

PUBLIZIERBARER Endbericht Studien

(gilt nicht für andere Projekttypen)

A) Projektdaten

Titel:	Effect of temperature on the reproductive potential of teleost fish
Programm:	ACRP, 1 st call
Koordinator/ Projekteinreicher:	A962989
Kontaktperson - Name:	Univ. Prof. Dr. Franz Lahnsteiner
Kontaktperson – Adresse:	Abteilung für Organismische Biologie, Universität Salzburg Hellbrunnerstrasse 34, 5020 Salzburg
Kontaktperson – Telefon:	0662-8044-5630
Kontaktperson E-Mail:	Franz.Lahnsteiner@sbg.ac.at
Projekt- und Kooperationspartner (inkl. Bundesland):	-
Projektwebsite:	
Schlagwörter:	Fortpflanzung, Fische, Klimawandel, Wassertemperatur, Spermien, Eier, Embryonen
Projektgesamtkosten:	208.368,00
Fördersumme:	184.799,00
Klimafonds-Nr:	A962989
Projektstart & Ende	Start: 01-03-2010 Ende: 31-07-2012

B) Projektübersicht

1 Executive Summary

Fische sind wechselwarme Tiere und daher stark von der Umgebungstemperatur abhängig. Erhöhte oder durch extreme Witterungsverhältnisse stark schwankende Wassertemperaturen, wie sie aufgrund des Klimawandels zu erwarten sind, könnten daher auch ihre Fortpflanzung beeinflussen. Dies wurde an ausgewählten Fischarten untersucht.

► Bei der Bachforelle, *Salmo trutta*, verzögern Wassertemperaturen, die während der Vorlaichzeit (August, September, Oktober) gegenüber dem Optimum um circa 5°C erhöht sind, den Zeitpunkt des Ablaichens und führen zu erniedrigter Spermien- und Eiqualität.

► Bei der Äsche, *Thymalus thymallus*, werden die Reifungsprozesse der Eier stärker von der Temperatur beeinflusst als die der Spermien. Während der Vorlaichzeit (April, Mai) um 3 - 4°C erhöhte Wassertemperaturen reduzieren die Qualität der Spermien, den Prozentsatz der ablaichenden Weibchen und deren Eiqualität.

► In der Natur laichen Äschen bei einer Wassertemperatur von 5.5 - 7.2°C. Eine Zunahme der mittleren Wassertemperatur um 1°C während der letzten 10 - 15 Tage vor dem Ablaichen beschleunigt das Ablaichen um 3,5 Tage, eine Zunahme um 1°C vom 21. Dezember an um circa 5,5 Tage.

► Beim Flussbarsch, *Perca fluviatilis*, wird die Reifung der Männchen und deren Samenqualität nicht von ökologisch relevanten Wassertemperaturen beeinflusst. Die Reifung der Eier wird dagegen von der Wassertemperatur beeinflusst. Temperaturen, die während der Vorlaichzeit (April, Mai) gegenüber dem Optimum um circa 4°C erhöht sind, verringern die Anzahl der ablaichenden Weibchen und deren Eiqualität.

► In der Natur wird das Ablaichen von Barschen durch kurzfristige Temperaturveränderungen induziert. Ist die Wassertemperatur niedrig (< 12°C), wird das Ablaichen durch eine Zunahme der Wassertemperatur ausgelöst. Umgekehrt löst bei Wassertemperaturen von >12°C eine Temperaturabnahme den Laichvorgang aus.

► Bei der Elritze, *Phoxinus phoxinus*, ist ein kurzfristiger Anstieg der Wassertemperatur um 6 - 11°C der Laichauslöser. Elritzen haben ein weitgestrecktes Temperaturoptimum und ein negativer Einfluss von ökologisch relevanten Temperaturen auf ihre Fortpflanzung konnte nicht beobachtet werden. Daher könnten Elritzen unter reproduktionsbiologischen Gesichtspunkten von einer Zunahme der Wassertemperatur profitieren.

► Die Spermien und Eier der untersuchten Fischarten haben ein breites Temperaturoptimum. Ökologisch relevante Temperaturen haben nur einen sehr geringen Einfluss auf die Spermienmotilität, die Eiquellung und die Befruchtungsvorgänge.

► Die Embryonalentwicklung der Fische ist stark von der Wassertemperatur abhängig und die Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen gering. Auch kurzfristige Überschreitung der Grenzwerte hat negative Effekte. Bei der Bachforelle ist die Embryonalentwicklung bei Temperaturen $\geq 11^\circ\text{C}$ gestört. Die Embryonen von Äschen tolerieren $\leq 13^\circ\text{C}$, Barschembryonen $\leq 18^\circ\text{C}$, Elritzenembryonen $\leq 24^\circ\text{C}$.

► Erhöhte Temperaturen während der Embryogenese resultierten in einer verringerten Entwicklungsrate, einem verringerten Prozentsatz an geschlüpften Larven und insbesondere in einem hohen Anteil an missgebildeten Larven. Diese haben eine missgebildete, stark verkrümmte Wirbelsäule, können nicht schwimmen und sterben innerhalb weniger Tage.

2 Hintergrund und Zielsetzung

Fische der gemäßigten Breiten pflanzen sich nur einmal im Jahr in der sogenannten Laichzeit fort. Diese ist entweder im Herbst oder im Frühjahr. Die Reifung der Spermien und Eier wird hauptsächlich durch die Photoperiode gesteuert, aber auch durch die Wassertemperatur beeinflusst (Bon et al. 1999; Bromage et al. 2001). Spermien und Eier werden in das Wasser abgegeben, wo die Befruchtung der Eier und die anschließende Embryonalentwicklung erfolgen. Bis heute gibt es nur wenig Daten, wie sich erhöhte Wassertemperaturen auf die Reifung der Spermien und Eier, den Befruchtungsprozess und die embryonale Entwicklung auswirken. Die Auswirkungen können negativ sein, indem sie die bestimmte Prozesse stören, reduzieren oder völlig unterbinden. Sie können aber auch positiv sein, indem sie mehrere Fortpflanzungszyklen und damit eine erhöhte Fortpflanzungsaktivität ermöglichen. Sowohl durch positive als auch durch negative Einflüsse wird die Struktur von Fischpopulationen beeinflusst, was wiederum eine schwerwiegende Wirkung auf die Artenzusammensetzung unserer Gewässersysteme hat. Folglich sind Daten, die den Einfluss der Temperatur auf die Fortpflanzung der Fische beschreiben, für die Risikobeurteilung der Auswirkung einer Klimaerwärmung von entscheidender Bedeutung.

Bisher gibt es zu diesem Thema nur spärliche Informationen. Es ist unbekannt, ob und wie erhöhte Wassertemperaturen die Reifung der Spermien beeinflussen. Die Reifung der Eier wird durch erhöhte Temperaturen verzögert, gestört oder völlig blockiert, wie an der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und am atlantischen Lachs (*Salmo salar*) nachgewiesen werden konnte (Pankhurst et al., 1996a,b; Davies and Bromage, 2001). Dies ist auf eine Störung der hormonellen Regelkreisläufe zurückzuführen (King und Pankhurst, 2004). Bislang gibt es keine Untersuchungen, ob die Physiologie der Spermien und Eier und die Befruchtungsvorgänge von der Temperatur beeinflusst werden. Für die Entwicklung der Embryonen gibt es einen optimalen Bereich. Über- und Unterschreitung des optimalen Bereichs führen zu deutlich erniedrigten Überlebensraten (Ojanguren und Braña 2003).

Das vorliegende Forschungsprojekt wurde an Bachforelle (*Salmo trutta*), Äsche (*Thymallus thymallus*), Flußbarsch (*Perca fluviatilis*) und Elritze (*Phoxinus phoxinus*) durchgeführt und hat folgende Schwerpunkte:

(a) Es untersucht die Auswirkung von Temperaturregimen, die als realistisch für die gegenwärtige und zukünftige Umweltsituation erachtet werden können, auf die Gametenreifung bei Fischen. Natürlich schwankende Temperaturregime, die für die untersuchte Fischart optimal sind, wurden als Kontrolle verwendet. Andere Temperaturregime, die im Vergleich zur Kontrolle um 2-5 ° C erhöht waren, wurden verwendet, um die Auswirkung von erhöhten Temperaturen auf die Gametenreifung zu testen. Grundwasser mit einer konstanten Temperatur wurde getestet, um herauszufinden, ob die Temperatur überhaupt einen Einfluss auf die Gametenreifung hatte. Die Auswirkung der verschiedenen Temperaturregime auf den Zeitpunkt der Spermien- und Eireife, auf den Prozentsatz der reifen Fische und auf ausgewählte physiologische und biochemische Qualitätsparametern der Spermien und Eier wurde untersucht.

(b) Der Einfluss der Temperatur auf die Physiologie der Spermien und Eier wurde untersucht. Dazu wurden die Spermien und Eier unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt und die Spermienmotilität, die Gewichtszunahme der Eier während der Quellung und die Fertilität der Spermien und Eier wurden bestimmt.

(c) Auch die Auswirkung der Temperatur auf die Embryogenese wurde untersucht. Befruchtete Eier wurden bis zum Schlupf bei verschiedenen Temperaturen erbrütet und die

resultierenden Überlebensraten der Embryonen und Larven bestimmt. Die oberen Temperaturgrenzen und die Entwicklungsstadien, die am empfindlichsten auf Temperaturschwankungen reagierten, wurden definiert.

3 Projektinhalt und Ergebnis

Fische sind wechselwarme Tiere und daher stark von der Umgebungstemperatur abhängig. Erhöhte oder durch extreme Witterungsverhältnisse stark schwankende Wassertemperaturen, wie sie aufgrund des Klimawandels zu erwarten sind, könnten daher auch ihre Fortpflanzung beeinflussen, insbesondere die Reifungsprozesse der Spermien und Eier, die Qualität und Funktionalität der Gameten und die Embryogenese. Dies wurde an Bachforelle (*Salmo trutta*), Äsche (*Thymallus thymallus*), Flußbarsch (*Perca fluviatilis*) und Elritze (*Phoxinus phoxinus*) untersucht.

