

DIVERSIFY

Adlerfisch (*Argyrosomus regius*)

Während des ersten Projektjahres (Dez. 2013 – Nov. 2014) konnten bereits erste Untersuchungen mit dem Adlerfisch (*Argyrosomus regius*) durchgeführt werden. Die wichtigsten Ergebnisse finden Sie in der nachfolgenden Aufstellung:

1. Reproduktion

Die genetische Variabilität verschiedener Elterntierbestände wurde mittels Multiplex-Analysen durch das FCPCT (Fundacion Canaria Parque Cientifico Tecnologico de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria – AG Dr. J.M. Alfonso) analysiert. Die untersuchten Bestände scheinen drei verschiedenen Populationen mit einer ausreichend großen genetischen Variabilität anzugehören, um einen Zuchtbestand aufbauen zu können (Fig. 1). Dennoch wird es noch einiger Bemühungen benötigen, um einzelne Bestände zu sortieren und konzentriert geeignete Zuchtlinien zu etablieren.

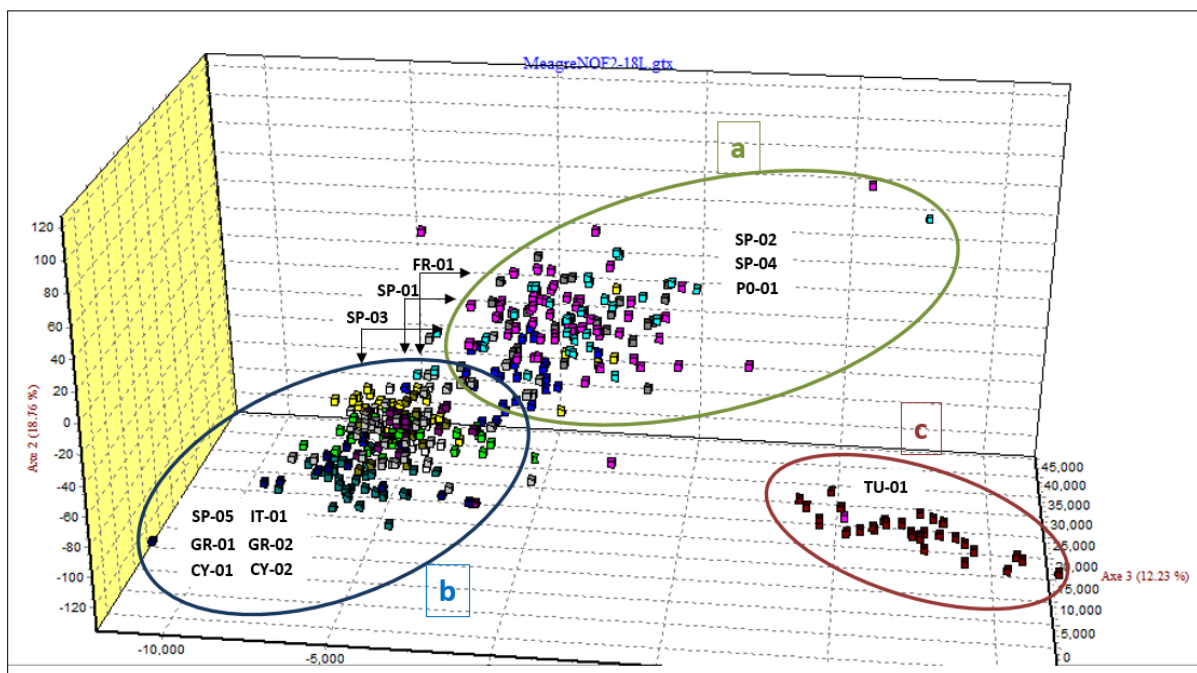


Fig. 1. Faktorielle Korrespondenzanalyse von 18 Loci (n = 376) aus 13 Adlerfisch-Populationen (*Argyrosomus regius*, Aquakultur Mittelmeer).

Im IRTA (Institute de Recerca I Tecnologia Agroalimentaries – AG Dr. N. Duncan) wurden jeweils 6 adulte Weibchen (\varnothing 21,2 kg) und Männchen (16,1 kg) wechselweise verpaart. Die finale Reifung wurde mittels GnRH-Injektionen (15 μ g/kg Weibchen, 7,5 μ g/kg Männchen – gegeben im Abstand von 7 – 10 Tagen) induziert. Elterntiere, die nach 2 – 3 Injektionen keine Laichaktivität zeigten, wurden ausgetauscht. Insgesamt konnten 41 Paare zum Ablaichen gebracht werden, wovon 10 Paare > 500.000, 16 Paare > 250.000 und 19 Paare > 100.000 Larven produzierten (Fig. 2). Es konnte während des Versuchs kein signifikanter Zusammenhang zwischen schlechten Laicherfolgen und Reifegrad, Mehrfachlaichern oder der Laichinduktion festgestellt werden. Dagegen zeigten einzelne Individuen hohe Variationen in der Anzahl abgelaichter Eier und deren Qualität.

