



**Konzepte zur Optimierung der Aquakultur:
Physiologische, ökologische und molekularbiologische Untersu-
chungen am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch
(*Thunnus thynnus*)**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Florian Borutta

aus Dinslaken

Düsseldorf, Januar 2012

aus dem Institut für Stoffwechselphysiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. C.R. Bridges
Korreferent: Prof. Dr. E. Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2012

Erklärung

Die hier vorgelegte Inauguraldissertation habe ich eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die Inauguraldissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Florian Borutta

Düsseldorf, den 30.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Biologie des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches	1
1.2 Kommerzielle Bedeutung und Befischung des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches.....	4
1.3 Fortpflanzung und reproduktive Dysfunktionen.....	6
1.4 Forschungsprojekte zur Domestizierung und Zucht	8
1.5 Wissenschaftsstand, Problematiken und Bedürfnisse innerhalb der sich entwickelnden Thunfisch- Aquakultur	9
1.5.1 Behandlungs- und Handhabungstechniken	9
1.5.2 Standortanalysen	13
1.5.3 Laboranalysen	13
1.5.4 Modellorganismen	16
1.6 Zielsetzung	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Versuchstiere und Hälterung	18
2.1.1 Nil-Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	18
2.1.2 Blauflossen-Thunfisch (<i>Thunnus thynnus</i>)	19
2.1.3 Goldbrasse (<i>Sparus aurata</i>)	20
2.2 Versuchstiermarkierung.....	21
2.2.1 Nil-Tilapia Markierung	21
2.2.2 Markierung des Blauflossen-Thunfisches	21
2.3 Probenbeschaffung für molekularbiologische Arbeiten	23
2.4 Messung physikalischer Umweltparameter und des Fischverhaltens innerhalb der Netzkäfige	24
2.4.1 Stationäre HOBO-Datenlogger	24
2.4.2 Fisch-Datenlogger	26
2.5 Etablierung einer sicheren und stressfreien Injektionsnarkose bei Teleostern.....	27
2.5.1 Injektionsnarkose am Nil-Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) und Goldbrassen (<i>Sparus aurata</i>).....	27
2.5.1.1 Verwendete Narkotika	27
2.5.1.2 Narkosevorbereitungen	29
2.5.1.3 Applikationsweg.....	30
2.5.1.4 Beurteilung der Narkosetiefe und -dauer	31
2.5.1.5 Eingriffe unter Narkose	32
2.5.2 Injektionsnarkose am Blauflossen-Thunfisch (<i>Thunnus thynnus</i>).....	33
2.5.2.1 Narkosevorbereitungen und Equipment.....	33
2.5.2.2 Applikationsweg.....	34
2.5.2.3 Handling und Eingriffe unter Narkose.....	34
2.6 Quantitative Konzentrationsbestimmung der Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol in Tilapia-Plasma	35
2.6.1 Bestimmung der Plasmacortisolkonzentrationen mittels enzymgekoppelten Immunabsorptionstest ...	35
2.6.1.1 Cortisolextraktion aus Tilapia-Plasma	35
2.6.1.2 Herstellung des Cortisol-Tracers und verwendete Antikörper.....	35
2.6.1.3 Schachbrett-Titration	37
2.6.1.4 Das Cortisol-ELISA-Verfahren	37
2.6.1.5 ELISA Auswertung	39
2.6.2 Bestimmung der Plasmakatecholaminkonzentrationen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	39
2.6.2.1 Katecholaminextraktion aus Tilapia-Plasma	40

2.6.2.2 Katecholamin-HPLC-Verfahren	40
2.6.2.3 HPLC Auswertung	41
2.7 Individuen- und Artidentifizierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	41
2.7.1 RFLP-Analyse zur Individuenidentifizierung von <i>Thunnus thynnus</i> in Gefangenschaft	42
2.7.1.1 Primerdesign	42
2.7.1.2 DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
2.7.1.3 Restriktionsverdau	43
2.7.1.4 Gelelektrophorese der PCR- und RFLP-Produkte	44
2.7.2 RFLP-Analyse zur Speziesidentifizierung verschiedener Thunfischarten	45
2.7.2.1 Primerdesign	45
2.7.2.2 DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
2.7.2.3 Restriktionsverdau	46
2.7.2.4 Gelelektrophorese der PCR- und RFLP-Produkte	46
2.8 Elternschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels Mikrosatelliten-DNA-Analyse	47
2.9 Mutterschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels mitochondrialer Kontrollregion	51
2.10 Statistische Auswertung und grafische Darstellung.....	52
3 Ergebnisse	54
3.1 Quantifizierung gelungener Markierungs- und Biopsieversuche beim Atlantischen Blauflossen-Thunfisch	54
3.2 Physikalische Umweltparameter und Fischverhalten innerhalb der Netzkäfige	56
3.2.1 Stationäre HOBO-Datenlogger	56
3.2.2 Fisch-Datenlogger	67
3.3 Injektionsnarkose am Nil-Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) und Goldbrassen (<i>Sparus aurata</i>).....	71
3.3.1 Intramuskuläre Injektion.....	71
3.3.2 Intraperitoneale Injektion	71
3.4 Quantitative Konzentrationsbestimmung der Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol in Tilapia-Plasma	77
3.4.1 Evaluierung des Cortisol-ELISA.....	77
3.4.2 Quantifizierung der Plasmacortisolkonzentrationen	78
3.4.3 Quantifizierung der Katecholaminkonzentrationen	79
3.5 Injektionsnarkose am Blauflossen-Thunfisch.....	80
3.6 Individuenidentifizierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	82
3.7 Speziesidentifizierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus	85
3.8 Elternschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels Mikrosatelliten-DNA-Analyse	89
3.9 Mutterschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels mitochondrialer Kontrollregion	99
3.9.1 Verifizierung des mikrosatellitengestützten Elternschaftstests via mtDNA	99
3.9.2 Untersuchung der Haplotypendiversität zur Qualifizierung einer Laichperiode	100
4 Diskussion	102
4.1 Kritische Betrachtungen.....	102
4.2 Charakterisierung und Bewertung des angewandten Markierungs- und Biopsieverfahrens.....	103
4.3 Beschreibung und Identifikation der observierten und notwendigen Laichbedingungen	106
4.3.1 Allgemeine Standortbeschreibungen und Untersuchungen.....	106
4.3.2 Vergleichende Standortanalysen und Identifikation der notwendigen Laichtemperatur	108
4.4 Charakteristika des laichzeitbedingten Schwimmverhaltens	112
4.5 Identifikation und Anwendung wirksamer Injektionsnarkotika für Teleosteer	114
4.5.1 Grundlegende Betrachtung der Applikationswege.....	114
4.5.2 Erläuterung potenter Wirkstoffe sowie deren Konzentrationsspektren	115
4.5.3 Charakterisierung der narkoseinduzierten Stressantwort.....	119
4.5.4 Injektionsnarkose am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch	121

4.6 Beurteilung der Individuen- und Speziesidentifikation.....	123
4.6.1 Individuenidentifikation.....	123
4.6.2 Speziesidentifikation.....	124
4.7 Reproduktionsanalysen am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch	125
4.7.1 Elternschaftstests mittels Mikrosatelliten-Analyse	125
4.7.2 Mutterschaftstest mittels mitochondrialer Kontrollregion	128
4.8 Zusammenfassende Charakterisierung der untersuchten Reproduktionsvorgänge	130
5 Zusammenfassung.....	132
6 Summary	134
7 Literaturverzeichnis.....	136
8 Anhang.....	154

Abkürzungsverzeichnis

1. Ak	Erstantikörper
2. Ak	Zweitantikörper
α	Signifikanzniveau, festgelegt auf $\alpha = 0,05$
AChE	Acetylcholinesterase
ALLOTUNA	Apulisches Regionalprojekt (Organizzazione di un sistema integrale di allevamento del tonno rosso nel golfo di Taranto, 2008-2010)
APS	Ammoniumperoxodisulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
AT	Weißer-Thunfisch (<i>Thunnus alalunga</i>), engl. albacore tuna
B	Proben- bzw. Standardextinktionen im ELISA
B_0	maximale Extinktion im ELISA
BET	Großaugen-Thunfisch (<i>Thunnus obesus</i>), engl. bigeye tuna
BSA	Rinderserumalbumin
bp / kb	Basenpaare / Kilo-Basenpaare
COXI	Cytochrom-C-Oxidase (Subunit 1)
DCM	Dichlormethan, CH_2Cl_2
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$
ELISA	enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
F-CMO	Cortisol-Carboxymethyloxim
FAC	Faktorielle-Korrespondenz-Analyse
GABA	γ -Aminobuttersäure
GnRH / GnRH α	Gonadotropin-Releasing-Hormon / Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonist
HPGL-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Leber-Achse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICCAT	International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IgG	Gammaglobulin
lx	Lux, Beleuchtungsstärke
m	Steigung (mathematisch)

MED	minimal effektive Dosis
mtDNA	mitochondriale DNA
NBFT	Atlantischer Blauflossen-Thunfisch (<i>Thunnus thynnus</i>), engl. northern oder Atlantic bluefin tuna
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSB	unspezifischen Bindungen im ELISA
p.d.	pro Tag (per diem)
PBFT	Pazifischer Blauflossen-Thunfisch (<i>Thunnus orientalis</i>), engl. Pacific bluefin tuna
PIT	passiv integrierter Transponder
PCR	Polymerasekettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient (mathematisch)
R ²	Bestimmtheitsmaß (mathematisch)
RE	Restriktionsenzym
REPRODOTT	EU-Projekt (<u>D</u> omestication of <i>T</i> hunnus <i>t</i> hynnus, the bluefin tuna (BFT). A Feasibility Study on its <u>R</u> eproduction in captivity, 2003-2006)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SBFT	Südlicher Blauflossen-Thunfisch (<i>Thunnus maccoyii</i>), engl. southern bluefin tuna
SELFDOTT	EU-Projekt (From capture based to <u>S</u> ELF-sustained aquaculture and <u>D</u> omestication of bluefin tuna, <i>T</i> hunnus <i>t</i> hynnus, 2008-2011)
SJT	Echter Bonito (<i>Katsuwonus pelamis</i>) engl. skipjack tuna
STABW / ±	Standardabweichung (mathematisch)
T _a	Annealingtemperatur der PCR-Primer
T _m	Schmelztemperatur der PCR-Primer
U	Enzym Unit
v/v	Volumenprozent
YFT	Gelflossen-Thunfisch (<i>Thunnus albacares</i>), engl. yellowfin tuna
\bar{x}	Mittelwert (mathematisch)

1 Einleitung

Die gemeinhin als Thunfische bezeichneten Fischarten (Tribus *Thunnini*), zu denen acht Arten der Gattung *Thunnus*, insgesamt sechs Arten der Gattungen *Auxis*, *Euthynnus* und *Allothunnus* sowie mit dem Echten Bonito (*Katsuwonus pelamis*) der einzige Vertreter der Gattung *Katsuwonus* gezählt werden, stellen in fischereiwirtschaftlicher Sicht eine der bedeutendsten Gruppen dar (Collette et al., 2001). Vor allem der Atlantische Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758, nachfolgend abgekürzt als NBFT), auch bekannt als Roter Thun, rückte im Zusammenhang mit dem zu Beginn der 90er Jahre weltweit ausbrechenden Sushi-Boom zunehmend ins Interesse der Konsumenten und entwickelte sich so zur Thunfischspezies mit dem höchsten kommerziellen Wert (Mylonas et al., 2010; Sakamoto & Allen, 2011).

Das hohe Profitabilitätsniveau und die anhaltende Überfischung der Wildbestände lancierten die ersten Versuche den Atlantischen Blauflossen-Thunfisch zu domestizieren. Jedoch konnte eine erfolgreiche Reproduktion separat gehaltener Zuchtfische bislang nur sporadisch beobachtet werden (de la Gandara et al., 2010). Aus diesem Grund bestehen viele offene Fragen und die Notwendigkeit den Umgang, die Haltung und die Zucht des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs auf physiologischer, ökologischer und molekularbiologischer Ebene zu optimieren. In vorliegender Arbeit wurde das Ziel verfolgt einige dieser Fragestellungen zu untersuchen um einen Beitrag zur Entwicklung einer nachhaltigen Aquakultur des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs zu leisten.

1.1 Biologie des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs

Mit einer Größe von über 4,5 m und einem Gewicht von bis zu 900 kg ist der Atlantische Blauflossen-Thunfisch nicht nur die größte Art der Familie „Makrelen und Thunfische“ (*Scombridae*) sondern zählt außerdem zu den größten rezenten Knochenfischen (*Osteichthyes*) (Fromentin & Powers, 2005; De Stefano & van der Heijden, 2007).

Der spindelförmige Körper, welcher cranial deutlich robuster ausgeprägt ist als caudal, weist dorsal eine dunkelblaue Färbung auf, die in ventraler Richtung in ein silber-weiß übergeht (vgl. Abbildung 1.1). Wie alle *Scombridae* besitzt auch der NBFT zwei Dorsalflossen sowie eine Vielzahl kleiner Flossen – die sogenannten Finlets – entlang des Saums des dorsalen und ventralen Schwanzstiels (ICCAT, 2009a). Im Gegensatz zu vielen anderen Fischarten weist der Atlantische Blauflossen-Thunfisch, dessen Lebensspanne 30 Jahre und mehr umfassen kann, keinen Geschlechtsdimorphismus auf (Neilson & Campana, 2008; Santamaria et al., 2009). Da bislang kein geschlechtsdeterminierender Genabschnitt beim NBFT identifiziert wurde, beruhen die momentan durchgeführten Geschlechtstests auf Protein- bzw. Hormonanalysen in Blut und Muskelproben. Diese Tests sind allerdings nur kurz vor und während der Laichzeit erfolgsversprechend, da erst hier messbare Konzentrationsunterschiede zwischen den Zielmolekülen vorzufinden sind (Susca et al., 2001; Schulz, 2006; Hoeder, 2010; Micera et al., 2010).