3.1. Einfluss der Wassertemperatur auf die Gametenreifung

3.1.1. Bachforelle

Die Temperaturregime T1, T2 und T3, in denen die Bachforellen gehalten wurden, sind in Abbildung 1 dargestellt. T1 stellt ein Temperaturegime dar, das als optimal für Bachforellen angesehen werden kann, da in diesem in der Fischzuchtanstalt Kreuzstein seit Jahrzehnten Bachforellen aufgezogen und fortgepflanzt werden. T2 stellt ebenfalls ein natürlich schwankendes Temperaturregime dar, das aber insbesondere im August und September um bis zu 5°C erhöht war, wie es insbesondere für heiße Spätsommer typisch ist. T3 hatte eine konstante Temperatur von circa 9°C und diente als Kontrolle.

Der Beginn der Laichzeit der männlichen Fische war bei allen drei getesteten Wassertemperaturen gleich, da die ersten Männchen am 07. November mit der Spermienproduktion begannen (Abb. 2a).

In T1 wurde ein 4-wöchiger Peak (07. 11. – 7.12.) in der Fortpflanzungsaktivität (= Prozentsatz der reifen Männchen und in deren Samenqualität [Samenvolumen, Spermienmotilität]) beobachtet (Abbildung 2a, c, d). In T2 dauerte die maximale Fortpflanzungsaktivität nur 2 Wochen und begann gegenüber T1 2 Wochen später (21. 11. – 7.12.). In T3 war kein Peak in der Fortpflanzungsaktivität festzustellen (Abb. 2a, c, d). In T2 wurde gegenüber T1 und T2 ein erhöhter Prozentsatz von Spermien mit DNA-Schädigungen festgestellt. Auch die Konzentration bzw. Aktivität von bestimmten biochemischen Parametern (der Harnsäure und Peroxidase und der Lysozym-Aktivität) war in T2 verändert. Dagegen konnten in der Spermienfertilität, in der Spermindichte und in anderen physiologischen und biochemischen Parametern (Membranintegrität der Spermien, ATP, Phosphokreatin, Superoxiddismutase-Aktivität) keine Unterschiede zwischen den drei Temperaturregimen festgestellt werden.

Bei allen drei untersuchten Wassertemperaturen reifte der gleiche Prozentsatz an Weibchen (80%). In T1 und T3 waren die ersten Weibchen bereits am 7.11. reif, in T2 erst am 7.12. (Abb. 2b). Der höchste Prozentsatz an reifen Weibchen (dies entspricht der maximalen Fortpflanzungsaktivität) wurde sowohl in T1 als auch in T2 am 7.12. beobachtet. In T3 wurde kein Maximum festgestellt, sondern die Weibchen reiften zeitlich verteilt zwischen 07.11. – 21.12. (Abb. 2b). Die Fertilität der Eier und die prozentuale Gewichtszunahme während der Quellung waren in T1 und T3 gleich hoch. In T2 stark war die Eifertilität stark verringert (Abb. 2e) und die Gewichtszunahme während der Quellung variabel. Auch die biochemische Zusammensetzung der Eier unterschied sich, da die Konzentration der freien Fettsäuren (Abb. 2f) und der Phospholipide in T2 signifikant

niedriger war als in T1 und T3. Viele Messparameter wurden nicht durch die Temperatur beeinflusst. Dies waren das Eigewicht ($62,7 \pm 5,7$ mg), die Anzahl der Eier die pro kg Fisch produziert wurden ($171,2 \pm 66,0$), die Konzentrationen der Triglyceride ($4,91 \pm 2,61$ mg / Ei), Proteine ($36,90 \pm 4,40$ mg / Ei), und Kohlenhydrate ($0,10 \pm 0,042$ mg / Ei) und die Lysozym-Aktivität ($51,51 \pm 23,87$ U / min / Ei).

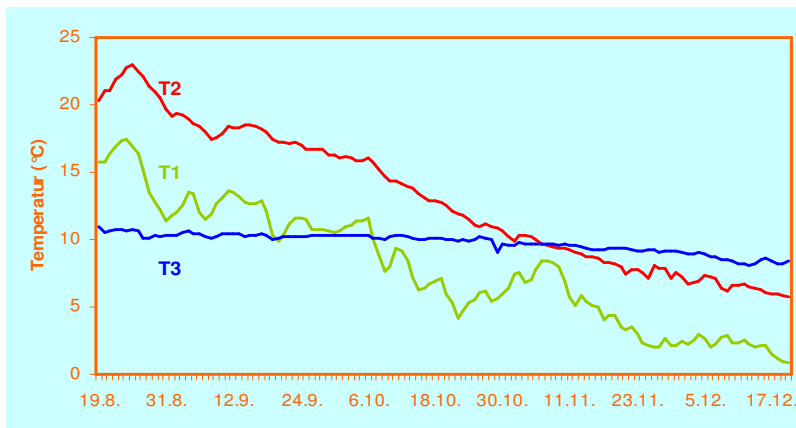


Abbildung 1. Temperatur-regime, in denen die Bachforellen gehalten wurden: T1: optimal mit täglichen und saisonalen Schwankungen, T2: erhöht mit täglichen und saisonalen Schwankungen, T3 konstant.

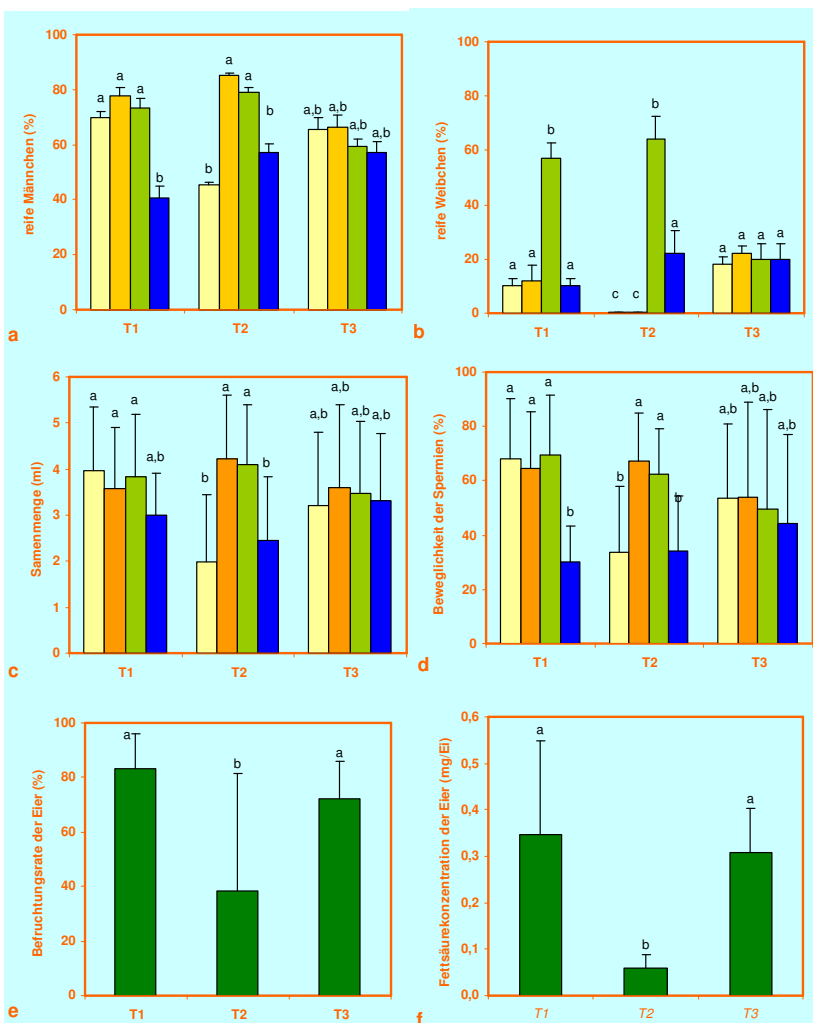


Abbildung 2. Prozentsatz der reifen Bachforellenmännchen und -weibchen und Spermien- und Eiqualität bei den verschiedenen Wassertemperaturen T1, T2 und T3. In (a) - (d) zeigt die Farbe der Balken das Datum der Probenahme: gelb: 7.11., orange: 21.11., grün: 7.12., blau: 20.12. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken weisen auf statistisch signifikante Unterschiede hin.

3.2. Äsche

Die Temperaturregime T1-T4, die bei Äschen untersucht wurden, sind in Abbildung 3 dargestellt. Bei den Männchen hatte die Wassertemperatur folgenden Einfluss auf die Gametenreifung: Der Prozentsatz der reifen Männchen betrug zu Beginn der Laichzeit am 14.4. bei allen untersuchten Wassertemperaturen 60-70%. In T1, dem optimalen Temperaturregime, stieg der Prozentsatz der reifen Männchen bis zum 31.5. auf 80% an, ebenso wie die Motilitätsrate der Spermien (Abbildung 3a, d). Bei allen anderen Wassertemperaturen (T2, T3, T4) sank der Prozentsatz der reifen Männchen im Verlauf der Laichzeit auf unter <30% (Abb. 4a) und die Beweglichkeit der Spermien nahm ab.

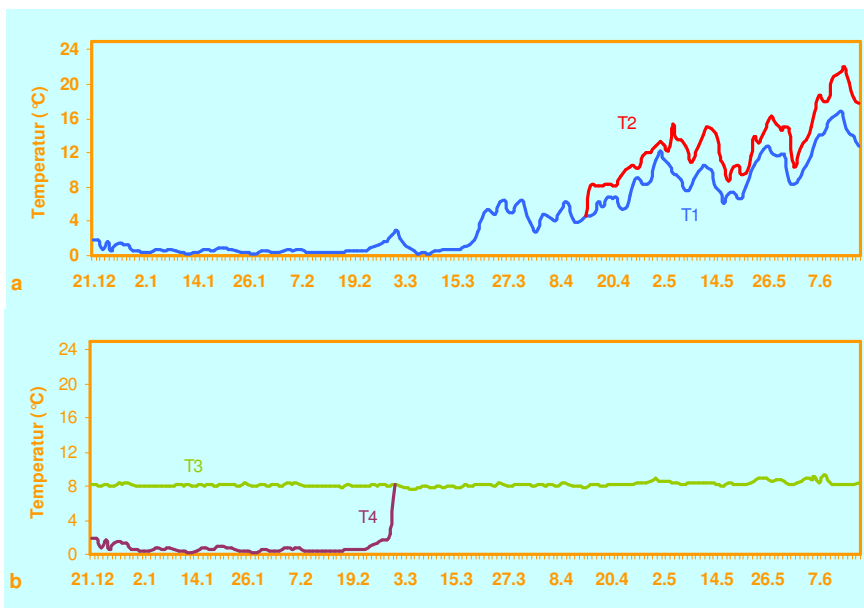


Abbildung 3. Temperaturregime, in denen Äschen und Barsche gehalten wurden.