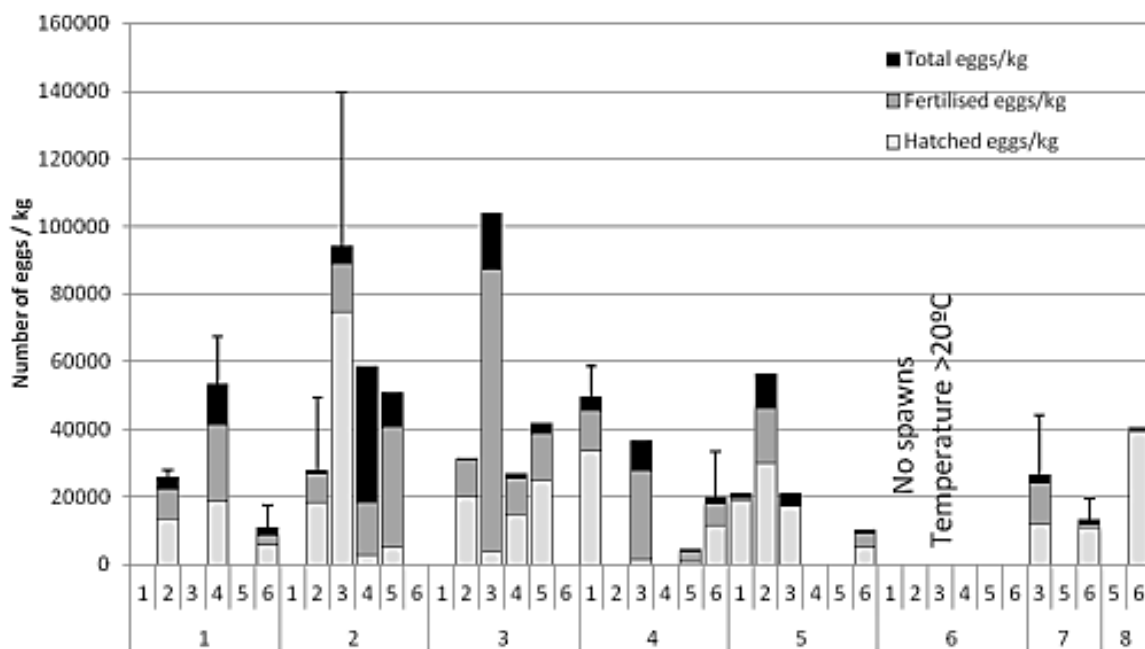


Fig. 2. Durchschnittliche Eimenge (\pm SD) pro kg Körpergewicht nach GnRH-Injektion. Totale Eizahlen wurden mit dem prozentualen Fertilisationsanteil und der Schlupfrate multipliziert, um die Anzahl befruchteter Eier und die erwartete Schlupfrate bestimmen zu können.

Ein weiteres Experiment mit der Fragestellung, wie viele erfolgreiche Gelege durch fortlaufend wöchentliche GnRH-Injektionen gewonnen werden können, wurde mit 4 Brutpaaren am HCMR (Hellenic Center for Marine Research - AG Dr. C.C. Mylonas) durchgeführt. Durch das angewandte Injektionsmanagement konnten maximal 17 Gelege mit Schlupfraten über 80 % und einer Überlebensdauer der Larven von 5 Tagen erzielt werden.

Beide Versuchsdurchgänge belegen, dass durch paarweise Haltung der Elterntiere hochqualitative Eier gewonnen werden können. Somit kann dieses Verfahren für die Durchführung von Zuchtprogrammen angewendet werden.



Durch eine Biopsie der Ovarien kann der Reifegrad verlässlich festgestellt werden.

2. Larvenkultur

Die Umstellung der Larven auf Trockenfutter (weaning) wurde an der IRTA (Dr. A. Estevez) untersucht. Dafür wurden Larven verschiedenen Alters (12, 15 und 20 Tage nach dem Schlupf) mit Futter aus 50 % angereicherten Artemia-Metanauplien und 50 % Fischfutter (Gemma Micro, Skretting), gefüttert. Folgende Daten wurden erhoben: Wachstumsrate (Fig. 3), Überlebensrate (Fig. 4), Fettsäurezusammensetzung und Entwicklung des Verdauungsapparates (Histologie und Enzymaktivität). Durch den ausgeprägten Kannibalismus ab dem 12. Tag waren die Überlebensraten sehr gering (2 – 3,3 %). Auf diesen Ergebnissen aufbauend wird 2015 ein Versuchsdurchlauf mit weiteren Fragestellungen, z. B. Verlängerung der Photoperiode zur Erhöhung der potentiellen Futteraufnahmezeitdauer oder Erhöhung der Besatzdichte, durchgeführt.