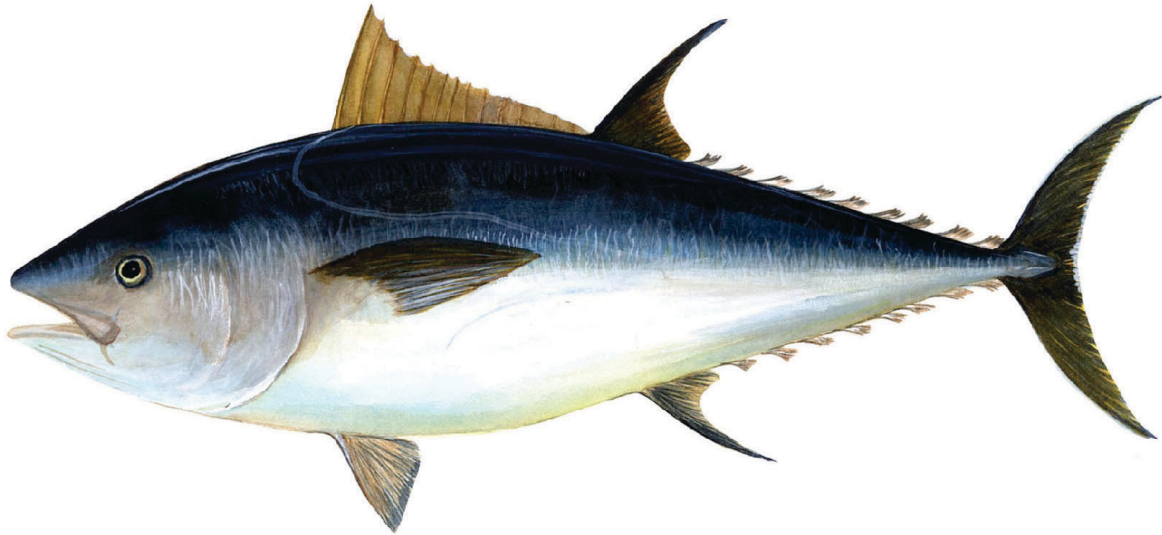


Abbildung 1.1: Habituszeichnung eines adulten Atlantischen Blauflossen-Thunfischs

Quelle: National Oceanic & Atmospheric Administration (NOAA), Photo Library. Image ID: fish2056, NOAA's Fisheries Collection (www.photolib.noaa.gov).

Die Nahrung der pelagischen Räuber setzt sich aus einer breiten Spanne verschiedener Knochenfische, Invertebraten und Elasmobranchier zusammen, wodurch der NBFT zu einem opportunistischen Spitzenprädatoren gezählt werden kann (Chase, 2002). Durch seine Größe und Spitzengeschwindigkeiten von bis zu 80 km/h können nur große pelagische Haie und Schwertwale zu den Fressfeinden adulter Blauflossen-Thunfische gezählt werden (Wardle *et al.*, 1989; Fromentin & Powers, 2005).

Eine unter allen Knochenfischen einzigartige Besonderheit der *Thunnini* ist ihre Fähigkeit zur Regulation der Körpertemperatur. Ausschlaggebend für diese Adaptation, welche auch bei geringen Temperaturen einen hohen Metabolismus zulässt und damit einhergehend eine erhebliche Aktivität erlaubt, ist das Zusammenspiel zwischen einem lateralen sowie vaskulären Rete mirabile, dem großen Anteil roter Muskulatur und dem physiologischen Gegenstromprinzip. Hierbei wird sauerstoffarmes aber durch die Aktivität der roten Muskulatur erwärmtes Blut in einem feinen Kapillarnetz (Rete mirabile) gegenläufig an kaltem aber sauerstoffreichem Blut vorbeigeleitet. Da diese Blutgefäße trotz ihres geringen Durchmessers sehr dickwandig sind, findet ungeachtet ihrer räumlichen Nähe kein Sauerstoff- sondern nur ein Wärmeaustausch statt. Da diese Fähigkeit zusätzlich linear mit der Körpermasse zunimmt, können vor allem beim NBFT Differenzen zwischen proximaler Körpertemperatur und Wassertemperatur von bis zu 20 °C gemessen werden (Stevens & Neill, 1978; Carey & Gibson, 1983; Holland *et al.*, 1992).

Eine weitere Eigenschaft der Thunfische ist der Verlust des opercular- und kiefergestützten Wassertransports über die Kiemen, wodurch Spezies des Tribus *Thunnini* zu obligatorischen ram-Ventilierern gezählt werden. Diese Atemtechnik setzt ein permanentes Schwimmen mit leicht geöffnetem Maul voraus, wobei sauerstoffreiches Wasser passiv über die großflächigen Kiemen fließt. Allerdings führt ein lokomotorischer Stillstand aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs schnell zum Erstickungstod dieser Dauerschwimmer (Muir & Kendall, 1968; Bushnell & Jones, 1994).

Das Habitat des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches erstreckt sich nahezu über den gesamten Nordatlantik zwischen dem Äquator und dem 69. Breitengrad Nord sowie auf seine Nebenmeere, wie Mittelmeer, Schwarzes Meer, Nordsee, Karibisches Meer und den Golf von Mexiko (Mather *et al.*, 1995; vgl. Abbildung 1.2). Doch vor allem im Nordostatlantik um die britischen Inseln und der Küste Norwegens sowie der Nordsee verschwand der NBFT bereits zu Anfang der 1960er Jahre aufgrund einer unreglementierten Befischung fast vollständig (MacKenzie & Myers, 2007). Anhand eines im Jahre 1996 angelaufenen Markierungsprogramms (Tag-A-Giant, TAG program) konnte festgestellt werden, dass Blauflossen-Thunfische, nicht nur wie bis dato angenommen das Epipelagial besiedeln, sondern bisweilen auch in Tiefen von bis zu 1000 m ins Mesopelagial vordringen und dabei Temperaturen zwischen 3 und 30 °C tolerieren (Block *et al.*, 2001).

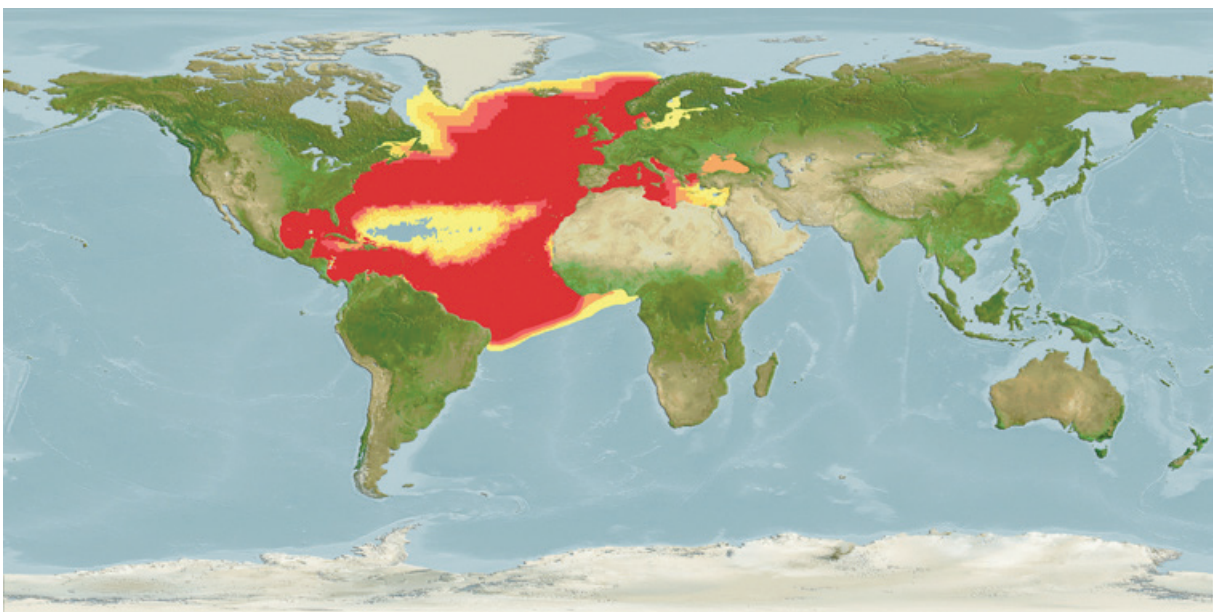


Abbildung 1.2: Verbreitungsgebiet von *T. thynnus*

Auf der dargestellten Weltkarte ist das Verbreitungsgebiet des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches anhand seiner relativen Vorkommenswahrscheinlichkeit, berechnet nach Umwelttoleranz- bzw. Präferenzbereichen und Fangstatistiken, markiert. Vorkommenswahrscheinlichkeit p : ■ = 0,01-0,19; ■ = 0,2-0,39; ■ = 0,4-0,59; ■ = 0,6-0,79; ■ = 0,8-1 (modifiziert nach Quelle: Computer Generated Native Distribution Map of *Thunnus thynnus* (reviewed). www.aquamaps.org, version of Aug. 2010).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der NBFT ein sogenanntes Homing-Verhalten aufweist und hierdurch in verschiedene Populationen aufgeteilt werden kann. Während es außerhalb der Laichzeit zu einer Durchmischung der Individuen im offenen Atlantik kommt, beginnt mit dem Einsetzen der Reproduktionszeit eine Trennung der Populationen. Mindestens vier Populationen, die sich räumlich in ihre Laichregionen im Golf von Mexiko, um die Balearischen Inseln sowie dem Tyrrhenischen und Ionischen Meer aufteilen, können differenziert werden. Diese Erkenntnisse stützen sich neben den Ergebnissen des Markierungsprogramms mit elektronischen Datenloggern (Block *et al.*, 2005) auch auf DNA-basierte Methoden (Carlsson *et al.*, 2004) und auf Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der Otolithen (Rooker *et al.*, 2003).

Neben dem Atlantischen Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus thynnus*) werden mittlerweile auch der Pazifische (*Thunnus orientalis*) und der Südliche Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus maccoyii*) als eigenständige, jedoch eng verwandte Arten betrachtet (Sawada *et al.*, 2005).

1.2 Kommerzielle Bedeutung und Befischung des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs

Vor allem im Mittelmeer hat die Befischung des NBFT eine lange Tradition. Erste Belege über den Fang von Blauflossen-Thunfischen reichen bis zu 7000 Jahre v. Chr. zurück und wissenschaftliche Aufzeichnungen über die saisonalen Migrationen der Fische wurden bereits vom griechischen Philosophen Aristoteles (ca. 400 v. Chr.) und dem römischen Gelehrten Plinius (ca. 1. Jh. n. Chr.) abgefasst (Doumenge, 1998; Fromentin, 2003).

Der kommerzielle Fang des Blauflossen-Thunfischs begann im Mittelmeerraum bereits im frühen Mittelalter (Vargas & del Corral, 2007). Die hierbei seit Jahrhunderten angewandte traditionelle Fangmethode besteht aus einem fest installierten Netzlabyrinth, der sogenannten Almadraba (Spanien) bzw. Tonnara (Italien). Mit dieser passiven Fangmethode, bei welcher den Fischen mittels mehrerer hundert Meter langer Stellnetze der Laichweg abgeschnitten wird und diese schließlich in die reusenähnliche „Todeskammer“ geleitet werden (vgl. Abbildung 1.3), wurden bereits um das Jahr 1550 allein in Spanien etwa 120000 Atlantische Blauflossen-Thunfische gefangen (Ganzedo *et al.*, 2009).

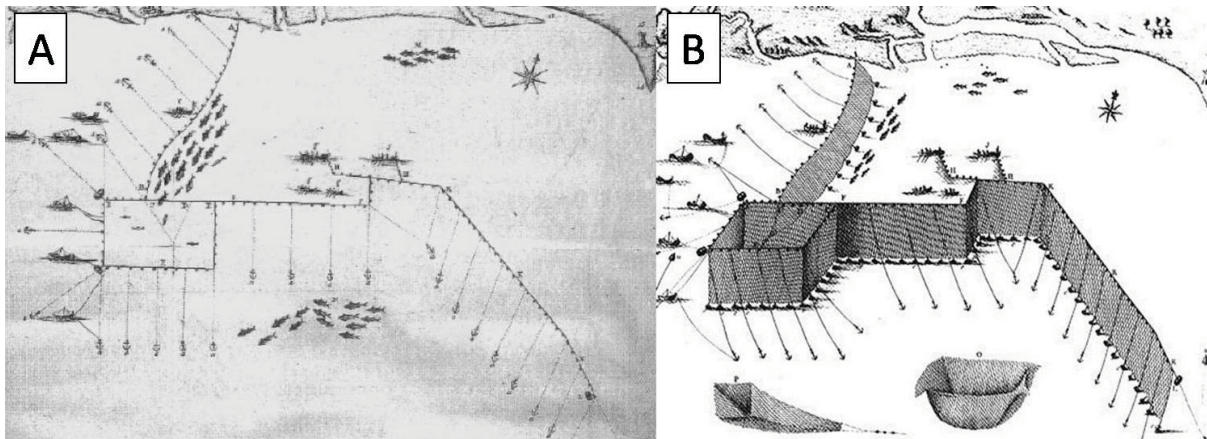


Abbildung 1.3: Historische Darstellungen einer statischen Thunfischfalle (Almadraba)

Beide Abbildungen zeigen technische Zeichnungen einer einfachen Almadraba (*almadraba de buche*) am Strand von El Terrón, Huelva. Neben den am Meeresboden verankerten Stellnetzten ist die rechteckige „Todeskammer“ mit reusenähnlichem Eingang zu erkennen. (A) Darstellung nach Sáñez Reguart (1795). (B) Darstellung nach Cornide (1788).