Abb. 3a. Natürlich schwankende Temperaturregime

Abb. 3b. konstantes und künstlich schwankendes Temperaturregime

Die Samenmenge nahm vom 14.4. bis 31.5. bei Fischen, die in T1, T3 und T4 gehaltenen wurden, leicht zu, während es in T2 konstant blieb (Abb. 4c). Die Spermiedichte und der Prozentsatz der lokal beweglichen Spermien nahmen im Verlauf der Laichzeit bei allen Wassertemperaturen ab. Die Schwimmggeschwindigkeit der Spermien veränderte sich nicht.

In T1 reiften 78% der weiblichen Fische (Abb. 4b) synchron zwischen dem 25.5. und 31.5. Dagegen reiften bei den anderen Wassertemperaturen weniger als 10% der Weibchen (Abb. 4b). Circa 50% der befruchteten Eier aus T1 entwickelten sich zu Augenpunkteiern, während für alle anderen Gruppen die Entwicklungsrate <5% war (Abb. 4e). Auch die Gewichtszunahme während der Quellung war für Eier aus T1 höher als für jene aus T3 und T4.

Für die Äschenpopulationen aus natürlichen Gewässern zeigte eine Korrelationsanalyse hochsignifikante Zusammenhänge ($P < 0,005$) zwischen dem Abblanchdatum und der mittleren Wassertemperatur vom 21.12. bis zum Abblanchtermin ($R^2 = 0,856$), zwischen dem Abblanchdatum und der mittleren Wassertemperatur während der letzten 15 d ($R^2 = 0,667$) und 10d ($R^2 = 0,616$) vor dem Abblanchen und zwischen dem Abblanchdatum und der mittleren Temperaturdifferenz zwischen Januar und den letzten 15 d vor dem Abblanchen ($R^2 = 0,624$). Mittels dieser Daten konnte ein multiples Regressionsmodell erstellt werden, das basierend auf den Wassertemperaturdaten den Abblanchtermin vorhersagt. Unabhängige Variablen sind die mittlere Temperatur während der letzten 15 d vor dem Abblanchen (x_1) und die mittlere Temperatur vom 21.12. bis zum

Ablaichen (x_2), die abhängige Variable das Ablaichdatum ($y = -13,55 x_1 + 0,745x_2 - 62,57x_2 + 7,46x_2^2 + 286,4, R^2 = 0,907$)

Da die Äschenpopulation vom Enzinger Boden ein spezielles alpines Temperaturregime aufweist und getrennt von den Tieflandpopulationen positioniert wird, hat sie in der obigen Regressionsanalyse eine starke Trendwirkung. Wenn die Enzinger Boden Daten nicht in die statistische Analyse eingeschlossen werden, erniedrigt sich daher die Signifikanz der Korrelationen. Die höchsten R^2 -Werte wurden für die Korrelationen zwischen dem Ablaichtermin und der mittleren Temperatur während der letzten 10 d ($R^2 = 0,396$) und 15 d vor dem Ablaichen gefunden ($R^2 = 0,309$). R^2 betrug 0,263 für die Korrelation zwischen der mittleren Temperatur vom 21.12. bis zum Ablaichzeitpunkt und dem Ablaichzeitpunkt und 0,168 für die Korrelation zwischen der mittleren Temperaturdifferenz zwischen Januar und den letzten 15 d vor dem Laichen. Das aus diesem Datensatz resultierende multiple Regressionsmodell mit denselben Variablen wie oben beschrieben lautete: $y = 6,95x_1 - 0,758x_1^2 - 13,21x_2 + 1,37x_2^2 + 121,59, R^2 = 0,410$.

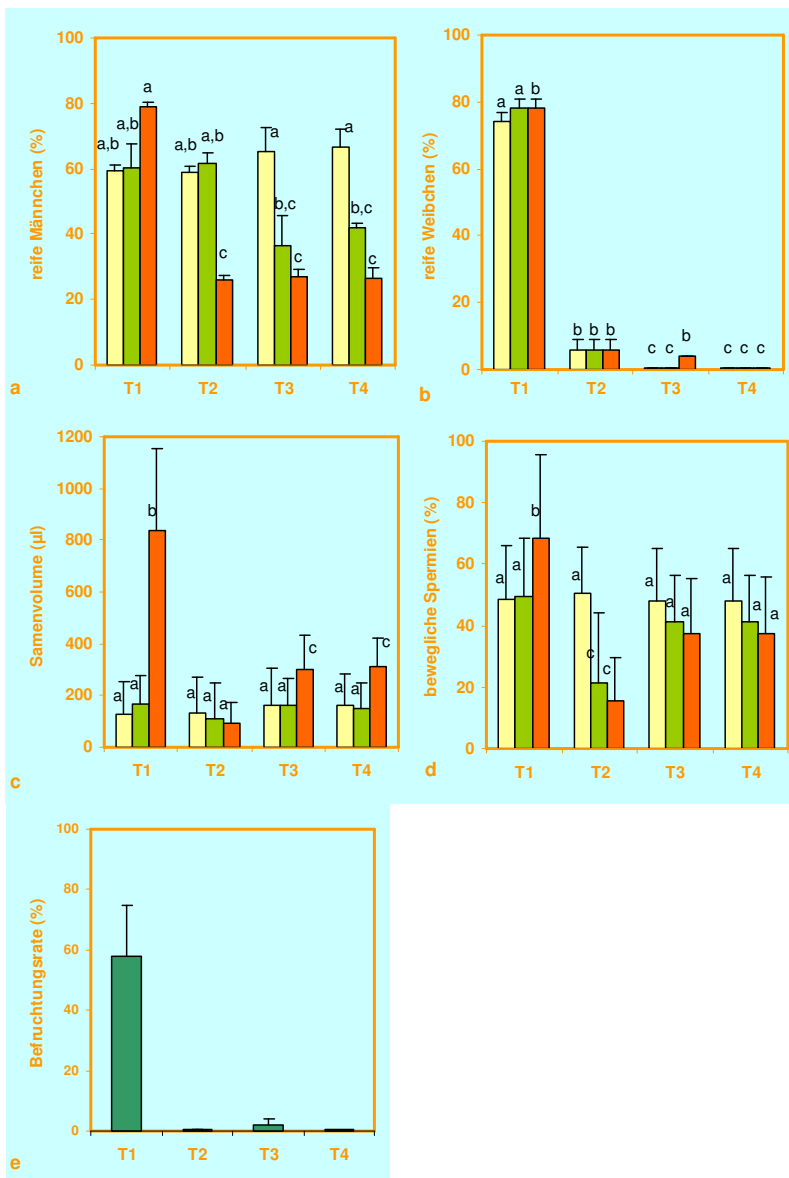


Abbildung 4. Prozentsatz der reifen Männchen und Weibchen und Spermien- und Eiqualität von Äschen bei verschiedenen Wassertemperaturen. Farbe der Balken gibt Datum der Probenahme an: gelb: 14.4., grün: 29.4., orange: 31.5. T1 - optimale Temperatur, T2 - erhöhte Temperatur, T3 - konstante Temperatur, T4 - abrupte Temperaturänderung. Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken weisen auf statistisch signifikante Unterschiede hin.

3.3. Barsch

Die getesteten Temperaturbereiche T1 - T3 gleichen denen der Äsche und sind in Abbildung 3 dargestellt. Ein natürlich schwankendes Temperaturregime (T1), ein ähnliches, das aber um 3 bis 4°C erhöht war (T2) und ein konstantes Temperaturregime wurden getestet. Die drei Temperaturregime hatten keinen Einfluss auf den Reifegrad der Männchen und auf deren Samenqualität. Alle untersuchten Parameter waren während der Laichzeit (15.4. - 14.6.) konstant (Tabelle 1).

In T1 wurde ein natürliches Ablachen der Weibchen vom 24.4. - 15.6. beobachtet. Die Wildpopulationen vom Grundsee und Mondsee laichten in einem vergleichbaren Zeitraum ab. In T2 laichten die Barsche über eine bedeutend kürzere Zeitspanne vom 13.5. - 3.6., und in T3 vom 20.5. - 15.6.. Der Prozentsatz der reifen Weibchen war in T1 am höchsten, gefolgt von T2 und T3. Das Gewicht der abgelaichten Eistränge, die Befruchtungsrate und die Augenpunktrate der Eier unterschieden sich nicht.

Um Korrelationen zwischen kurzfristigen Temperaturschwankungen und dem Ablachzeitpunkt herauszufinden wurden basierend auf der Wassertemperatur verschiedene Temperaturvariablen berechnet und diese auf Korrelationen untersucht. Signifikante negative Korrelationen wurden zwischen spT (Wassertemperatur am Tag des Ablachens) und mT(d1...3)-mT(d4...6) (Temperaturdifferenz zwischen dem Mittelwert der Tage 1-3 und dem Mittelwert der Tage 4-6 vor dem Laichen) und zwischen spT und mT(d1...5)-mT(d5...10) (Temperaturdifferenz zwischen dem Mittelwert der Tage 1-5 und dem Mittelwert der Tage 6-10) vor dem Laichen gefunden. Diese Korrelationen zeigen, dass die Fische am Beginn der Fortpflanzungsphase nach einer Temperaturerhöhung [mT(d1...3)-mT(d4...6) oder mT(d1...5)-mT(d5...10) haben positive Werte] ablaichten und im späteren Verlauf der Laichsaison nach einer Abnahme der Temperatur (die Werte der Variablen sind negativ). MT6d wies auch eine negative Korrelation mit mT(d1...3)-mT(d4...6) auf und mT10d mit mT(d1...3)-mT(d4...6). Diese Korrelationen werden als die biologisch wichtigsten angesehen, da sie zeigen, dass das Ablachen durch einem kurzfristigen Temperaturanstieg induziert wird, wenn die mittlere Temperatur in den letzten Tagen vor dem Laichen niedrig (<12°C) ist und nach einer kurzfristigen Temperaturabnahme, wenn die Temperatur hoch ist (>12°C).