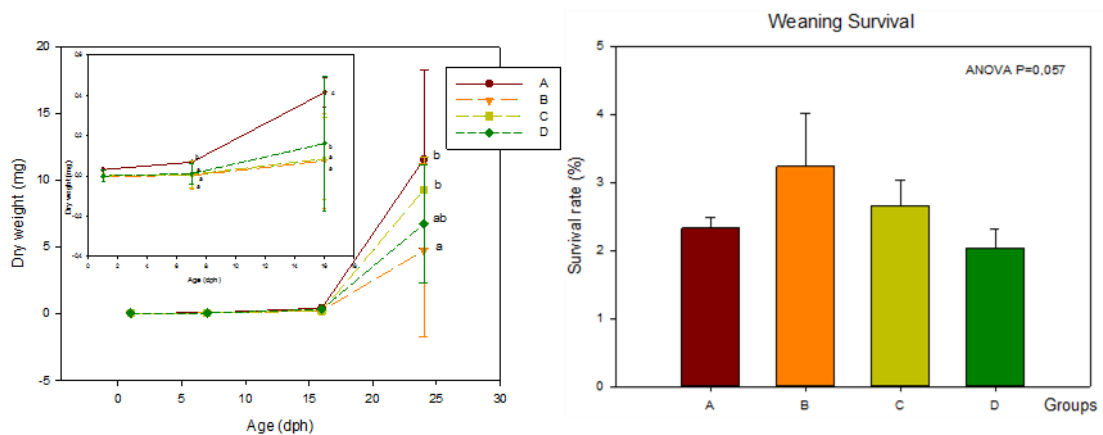


Fig. 3 und 4. Wachstum (Trockengewicht in mg) und Überlebensrate (%) der Larven während des Weaning.

3. Ernährung

Der Bedarf der wachsenden Larven an Omega-3-Fettsäuren (hoch ungesättigte Fettsäuren = HUFA) und Vitamin C und E wurden in mehreren Fütterungsexperimenten an der FCPCT (AG Dr. L. Robaina) untersucht. Nachdem Larven vom 14. bis zum 28. Tag nach dem Schlupf mit verschiedenen Kombinationen aus HUFA (0,5 – 3,5 %) und Vit. E und C (150 Vit. E + 180 Vit. C, 300 Vit. E + 180 Vit. C, 300 Vit. E + 360 Vit. C) versorgt worden sind, konnte bei Einsatz von 3,5 % HUFA (gegenüber 0,5 %) eine klare Steigerung des Wachstums und des individuellen Körpergewichts beobachtet werden. Die Verwendung verschiedener Vitaminkonzentrationen hatte dagegen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Larven.

Durch die Analyse der Körperzusammensetzung konnte gezeigt werden, dass eine fettreiche Diät (Fischöl und/oder Omega-3-Fettsäuren) die Konzentrationen von Omega-3-FS im Körper erhöht und in Kombination mit Vit. E und C zusätzlich den Gesamtkörperfettgehalt steigert. Durch histologische Analysen ist ebenfalls der Einfluss der Futterzusammensetzung auf die Entwicklung des Kopfdarms nachgewiesen worden. Larven, die mit 0,5 % HUFA versorgt wurden, hatten besonders ausgeprägt pigmentierte Enterozyten mit zentral gelegenem Nukleus und wenigen Lipidvakuolen, wohingegen Larven mit höheren Konzentrationen an HUFA (z. B. 3,5/150/180) mehr und größere Enterozyten mit Lipidvakuolen um den Nukleus aufwiesen. Dies deutet demzufolge auf eine gesteigerte Absorption von Lipiden hin. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass hohe Konzentrationen an n3-

HUFAs von Adlerfischlarven benötigt werden, um das Wachstum zu fördern. Eine Gabe von Vit. E und C reduziert dazu die Oxidation von Fettsäuren während der Entwicklung.

Daher müssen für das Weaning Futtermittel verwendet werden, die ausreichend n3-HUFAs sowie Vit. E und C enthalten (Tab. 1).

	Diet					
	0.5/150/180	0.5/300/180	0.5/300/360	3.5/150/180	3.5/300/180	3.5/300/360
Total length (24dah)	4.754±0.44 ^b	4.999±0.39 ^a	4.906±0.40 ^{ab}	4.955±0.45 ^a	4.964±0.48 ^a	5.055±0.38 ^a
Total length (28dah)	5.155±0.46 ^{ab}	5.198±0.43 ^{ab}	5.139±0.51 ^{ab}	5.290±0.44 ^a	4.969±0.31 ^b	5.340±0.59 ^a
Dry weight (24dah)	0.192±0.04 ^c	0.208±0.02 ^{bc}	0.202±0.03 ^{bc}	0.207±0.02 ^{bc}	0.223±0.02 ^{ab}	0.238±0.03 ^a
Dry weight (28dah)	0.233±0.02	0.214±0.04	0.207±0.03	0.267±0.05	0.234±0.05	0.244±0.04
Survival (%)	12.09±4.96	8.04±5.20	15.12±4.14	14.16±8.29	16.68±3.45	15.16±7.67

*Values (mean ± standard deviation) with the same letters are not significantly different; ANOVA, $P_{\text{Length}} < 0.01$; $P_{\text{Weight}} < 0.05$.