Obwohl dieses traditionelle System zum Teil noch bis zum heutigen Tag angewandt wird, dient es mittlerweile eher als touristische Attraktion denn als kommerzielle Fangmethode (Vargas & del Corral, 2007). Inzwischen wurden die stationären Fallen weitestgehend durch Ringwaden-, Langleinen-,

Handleinen- und Futterbootfischerei abgelöst (Mylonas *et al.*, 2010). Im Mittelmeer wird der Großteil an Blauflossen-Thunfischen (ca. 70 %) mittels Ringwadenfischerei (purse-seine fishing), mit der ganze Fischschwärme selektiv abgefischt werden, gefangen (ICCAT, 2011). Bei dieser Fangmethode wird ein Netzvorhang kreisförmig um den Fischschwarm gefahren und der Netzboden geschlossen, sobald die Einkreisung abgeschlossen ist (FAO, 2003). Da diese Fangtechnik nur während der Laichwanderung der Thunfische lohnenswert ist, in der sich die Tiere zu großen Schwärmen nahe der Wasseroberfläche zusammenfinden, ergibt sich ein stark saisonales Geschäft. Zusätzlich ist diese Art der Fischerei auf Anraten der International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT) von der Europäischen Union mittlerweile streng reglementiert und nur noch für einen Monat zwischen Mai und Juni zugelassen (European Commission, 2011). Aus diesem Grund wird nur ein kleiner Teil der Tiere direkt nach dem Fang geschlachtet, während der Großteil der Fische zur temporären Hälterung in schwimmende Netzkäfige überführt wird (Fromentin & Powers, 2005).



Abbildung 1.4: Thunfischkäfige zur Mast und Reproduktion

Abgebildet sind zwei Thunfischkäfige an der Küste Vibo Valentia Marinas (Italien, 2008). Im Vordergrund befindet sich der Replikationskäfig (\varnothing 20 m, Tiefe 16 m) versehen mit einem blauen Plastikvorhang, der den strömungsbedingten Verlust abgelaichter Eier verhindern soll. Im Hintergrund ist ein Mastkäfig (\varnothing 50 m, Tiefe 20 m) zu erkennen. Die roten Bojen sind am Boden verankert und dienen zur stationären Befestigung der Käfige.

Die inzwischen als Thunfisch-Mast (ranching & fattening) bekannte und weltweit verbreitete Methode entstand in den 1960er Jahren in der St. Margaret's Bay, Nova Scotia, Canada und breitete sich ab den späten 1970er Jahren auch im Mittelmeer aus (Carey *et al.*, 1984; Miyake *et al.*, 2003). Neben der Entzerrung des Absatzmarkts dient die Mästung hauptsächlich zur Steigerung des intramuskulären Fettgehalts der Käfigtiere, da ein hoher Fettanteil vor allem vom preisbestimmenden japanischen Sushi- und Sashimi-Markt erwünscht ist. So bestehen enorme Preisunterschiede zwischen fetten und mageren Fischen sowie zwischen der fettarmen Rückenpartie (akami oder maguro) und den fettreichen Flanken (toro) eines Fisches. Aus diesem Grund werden heutzutage 99 % der im Mittelmeer mittels Ringwadenfischerei gefangenen Tiere an Mastfarmen verkauft und über einen Zeitraum von drei bis 24 Monaten fettgefüttert (Mylonas *et al.*, 2010). Hierzu werden die gefangenen Fische zunächst auf dem offenen Meer aus dem Ringwadennetz in einen Transferkäfig überführt, welcher anschließend zum Teil über mehrere hundert Kilometer in Küstennähe geschleppt wird, wo die endgültige Aufteilung der Tiere in die Mastkäfige erfolgt. In diesen schwimmenden Netzkäfigen, die einen Durchmesser zwischen 30 und 90 m sowie eine Tiefe zwischen 15 und 30 m aufweisen, erfolgt die

Hälterung und Fütterung mit einem Mix verschiedener Futterfische und Cephalopoden (Ottolenghi, 2008).

Außer der beschriebenen Steigerung der Fleischqualität sind vor allem neu entwickelte Methoden zur selektiven Tötung der Mastfische von Vorteil für die Thunfischfarmer. Die am weitesten verbreitete Arbeitsweise zur Schlachtung ist das Erschießen einzelner Tiere mittels einer Harpune oder einer Lanze (Jab-Stick), die mit einer Schrotpatrone beladen ist und bei Fischkontakt ausgelöst wird. Um die Fische umgehend zu töten und um das wertvolle Fleisch nicht zu beschädigen wird dabei auf den Kopf bzw. das Gehirn der Fische gezielt. Der Nutzen für die Farmbetreiber liegt in der möglichen Selektion einzelner Tiere, der auftragslagen- bzw. marktsituationsabhängigen Auswahl an zu tötenden Tieren und der Gewährleistung einer hohen Fleischqualität, hervorgerufen durch den relativ stressfreien und augenblicklichen Tod. Aus tierethischer Sicht muss angemerkt werden, dass diese Tötungsmethode weitaus schneller, sicherer und effizienter erfolgt als z.B. bei der als „crowding“ bekannten Vorgehensweise, bei der die Fische durch das Anheben und die Verengung des Netzes zusammengedrängt und erstickt werden (Mylonas *et al.*, 2010). Der kommerzielle Nachteil dieser Methode liegt hauptsächlich im vermehrten Auftreten des sogenannten „burnt-flesh“ Syndroms (Yaki Niku), bei dem durch anaerobe Muskelkontraktionen während des Zusammendrängens der Fische die proximale Körpertemperatur und die Muskellaktatkonzentration so stark erhöht werden, dass es zu einer massiven Verminderung der Fleischqualität und damit des Verkaufspreises kommt (Buentello *et al.*, 2008; Buentello *et al.*, 2010).

Wie lohnenswert der Fang und die Mast des NBFT sind, zeigt ein Blick auf aktuelle Handelspreise. So wurde zu Beginn des Jahres 2011 ein einzelner 342 kg schwerer Blauflossen-Thunfisch auf dem Tsukiji-Fischmarkt, Tokio, für 279000 Euro versteigert (Spiegel Online, 2011; Williams, 2011). Der Durchschnittspreis pro Tonne Blauflossen-Thunfisch lag in den Jahren 2004 bis 2009 in Japan mit ca. 21000 Dollar zwar deutlich darunter, zeigt aber dennoch dessen enormen Marktwert (Longo, 2011). Durch die außergewöhnliche Wertigkeit des Fisches und durch die mittlerweile auf 12900 Tonnen reduzierte Fangquote für die östliche NBFT Population (rebuilding quota), hat sich die Menge der illegal und unkontrolliert gefangenen Fische nach Angaben der ICCAT und der Umweltschutzorganisation PEW Environment Group schätzungsweise verdoppelt (ICCAT, 2009b; Bregazzi, 2011). Wenn die Befischung auf dem bisherigen Level fortgesetzt wird, werden die noch bestehenden Bestände weiter zurückgehen, wodurch der Atlantische Blauflossen-Thunfisch bereits in wenigen Jahren als funktionell ausgestorben gelten könnte (Taylor *et al.*, 2011; Williams, 2011).

1.3 Fortpflanzung und reproduktive Dysfunktionen

Der Atlantische Blauflossen-Thunfisch zählt aufgrund seiner saisonalen Reproduktion im Gegensatz zu anderen laichwandernden Fischen (z.B. Europäischer Aal und Pazifischer Lachs) zu den iteroparen Organismen. Durch eine asynchrone Oozytenreifung können sich weibliche NBFT über mehrere Wo-

chen hinweg in einem ein- bis zweitägigen Rhythmus fortpflanzen, was einem Verhalten entspricht, das als Portionslaichen bekannt ist (Medina *et al.*, 2002).

Im Vergleich zum Golf von Mexiko, wo die Laichzeit auf die Monate April bis Juli begrenzt ist, setzt die Reproduktionsphase im Mittelmeer zeitversetzt und in Abhängigkeit vom aufgesuchten Laichgebiet zwischen den Monaten Juli und August ein (Teo *et al.*, 2007). Ab einem Alter von etwa vier Jahren und einer damit einhergehenden Größe von etwa 120 cm gelten Individuen des Mittelmeerbestands als geschlechtsreif und nehmen aktiv an der Reproduktion teil. Die Fortpflanzung der oviparen NBFT findet meist nachts, in großen Schwärmen und nahe der Wasseroberfläche statt. Hierbei wird ein laichbereites Weibchen von mehreren männlichen Tieren verfolgt, woraufhin dieses unbefruchtete Eier aus der Urogenitalpapille ins Freiwasser entlässt, die umgehend von den männlichen Tieren besamt werden (Ovuliparie). Die präferierte Laichtemperatur des NBFT wird bislang nur ungenau mit mehr als 23 bzw. 24 °C (Schaefer, 2001; Fromentin & Powers, 2005; Mylonas *et al.*, 2007) oder mit einer großen Spanne zwischen 18 und 27 °C (Mather *et al.*, 1995) angegeben. Die aufgrund eines Öltröpfchens zur Wasseroberfläche aufsteigenden Eier entwickeln sich in Abhängigkeit von der Wassertemperatur innerhalb von 28 bis 32 Stunden zur schlupfbereiten Larve, die sich in den folgenden Wochen im pelagischen Ichthyoplankton zum Jungfisch entwickelt (Mylonas *et al.*, 2007; De Metrio *et al.*, 2010a).

Die neuroendokrinen Mechanismen, welche die Ovulation bzw. die Spermiation regulieren, unterliegen beim NBFT – wie bei anderen Teleostern – einer hormonellen Kontrolle, die durch mehrere endogene und/oder exogene Reize stimuliert wird. Zu den exogenen Reizen, die einen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Leber-Achse (HPGL-Achse, engl. hypothalamus-pituitary-gonadal-liver axis) des NBFT nehmen, zählen vor allem die Temperatur, die Salinität und die Photoperiode (Mather *et al.*, 1995). Der endogene Einfluss auf die finale Oogenese bzw. Spermatogenese beruht vor allem auf der Plasmakonzentration des Peptidhormons Gonadoliberin (Gonadotropin-Releasing-Hormon, GnRH). Das im Hypothalamus synthetisierte Hormon besitzt bei Teleostern eine geringe Halbwertszeit von wenigen Stunden, weshalb es in ausreichend hohen Konzentrationen ausgeschüttet werden muss, um die weitere hormonelle Kaskade zwischen Hypophyse und Gonade anzuregen (Zohar *et al.*, 1990). GnRH induziert im Weiteren die Sekretion der Gonadotropine GtHI (Follikelstimulierendes Hormon, FSH) und GtHII (Luteinisierendes Hormon, LH) aus der Hypophyse, wodurch die Gonadogenese in beiden Geschlechtern ausgelöst wird (Peter & Yu, 1997). Das maßgebliche Gonadotropin der Teleosteer ist das Luteinisierende Hormon, welches strukturell und funktionell homolog zu seinen Pendants in anderen Vertebraten ist. Beim weiblichen Fisch läuft die weitere Kaskade bis zur Ovulation und dem Germinalen Vesikel-Zusammenbruch (germinal vesicle breakdown, GVBD) über Maturation induzierende Steroidhormone (maturation-inducing hormone, MIH) wie 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P) und dem Maturation fördernden Faktor (maturation-promoting factor, MPF) ab (Nagahama & Yamashita, 2008). Gleichzeitig führt die Estradiolproduktion des Follikelepithels zur Synthetisierung und Ausschüttung des Dottervorstufenproteins Vitellogenin (Vtg) in bzw. aus der Leber, welches anschließend in die sich entwickelnden Oozyten eingelagert wird (Kime, 1993). Beim Männchen wird durch das Luteinisierende Hormon die Bildung von Tes-

tosteron und 11-Ketotestosteron angeregt, wodurch die Spermatogenese eingeleitet wird (Schulz & Miura, 2002).

In Gefangenschaft bzw. in der Aquakultur weisen jedoch fast alle Fischarten eine reproduktive Dysfunktion auf. Bei weiblichen Tieren drückt sich diese Dysfunktion meist in einer ausbleibenden finalen Oozytenreife und einer damit einhergehenden ausbleibenden Reproduktion aus. Männliche Fische weisen in Gefangenschaft oft eine reduzierte Spermienproduktion sowie eine verminderte Spermienqualität auf. Ausschlaggebender Punkt für das Auftreten dieser Fehlfunktionen ist das Ausbleiben der exogenen Reize, die im Laichgebiet oder auf der Laichwanderung erfahren werden. Dementsprechend bleiben die Aktivierung der HPGL-Achse und die entsprechenden endokrinen Antworten aus (Zohar & Mylonas, 2001).

1.4 Forschungsprojekte zur Domestizierung und Zucht

Durch die anhaltende Überfischung sind die Bestände des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches in den letzten Jahrzehnten um etwa 80 % gesunken (Block *et al.*, 2005). Aus diesen Gründen ist die Spezies von der International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) als „vom Aussterben bedroht“ auf der Roten Liste gefährdeter Arten kategorisiert (IUCN, 2011).