Tabelle 1. Prozentsatz der reifen Fische und Gametenqualitätsparameter von Flußbarschen in 3 verschiedenen Temperaturregimen. Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben neben den Werten weisen auf statistisch signifikante Unterschiede hin.

Parameter	T1 (optimale Temperatur)	T2 (erhöhte Temperatur)	T3 (konstante Temperatur)
Männchen			
reife Männchen, %	84 ± 5	80 ± 4	76 ± 3
Samenvolumen, ml	1,6 ± 0,8	1,7 ± 0,8	1,6 ± 0,9
Spermiendichte, 10 ⁹ cells ml ⁻¹	18,8 ± 2,9	17,2 ± 2,8	17,7 ± 3,1
bewegliche Spermien, %	63,9 ± 19,3	61,8 ± 20,8	60,5 ± 25,4
Weibchen			
reife Weibchen, %	75 ± 5 ^a	52 ± 3 ^c	26 ± 6 ^b
Gewicht eines Eistrangs, g	94,2 ± 31,6 ^a	110,3 ± 21,2 ^a	96,5 ± 21,0 ^a
Befruchtungsrate, %	74,0 ± 18,2 ^a	83,3 ± 19,6 ^a	82,7 ± 16,8 ^a
Augenpunktrate, %	71,7 ± 17,7 ^a	63,7 ± 16,2 ^a	66,6 ± 15,8 ^a

3.4. Elritze

Durch eine Temperaturerhöhung von 9°C auf 16°C (T1), 18°C (T2), oder 20°C (T3) konnte das Ablachen von Elritzen innerhalb von 2-3 Tage induziert werden (Abb. 5a, b). Die Anzahl der abgelaichten Eier, die Befruchtungsrate, die Augenpunktrate, der Prozentsatz der geschlüpften Larven, und der normal entwickelten Larven unterschieden sich nicht. Bei einer konstanten Temperatur von 9°C laichten die Elritzen nicht ab (Abb. 5a, b). Wenn die Temperatur in 8-tägigen Intervallen von 9°C auf 18°C erhöht wurde (T5), laichten die Elritzen nur einmal ab, nämlich nach der ersten Temperaturerhöhung (Abb. 5c). Wenn die Temperatur dagegen in 14-tägigen Intervallen auf 18°C erhöht wurde, laichten die Elritzen nach jeder Temperaturerhöhung ab (T6) (Fig. 5d). Die Anzahl der abgelaichten Eier, die Befruchtungsrate, die Augenpunktrate, der Prozentsatz der geschlüpften Larven, und der normal entwickelten Larven unterschieden sich nicht. Elritzen laichten bei zunehmender Photoperiode (9.5., 10.6.), während der Sommersonnenwende (4.7.) und bei abnehmender Photoperiode (1.8., 15. 11.) ab, sobald die Temperatur von 9°C auf 18°C erhöht wurde. Die Zahl der abgelaichten Eier war am 9.5., 10.6., 4.7., und 1.8. signifikant höher als am 15. November. Die Befruchtungsrate, die Augenpunktrate, der Prozentsatz der geschlüpften Larven, und der normal entwickelten Larven waren am 15. 11. niedriger als am 9. 5., 10.6., 4.7. und 1.8..

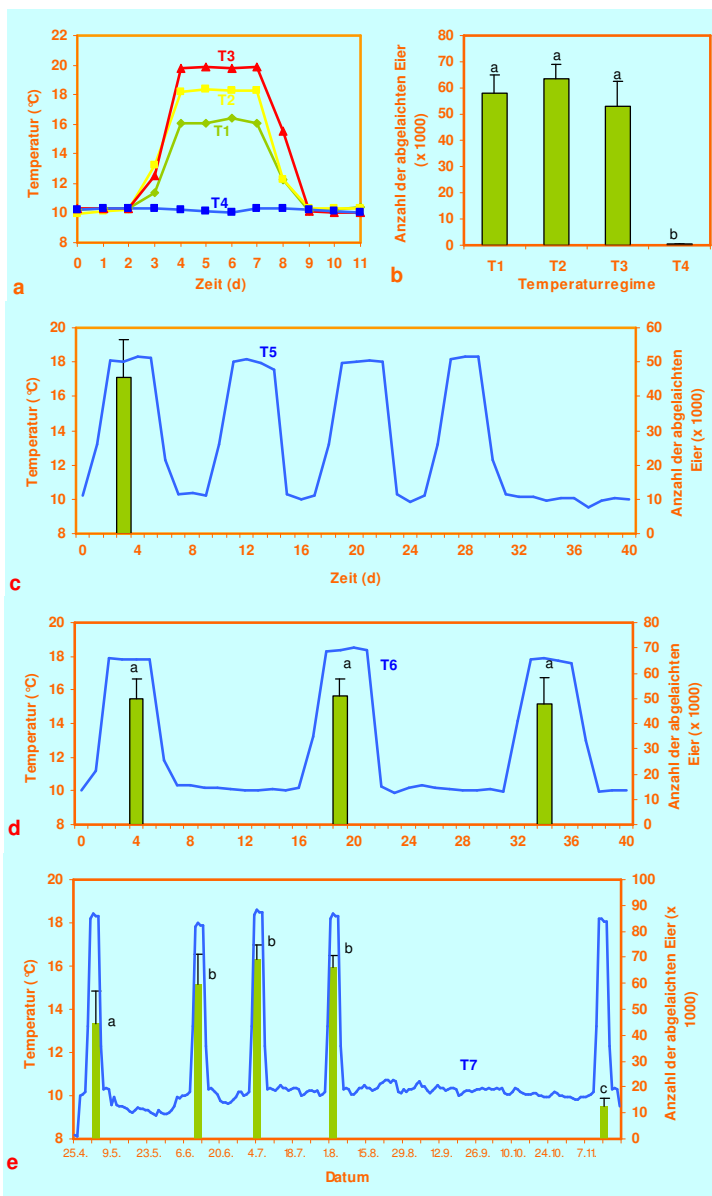


Abbildung 5. Auslösung des Ablachvorganges der europäischen Elritze durch verschiedene Temperaturregime. Linien geben die Wassertemperatur wieder, Balken die Anzahl der abgelaichten Eier. (a) Temperaturregime T1 - T4, (b) Anzahl der Eier, die in T1-T4 abgelaicht wurden, (c) T5, (d) T6, (e) T7. Daten bezüglich der Anzahl der Eier sind Mittelwert \pm Standardabweichung, jene mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Der gonadosomatische Index (GSI) wurde an Wildpopulationen aus der Ager, Trattnach und großen Mühl untersucht. Diese Flüsse hatten signifikant unterschiedliche Wassertemperaturen. Die Ager hatte die höchste Temperatur. Die Wassertemperaturen der Trattnach waren im Frühling, Sommer und Herbst höher als die der großen Mühl (Abb. 6a). Der GSI der Männchen und Weibchen war in der großen Mühl und in der Trattnach im Frühjahr (10.5.) am höchsten (Abb. 6b, c). Für beide Populationen erreichte der GSI der Männchen im Herbst (20-Oktober) und Winter (20.2.) sein Minimum, der der Weibchen im Winter (20.2.) (Abb. 6b, c). In der Elritzenpopulation der Ager zeigte der GSI der Männchen und Weibchen keine klare saisonale Spitze. Er war vom Frühjahr bis zum Herbst (10.5. bis 20.10.) konstant und hatte sein Minimum im Winter (20.2.) (Abb. 6b, c).

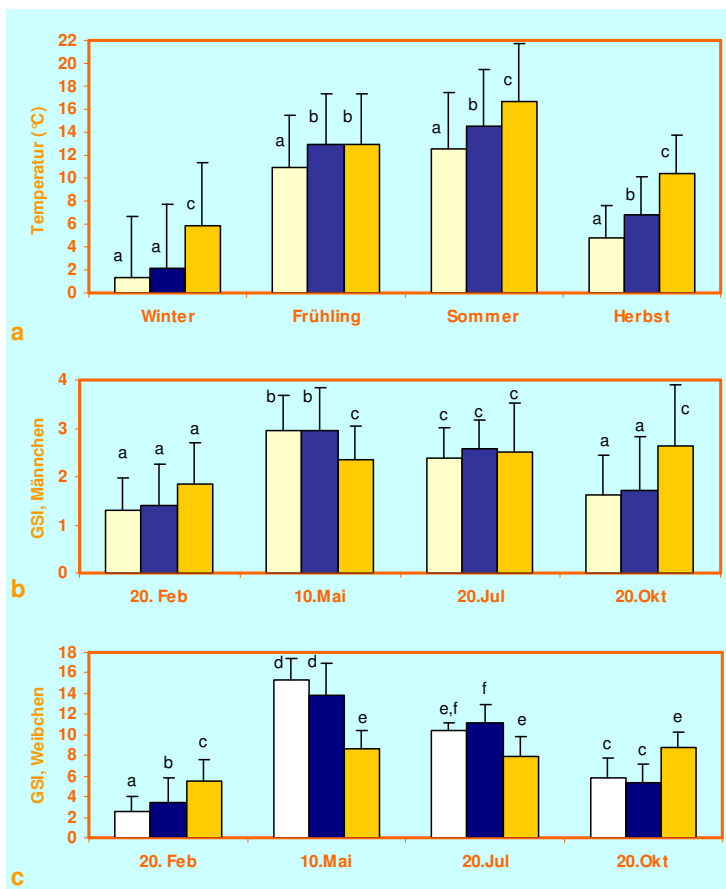


Abbildung 6. Gonadosomatischer Index (GSI) der europäischen Elritze in Flüssen mit unterschiedlichen Temperaturregime. hellgelb - Große Mühl, blau - Trattnach, orange - Ager. (a) Mittlere Wassertemperatur, (b) männlicher GSI, (c) weiblicher GSI. Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung, jene mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

3.2. Einfluss der Temperatur auf die Physiologie der Spermien und Eier

Bei den Bachforellen lag das Temperaturoptimum für die Spermienmotilität bei 4 - 8°C. Der Prozentsatz der beweglichen Spermien war bei > 8°C signifikant erniedrigt und deren Schwimmgeschwindigkeit bei > 10°C. Für Äschenspermien betrug das Temperaturoptimum 6 - 16°C. Barschspermien hatten ein Temperaturoptimum von 12 - 16°C. Für die Motilitätsparameter 10 sec nach der Aktivierung war das Temperaturoptimum noch breiter, da es sich von 12 - 20°C erstreckte. Dagegen war 45 sec nach der Aktivierung die Motilität bei 18 - 20°C erniedrigt. Bei der Elritze wurde die höchste Spermienmotilität bei 10 - 22°C gemessen.