Tab. 1. Performance und morphometrische Parameter von Adlerfischlarven (initiale Körperlänge $4,07 \pm 0,26$ mm und Trockengewicht $0,058 \pm 0,01$ mg), die mit 6 unterschiedlichen Futterkombinationen (Omega-3-Fettsäuren, Vit. E und C) zwischen dem 14. und 24. Tag nach dem Schlupf versorgt wurden.

Ausgesuchte Futterkombinationen wurden darüber hinaus eingesetzt, um die Effekte auf folgende Marker zu untersuchen:

1. Stressresistenz durch Handling (FCPCT)
2. Genexpression von Stress-Bio-Markern (z. B. HSPs) (FCPCT)
3. Verhalten (Danmarks Tekniske Universitet - AG Dr. Ivar Lund)
4. Energieverbrauch nach subletalem Stress (Danmarks Tekniske Universitet - AG Dr. Ivar Lund)
5. Aktivität (mittels Videoanalytik) (Danmarks Tekniske Universitet - AG Dr. Ivar Lund)
6. Fluchtverhalten (Danmarks Tekniske Universitet - AG Dr. Ivar Lund)
7. Sinnesverarbeitung (Schärfe) (Danmarks Tekniske Universitet - AG Dr. Ivar Lund)

8. Verdauungsenzyme (Proteasen, Amylase, Lipase)

9. ATPase-Aktivität im Darm (University of La Laguna, Dr. Covadonga Rodriguez)

Der Bedarf an essentiellen Fettsäuren wird durch Fütterungsexperimente mit 6 verschiedenen Variationen der Omega-3-Fettsäuren Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure und Arachidonsäure (FCPCT) im Futter evaluiert werden.

4. Mast

Während der Larvenaufzucht ist es unabdingbar, diese regelmäßig nach Größen zu sortieren, um so einerseits dem Kannibalismus vorzubeugen und andererseits schlecht wachsende Individuen auszusortieren. Diese könnten ansonsten die Wachstumsbilanz der Tiere nach dem Transfer in Netzgehegeanlagen negativ beeinflussen. Um die natürlichen Gegebenheiten einer kommerziellen Aufzucht realistisch zu simulieren und mögliche Variationen der Wachstumsraten zu erfassen, wurde ein Mischbestand juveniler Adlerfische aus 5 Elterntierbeständen am IRTA untersucht. Dafür wurden die Tiere zunächst unter identischen Bedingungen (anfängliche Besatzdichte, Futter, Tankgröße) aufgezogen. Während einer 4-monatigen Haltung wurde die Wachstumsleistung der Tiere kontrolliert und verglichen. 70 % der Fische lagen nach 4 Monaten in einem Bereich von 15 – 30 g (Fig. 5).