Zur Entwicklung einer nachhaltigen Aquakultur, womit die noch bestehenden Bestände geschont werden könnten, wurden weltweit verschiedene Forschungsprojekte ins Leben gerufen. Bereits im Jahr 1970 wurde von der japanischen Fischereibehörde ein Programm zur Zucht des Pazifischen Blauflossen-Thunfisches (*Thunnus orientalis*) gegründet, mit dessen Hilfe es 32 Jahre später gelang, den Lebenszyklus in Gefangenschaft vollständig zu schließen (Sawada *et al.*, 2005). Ab dem Jahr 2001

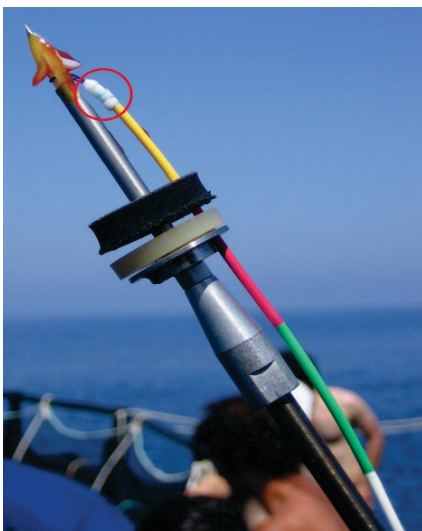


Abbildung 1.5: Hormonimplantation
Implantationsbereiter Induktions- und Markierungstag. Implantate sind mit einem roten Kreis markiert (Vibo, 2008).

wurden auch im Mittelmeerraum mit den Programmen DOTT (Domestication of *Thunnus thynnus*, the Blue Fin Tuna. Strategies for European Development in the Context of a Global Market, 2001-2002), REPRODOTT (Domestication of *Thunnus thynnus*, the bluefin tuna (BFT). A Feasibility Study on its Re-production in captivity, 2003-2006) und SELFDOTT (From capture based to SELF-sustained aquaculture and Domestication of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, 2008-2011) drei von der Europäischen Kommission finanzierte Projekte zur Domestizierung und Nachzucht des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches durchgeführt. Zusätzlich wurden verschiedene Nationalprojekte, wie das apulische Regionalprojekt ALLOTUNA (Organizzazione di un sistema integrale di allevamento del tonno rosso nel golfo di Taranto, 2008-2010) gefördert.

Im Gegensatz zu den langjährigen japanischen Zuchtversuchen, die auf einer instinktiven Reproduktion ohne zusätzliche Behandlung der Elterntiere (Broodstock)

basieren, wodurch jedoch Jahre ohne Zuchterfolg (1983-1993) bzw. mit geringfügiger Reproduktion zu beobachten waren, wurde innerhalb der europäischen Projekte auf eine hormonelle Behandlung der Zuchtfische gesetzt (Sawada *et al.*, 2005; De Metrio *et al.*, 2010a; de la Gandara *et al.*, 2010). Diese Hormonbehandlung beruht auf einer artifiziellen Aktivierung der HPGL-Achse, welche durch die Implantation von porösen Kunststoffcarriern mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung ausgelöst wird. Hierbei wird ein Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonist (GnRHa) zusammen mit Inulin und Rinderserumalbumin in eine Polyethylen-Vinylacetat-Matrix gebracht, in Form gegossen, an einer Identifikationsmarkierung befestigt (vgl. Abbildung 1.5 & 2.2) und per Harpune in die Dorsalmuskulatur implantiert (Mylonas *et al.*, 2007; Rosenfeld *et al.*, 2012). Im Weiteren führt die mehrtägige Diffusion des GnRHa in die Blutbahn zur einer Sekretion der Gonadotropine aus der Hypophyse und zur finalen Ovulation bzw. Spermiation. Durch Weiterentwicklungen der Implantate und der Implantationsmethodik konnten mit Hilfe der gezielten Hormongabe seit dem Jahr 2008 in den Versuchskäfigen des ALLOTUNA- und SELFDOTT-Projekts regelmäßige Zuchterfolge verzeichnet werden.

1.5 Wissenschaftsstand, Problematiken und Bedürfnisse innerhalb der sich entwickelnden Thunfisch-Aquakultur

Zum Aufbau einer rentablen, kontrollierbaren aber auch nachhaltigen Blauflossen-Thunfisch-Aquakultur besteht die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer bzw. verbesserter Behandlungstechniken sowie Labor- und Standortanalysen, die dazu führen, die Käfighaltung und Zucht auf tierethischer, umweltschutztechnischer und kommerzieller Sicht zu optimieren.

1.5.1 Behandlungs- und Handhabungstechniken

Vor allem die Entwicklung einer angemessenen Betäubungstechnik sowie die Verbesserung der bereits bestehenden Hormoninduktions-, Markierungs- und Biopsiemethoden tragen maßgeblich zum Aufbau einer praktikablen NBFT-Aquakultur bei.

Narkose bei Fischen

Seit den 1930er Jahren, als es erstmalig gelang Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Diethylether zu narkotisieren, spielt die Anästhesie sowohl in der Aquakultur als auch in der angewandten Fischereiforschung eine wichtige Rolle. Anästhetika vermitteln eine kontrollierbare und reversible Immobilisierung, Relaxation, Bewusstlosigkeit sowie den Verlust von Reflexen und Schmerzempfinden, wodurch Behandlungen und operative Eingriffe vorgenommen werden können (Hall *et al.*, 2001; Walsh & Pease, 2002). Aus diesen Gründen wird nicht nur die durch die Behandlung hervorgerufene Stressreaktion reduziert, sondern auch die Sicherheit während des Eingriffs für das Versuchstier und die durchführende Person erhöht (Neiffer & Stamper, 2009).

Generell kann zwischen physikalischen und chemischen Betäubungs- bzw. Narkosetechniken unterschieden werden. Zu den physikalischen Methoden zählen die Hypothermie, die Elektrostimulation

und der Kopfschlag. Da diese Techniken zum Teil nicht durchführbar bzw. nur schlecht dosierbar sind und zudem keinen Bewusstseinsverlust sowie keine Analgesie induzieren, sondern nur eine Immobilisation vermitteln, sind chemische Methoden vorzuziehen. Chemische Wirkstoffe können bei Fischen oral, parenteral (intramuskulär, subkutan, intravenös, intraperitoneal) oder inhalativ appliziert werden (Brown, 1993). Beim Einsatz chemischer Narkosetechniken bei Fischen ist zu beachten, dass sowohl Wirkungseintritt als auch -dauer stark von der Umgebungstemperatur und dem pH-Wert abhängen (Neiffer & Stamper, 2009).

Die einfachste und am weitesten verbreitete Methode zur Narkotisierung der verschiedensten Fischarten ist die **Inhalationsanästhesie (Immersionanästhesie)**. Hierbei wird eine anästhetisch wirksame Substanz im Wasser eines Narkosebeckens gelöst, welche anschließend vom eingesetzten Versuchstier über das Kiemenepithel und das Integument in die Blutbahn aufgenommen wird. Die am weitesten verbreiteten Inhalationsanästhetika sind das als MS-222 bekannte Tricain-Methansulfonat, das auch in der Humanmedizin als Lokalanästhetikum eingesetzte Benzocain, Phenoxyethanol und Eugenol, der narkotisch wirksame Bestandteil des Nelkenöls (Munday & Wilson, 1997). Die Vorteile der Inhalationsanästhesie zeigen sich in einem schnellen Wirkungseintritt sowie einer Aufhebung derselben, in einer einfachen Aufrechterhaltung des Narkosestadiums durch konstante Rezirkulation des Narkosewassers über die Kiemen und die Unabhängigkeit vom Fischgewicht durch die Einstellung der Wirkstoffkonzentration im Wasser (Neiffer & Stamper, 2009). Im Hinblick auf eine Narkotisierung des NBFT besitzt die Inhalationsanästhesie jedoch einen bedeutenden Nachteil. So ist es mit dieser Methodik praktisch unmöglich die Thunfische in den sich im freien Meer befindenden Käfigen zu betäuben, da die erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen nicht erreicht werden können. Deshalb besteht die Notwendigkeit die Fische einzeln mit Hilfe einer Angel oder Handleine aus dem Käfig zu fangen und in einen an Bord befindlichen Narkosetank zu überführen. Diese Methode birgt nicht nur große Risiken für das Versuchstier und die durchführenden Personen, sondern erweist sich beim NBFT im Vergleich zu anderen Teleostern angesichts eines verzögerten Wirkungseintritts zudem als wenig potent (REPRODOTT, 2006). Als Gründe für die schlechte Wirkung der Inhalationsanästhetika sind zum einen der durch den Fang zusätzlich gesteigerte Metabolismus und zum anderen die im Narkosetank nicht durchführbare ram-Ventilation zu nennen (vgl. Absatz 1.1).

Auch bei der **oralen Applikation** von Narkosemitteln wie Diazepam überwiegen bei der Thunfischhaltung die Nachteile. Neben allgemeinen Defiziten der oralen Narkoseverabreichung wie dem schwierigen Einbringen eines wasserlöslichen Anästhetikums ins Futter, einer langen Einleitungszeit durch die erforderliche Darmresorption und der damit einhergehenden schlechten Dosierbarkeit, ist es in einem Thunfischkäfig unmöglich mit dieser Methode gezielt einen Fisch mit einer potenten Wirkstoffkonzentration zu versorgen und zu narkotisieren (Kölle & Henke, 2004).

Die **parenterale Wirkstoffapplikation** (Injektion) wird bei Fischen aufgrund des hohen Arbeitsaufwands und der Schwierigkeit dieser Methode nur selten durchgeführt (Bonath, 1977; Kölle & Henke, 2004). Da zumeist die inhalative Methode bevorzugt wird, sind vergleichsweise wenige Forschungsergebnisse zur Injektionsanästhesie bei Fischen publiziert (u.a. Oswald, 1978; Harvey *et al.*, 1988; Graham & Iwama, 1990; Fleming *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005; Neiffer &

Stamper, 2009). Zudem lässt sich die parenterale Applikation in vier mehr oder weniger praktikable und gebräuchliche Injektionswege aufgliedern.

Die subkutane (s.c.) Injektion ist bei Fischen aufgrund des häufigen Auftretens von Nekrosen nicht empfehlenswert und wird nur zur Fischmarkierung mittels fluoreszierender Elastomere eingesetzt (Frederick, 1997; Baumgartner, 2006). Intravenöse Applikationen von Anästhetika und anderen Wirkstoffen sind bei Fischen grundsätzlich durchführbar, erfordern aber in der Regel eine Prämedikation um eine sichere Injektion – meist in die Dorsalgefäße – zu gewährleisten (Frøystad *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2003). Beide Injektionswege erweisen sich deshalb als ungeeignet für freischwimmende Thunfische.

Die gebräuchlichsten Applikationsrouten bei Knochen- und Knorpelfischen sind die intramuskuläre (i.m.) und intraperitoneale (i.p.) Injektion. Bei der intramuskulären Injektion muss jedoch darauf geachtet werden, dass der größte Teil der Fischmuskulatur aus der anaerob arbeitenden und daher geringfügig durchbluteten weißen Muskulatur besteht, wodurch die Induktionszeit der Narkose im Vergleich zu Mammalia deutlich erhöht wird. Bei der intraperitonealen Injektion besteht die Gefahr, Organe zu verletzen oder gar den Wirkstoff in diese zu applizieren. Jedoch existiert bislang keine Alternative zur intramuskulären bzw. intraperitonealen Narkotisierung bei großen freischwimmenden Teleostern und Haien oder bei der gezielten Betäubung einzelner Tiere in Großaquarien (Williams *et al.*, 2004). Mögliche Techniken für eine i.m. und i.p. Injektion sind neben der Applikation per Hand (nur nach vorherigem Fang möglich), das Einbringen der Narkotika via Injektionsstab (vgl. Abbildung 2.7), über Druckluftspritzen, die mittels Harpune verschossen werden oder mittels eines Unterwasserbetäubungsgewehrs mit Laserzielvorrichtung (Harvey *et al.*, 1988; REPRODOTT, 2006; Caprioli, 2007). Die gebräuchlichen Injektionsanästhetika entsprechen jenen, welche in der allgemeinen Veterinär- und Humanmedizin zum Einsatz kommen. Generell sind dies α_2 -Adrenozeptor-Agonisten wie Xylazin, Detomidin und Medetomidin, das Dissoziativum Ketamin, das Hypnotikum Propofol oder Opioiden wie Carfentanyl, Fentanyl und Etorphin (Brown, 1993; REPRODOTT, 2006; Neiffer & Stamper, 2009). Bislang beschäftigt sich lediglich die Forschungsarbeit von Williams *et al.* (2004) mit der Injektionsnarkotisierung zweier Spezies der Familie *Scombridae*. Allerdings lag das Gewicht der verwendeten Pazifischen Makrelen (*Scomber japonicus*) mit maximal 400 g (das Gewicht der untersuchten Pazifik-Bonitos (*Sarda chiliensis*) wurde nicht angegeben) weit unter dem Gewicht geschlechtsreifer NBFT (≥ 40 kg). Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit eine Versuchsreihe zur Etablierung einer sicheren und stressfreien Injektionsnarkose beim Atlantischen Blauflossen-Thunfisch durchgeführt.