Der Einfluss der Temperatur auf die Gewichtszunahme der Eier während der Quellung wurde bei den Bachforellen untersucht und es zeigten sich in einem weiten

Temperaturbereich von 3 - 15°C keine statistisch signifikanten Unterschiede. Aufgrund dieser hohen Temperaturtoleranz wurden bei Äsche, Barsch und Elritze keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

3.3. Einfluss der Wassertemperatur auf die Embryonalentwicklung

Für Bachforellenembryonen war das Temperaturoptimum $\leq 9^\circ\text{C}$ (Abb. 7a, Tab. 2). Bei 15°C starben alle Embryonen innerhalb der ersten 10 d (Abb. 7a). Bei 11°C und 13°C entwickelten sich Eier zu Augenpunktembryonen. Erfolgte die Erbrütung bei 13°C , war der Prozentsatz der Eier, die sich zu Augenpunktembryonen entwickelten gegenüber 9°C erniedrigt, nicht jedoch bei 11°C (Abb. 7a). Sowohl bei 11°C als auch bei 13°C waren der Prozentsatz von geschlüpften Larven und der Prozentsatz von normal entwickelten Larven gegenüber niedrigeren Temperaturen stark vermindert (Abb. 7a). Wenn Embryonen in späteren Entwicklungsstadien bei 13 oder 15°C inkubiert wurden, entwickelte sich ein höherer Prozentsatz zu Augenpunktembryonen, als wenn Embryonen in frühen Entwicklungsstadien bei 13 oder 15°C inkubiert wurden (Tab. 2). Jedoch waren der Prozentsatz der geschlüpften Larven und der Prozentsatz der normal entwickelten Larven niedrig und für alle diese Versuche gleich. Bachforellenlarven, deren Eier bei suboptimalen Temperaturen erbrütet wurden, wiesen Missbildungen an der Wirbelsäule auf. Diese hatte gegenüber normal entwickelten Larven eine starke Krümmung (Verkrüppelung) (Abb. 8). Die Larven waren schwimmunfähig und starben innerhalb weniger Tage.

Für Äschenembryonen lag das Temperaturoptimum bei 6 - 13°C , da in diesem Temperaturbereich der Prozentsatz der Eier, die sich zu Augenpunkteiern entwickelten, der Prozentsatz der geschlüpften Larven und der Prozentsatz der normal entwickelten Larven am höchsten waren (Abb. 7b). Für Barschembryonen lag das Temperaturoptimum bei 12 - 18°C (Abb. 7c), Elritzenembryonen hatten ein breites Temperaturoptimum von 12.5 bis 25°C (Abb. 7d). Auch in den letztgenannten Arten führten suboptimale Temperaturen zu Missbildungen der Larven wie sie oben an der Bachforelle beschrieben wurden.

Tabelle 2. Einfluss der Temperatur auf die Embryonalentwicklung bei Bachforellen. frühe Embryonalstadien: Befruchtung bis Beginn der Somitenentwicklung, späte Embryonalstadien: Beginn der Somitenentwicklung bis Schlupf. Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung, jene mit verschiedenen Superskripts unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

Erbrütung	Augenpunkt- rate (%)	Schlupfrate (%)	normal entwick- elte Larven (%)
Befruchtung bis Schlupf bei 9°C	$90,9 \pm 11,2^a$	$77,5 \pm 12,4^a$	$69,1 \pm 10,4^a$
Befruchtung bis Schlupf bei 13°C	$65,9 \pm 28,2^b$	$21,6 \pm 27,4^b$	$3,1 \pm 3,2^b$
frühe Embryonalstadien bei 13°C	$45,4 \pm 18,3^c$	$20,5 \pm 18,1^b$	$3,1 \pm 2,8^b$
späte Embryonalstadien bei 13°C	$77,3 \pm 14,5^{a,b}$	$29,8 \pm 13,4^b$	$7,6 \pm 7,7^b$
Befruchtung bis Schlupf bei 15°C	$0,0^d$	$0,0^c$	-
frühe Embryonalstadien bei 15°C	$26,7 \pm 34,7^e$	$0,0^c$	-
späte Embryonalstadien bei 15°C	$76,3 \pm 22,8^b$	$1,9 \pm 4,2^d$	$0,3 \pm 0,2^b$

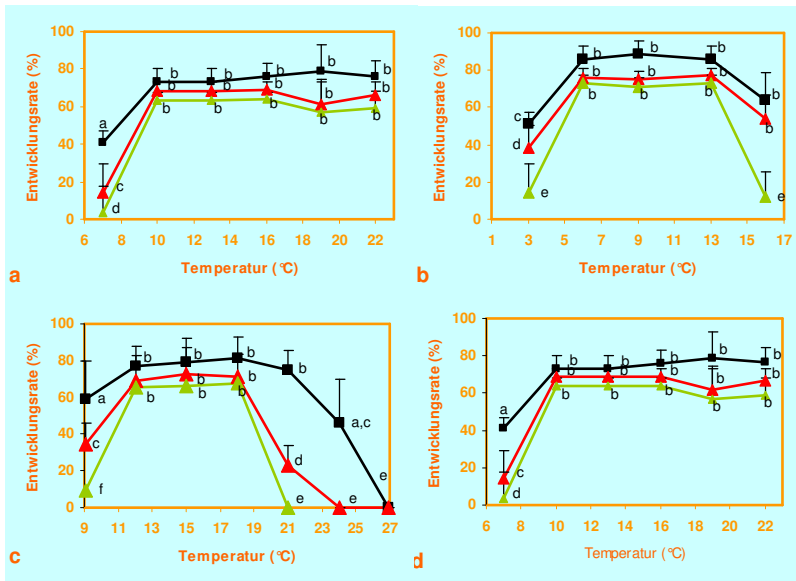


Abbildung 7. Auswirkung verschiedener Temperaturen auf die Entwicklung von Embryonen und Larven. (a) Bachforelle, (b) Äsche, (c) Barsch, (d) Elritze. schwarz: Prozentsatz der Embryonen im Augenpunktstadium, rot: Prozentsatz der geschlüpften Larven, grün: Prozentsatz der normal entwickelten Larven. Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung, jene mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($P < 0,05$).

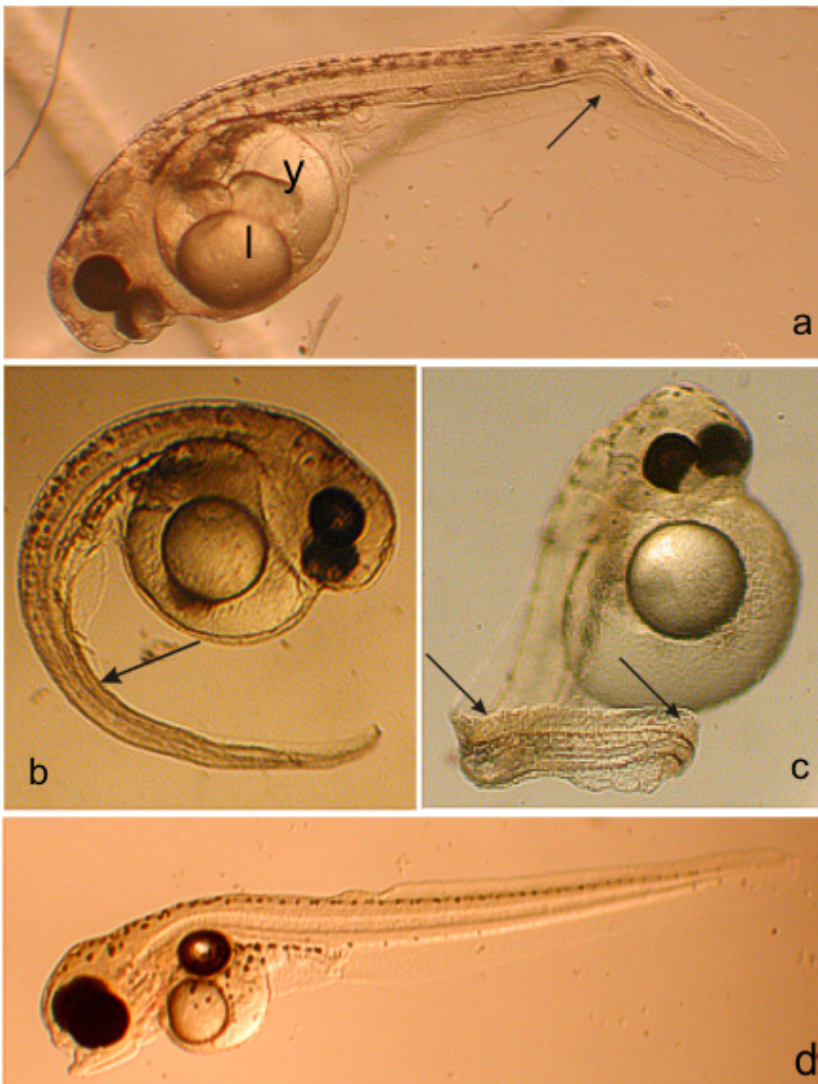


Abbildung 8. Missbildungen bei Dottersacklarven 1 Tag nach dem Schlüpfen. (a) Larve mit geknicktem Schwanz (Pfeil). (b) Larve mit stark gekrümmter Wirbelsäule, (c) Larve mit doppelt geknicktem Schwanz (Pfeile), (d) normal entwickelte Larve.