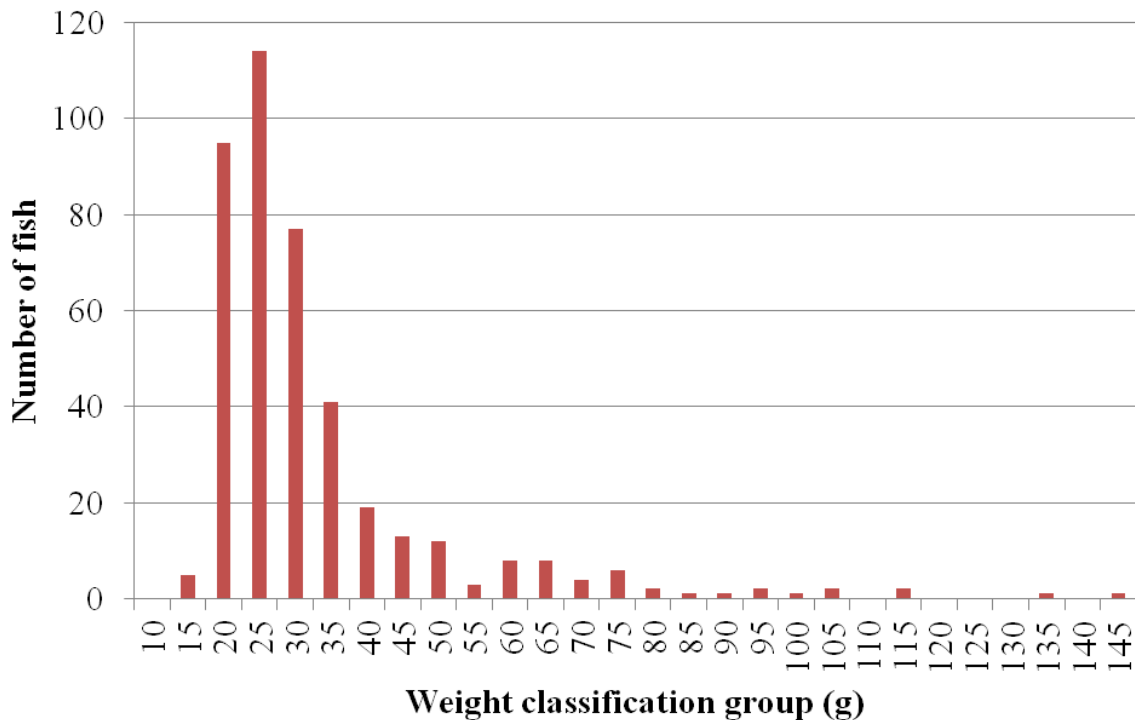


Fig. 5. Größenverteilung aller Fische nach 4-monatiger Hälterung.

Problematisch war die Verschiebung von 30 % der Population, die Individuengewichte zwischen 30 und 145 g aufwiesen. Die normalverteilten 70 % wurden in 3 Größenklassen eingeteilt und regelmäßig gewogen:

1. Groß, 25 – 30 g (73 Tiere)
2. Mittel, 20 – 25 g (89 Tiere)
3. Klein, 15 – 20 g (86 Tiere)

Jeweils 50 Tiere jeder Gruppe wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und alle 21 Tage vermessen. Große Fische wuchsen innerhalb des 4-monatigen Versuchszeitraums von $27,2 \pm 1,5$ g auf 113 ± 21 g, Tiere der mittleren Gruppe von $22,7 \pm 12,2$ g auf $94,2 \pm 19,8$ g und kleine Tiere von $17,9 \pm 1,8$ g auf $71,6 \pm 31,31$ g. Bei jeder Probenahme waren die Tiere der einzelnen Gruppen signifikant ($P < 0,05$) gewachsen (im Vergleich zu der jeweils vorhergegangenen Beprobung). Die Wachstumsraten der einzelnen Gruppen waren nahezu identisch (Fig. 6). Um mögliche Unterschiede im Wachstum der Nachkommen der 5 verschiedenen Elternlinien zu untersuchen, wurden alle Tiere nach Beendigung des Versuchs (11.12.2014) genetisch analysiert.