Markierungs- und Biopsiemethoden

Die Markierung und Identifizierung von Fischen spielt vor allem in der Aquakultur und der Erforschung von Migrationsbewegungen einzelner Individuen oder ganzer Populationen eine wichtige Rolle. Neben der Individualidentifikation ist die Geschlechterunterscheidung insbesondere bei Fischen ohne Sexualdimorphismus von Bedeutung. Hierzu wurden bis dato viele verschiedene externe

und interne Markierungsmethoden entwickelt, die mehr oder weniger gut für die Identifizierung von frei in Käfigen schwimmenden Thunfischen geeignet sind.

Interne Markierungen wie das Anfärben der Otolithen mit Stoffen wie Tetracyclin, die sich in calcifizierende Wachstumsregionen einlagern, sind nicht geeignet, da sie nur postmortal unter UV-Licht visualisiert werden können. Auch die Implantation von passiv integrierten Transpondern (PIT-Tags) spielt in der Thunfischhaltung bisher nur eine untergeordnete Rolle, da die Sendereichweite der ausgestrahlten Radiowellen nur wenige Zentimeter betragen und sich die Tiere während der Auslesezeit nicht bewegen dürfen, wodurch nur gefangene oder betäubte Tiere identifiziert werden können (Chart & Bergersen, 1988; Zydlewski *et al.*, 2001, Holm *et al.*, 2007). Akustische Transmitter, die zur Verfolgung markierter Fische dienen, können zwar individuenpezifische Signale aussenden, helfen aber nicht dabei einzelne Fische in einem Schwarm auszumachen (Baumgartner *et al.*, 2008). Andere interne jedoch äußerlich sichtbare Markierungen wie die subkutane Injektion bunter bzw. fluoreszierender Elastomere oder die herkömmliche Tätowierung, welche oft bei *Salmoniden* und *Cypriniden* verwendet werden, können bei unbetäubten Fischen nicht angebracht werden und sind bis dato bei *Thunnini* nicht erprobt (Frederick, 1997; Das Mahapatra *et al.*, 2001).

Externe Markierungen stellen dagegen eine adäquatere Methode zur Identifikation großer freischwimmender Fische innerhalb eines Käfigs oder Aquariums dar. Hierzu zählen Flossenbeschneidungen (fin clipping, betrifft hauptsächlich die Adipose (Fettflosse) bei *Salmoniden*) sowie die Implantation verschiedener nummerierter und farbig gekennzeichnete Plastik- und Metallmarkierungen in Muskel, Kiefer oder Flossen (Chart & Bergersen, 1988). Die Implantation dieser Kennzeichnungen, vor allem von sogenannten Spaghetti-Tags, ist sowohl innerhalb von Populationsstudien verschiedenster Fischarten – so auch beim Atlantischen Blauflossen-Thunfisch – als auch in der Aquakultur weit verbreitet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Manipulationen keinen negativen Einfluss auf die Mortalitäts- und Wachstumsrate behandelter Fische besitzen (u.a. Tičina, 2007; Phelps & Rodriguez, 2011). Nach dem Vorbild kommerziell erwerblicher Tags wurde im Programm REPRODOTT damit begonnen, einfache Identifikationsmarkierungen sowie Hormoninduktionstags herzustellen, um die Zuchtfische einzeln identifizieren und induzieren zu können. Gleichzeitig bestand die Notwendigkeit Muskelproben für erforderliche Protein- und DNA-Analysen via Biopsie zu entnehmen. Hierzu wurde mit Hilfe der Zentralwerkstatt Biologie (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) ein Prototyp zur Tag-Implantation bei synchroner Muskelbiopsienahme entworfen, der unter Wasser von einem Taucher auf einem 2 m langen Jab-Stick bedient werden musste (Bridges *et al.*, 2001; REPRODOTT, 2006). Mit Ausnahme von Walen und Delphinen, bei denen per Armbrust und Biopsiepfahl Gewebeprobe beim regelmäßigen Auftauchen genommen werden können, stellt das entwickelte Biospiegerät eine bislang einzigartige Entwicklung dar, mit der unter Wasser Probenmaterial – bei gleichzeitiger Markierung – aus großen freischwimmenden Organismen entnommen werden kann (Mathews *et al.*, 1988; Weller *et al.*, 1997).

Im Laufe der Forschungsarbeit galt es die bereits entwickelten Prototypen zu verbessern, um anschließend den Implantations- und Biopsieerfolg evaluieren zu können.

1.5.2 Standortanalysen

Dank satellitengestützter Observationen der Meeresoberfläche und durch den Zugriff auf allgemeine Datenbanken, die geographische und meteorologische Informationen zu jeder weltweiten Position liefern, ist es möglich im Vorfeld Machbarkeitsstudien für neuzugründende Aquakulturen durchzuführen. Voraussetzung für eine solche Studie ist allerdings das Vorwissen, welche Parameter bei der Nach- oder Aufzucht einer Spezies als kritisch, vernachlässigbar und essentiell betrachtet werden müssen (Radiarta *et al.*, 2008). Sind die obligatorischen biophysikalischen Parameter wie Temperatur, Salinität, Chlorophyllgehalt, Verschmutzungsgrad, Seegang, Wassertiefe und Bodenbeschaffenheit einer aquakulturell interessanten Spezies sowie infrastrukturelle Größen bekannt, können geographische Informationssysteme (GIS) erstellt werden, mit deren Hilfe Standortanalysen durchgeführt werden können (Pérez *et al.*, 2003a; Pérez *et al.*, 2003b; Pérez *et al.*, 2005; Longdill *et al.*, 2008; Radiarta *et al.*, 2008).

Da viele dieser Faktoren bzw. deren positiver oder negativer Einfluss für die Nachzucht des NBFT noch nicht ausreichend erforscht sind (vgl. Absatz 1.3 Laichtemperatur), galt es über stationäre und an Zuchtfischen befestigten Langzeit-Datenloggern die präferierte Temperatur, Beleuchtungsstärke und Tauchtiefe während der Laichzeit zu ermitteln.

1.5.3 Laboranalysen

Moderne DNA-Markertechnologien und Protein-Assays haben die Möglichkeiten zur Forschung, Kontrollierbarkeit und zur gerichteten Zucht in der Aquakultur diversifiziert. Die Erstellung von Genkarten (Kopplungskarten), die Möglichkeiten zu Populationsstudien, zur Geschlechtsbestimmung, zur Identifizierung einzelner Individuen, zu Elternschafts- sowie Mutterschaftsanalysen und die Betrachtungsmöglichkeit exprimierter Gene bzw. Proteine lieferten neue Einblicke in Wildbestände und Wege die Zucht verschiedenster Spezies zu optimieren (Liu & Cordes, 2004; Lo Presti *et al.*, 2009).

In der kommerziellen Aquakultur nehmen genetische Analysen die Ertragssteigerungen implizieren oder einem Ertragsverlust vorbeugen eine wichtige Rolle ein. Als Beispiel sei die Tilapia-Aquakultur genannt, bei der eine gezielte Zucht mit zuvor generierten Supermännchen mittlerweile weit verbreitet ist. Der Vorteil dieser Zucht mit männlichen Individuen die ein doppeltes Y-Chromosom besitzen, liegt in der Produktion einer rein männlichen Nachkommenschaft, die ein deutlich schnelleres Wachstum zeigen als weibliche Tilapien. Aquakulturen mit genetisch selektierten Vatertieren können durch dieses Verfahren ihre Produktion um bis zu 58 % steigern (Mair *et al.*, 1995; Mair *et al.*, 1997). Genetisch bedingte Ertragsverluste werden in der Aquakultur hauptsächlich durch ein erhöhtes Maß an Inzucht hervorgerufen. Hierunter versteht man die Verpaarung von Individuen, die näher miteinander verwandt sind als das Mittel der jeweiligen Population, was zur Folge hat, dass die Genotypenfrequenz und die Heterozygotie der Nachkommen reduziert werden. Langfristige Folgen der Inzucht sind reduzierte Wachstums- und Überlebensraten, Unfruchtbarkeit sowie biochemische und morphologische Anomalien (Dunham, 2011).

In der bislang noch nicht kommerzialisierten Nachzucht des NBFT können anhand von DNA-Markern verschiedene essentielle Fragen beantwortet werden, die Einblicke in die bisherigen Zuchtversuche

gewähren. Hierzu zählen z.B. die Speziesidentifikation abgefischter Eier, welche aufgrund der nahezu identischen Morphologie pelagischer Fischeier notwendig ist, die genetische Individualidentifikation (Fingerprinting bzw. Barcoding) der Zuchttiere und die Analyse des Reproduktionserfolgs auf molekularbiologischer Ebene.

Die am weitesten verbreiteten DNA-Marker in der Aquakultur und der Ichthyologie sind:

AFLP (amplified fragment length polymorphism): Bei der AFLP-Analyse wird die extrahierte DNA zunächst mittels zweier Restriktionsenzyme fragmentiert, bevor durch die Zugabe passender Oligonukleotid-Adaptoren die Bindungsstellen spezifischer Primer bereitgestellt werden. Via Polymerasekettenreaktion (PCR) können anschließend einige der Restriktionsfragmente multilocularen Ursprungs amplifiziert und visualisiert werden. AFLP-Studien werden meist für Genkartierungen, Geschlechtsbestimmungen und Populationsstudien verwendet (Vos *et al.*, 1995; Liu & Cordes, 2004).

RAPD (random amplified polymorphic DNA): Die RAPD-Technik beruht auf der zufälligen PCR-basierten Amplifikation unbekannter, polymorpher DNA-Bereiche mittels kurzer, acht bis zehn Basenpaar (bp) langer Primer, willkürlicher Sequenz. Polymorphismen in den Amplifikaten zweier oder mehrerer Individuen resultieren in spezifischen Bandenmustern nach elektrophoretischer Auftrennung. RAPD-Analysen werden für Populationsstudien, Geschlechtsbestimmungen und zur Identifikation einzelner Individuen verwendet (Williams *et al.*, 1990; Liu & Cordes, 2004).

RFLP (restriction fragment length polymorphism): Mit der von Botstein *et al.* (1980) entwickelten Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus ist es möglich, DNA-Bereiche mit bekannter und unbekannter Sequenz auf Polymorphismen zu untersuchen. Hierzu werden DNA-Abschnitte via PCR amplifiziert und anschließend mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme, RE) verdaut. Restriktionsenzyme, die in Bakterien den Schutz vor Fremd-DNA übernehmen, besitzen spezifische 4, 5, 6 oder 8 Basenpaar Erkennungssequenzen. Liegt eine spezifische Sequenz in einem DNA-Bereich vor, werden die Nukleotidbindungen in oder in einem definierten Abstand zur Erkennungssequenz hydrolysiert, wodurch zwei DNA-Teilstücke entstehen. Mutationen wie Deletion, Addition oder Substitution eines Nukleotids bzw. mehrerer Nukleotide können zur Bildung neuer Erkennungssequenzen oder zur Destruktion bestehender Erkennungssequenzen führen. In einem solchen Fall führt die anschließende Visualisierung der Restriktionsprodukte zu einem Längenpolymorphismus zwischen Individuen, Populationen oder Arten (Roberts *et al.*, 2003). Die Technik des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus wird hauptsächlich für Genkartierungen und zur Identifikation einzelner Populationen und Arten verwendet (Chow & Ushiyama, 1995; Cocolin *et al.*, 2000; Liu & Cordes, 2004).

SNP (single nucleotide polymorphism): Einzelnukleotid-Polymorphismen stellen die häufigsten Sequenzunterschiede in allen Organismen dar. Durch Punktmutationen, die häufig stille Mutationen sind, können in einem Locus bis zu vier verschiedene Allele entstehen, die meist durch direkte Sequenzierungen identifiziert werden. SNP's werden für Genkartierungen, Verwandtschafts- und Populationsstudien verwendet (Liu & Cordes, 2004).

SSR (simple sequence repeats): Die auch **Mikrosatelliten** genannten SSR's sind einfache Wiederholungssequenzen aus zwei bis sechs Basenpaaren in Bereichen codierender und nicht codierender

DNA. Am häufigsten treten Dinukleotidwiederholungen mit einer Motivfrequenz von wenigen hundert Repeats auf. Der Informationsgehalt der Mikrosatelliten basiert auf dem hohen Grad größen-spezifischer Polymorphismen. Dieser wird durch das „Rutschen“ (slippage) der Polymerase während der DNA-Replikation hervorgerufen, wodurch Unterschiede innerhalb der Wiederholungsfrequenzen respektive der Allelgrößen resultieren (Tautz, 1989). Da Mikrosatelliten mit Größen zwischen 75 bis 300 bp leicht mittels PCR amplifiziert werden können, durch eine überdurchschnittliche Mutationsrate hoch polymorph sind und aufgrund ihrer kodominanten Vererbung nach den mendelschen Regeln, eignen sie sich für eine Vielzahl genetischer Analysen. In der Aquakultur bzw. der Fischforschung werden Mikrosatelliten hauptsächlich für Elternschafts- und Verwandtschaftsanalysen, Populationsstudien sowie zur Genkartierung verwendet (O’Connell & Wright, 1997). Für den Atlantischen Blauflossen-Thunfisch sind die Primersequenzen, das sich wiederholende Basenmotiv sowie die detektierten Allele und deren erwartete Längen für 25 Mikrosatelliten-Loci bekannt (Clark *et al.*, 2004). Ergebnisse einer umfassenden, mikrosatellitenbasierenden Reproduktionsanalyse des NBFT wurden bislang nicht publiziert und werden in vorliegender Arbeit erstmalig beschrieben.