4 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

4.1 Einfluss der Wassertemperatur auf die Reifung der Spermien und Eier

4.1.1. Bachforelle

Das getestete Temperaturregime T1 stellt ein natürlich schwankendes Temperaturregime dar, das als typisch für alpine Flusssysteme und als optimal für Bachforellen angesehen werden kann. T2 ist ein um 3 - 5°C erhöhtes, natürlich schwankendes Temperaturregime, das typisch für einen heißen Sommer und Herbst mit einem Temperaturabfall spät im Jahr ist und daher repräsentativ für das Szenario eines Klimawandels. T3 hatten eine konstante Temperatur, die im Optimalbereich für Bachforellen lag. T2 hatten die folgenden negativen Auswirkungen: Bei den Männchen wurde der Beginn der maximalen Fortpflanzungsaktivität verzögert und verkürzt. Im Samen wurden biochemische Veränderungen festgestellt, und ein erhöhter Prozentsatz von Spermien wies DNA-Schäden auf. Bei den Weibchen war der Zeitpunkt des Ablagens (Ovulation) für ca. 4 Wochen verzögert, die Befruchtungsrate der Eier war verringert und deren biochemische Zusammensetzung verändert. In T3 war die Reifung der Fische nicht synchronisiert, da kein Peak in der Fortpflanzungsaktivität gefunden wurde, sondern die Fische über einen längeren Zeitraum sukzessive reiften. Laut King und Pankhurst (2004) stören suboptimale Temperaturen die endokrinen Prozesse, die die Gametenreifung steuern.

4.1.2. Äsche

Das Temperaturregime T1 stellte wiederum ein natürlich schwankendes Temperaturregime dar, das typisch für voralpine Flusssysteme ist, in denen sich Äschen fortpflanzen. T2 war ebenfalls ein natürlich schwankendes Temperaturregime, das aber ab Anfang April um 3 - 4°C erhöht war. Dieses Temperaturregime ist typisch für einen raschen Temperaturanstieg zu Frühlingsbeginn. T3 stellte ein konstantes Temperaturregime dar und diente als Negativkontrolle, während T4 abrupte Temperaturänderungen simulierte.

Die Versuche zeigen, dass nur jene Männchen vollständig reiften, die in T1 gehalten wurden. Bei allen anderen Temperaturregimen wurde eine vollständige Reifung des Samens blockiert. Die Reifungsprozesse der Weibchen wurden noch stärker von der Temperatur beeinflusst. Vor allem war ein Temperaturregime mit natürlichen, saisonalen Schwanken zur Reifung der Eier notwendig ist. Dies ist ein Unterschied zur Bachforelle, bei der die Gameten auch bei konstanter Temperatur reiften. Nur bei optimalen Wassertemperaturen (T1) reifte ein hoher Prozentsatz (70%) der Weibchen und die Eier waren von hoher Qualität. Um 3–4°C erhöhte Wassertemperaturen und abrupte Änderungen der Wassertemperatur blockierten die Reifung der Eier fast völlig und die Qualität und Überlebensrate der produzierten Eier war äußerst gering.

Korrelations- und Regressionsanalysen, die an Wildpopulationen durchgeführt wurden, zeigten dass ein leichter Anstieg der Wassertemperatur die Gametenreifung beschleunigte. Ein mittlerer Anstieg der Wassertemperatur vom 21.12. bis zur Fortpflanzungsphase um 1°C beschleunigte die Gametenreifung um circa 5,5 Tage, ein Anstieg um 1°C während der letzten 10 - 15 Tage vor dem Laichen um circa 3,5 Tage.

4.1.3. Barsch

Ähnlich wie bei der Äsche wurde auch beim Barsch ein natürlich schwankendes Temperaturregime getestet, das für voralpine Flusssysteme mit reproduzierenden Barschpopulationen charakteristisch ist. T2 war wiederum ein natürlich schwankendes Temperaturregime mit erhöhten Temperaturen ab Anfang April und T3 ein konstantes Temperaturregime, das als Negativkontrolle diente.

Beim Flussbarsch hatten die untersuchten Temperaturregime keinen Einfluss auf die Reifung der Spermien und die Samenqualität. Dies zeigt, dass die Spermiogenese hauptsächlich durch die Photoperiode gesteuert wird. Oogenese und Ovulation wurden dagegen von der Temperatur beeinflusst. In T2 war der Prozentsatz der ablaichenden Weibchen verringert und der Beginn der Fortpflanzungsperiode für etwa 2 Wochen verzögert. Auch bei konstanten Wassertemperaturen (T3) reifte nur eine geringe Anzahl der Weibchen. Der unterschiedliche Einfluss der Temperatur auf die Reifung von Männchen und Weibchen kann unter reproduktionsbiologischen Gesichtspunkten erklärt werden. Um eine Kontinuität der Reproduktion garantieren können, wird Samen von hoher Qualität während der gesamten Laichzeit unabhängig von kurzfristigen Temperaturreizen produziert. Dagegen laichen die Weibchen nur bei Bedingungen, die das Überleben der Eier und Embryonen gewährleisten. Daher wird die Reifung der Eier durch kurzfristige Umweltparameter gesteuert.

Die Analyse der Wassertemperatur während der Fortpflanzungsperiode zeigte, dass Barsche grundsätzlich in einem weiten Temperaturbereich von 7-16 ° C ablaichen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit denen von Probst et al. (2009). Korrelationsanalysen zeigten, dass das Ablaichen und damit die Ovulation in der folgenden Weise temperaturabhängig ist: Wenn die Temperatur vor dem Laichen niedrig ist (<12 ° C), wird dieses durch einen Temperaturanstieg ausgelöst, wenn die Temperatur hoch ist (> 12°C) durch eine Abnahme der Temperatur. Dies könnte eine Strategie sein, um für die Eier optimale Entwicklungsbedingungen zu gewährleisten.

4.1.4. Elritze

Bei der Elritze wird die Fortpflanzung fast ausschließlich von der Wassertemperatur gesteuert. Darauf weisen folgende Fakten hin: (1) Elritzen laichen in einem konstanten Temperaturregime in Kombination mit einer natürlichen, zunehmenden Photoperiode nicht ab, sondern nur nach einem Temperaturanstieg. (2) Das Ablaichen konnte durch eine Temperaturerhöhung nahezu unabhängig von der Photoperiode ausgelöst werden, nämlich bei zunehmender Photoperiode, während der Sommersonnenwende, und bei abnehmender Photoperiode. Ein Temperaturanstieg von 6 - 10°C beeinträchtigte weder den Zeitpunkt des Ablaichens, noch die Anzahl der abgelaichten Eier oder die Qualität der Eier. Dies weist auf eine hohe Thermotoleranz hin. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Elritze von einem Anstieg der Wassertemperatur aufgrund des Klimawandels profitieren könnte. Die Beobachtung, dass das Ablaichen in 14-tägigen Intervallen induziert werden konnte, bestätigt, dass die Elritze ein Portionslaicher ist wie auch in anderen Studien beschrieben (Frost 1943, Mills 1988, Blanck et al. 2007).

Laichdaten von Wildpopulationen stehen nicht zur Verfügung, da der Laichvorgang in der Natur kaum zu beobachten ist. Untersuchungen des gonadosomatischen Index (GSI) von Elritzenpopulationen aus der Großen Mühl und Trattnach zeigten, dass die Elritzenpopulationen vom Frühjahr bis zum Herbst ablaichten. Die GSI-Werte von Elritzen aus der Ager, die eine erhöhte Wassertemperatur aufweist, deuten darauf hin, dass die Fortpflanzungsperiode unter diesen Bedingungen verlängert ist. Dies bestätigt wiederum die experimentellen Daten, dass das Reproduktionspotential der Elritze durch erhöhte Wassertemperaturen zunehmen könnte.

4.2 Einfluss der Wassertemperatur auf die Spermien und Eier

Aus den Versuchen kann geschlossen werden, dass ökologisch relevante Temperaturen die Spermienmotilität nur geringfügig (Bachforelle, Äsche, Barsch) oder überhaupt nicht (Elritze) beeinflussen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die Befruchtung nicht

nur von der Beweglichkeit der Spermien sondern von weiteren Parametern wie z.B. Alter, sozialer Erfahrung, Spermienkonzentration pro Ei, Wasserturbulenzen und Wasserchemie (Hoysak und Liley, 2001; Liley et al, 2002) abhängig ist. Wie an den Bachforellen gezeigt, haben auch die Eizellen ein breites Temperaturoptimum. In diesem Bereich verlaufen die Prozesse der Eiquellung und die Befruchtungsvorgänge völlig ungestört. Daher wird ein Einfluss von erhöhter Wassertemperatur infolge des Klimawandels auf die Gametenfunktionalität und die Befruchtung ausgeschlossen.

4.3. Einfluss der Wassertemperatur auf die Embryonalentwicklung

Embryonen von Bachforelle, Äsche und Barsch haben ein relativ enges Temperaturoptimum (Bachforelle: 2 - 9°C, Äsche: 6 - 13°C, Barsch: 12 - 18°C), während jenes von Elritzenembryonen breiter ist (12 - 25°C). Suboptimale Temperaturen induzieren irreversible Störungen in den Entwicklungsprozessen und manifestieren sich in Missbildungen der Larven. Dies sind insbesondere Verkrümmungen der Wirbelsäule (Abb. 9). Ähnliche Missbildungen wurden bei Larven von Zebrafischen (Lahnsteiner, 2011) und Aalrutten (Lahnsteiner et al., 2012) beobachtet, wenn die Embryonen bei suboptimalen Temperaturen erbrütet worden waren. Auch eine kurzzeitige Überschreitung des optimalen Temperaturbereichs manifestiert sich in den beschriebenen Missbildungen.

4.4. Nutzung der Daten

Alle Projektergebnisse wurden durch Veröffentlichung auf der Website www.aqua-research.at/ und in wissenschaftlichen Zeitschriften bereits frei zugänglich gemacht. In den Veröffentlichungen wird darauf hingewiesen, dass die Arbeit durch das ACRP Programm des österreichischen Klima- und Energiefonds Fonds finanziert wurde.

Die Daten haben kein Marktpotenzial und werden nicht patentiert. Sie sind für Ministerien, Fischereiinstitute, Fischereiverbände und für Umweltschutzorganisationen von großer Bedeutung, da sie das Reproduktionspotential verschiedener Fischarten in optimalen und suboptimalen natürlichen Temperaturregimen beschreiben. Durch den Einsatz verschiedener Kenngrößen wie z.B. die tägliche, wöchentliche, monatliche Durchschnittstemperatur in der Reproduktionsphase (Vorlaich- und Laichzeit), die tägliche, wöchentliche, monatliche minimale und maximale Temperatur in der Reproduktionsphase, die tägliche, wöchentliche, monatliche minimale und maximale durchschnittliche Temperatur, die Temperatursummengrade, etc. können die hier präsentierten Ergebnisse direkt zur Evaluierung natürlicher Gewässer angewandt werden, sofern die ökologischen und verhaltensbiologischen Rahmenparameter exakt beachtet werden.