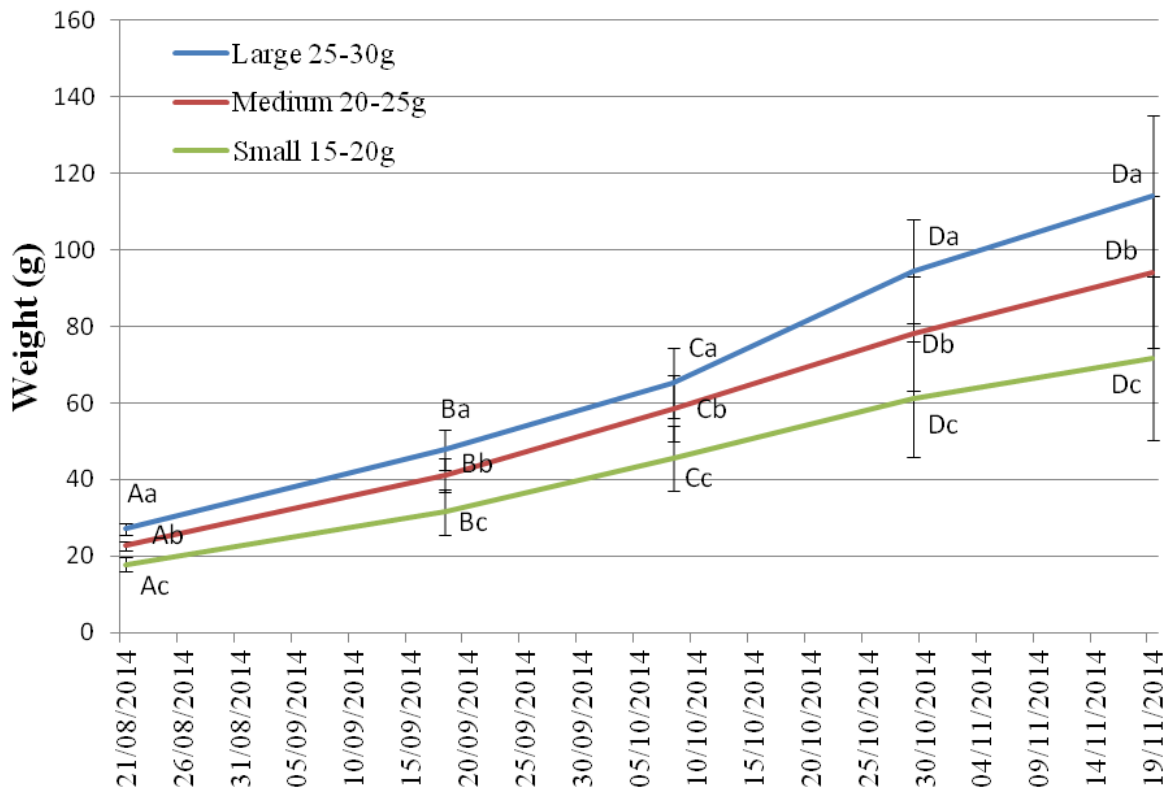


Fig. 6. Durchschnittliche Gewichtszunahme ($g \pm SD$) von juvenilen Adlerfischen dreier Gewichtsklassen (Large, Medium, Small) über einen Zeitraum von 4 Monaten in g. Alle Fische stammten aus 5 verschiedenen Gelegen aus 2 Laichgeschehen. Großbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) innerhalb einer Größenklasse, kleine Buchstaben solche ($P < 0,05$) zwischen den Gruppen an dem jeweiligen Beprobungstag an.



Gewichtskontrolle der Adlerfische.

Der Effekt verschiedener Netzkäfigtiefen während der Mast wurde am HCMR untersucht. Dafür wurden an der HCMR Souda Bay Testanlage (Dr. N. Papandroulakis) zwei verschieden tiefe Netzkäfigtypen im Duplikat eingesetzt (Typ I = 180 m^3 [6 x 6 x 5 m] und Typ II = 290 m^3 [6 x 6 x 8 m]). Die für den Versuch verwendeten Fische stammten aus der Aufzuchtanlage des HCMR. Mit 2 g sind sie an die Souda Bay Testanlage überführt und dort bis zu einer Initialgröße von $200 \pm 20 \text{ g}$ aufgezogen worden, bevor sie in die Netzgehegeanlagen verbracht wurden. Um vergleichbare Besatzdichten während des Versuchs zu gewährleisten, wurden die 180-m^3 -Käfige mit jeweils 5.150 Tieren, die 290-m^3 -Käfige mit jeweils 8.240 Tieren besetzt. Die Versuchsdauer wurde mit 8 Monaten angesetzt, so dass die finale Beprobung im Frühjahr 2015 stattfinden wird. Während des gesamten Zeitraums werden die Zuwachsraten durch monatliche Wägungen kontrolliert (Fig. 7).

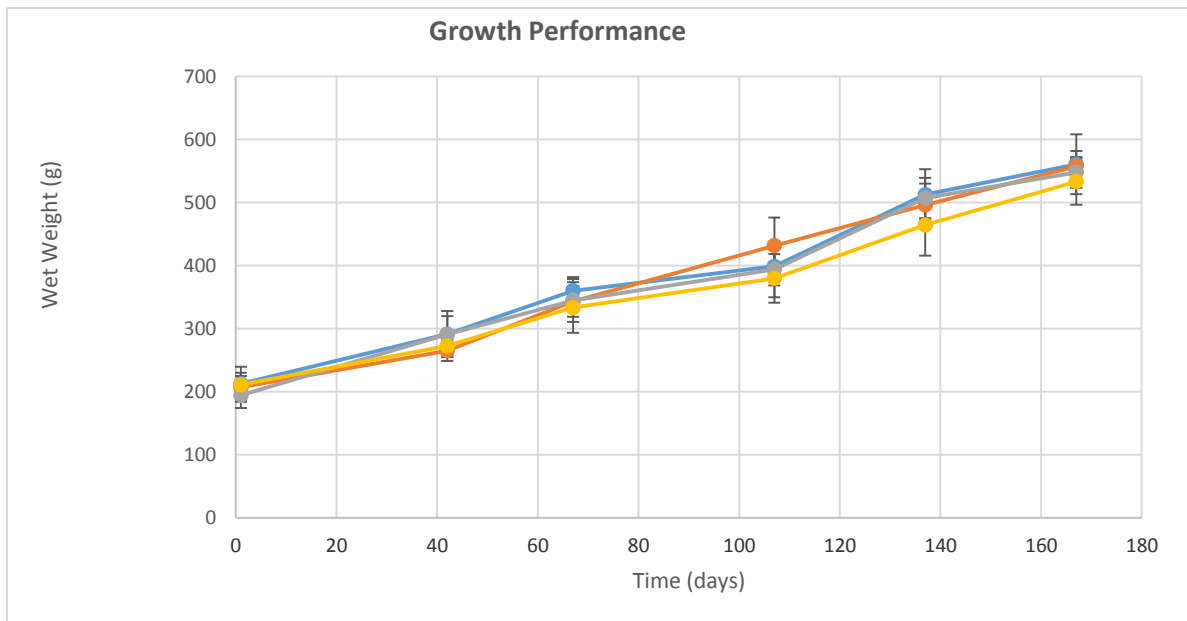


Fig. 7. Zuwachsraten ($g \pm SD$) von Adlerfischen, welche in verschiedenen Netzkäfiganlagen in Souda Bay aufgezogen wurden.