Im Gegensatz zu AFLP-, RAPD-, SNP- und SSR-Markern die vorrangig auf der Untersuchung nukleärer DNA basieren, befinden sich die Zielbereiche des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus hauptsächlich auf der mitochondrialen DNA (mtDNA). Die mitochondriale DNA des NBFT ist ein zirkuläres, 16526 bp langes, doppelsträngiges Molekül, das pro Zelle bis zu 1000 Kopien besitzt, wodurch die Amplifikation mitochondrial codierter Gene auch aus kleinsten Gewebeproben möglich ist (Manchado *et al.*, 2004; Hartmann *et al.*, 2011). Zusätzliche Besonderheiten der mtDNA, welche diese zu einem besonders effektiven Target für RFLP-Untersuchungen machen, sind vor allem die im Vergleich zur nukleären DNA hohe Mutationsrate und deren ineffektiver Reparatursmechanismus. Hierdurch haben sich Sequenzunterschiede zwischen Individuen, Populationen und Arten in verschiedenen Bereichen der mtDNA entwickelt, die vorrangig über RFLP-Studien oder direkte Sequenzierungen analysiert werden. (Wilson *et al.*, 1985; Liu & Cordes, 2004). Unter den 13 proteincodierenden Genen, den 22 tRNA Genen, den Genen für die große und kleine ribosomale Untereinheit und der mitochondrialen Kontrollregion (d-loop), dem Startpunkt für Replikation und Transkription des DNA-Moleküls, werden vor allem die 1551 bp lange erste Untereinheit des Gens Cytochrom-C-Oxidase (*COXI* oder *COI*) und die 865 bp lange d-loop-Region für Genomuntersuchungen herangezogen (Quinteiro *et al.*, 2001; Herbert *et al.*, 2003).

Eine umfassende Speziesidentifikation der Gattung *Thunnus* mittels RFLP wurde bislang nur anhand der mitochondrialen, genübergreifenden Region zwischen der sechsten Untereinheit der ATP-Synthase (*ATP6*) und der dritten Untereinheit des Cytochrom-C-Oxidase-Gens (*COXIII*) erreicht. Hierzu sind jedoch drei Einzelverdäue sowie deren individuelle Visualisierung notwendig (Chow & Inoue, 1993; Takeyama *et al.*, 2001). Andere bisherige Publikationen beschäftigen sich entweder mit der relativ kostenintensiven Artidentifikation über die Sequenzierung der *COXI*-Region (Ward *et al.*, 2005) oder mit der RFLP-basierten Unterscheidung von maximal vier Arten des Genus *Thunnus* aus Konservendosen über einen Teil des Cytochrom-B-Gens (Quinteiro *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2005; Lin & Hwang, 2007).

Neben der hohen Mutationsrate mitochondrialer DNA, die sie zu einem wichtigen molekularbiologischen Werkzeug macht, ist eine weitere Besonderheit in der Vererbung der nicht nukleären DNA zu finden. Mitochondriale DNA wird vorrangig maternal vererbt (Faktor ca. 1000:1), was aus der Ubiquitinierung und der anschließenden Lysierung paternaler Mitochondrien im Cytoplasma der Oocyte resultiert (Giles *et al.*, 1980; Sutovsky *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Tatsache kann vor allem die hochvariable d-loop-Region der mtDNA als molekularer Marker für Mutterschaftsanalysen in der Aquakultur eingesetzt werden.

In der durchgeführten Forschungsarbeit galt es das Leistungsvermögen von RFLP-Markern zur Identifikation einzelner Broodstock-Individuen zu untersuchen, einen einfachen RFLP-basierten Test zur Speziesidentifikation im Tribus *Thunnini* zu etablieren und den Abblacherfolg der Zuchttiere mittels Mikrosatelliten-DNA (Elternschaftstest) sowie d-loop-Sequenzierung (Mutterschaftstest) zu analysieren.

1.5.4 Modellorganismen

Aufgrund seines kommerziellen und ökologischen Werts werden Pionierstudien, die notwendigerweise an lebenden Organismen durchgeführt werden müssen, generell nicht an Atlantischen Blauflossen-Thunfischen, sondern an verschiedenen Modellspezies realisiert. Als Beispiele hierfür sind Transportversuche mit Eiern der Bernsteinmakrele (*Seriola dumerili*), cytologische Untersuchungen der Ei- und Embryonalentwicklung des Atlantischen Bonitos (*Sarda sarda*) und die Erprobung von GnRH-Implantaten am Goldbrassen (*Sparus aurata*) zu nennen (Mylonas & Zohar, 2001; SELFDOTT, 2010). Auch die im Laufe dieser Arbeit durchgeführte Evaluierung einer effektiven Injektionsnarkose für den NBFT wurde zunächst an Modellspezies erprobt. Die verwendeten Nil-Tilapien (*Oreochromis niloticus*) und Goldbrassen (*Sparus aurata*) wurden nach folgenden Kriterien und Gründen ausgewählt:

- Transferierbarkeit: Um die Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse von einer limnischen Spezies (Nil-Tilapia) auf eine marine Spezies (Goldbrasse) bzw. auf interspezifischer Ebene zu überprüfen.
- Verwandtschaft: Goldbrassen und Nil-Tilapien zählen wie der NBFT zur Ordnung *Perciformes* (Barschartige). Eine niedrigere phylogenetische Rangstufe zwischen einer Süßwasserspezies und den ausschließlich marin lebenden Vertretern der Unterordnung *Scombroidei*, zu denen auch der NBFT zählt, ist nicht existent (Nelson, 1994).
- Umweltverträglichkeit und Ökonomie: Beide Modellorganismen werden in Aquakultur gezüchtet, wodurch sie nicht aus der Natur entnommen werden müssen und leicht zu beziehen sowie relativ kostengünstig sind.
- Haltung: Die Haltung von Fischen der Gattung *Oreochromis* ist aufgrund ihrer Anspruchsllosigkeit in Bezug auf Wassertemperatur, pH-Wert, Salinität und Wasserqualität (z.B. Nitritgehalt und Sauerstoffkonzentration) auch in Rezirkulationssystemen einfach zu bewerkstelligen (Avella *et al.*, 1993).

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung und Verbesserung von Handhabungsmethoden und molekularbiologischen Analysen sowie die Evaluierung beobachteter Reproduktionsprozesse für bzw. innerhalb der entstehenden Aquakultur des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs. Im Einzelnen liegen folgende Ziele dieser Untersuchung zu Grunde:

- Entwicklung und Etablierung einer DNA-basierten Spezies- und Individuenidentifikation ohne Zuhilfenahme der Sequenziertechnik.
- Evaluierung der Fortpflanzungsbeteiligung und des Fortpflanzungserfolgs über Elternschafts- und Mutterschaftsanalysen verschiedener Reproduktionsvorgänge.
- Entwicklung einer effektiven und stressfreien Injektionsnarkose für den Atlantischen Blauflossen-Thunfisch am Beispiel des Nil-Tilapia.
- Auswertung und Optimierung der verwendeten Markierungs- und Biopsiemethodik.
- Identifikation kritischer und erforderlicher Temperaturen und Temperaturprofile, die die Reproduktion begünstigen bzw. auslösen.
- Analyse des Schwimmverhaltens innerhalb der Netzkäfige mit Schwerpunkt auf die Laichzeit.

Im nachfolgenden Kapitel werden die verwendeten Materialien und Methoden sowie die untersuchten Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen beschrieben. Kapitel 3 beinhaltet die grafische und tabellarische Darstellung der gewonnenen Versuchsergebnisse, welche gleichzeitig mit Hilfe statistischer Testverfahren ausgewertet wurden. Abschließend werden die im Rahmen dieser Arbeit gesammelten Erkenntnisse sowohl untereinander als auch mit dem gegenwärtigen Forschungsstand verglichen und diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Hälterung

Sämtliche Versuche an lebenden Organismen während der Forschungsarbeit wurden an Nil-Tilapien (*Oreochromis niloticus*), Goldbrassen (*Sparus aurata*) und Atlantischen Blauflossen-Thunfischen (NBFT, *Thunnus thynnus*) durchgeführt.

2.1.1 Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Die verwendeten Nil-Tilapien wurden über das Department of Animal Sciences der Universität Wageningen, Niederlande bezogen. In drei Schritten wurden insgesamt 100 Tilapien beider Geschlechter ins Institut für Stoffwechselphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf überführt (23.12.2008: 20 Tiere, 08.10.2009: 50 Tiere, 18.01.2011: 30 Tiere). Das Gewicht der neuerworbenen Tiere lag zwischen 150 und 800 g.

Die Versuchstiere wurden am Institut für Stoffwechselphysiologie in einer temperierten Klimakammer bei konstanten 25 C Wassertemperatur und einer Besatzdichte von maximal 30 Tieren pro Becken gehältert. Um ungewollte Fortpflanzungen und Territorialverhalten zu vermeiden, wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt. Die Geschlechtsbestimmung erfolgte durch den äußerlichen Sexualdimorphismus, sichtbar an Afterflosse (Anale) und Genitalpapille (Chervinski, 1965). Eine Kreiselpumpe (Typ 1042, 90 l/min, Eheim) gewährleistete die Wasserzirkulation durch das selbstgebaute Aquariensystem, bestehend aus drei 800 l GFK-Rundbecken, einem zylindrischen Auenfilter (Höhle 83 cm, O 32 cm, Leervolumen 66,75 l, Eigenbau Zentralwerkstatt Biologie der Heinrich-Heine Universität) und einem UV-Entkeimer-Bypass (UV-Wasserklarer 1000, 30 Watt, Wiegand GmbH). Ein runder Beluftungsstein (O 5 cm), angeschlossen an die interne Druckluftleitung, sorgte in jedem Becken für eine ausreichende Sauerstoffversorgung. über einen automatischen Dimmer mit integrierter Zeitschaltuhr (Auto-Dimm LSL, Heers Elektronik) und passender Lichtleiste wurde ein circadianer Rhythmus von 12 h Tag und 12 h Nacht, sowie Sonnenauf und -untergang simuliert.

Die Fütterung der Fische erfolgte täglich mit gekörntem Trockenfutter (C-3 ProAqua K 18, Skretting), wobei die verabreichte Futtermenge etwa 1 % des Gesamtfischgewichts entsprach.

Der Nitritgehalt des Wassers wurde regelmäßig mit einem Nitrit-Tropfentest (Test NO₂⁻, Tetra) bestimmt. Lag der Nitratgehalt $\geq 0,3$ mg/ml wurde ein Wasserwechsel (~ halbes Gesamtvolumen) vorgenommen. Dies erfolgte in der Regel alle sieben Tage. Der biomechanische Filter wurde mit ~ 20 kg groben, porösen Lavagestein und normaler Aquarium Filterwatte gefüllt. Eine Filterreinigung erfolgte in einem Rhythmus von etwa sechs Wochen.

Nil-Tilapien, an denen Narkoseversuche in Düsseldorf durchgeführt wurden, dienten als Modellorganismen für den Atlantischen Blauflossen-Thunfisch (vgl. Absatz 2.5.1). Die Durchführung von Tierversuchen gemäß  8 des Tierschutzgesetzes wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen 8.87-50.10.08.249) genehmigt. Darüber hinaus lag

eine Tierhaltungserlaubnis zu Versuchszwecken gemäß § 11 Abs. 1 Satz 1 Nr. 1 des Tierschutzgesetzes vom Ordnungsamt Düsseldorf (Aktenzeichen 32/12-1-5) vor.

2.1.2 Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus thynnus*)

Im Rahmen des EU-Projekts SELFDOTT und des apulischen Regionalprojekts ALLOTUNA wurden Blauflossen-Thunfische von involvierten, kommerziellen Thunfischfarmen zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung gestellt. Die beteiligten Firmen in Malta (Malta Fish Farming Ltd., SELFDOTT), Spanien (Fuentes Group, Tuna Graso, SELFDOTT) und Italien (Marenostro, ALLOTUNA), stellten über jeweils drei Jahre bis zu zwei Netzkäfige (vgl. Abbildung 1.4, Tabelle 2.1) mit durchschnittlich 35 geschlechtsreifen Blauflossen-Thunfischen zur Verfügung.

In den Jahren 2008 bis 2010 wurden an allen drei Standorten insgesamt 146 Blauflossen-Thunfische zu Versuchszwecken (SELFDOTT Work Package 2 & 4, ALLOTUNA Phase 4 & 5) getötet. Die Tiere hatten eine durchschnittliche Größe von 151 cm ($\pm 20,4$ cm) bei einem mittleren Gewicht von 67,3 kg ($\pm 27,3$ kg). Alle Käfige wurden nach der Tötung von Versuchstieren erneut bis zum Ausgangsbestand besetzt. Eine Auflistung der getöteten Versuchstiere befindet sich im Anhang (vgl. Tabelle 8.1).