Da sich die Daten auf Fischarten beziehen, die auch eine kommerzielle Bedeutung haben, sind sie auch für die Aquakultur von Bedeutung und dabei insbesondere zur Optimierung der Produktion von Aufzuchtbetrieben.

C) Projektdetails

5 Methodik

5.1. Durchgeführte Versuche und angewandte Methoden

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem österreichischen Tierversuchsgesetz durchgeführt. Äschen (mittleres Gewicht 243 ± 47 g), Bachforellen (280 ± 70 g) und

Barsche (114 ± 65 g) wurden von Fischzuchten bezogen, Elritzen (mittleres Gewicht $7,67 \pm 2,95$ g) wurden von Wildpopulationen abgefischt. Die Fische wurden in Langstrombecken mit einem Volumen von 8 m^3 unter natürlicher Photoperiode und bei einer Durchflussrate von 2 l/sec gehalten.

5.1.1. Einfluss der Temperatur auf die Gametenreifung und Gametenqualität

Äsche (*Thymallus thymallus*): Die Experimente mit Äschen starteten am 21. Dezember, da die zunehmende Photoperiode die Gametenreifung induziert. Die Becken wurden mit jeweils 25 männlichen und 25 weiblichen Äschen besetzt. Becken 1 wurde mit Bachwasser versorgt, Becken 2 mit Bachwasser, das vom 15. April an mit einer Wärmepumpe um $3-4^\circ\text{C}$ erwärmt wurde. Im Becken 3 wurden die Fische vom 21.12. bis 28. Februar in Bachwasser gehalten, anschließend wurde das Becken mit Grundwasser versorgt. Das 4. Becken wurde während der gesamten Versuchsperiode mit Grundwasser versorgt.

Da Äschen für den Widerbesatz von verschiedenen Gewässersystemen in der Fischzuchtanstalt Kreuzstein aufgezogen werden, konnten Ablichdaten folgender Populationen in die Untersuchungen miteinbezogen werden: Inn bei Prutz ($47^\circ04'\text{N}$, $10^\circ39'\text{O}$) für die Jahre 2005 - 2010, Kitzbühler Ache bei St. Johann ($47^\circ31'\text{N}$, $12^\circ25'\text{O}$) von 2000 bis 2010, Oichten in der Nähe von Oberndorf ($12^\circ55'\text{N}$, $47^\circ57'\text{O}$) von 1985 bis 1991, und für 1993, 1994 und 1996, Vöckla bei Neukirchen ($48^\circ02'\text{N}$, $13^\circ32'\text{O}$) von 1989 bis 1993. Daten standen auch für eine alpine Stauseepopulation vom Enzingerboden bei Mittersill (1482 m ü.M., $47^\circ10'\text{N}$, $12^\circ37'\text{O}$) (2003-2004 und 2006-2010) zur Verfügung. Die mittleren täglichen Wassertemperaturdaten für den Inn und die Kitzbühler Ache stammten von Messpunkten des österreichischen Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft und von eigenen Messungen mit Temperaturloggern. Fehlende Wassertemperaturdaten wurden basierend auf der mittleren täglichen Lufttemperatur mittels Regressionsfunktionen berechnet.

Anschließend wurden auf Basis der Wassertemperatur und des Ablichzeitpunkts folgende Variablen berechnet: Anzahl der Tage vom 21. Dezember bis zum Ablichen, mittlere Wassertemperatur während der letzten 10, 15, 30 und 45 d vor dem Ablichen, Temperaturunterschied zwischen den letzten 10, 15 und 30 d vor dem Ablichen und den mittleren Januar- und Februartemperaturen, Anzahl der Tage mit einer Wassertemperatur $> 5^\circ\text{C}$ in den letzten 10, 15 und 30 d vor dem Laichen. Die verschiedenen Wassertemperaturvariablen wurden auf Korrelationen zueinander und mit der Anzahl der Tage bis zum Ablichen untersucht.

Barsch (*Perca fluviatilis*): Auch die Versuche mit Barschen begannen am 21.12., wobei die Becken mit jeweils 20 männlichen und 20 weiblichen Fischen besetzt wurden. Becken 1 wurde mit Bachwasser versorgt, Becken 2 mit Bachwasser, das vom 15. April an mit einer Wärmepumpe um $3-4^\circ\text{C}$ erwärmt wurde. Das dritte Becken wurde während der gesamten Versuchsperiode mit Grundwasser versorgt. Fichtenzweige oder Kokosmatten wurden als Laichsubstrat eingebracht.

Die Ablichtermine von Barschen wurden an 2 Wildpopulationen vom Mondsee ($47^\circ49'\text{N}$, $13^\circ24'\text{O}$) und vom Grundlsee ($47^\circ37'\text{N}$, $13^\circ49'\text{O}$) untersucht. An Standorten, die aus früheren Beobachtungen als Laichplätze bekannt waren, wurden Fichtenzweige in einer Tiefe von 1-2 m fixiert. Diese Laichsubstrate wurden täglich auf angeheftete Eistränge untersucht. Parallel wurde die Wassertemperatur mit Temperaturloggern aufgezeichnet.

Auf Grundlage der Wassertemperaturdaten und des Ablichtermins wurden folgende Variablen erstellt: Wassertemperatur am Tag des Ablichens (spT), mittlere Wassertemperatur während der letzten 3 d (mT3d) und 6 d (mT6d) vor dem Laichen, Temperaturdifferenz zwischen dem Mittelwert der Tage 1-3 und dem Mittelwert der Tage 4-6 vor dem Laichen [$\text{mT}(d1\dots3) - \text{mT}(d4\dots6)$] und die Temperaturdifferenz zwischen dem

Mittelwert der Tage 1-5 und dem Mittelwert der Tage 6-10 vor dem Laichen [mT(d1...5)-mT(d6...10)]. Diese Variablen wurden auf Korrelationen untersucht, um kurzfristige Temperaturveränderungen bestimmen zu können, die das Ablachen induzieren.

Bachforelle (*Salmo trutta*): Die Experimente an Bachforellen begannen am 15. August, da die abnehmende Photoperiode die Gametenreifung induziert. Die Becken wurden mit jeweils 25 männlichen und 20 weiblichen Tieren besetzt. Becken 1 wurde mit Bachwasser versorgt, Becken 2 mit Seewasser vom Mondsee, das eine circa 4 - 5°C höhere Temperatur hatte und Becken 3 mit Grundwasser.

Elritzen (*Phoxinus phoxinus*): Bei den Elritzen setzten sich die Experimentalgruppen aus jeweils 10 männlichen und 10 weiblichen Fischen zusammen und jedes Experiment wurde einmal wiederholt. Alle Experimente wurden unter Durchflussbedingungen (Durchflussrate: 1 l/h) und unter natürlicher Photoperiode durchgeführt. Zum Ablachen wurden die Fische in Becken mit einem doppelten Boden aus Edeltahlgitter gesetzt. Die abgelaichten Eier fielen durch das Drahtgitter auf den Boden und Eikannibalismus konnte dadurch verhindert werden. Im 1. Experiment wurde am 25. April die Wassertemperatur von 9°C auf 16°C, 18°C, oder 20°C erhöht. Nach 4 Tagen wurde die Temperatur wieder auf 9°C abgesenkt. Gruppe 4 wurde als Kontrolle bei 9°C gehalten. Im 2. Experiment wurde die Wassertemperatur im Abstand von 8 Tagen oder 16 Tagen von 9°C auf 16°C erhöht. Im 3. Experiment wurde versucht, das Ablachen in verschiedenen Jahreszeiten zu induzieren. Dazu wurde bei zunehmender Photoperiode (9. Mai, 10. Juni), zur Sommersonnenwende (4. Juli), und unter abnehmender Photoperiode (1. August, 15. November) eine Temperaturerhöhung von 9°C auf 16°C durchgeführt.

Weiters wurden Elritzen von Wildpopulationen der großen Mühl (48°34'N, 14°02'O), Trattnach (48°14'N, 13°49'O) und Ager (48°30'N, 13°47'O) am 21. 10. 2008, 20. 2. 2009, 9. 5. 2009 und 20. 7. 2009 elektrisch abgefischt. Diese Untersuchungen waren Teil eines größeren Projekts, das die Auswirkung der Wassertemperatur auf verschiedene Stressparameter von Wildfischen erfasste. Die Fische wurden durch eine Überdosis MS222 getötet und anschließend wurden neben anderen Parametern auch Länge, Gewicht und Gonadengewicht erfasst. Der gonadosomatische Index wurde mit der Formel $\text{Gonadengewicht} / \text{somatische Gewicht} * 100$ berechnet.

Für jede Fischart wurden alle beschriebenen Versuche einmal wiederholt. Während der Experimente wurde die Wassertemperatur zweimal am Tag mit Temperaturloggern von TinyTag® gemessen, nämlich um 6.00 Uhr und 18.00 Uhr. Bei Äschen, Bachforellen und Barschen wurde etwa 2 Wochen vor Beginn der Fortpflanzungsphase begonnen durch Abstreifen den Reifegrad der Fische festzustellen. Sobald die Fische reif waren, wurden Samen und Eier abgestreift und für die verschiedenen Tests verwendet. Barscheier können ohne hormonelle Vorbehandlung der Fische nicht abgestreift werden. Deshalb wurde ihnen ein natürliches Ablachen auf den oben beschriebenen Laichsubstraten ermöglicht. Die Eistränge wurden von den Laichsubstraten abgesammelt und ebenfalls für die Qualitätstests verwendet.

5.1.2. Einfluss der Temperatur auf die Embryogenese und Larvenentwicklung

Frisch befruchtete Eier wurden in speziellen, selbsthergestellten Inkubatoren bei verschiedenen Temperaturen erbrütet. Die einzelnen Inkubatoren wurden in rechteckige Kunststoffbehälter gehängt, die mit 50 l Wasser befüllt waren. Das Wasser wurde mit Heizstäben auf die gewünschte Temperatur erwärmt und jeder Behälter wurde über Ausströmer mit Luft versorgt. Das Wasser wurde bei Bachforellen in 10-tägigen Intervallen gewechselt, bei den anderen Arten in 2-tägigen Intervallen. Der Prozentsatz der Eier die

sich zum Augenpunktstadium entwickeln, der Prozentsatz der geschlüpften Larven, und der Prozentsatz der missgebildeten Larven wurden bestimmt.