Alle 2 Monate wurden Blutproben zur Bestimmung hämatologischer (Hämatokrit und Hämoglobingehalt), biochemischer (osmotischer Druck, Gehalt an Glukose, Laktat und freien Fettsäuren) und hormoneller (Cortisolgehalt) Parameter genommen, die derzeit analysiert werden.

Die vertikale Verteilung der Fische im Wasserkörper der Käfige wurde mit Hilfe von Echoloten bestimmt. Durch technische Probleme während des ersten Versuchsmonats (Mai 2014) konnten keine Daten erhoben werden, dies war erst durch den Einsatz eines verbesserten Systems (CageEye 1.3, Lindem Data Acquisition AS, Norwegen) möglich. Obwohl die Daten noch nicht abschließend ausgewertet sind, konnten schon jetzt ausgesprochen bemerkenswerte Beobachtungen gemacht werden. Die vertikale Verteilung der Fische (beobachtet über einen Zeitraum von 3 Tagen) zeigte einen ausgeprägten Tag-Nacht-Rhythmus. Während der Abend- und Nachtstunden hielten sich die Tiere in der unteren Hälfte des Käfigs auf, während des Tages dagegen im kompletten Wasserkörper. Dieses Verhalten war unabhängig von der eigentlichen Käfigtiefe, es wurde nur von den natürlichen Veränderungen der Photoperiode beeinflusst (Fig. 8). Unserem Erachten nach sind dies die ersten Beobachtungen des Verteilungsverhaltens von Adlerfischen in Netzkäfigen.

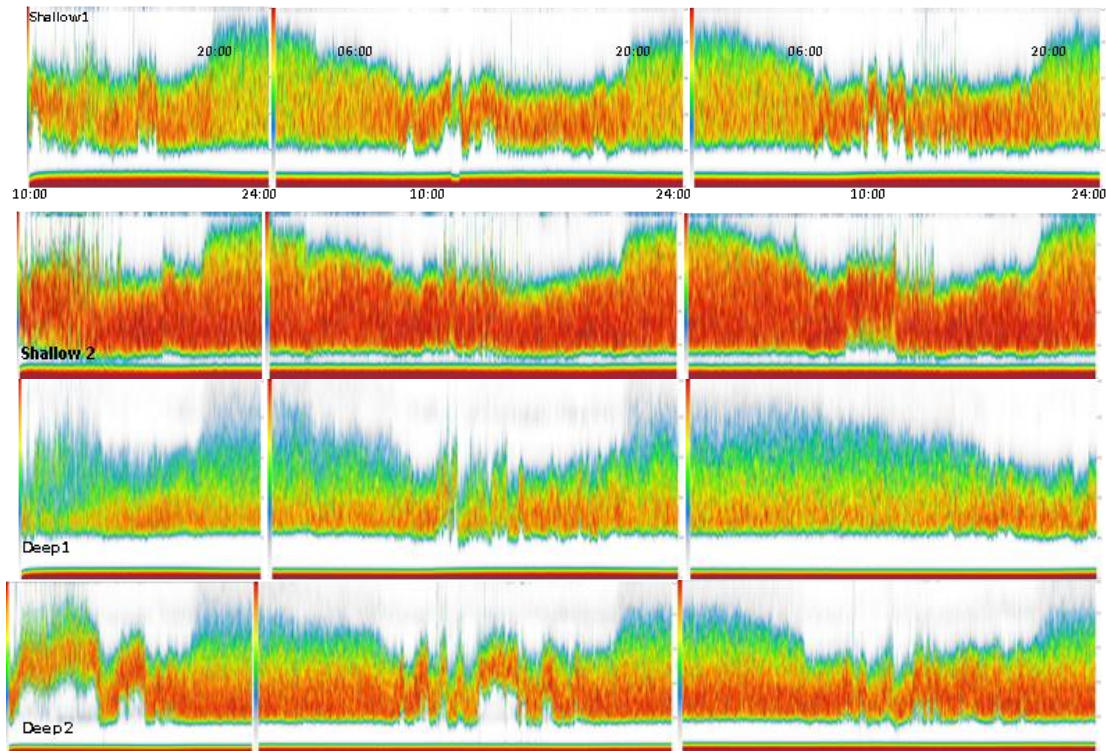


Fig. 8. Vertikale Verteilung von Adlerfischen in Netzkäfigen über einen Zeitraum von 3 Tagen.