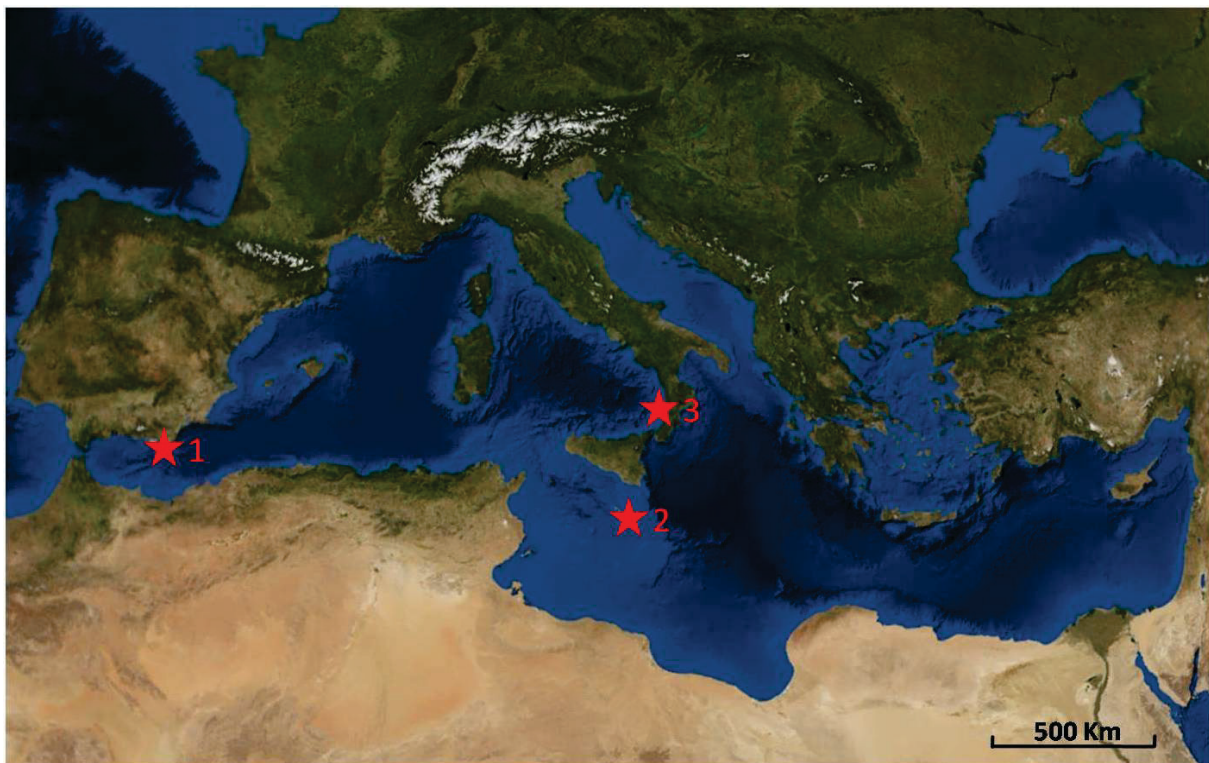


Abbildung 2.1: Übersichtskarte des Mittelmeerraums

Die Standorte der Thunfischkäfige werden mit einem roten Stern(★) auf der Karte angegeben. Von West nach Ost sind folgende Positionen markiert: ★1 = Cartagena, Spanien; ★2 = Marsaxlokk, Malta; ★3 = Vibo Valentia Marina, Italien (modifiziert nach Quelle: NASA (2001) *World Wind Java SDK* Software).

Alle verwendeten Versuchstiere wurden von firmeneigenen Schiffen mittels Ringwadennetzen (purse-seine netting) gefangen. Die für das SELFDOTT bzw. ALLOTUNA Projekt vorgesehenen Fische wurden in schwimmende Netzkäfige (\varnothing 25 m, maximale Tiefe 20 m) überführt. Alle verwendeten Käfige

waren aus einem schwimmenden Polyethylengerüst (HDPE = High density polyethylene), bestehend aus zwei bis drei verbundenen, zirkulären Ringen (\varnothing 35 cm) und einer inneren Relling, aufgebaut. Ein beschwertes Netz wurde in diesen Rahmen eingespannt und der gesamte Käfig an mehreren Betonankern fixiert (Halwart *et al.*, 2007).

Die Versuchsfische wurden einmal täglich bis zur Sättigung gefüttert. Neben Futterfischen wie der Mittelmeermakrele (*Scomber japonicus*), der Atlantischen Makrele (*Scomber scombrus*) und der Pferdemaakrele (*Trachurus trachurus*) wurden auch verschiedenen Cephalopoden, wie z.B. der Kurzflöskalmar (*Illex coindetii*) oder der Gemeine Kalmar (*Loligo vulgaris*), angeboten (De Metrio *et al.*, 2010a; De Metrio *et al.*, 2010b; Mylonas *et al.*, 2010).

Tabelle 2.1: Versuchstierübersicht innerhalb der Projekte SELFDOTT und ALLOTUNA

Aufgelistet sind die Käfigstandorte (Malta, Marsaxlokk; Spanien, Cartagena; Italien, Vibo Valentia Marina) mit jeweiliger GPS-Position und Versuchstierzahl für die Jahre 2008-2011 innerhalb der Projekte SELFDOTT und ALLOTUNA. Die Versuchstierzahlen beruhen auf Schätzungen von Tauchern, die im Rahmen des Fischtransfers in die Versuchskäfige erhoben wurden.

Standort	Jahr	Versuchstiere	GPS-Position	Projekt
Malta	2008	35	N 35° 50.433', E 14° 35.048'	SELFDOTT
Malta	2009	25	N 35° 49.645', E 14° 32.542'	
Malta	2009	25	N 35° 50.433', E 14° 35.048'	
Malta	2010	25	N 35° 50.323', E 14° 34.013'	
Malta	2010	25	N 35° 49.645', E 14° 32.542'	
Malta	2011	40	N 35° 50.323', E 14° 34.013'	
Spanien	2008	30	N 37° 33.985', W 00° 52.139'	
Spanien	2009	30	N 37° 33.913', W 00° 52.138'	
Spanien	2009	30	N 37° 33.985', W 00° 52.139'	
Spanien	2010	30	N 37° 33.913', W 00° 52.138'	
Spanien	2010	30	N 37° 33.985', W 00° 52.139'	
Spanien	2011	30	N 37° 33.913', W 00° 52.138'	
Spanien	2011	30	N 37° 33.985', W 00° 52.139'	
Italien	2008	80	N 38° 43.553', E 16° 04.689'	
Italien	2009	40	N 38° 43.553', E 16° 04.689'	
Italien	2010	30	N 38° 43.553', E 16° 04.689'	

2.1.3 Goldbrasse (*Sparus aurata*)

Im Jahr 2010 bestand die Möglichkeit ein bereits erprobtes Narkosemittel an einem weiteren Vertreter der Ordnung *Perciformes* zu testen. Hierzu stellte die maltesische Firma Malta Fish Farming Ltd. acht adulte Goldbrassen (*Sparus aurata*) zur Verfügung.

Die Fische wurden im Malta Aquaculture Research Centre in einem 25 m³ fassenden, rechteckigen Becken gehältert und täglich mit kommerziellem Pelletfutter gefüttert. Ein Durchflusssystem gewähr-

leistete einen permanenten Wasseraustausch mit dem Meer, wodurch Temperatur und Salinität innerhalb der Anlage äquivalent zum Meeresniveau gehalten wurden. Die für den Narkoseversuch ausgewählten Goldbrassen wiesen ein durchschnittliches Gewicht von 1087 g (± 187) auf.

2.2 Versuchstiermarkierung

Um alle Versuchstiere eindeutig und dauerhaft identifizieren zu können, wurden sowohl die Atlantischen Blauflossen-Thunfische als auch die Nil-Tilapien mit verschiedenen Methoden markiert. Von einer Markierung der untersuchten Goldbrassen wurde abgesehen, da diese nur einmalig für Narkoseversuche eingesetzt wurden.

2.2.1 Nil-Tilapia Markierung

Die individuelle Markierung der Tilapien diente dem Zweck bereits verwendete Fische nicht erneut für einen Narkoseversuch zu benutzen, ohne eine Erholungsphase von mindestens zwei Wochen eingehalten zu haben. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um trotz der geringen und maximal mehrstündigen Halbwertszeiten der verwendeten Narkotika (vgl. Absatz 2.5.1.1) sowie jener der untersuchten Stresshormone Cortisol, Adrenalin und Noradrenalin (vgl. Absatz 2.6) Folgeeffekte aus einem vorherigen Versuch mit Sicherheit auszuschließen.

Jedem erstmalig betäubten Nil-Tilapia wurde ein herkömmlicher Tieridentifikationschip (ISO-compliant-transponder, Tierchip Dasmann) in die dextrale Dorsalmuskulatur implantiert, welcher nach dem Prinzip des passiv integrierten Transponders (PIT) funktioniert. Innerhalb einer \varnothing 2 mm x 12 mm Bioglas-Kapsel befindet sich ein Transponder, bestehend aus Mikrochip und Antennenspule, der während des Auslesevorgangs kurzfristig durch niederfrequente Radiowellen des Lesegerätes (LID-560 Pocket Reader, Trovan) aktiviert wird, wodurch die Übertragung des auf dem Mikrochip gespeicherten Zahlencodes erfolgt (McCormick & Smith, 2004). Anschließend begibt sich der Transponder wieder in den Ruhezustand.

Der Einsatz von PIT's zur Fischidentifikation ist aufgrund ihrer Wiederverwendbarkeit eine preisgünstige und darüber hinaus sichere Methode, die bereits in vielen Studien bei verschiedenen Fischarten in Süß- und Salzwasser erfolgreich zum Einsatz kam (u.a. Das Mahapatra *et al.*, 2001; Park & Park, 2009; McEwan & Joy, 2011).

2.2.2 Markierung des Blauflossen-Thunfischs

Zur individuellen Thunfischkennzeichnung wurden externe Identifikationsmarkierungen (ID-Tags) entwickelt. Das Grundgerüst eines ID-Tags bestand aus einem 0,4 mm starken Nylonmonofilament (Danyl Spezi Line, D.A.M.) und einer Nylon-Pfeilspitze (BFIM-96, Floy Tag & Mfg., Inc.) mit Bohrungen für den Applikator und einen PIT. Das Monofilament wurde durch eine Öse im Pfeilkopf gefädelt und als Doppelstrang durch einen 2,5 cm langen Vinyl-Schlauch (\varnothing 2 mm, No. 20 tubing size, Floy Tag & Mfg., Inc.) geführt und mit Histoacryl Gewebekleber (B. Braun Melsungen AG) fixiert. Dieses erste

Schlauchstück (Reporter) fungierte als optische Kontrolle für eine gelungene Implantation sowie zur Begrenzung der Injektionstiefe. Anschließend wurden drei je 4 cm lange Polyolefin-Schläuche (\varnothing 2,2 mm No. 19 tubing size, Floy Tag & Mfg., Inc.) aufgefädelt, mit kurzen \varnothing 2 mm Schläuchen verbunden und mit einem Silikonelastomer (SILASTIC MDX4-4210 Medical Grade Elastomer, Dow Corning Corporation) ausgefüllt. Nachdem das Elastomer über Nacht ausgehärtet war, konnte das Ende des Tags mit transparentem Polyolefin-Schrumpfschlauch (HIS-3, 3 mm, Bürklin OHG) versiegelt werden.

Durch Variation sechs verschiedener Farben konnten bis zu 216 individuelle Farbmarkierungen hergestellt werden. Hierdurch wurde die eindeutige Identifizierung jedes markierten Fisches, sowohl an Land als auch im Wasser ermöglicht. Im Verlustfall eines externen Farbcodes garantierte der im Pfeilkopf eingesetzte PIT eine postmortale Fischidentifikation.

Um die ID-Tags gezielt in die freischwimmenden Thunfische implantieren zu können, wurde das Käfigvolumen durch Anheben des Bodens und eines Stellnetzes stark reduziert. Mittels Harpune (pneumatisch oder mit Gummizug) oder Lanze (Jab Stick) wurden die ID-Tags ca. 4 cm in die dorsale Muskulatur implantiert. Die in Zusammenarbeit mit der Zentralwerkstatt Biologie (Heinrich-Heine Universität) entwickelten Applikatoren dienten entweder zur alleinigen Tag-Implantation bzw. Muskelbiopsie (Harpune) oder zur gleichzeitigen Markierung und Biopsie (Jab-Stick, vgl. Abbildung 2.2). Um das Auftreten von Entzündungen zu vermeiden, wurden nur medizinisch zugelassene Produkte verwendet sowie der Pfeilkopf und der Reporter mit Betaisodona Salbe (Mundipharma) behandelt.

Tabellen der eingesetzten Tags, mit Informationen zum Standort und Implantationszeitpunkt sowie zur PIT-Nummer befinden sich im Anhang (vgl. Tabellen 8.2 bis 8.5).

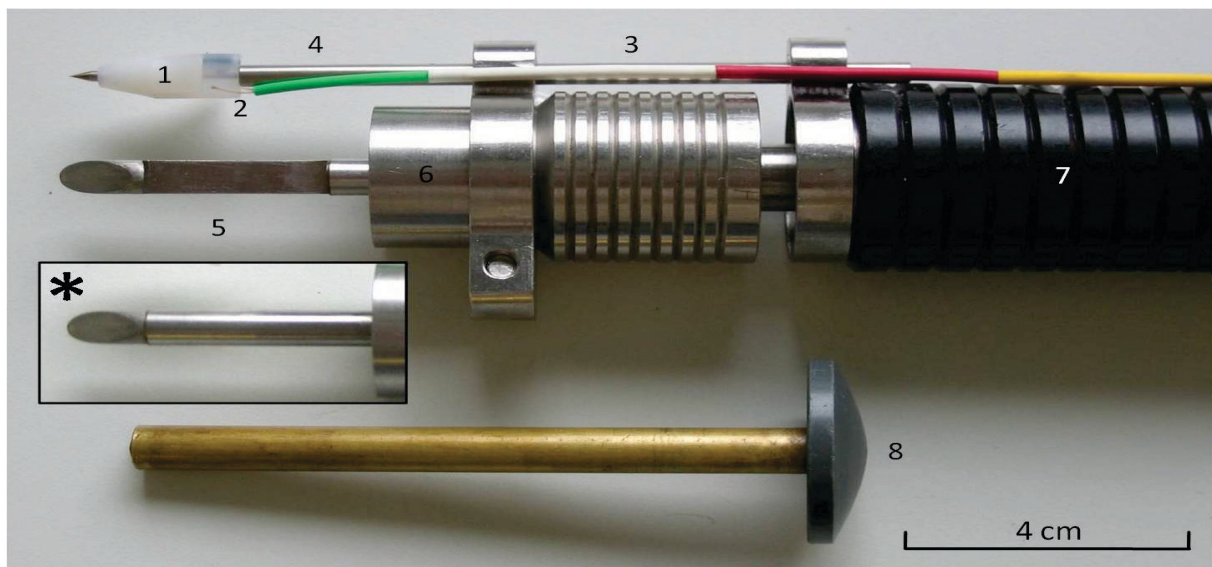


Abbildung 2.2: Duale ID-Tag-Implantations- und Biopsie-Apparatur

Die einsatzfähige Implantations- und Biopsie-Apparatur bestand aus einem ID-Tag [Pfeilkopf mit PIT (1), doppelsträngigem Monofilament (2), farbigen Schlauchstücken [grün = 2,5 cm Reporter, weiß-rot-gelb = je 4 cm langer Farbcode](3)], einer frei beweglichen Implantationsnadel (4), der Biopsienadel mit Schneide (5: geladen, * geschlossen) und dem federbetriebenen Auslösemechanismus (6). Mit einem 2-3 m langen Speer (7) wurden Markierungen und Biopsien unter Wasser vorgenommen. Die Biopsienadel konnte mit einer Spannvorrichtung (8) erneut geladen und geöffnet werden.

