erneut öffnen für Analyse der PI-Punkte

Hier erneut beginnen ABER diesmal Grün + Blau auf 0 – 255 einstellen; Rot auf 56 – 255!

Rest analog zur Analyse der FDA-Punkte

Abspeicherung Summary: „... (c1+c2) ZählungPI_Summary.xls“

Image: „... (c1+c2) ZählungPI.jpg“