5. Gesundheit

Von allen beprobten Larven und juvenilen Fischen wurden neben den Wachstumsdaten noch Proben (im Duplikat) zur Evaluierung der zeitabhängigen Veränderung des Immunstatus genommen. Ein Probenset wurde zur späteren Genexpressionsanalyse in RNAlater gelagert, das andere Set in Formalin fixiert, um histologisch ausgewertet zu werden. Mit voranschreitender Organentwicklung wurde die Probenahme auf einzelne Organe (Milz, Kopfniere, Kiemen und Eingeweide) ausgeweitet (Fig. 9). Diese wurden wiederum entsprechend in RNAlater oder Formalin verbracht. Zusätzlich wurden Proben für die immunabhängige Genexpressionsanalyse bei -80 °C gelagert. Aufgrund der hohen Kannibalismusrate und der dadurch bedingten verringerten Stückzahlen musste das im Versuchsplan angedachte Vorhaben, Tiere verschiedener Größenklassen (klein und groß) zu beproben, um eine mögliche Abhängigkeit der präpubertären Immunentwicklung vom Größenwachstum zu untersuchen, gestrichen werden.

Sampling Schedule

Larval and post-larval stage □:

Twice weekly sampling during the first 60 days.

Each sample:

30 larvae collected in RNA later

5 larvae collected in formol

(Total n = 16)

Weaned Juvenile stage □:

Weekly sampling after weaning.

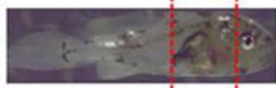
Each sample:

10-20 fish* Spleen, head kidney, peripheral blood in RNA later

5 fish collected in formol

(n = 8 x 2 = 16)

* Until fish are large enough for organ dissection collect all organ tissue as a unit as shown.



Mature Juveniles □:

Continue sampling every two weeks until 180 dph.

Each sample:

10-20 fish Spleen, head kidney, peripheral blood in RNA later

5 fish collected in formol

(n = 4 x 2 = 8)

Collect samples of median size and large size at each sampling point.

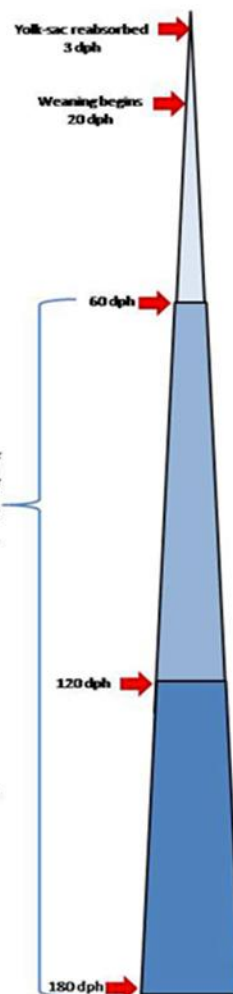


Fig. 9. Diagramm der geplanten Probenahmestrategie – Entwicklung des Immunsystems.

Für das Design geeigneter degenerierter Primer für Gene (Tab. 2), die an der Entwicklung des Immunsystems beteiligt sind, wurden entsprechende Gensequenzen mariner Knochenfische in der online verfügbaren GenBank identifiziert. Diese Sequenzen wurden aligniert und entsprechende Konsensussequenzen identifiziert. Die mRNA-Extraktion und die Synthese der cDNA für die Genexpressionsanalysen wurden bereits durchgeführt. Die Identifikation der artspezifischen Gensequenzen und die Etablierung der mRNA-Genexpressionsassays werden im folgenden Quartal 2015 stattfinden.

Tabelle 2. Zielgene für die Charakterisierung des Immunsystems des Adlerfisches. Unter der Voraussetzung, dass die identifizierten Sequenzen konservierte Regionen der gesuchten Gene widerspiegeln, sind folgende aufgeführte Amplikongrößen zu erwarten. Diese Schätzungen beruhen auf Informationen bereits identifizierter Sequenzen in GenBank.

	Target Gene	Degenerate/ Consensus Primers	Amplicon size
Endogeneous	EF1 (Elongation Factor)	X	230
Controls	GAPDH (Glyceraldehyde Phosphate Dehydrogenase)	X	239
	18S	X	-
Innate	Piscidin1 ("Defensin")	X	110
Immunity	Piscidin2 ("Defensin")	-	-
	Piscidin3 ("Defensin")	-	-
	Lysozyme	X	220
	Metallothionein	X	80
	MX protein	X	570
	NOD2 (Toll Like Receptor - TLR)	X	1390
Adaptive Response	RAG1 (Recombination Activating Gene)		
	IgM		
	IgT		
	TcR (T-cell Receptor)		
	C3 (complement)	X	1202
	TNFa (Tumor Necrosis Factor)	X	250
	IFN alpha (interferon)		
	IFN gamma		
	IL-1beta (Interleukin)		
	IL-2		
	IL-4		
	IL-10		
	IL-17		
IL-22			
Inflammatory Response	COX2 (cyclooxygenase 2)	X	1500
	MyD88 (myeloid differentiating factor)	X	130