5.1.3. Einfluss der Temperatur auf die Physiologie der Spermien und Eier

Die Spermienmotilität wurde mit Wasser bei verschiedenen Temperaturen aktiviert. Um die prozentuelle Gewichtszunahme der Eier während der Quellung zu bestimmen, wurde das Gewicht der frisch abgestreiften Eier bestimmt. Anschließend wurden die Eier 90 min lang in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Danach wurde das Wasser abgetrennt und das Eigewicht erneut bestimmt. Die Veränderungen im Eigewicht wurden als prozentuelle Gewichtszunahme berechnet. Bei Bachforellen wurden im Bereich von 3 - 15°C Befruchtungsexperimente durchgeführt. Samen und Eier wurden bei der Prüftemperatur für 5 min äquilibriert. Danach wurde die Befruchtung durchgeführt (Verhältnis Spermien : Ei = 1×10^5 : 1) und die Gameten wurden für 15 min bei der Prüftemperatur inkubiert. Abschließend wurden die befruchteten Eier in Durchflussinkubatoren bei $9 \pm 1^\circ\text{C}$ bis zum Augenpunktstadium erbrütet.

5.1.4. Analysemethoden

Samenvolumen, Samendichte, Beweglichkeit der Spermien, Spermienfertilität, Eigewicht, Anzahl der Eier pro Weibchen, Gewichtszunahme der Eier während der Quellung, Eifertilität und biochemische Parameter (Membranintegrität und DNA-integrität der Spermien, biochemische Zusammensetzung der Eier) wurden mit Routinemethoden bestimmt, die in Fachzeitschriften veröffentlicht wurden (Lahnsteiner et al., 1999, 2010). Für die statistischen Analysen wurde hauptsächlich die Varianzanalyse verwendet. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung wiedergegeben.

5 Arbeits und Zeitplan

Der Arbeitsplan und Zeitplan wird im folgenden Flussdiagramm dargestellt.

AP nr.	Titel des Arbeitspakets	Dauer	Anfang bis Ende
1	Aufbau der Versuchsanlage	2	01-03-2010 bis 30-04-2010
2	Einfluss der Temperatur auf die Gametenreifung und Gametenqualität in <i>Phoxinus phoxinus</i>	3	01-05-2010 bis 31-07-2010
5	Analyse der Gametenqualität	1	01-08-2010 bis 31-08-2010
3	Einfluss der Temperatur auf die Gametenreifung und Gametenqualität in <i>Salmo trutta</i>	4	01-09-2010 bis 31-12-2010
5	Analyse der Gametenqualität	1	01-01-2011 bis 31-01-2011
4	Einfluss der Temperatur auf die Gametenreifung und Gametenqualität in <i>Perca fluviatilis</i> und <i>Thymallus thymallus</i>	4	01-02-2011 bis 31-05-2011
5	Analyse der Gametenqualität	3	01-06-2011 bis 31-08-2011

5	Analyse der Gametenqualität	1	01-09-2011 bis 30-09-2011
3	Einfluss der Temperatur auf die Gametenreifung und Gametenqualität in <i>Salmo trutta</i>	2	01-10-2011 bis 30-11-2011
5	Analyse der Gametenqualität	2	01-12-2011 bis 31-01-2012
6	Verfassen von Publikationen und Abschlussberichten	2	01-02-2012 bis 31-03-2012
2	Einfluss der Temperatur auf die Gametenreifung und Gametenqualität in <i>Phoxinus phoxinus</i>	2	01-04-2012 bis 31-05-2010
6	Verfassen von Publikationen und Abschlussberichten	2	01-06-2012 bis 31-07-2012

5 Publikationen und Disseminierungsaktivitäten

- Lahnsteiner F, Kletzl M. (2011). The effect of water temperature on gamete maturation and gamete quality in the European grayling (*Thymallus thymallus*) based on experimental data and on data from wild populations. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 455-467. doi:10.1007/s10695-011-9526-8
- Lahnsteiner F. (2012). Thermotolerance of brown trout, *Salmo trutta*, gametes and embryos to increased water temperatures. *J. Appl. Ichthyol.* 2012, 1–7. e-pub ahead of print. DOI: 10.1111/j.1439-0426.2012.01934.x
- Lahnsteiner F, Kletzl M, Weismann T. (2012). The effect of temperature on embryonic and yolk-sac larval development in the burbot *Lota lota*. *J. Fish Biol.* 81, 977–986. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03344.x
- Lahnsteiner F, Mansour N. (2011). The effect of temperature on sperm motility and enzymatic activity in brown trout *Salmo trutta*, burbot *Lota lota* and grayling *Thymallus thymallus*. *J. Fish Biology* 81, 197–209. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03323.x
- Lahnsteiner F. (2012). The effect of water temperature on gamete maturation, gamete quality, and timing of spawning in the perch (*Perca fluviatilis*). Manuscript eingereicht bei Journal of Applied Ichthyology. Access via www.aqua-research.at/
- Lahnsteiner F., Strobl S., Kletzl M. (2012). Effect of temperature on the on gamete maturation, development of embryos and sperm motility in the European minnow, *Phoxinus phoxinus*. Manuscript eingereicht bei Fisheries Management and Ecology. Access via www.aqua-research.at/
- Lahnsteiner F., Leitner S. (2012). Effect of temperature on gametogenesis and gamete quality in brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of Experimental Zoology Part A*, in press. Access via www.aqua-research.at/

6 Literaturverzeichnis

- Billard R., Breton B. (1978). "Rhythms of Reproduction in Teleost Fish," In Thorpe J. E. (ed.), *Rhythmic Activity of Fishes*, New York, Academic Press, pp. 31–53.
- Bon E., Breton B., Govoroun M., and Menn F. (1999). Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: II seasonal variations of plasma

- gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 143-154.
- Bromage N., Porter M., Randall C. (2001). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98.
- Čech M., Vejrik J., Peterka J., Řiha M., Muška M., Jůza T., Draštik V., Kratochvíl M., Kubečka J. (2012). The use of artificial spawning substrates in order to understand the factors influencing the spawning site selection, depth of egg strands deposition and hatching time of perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Limnol.* 71, 170-179.
- Davies B., Bromage N. (2001). The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 205:183-200.
- Gern W.A., Stonecypher R.W., Hubert W.A. (1994). Effect of reduced incubation temperatures on survival of trout embryos. *Progr. Fish Cult.* 56, 180-184.
- Gillet C., Dubois JP. (2007). Effect of water temperature and size of females on the timing of spawning of perch *Perca fluviatilis* L. in Lake Geneva from 1984 to 2003. *J. Fish Biol.* 70, 1001-1014.
- Glasser F., Mikolajczyk T., Jalabert B., Baroiller J.F., Breton B. (2004). Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Gen Comp Endocrinol.* 136, 171-179.
- Gumà S.A. (1978). The effects of temperature on the development and mortality of eggs of perch, *Perca fluviatilis*. *Freshwater Biol.* 8, 221-227.
- Horvath L. (1978). Relation between ovulation and water temperature by farmed cyprinids. *Aquacult. Hung.* 1, 58-65.
- Hoysak D.J., Liley, N.R. (2001). Fertilization dynamics in sockeye salmon and a comparison of sperm from alternative male phenotype. *J. Fish Biol.* 58, 1286-1300.
- King H.R., Pankhurst N.W. (2004). Effect of short-term temperature reduction on ovulation and LHRHa responsiveness in female Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained at elevated water temperatures. *Aquaculture* 238, 421-436.
- Lahnsteiner F., Weismann T., Patzner R.A. (1999). Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiol., Biochem.* 20, 375-388.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Caberlotto S. (2010). Composition and metabolism of carbohydrates and lipids in *Sparus aurata* semen and its relation to viability expressed as sperm motility when activated. *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 157, 39-45.
- Lahnsteiner F. (2011). Limitations for prolonged chilled storage of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquaculture Res.* 42, 288-295.
- Lahnsteiner F., Kletzl M., and Weismann T. (2012). The effect of temperature on embryonic and yolk-sac larval development in the burbot *Lota lota*. *J. Fish Biol.* e-pub ahead of print.
- Liley N.R., Tamkee P., Tsai R., Hoysak D.J. (2002). Fertilization dynamics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of male age, social experience, and sperm concentration and motility on in vitro fertilization. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 59, 144-152.
- Luczynski M. (1984). A technique for delaying embryogenesis of vendace (*Coregonus albula* L.) eggs in order to synchronize mass hatching with optimal conditions for lake Ojanguren and Braña (2003)
- Manning N. J., Kime D. E. (1984). Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., in vivo and in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 376-388.
- Mills C. A. (1988). The effect of extreme northerly climatic conditions on the life history of the minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.) *J. Fish Biol.* 33, 545-561.
- Pankhurst N.W., Purser G.J., van der Kraak G., Thomas P.M., and Forteath G.N.R. (1996a). Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290.

- Pankhurst N.W., Purser G.J., van der Kraak G., Thomas P.M., and Forteach G.N.R. (1996b). Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290.
- Probst W.N., Stoll S., Hofmann H., Fischer P., and Eckmann R. (2009). Spawning site selection by Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) in relation to temperature and wave exposure. *Ecol. Freshwater Fish.* 18, 1-7.
- Sandströ O., Abrahamsson I., Andersson J., and Vetemaa M. (1997). Temperature effects on spawning and egg development in Eurasian perch. *J. Fish Biol.* 51, 1015-1024.
- Treasurer J.W. (1983). Estimates of egg and viable embryo production in a lacustrine perch, *Perca fluviatilis* *Env. Biol. Fish.* 8, 3-16.
- Zeh M., Ritter E., and Ribí G. (1989). Spawning and egg development of *Perca fluviatilis* in Lake Zürich. *Aquat. Sci.* 51, 100-107.

Diese Projektbeschreibung wurde von der Fördernehmerin/dem Fördernehmer erstellt. Für die Richtigkeit, Vollständigkeit und Aktualität der Inhalte übernimmt der Klima- und Energiefonds keine Haftung.