2.3 Probenbeschaffung für molekularbiologische Arbeiten

Elterntiere (Broodstock)

Zur Bearbeitung der angestrebten molekularbiologischen Fragestellungen, wie z.B. dem Elternschaftstest, bestand die Notwendigkeit, Gewebeproben der freischwimmenden Elterntiere zu sammeln. Um die Tiere nicht fangen zu müssen und darüber hinaus eine nachträgliche Tötung zu vermeiden, wurde hierzu die Technik der gleichzeitigen Markierung und Muskelbiopsie (vgl. Absatz 2.2.2) angewandt.

Die Biopsie-Apparatur (vgl. Abbildung 2.2 & 3.2) enthielt eine starke Metallfeder, die nach dem Spannvorgang von vier Kugellagern in Position gehalten wurde. Gleichzeitig wurde hierdurch die hülsenförmige Schneide in den Auslösekolben zurückgedrückt, so dass die Biopsienadel (Länge 4 cm) mit Probenaussparung frei lag.

Der Auslösekolben begrenzte die Eindringtiefe von Biopsie- und Implantationsnadel. Beim Auftreffen auf den Fisch wurde der Auslösekolben leicht zurückgeschoben, wodurch die Kugellager die gespannte Feder freigaben. Innerhalb eines Sekundenbruchteils schnellte die Schneide hervor und umschloss die eingedrungene Biopsienadel.

Zur Aufbewahrung wurden die Gewebeproben sofort in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit physiologischer Salzlösung (Fisch-Ringerlösung: 144 mmol/l NaCl, 6 mmol/l KCl, 5 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgSO₄, 12,4 mmol/l NaHCO₃) überführt. Ein Proteaseinhibitor (4 mmol/l, Pefabloc SC Plus, Roche) verhinderte die Proteinhydrolyse (Mintz, 1993), wodurch neben DNA-Analysen auch Protein-Assays, wie Vitellogenin- und Zona radiata-Protein-Dot-Blots (Hoeder, 2010), möglich waren. Die auf diese Weise behandelten Proben aus Italien und Malta wurden auf Trockeneis nach Düsseldorf transportiert und bei -80 °C gelagert.

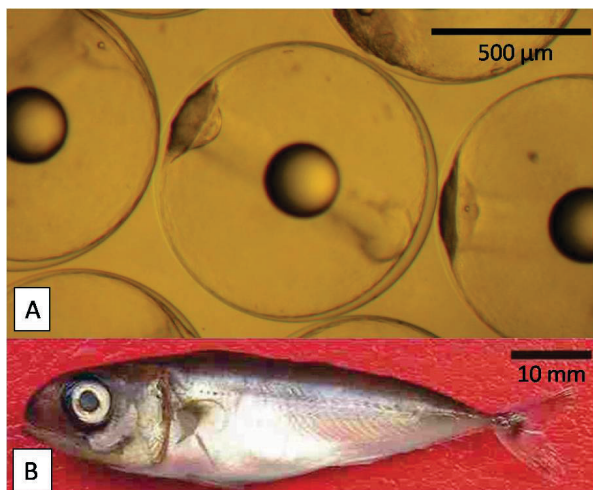


Abbildung 2.3: Mikrofotografische Aufnahmen der Thunfischnachzucht

A: Eier, ~ 12 h nach dem Ablaichen, \varnothing ~ 900 μ m (Vibo, 2008).

B: Fingerling, Länge 68 mm, 59 Tage nach dem Schlupf (R. Caprioli; Vibo, 2008).

Eier

Nach Hormoninduktion der Broodstock-Tiere erfolgte eine tägliche Kontrolle der Käfige. Mit 500 μ m Planktonnetzen wurde die Käfigoberfläche systematisch nach den pelagischen Thunfischeiern abgefischt. Anschließend erfolgte der Transfer in die Aufzuchtanstalten und die Probenahme (De Metrio, 2010a). Pro Ablaichvorgang wurde jeweils eine Charge Eier für DNA-Untersuchungen separiert, die zu einem Teil in 90 % Ethanol und zum anderen Teil bei -20 °C in Seewasser gelagert wurden. Die in Seewasser eingefrorenen Eier wurden auf Trockeneis nach Düsseldorf befördert und bei -80 °C aufbewahrt. Der Transport der Thunfischeier in Ethanol erfolgte bei Raumtemperatur mit anschließender Lage-

rung im Kühlschrank (8 °C).

Setzlinge (Fingerlings)

Proben juveniler Thunfische (engl. Fingerlings, Länge 3-6 cm) wurden von der kommerziellen Fischzucht Panittica bereitgestellt. Bei diesen Tieren handelte es sich um Nachkommen der italienischen Elterntiere aus dem Jahr 2010, die während der Aufzucht verstarben. Jeweils zehn Muskelproben von Fischen mit sichtbaren morphologischen Deformationen sowie solche ohne dieselbigen sollten auf ihre Elternschaft untersucht werden. Die Proben wurden auf Trockeneis versandt und bei -80 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Proben anderer Thunfischarten

Zur Etablierung eines Speziestests auf molekularbiologischer Ebene (vgl. Absatz 2.7.2) wurden, neben den NBFT-Proben aus den Projekten SELFDOTT und ALLOTUNA, weitere Thunfischproben beschafft.

In der kalabrischen Fischfabrik Marpesca wurden im Jahr 2010 Muskelproben von 14 Gelbflossen-Thunfischen (YFT, *Thunnus albacares*), sieben Weißen-Thunfischen (AT, *Thunnus alalunga*) sowie von vier weiteren Blauflossen-Thunfischen (NBFT, *Thunnus thynnus*) genommen.

Insgesamt 24 Muskelproben des Südlichen Blauflossen-Thunfisches (SBFT, *Thunnus maccoyii*) kamen 2009 vom Gondol Research Institute for Mariculture, Bali, Indonesien.

Je fünf Flossenstücke vom Weißen-Thunfisch (AT, *Thunnus alalunga*), Gelbflossen-Thunfischen (YFT, *Thunnus albacares*), Großaugen-Thunfisch (BET, *Thunnus obesus*) und Echten Bonito (SJT, *Katsuwonus pelamis*) wurden zudem von der Firma Pacific Planktonics, Hawaii, USA, bereitgestellt.

Zusammen mit der kroatischen Thunfischfirma Kali-Tuna wurden in den Jahren 2009 (20 Proben) und 2010 (33 Proben) insgesamt 53 Proben nicht geschlechtsreifer NBFT genommen.

Eine Auflistung der untersuchten Muskel-, Ei- und Flossenproben zur Entwicklung eines DNA-basierten Speziestests befindet sich im Anhang (vgl. Tabelle 8.6).

2.4 Messung physikalischer Umweltparameter und des Fischverhaltens innerhalb der Netzkäfige

Zur Bestimmung der präferierten Laichbedingungen des Blauflossen-Thunfisches wurden in den Käfigen in Italien (2008-2010), Spanien (2009-2010) und Malta (2009-2010) Licht- und Temperaturprofile aufgezeichnet.

Zusätzlich wurde das Schwimmverhalten einzelner Fische über eine gleichzeitige Messung der Tauchtiefe und der Umgebungstemperatur aufgezeichnet.

2.4.1 Stationäre HOBO-Datenlogger

Vor und während der Laichzeit erfolgte eine permanente Aufzeichnung von Temperatur [°C] und relativer Beleuchtungsstärke [lx]. Hierzu wurden wasserdichte Datenlogger (HOBO Pendant Tempe-

perature/Light Data Logger 64K, Onset Computer Corporation) eingesetzt. Um Temperatur- und Lichtunterschiede innerhalb eines Käfigs messen zu können, wurden die Datenlogger in allen Himmelsrichtungen und verschiedenen Tiefen angebracht.

In den Jahren 2009 und 2010 wurden beide maltesische Käfige, im Jahr 2011 nur ein Zuchtkäfig (vgl. Tabelle 2.1) mit jeweils acht Datenloggern ausgestattet. Pro Himmelsrichtung maßen je zwei Logger, angebracht in 1 m und 10 m Wassertiefe, die Licht- und Temperaturparameter. Zur gleichen Zeit zeichneten an je einem italienischen und einem spanischen Käfig jeweils 12 Datensammler (3 pro Himmelsrichtung in 1 m, 8 m und 16 m Tiefe) die gewünschten Parameter auf. Im Jahr 2008 kamen nur drei Datenlogger zum Einsatz. Ein Datenlogger führte eine Langzeitmessung in Malta durch (Juli 2008 bis März 2009), zwei weitere zeichneten die gewünschten Daten während der Laichzeit für eine Periode von drei Tagen in Italien auf.

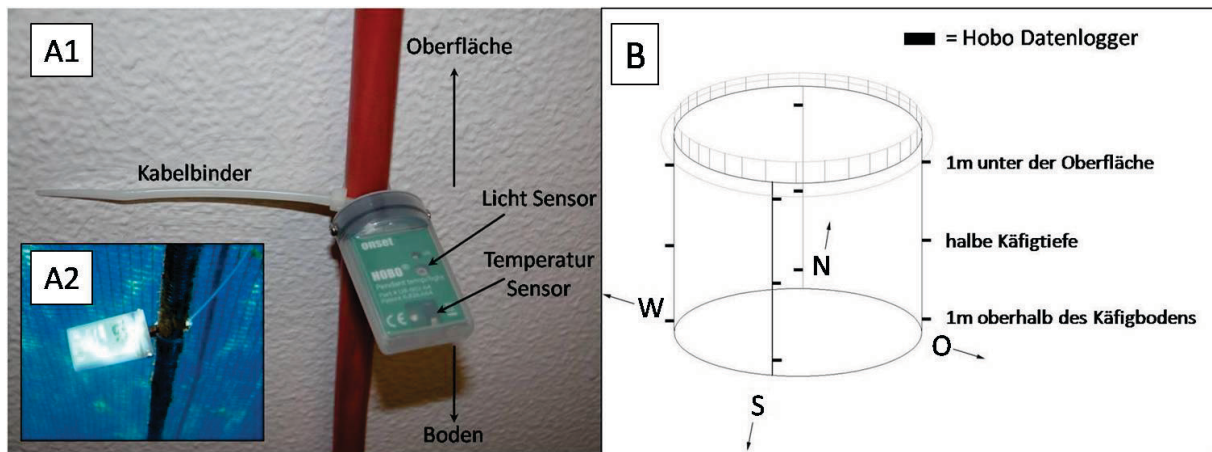


Abbildung 2.4: Befestigung der HOBO Pendant Temperature/Light Data Logger.

A: Beispiele zur Befestigung und Ausrichtung eines HOBO Data Loggers: (1) zur Veranschaulichung und (2) in der Praxis (Italien 2008, 1 m unter der Oberfläche). **B:** Technische Zeichnung eines Thunfischkäfigs mit je drei Datenloggern pro Himmelsrichtung. Datenlogger sind als schwarze Rechtecke gekennzeichnet.

Die Datenlogger wurden in den Jahren 2009 und 2010 für jeweils sechs Monate an der Außenseite der Fischkäfige befestigt (vgl. Abbildung 2.5 A2). Das Aufzeichnungsintervall für beide Parameter betrug 10 bis 20 Minuten. Berufstaucher reinigten die Oberseite und luden die gespeicherten Daten bis Mitte Mai wöchentlich herunter. Der Datentransfer erfolgte mittels passendem Unterwassershuttle (HOBO Waterproof Shuttle – U-DTW-1, Onset Computer Corporation). Während der Laichzeit wurde die Zeitspanne bis zum nächsten Download auf zwei bis drei Tage reduziert. Im Anschluss an die Messperiode wurden die Logger zur gründlichen Reinigung und zum Batteriewechsel entnommen.

Via mitgelieferter Software (*HOBOWare*, Version 2.6.0, Onset Computer Corporation) konnten die Daten auf einen Computer transferiert und zur weiteren Bearbeitung in ein Microsoft Excel-Arbeitsblatt (Microsoft Office 2007, Microsoft Deutschland GmbH) exportiert werden.

2.4.2 Fisch-Datenlogger

Um die bevorzugte Tauchtiefe sowie die präferierte Umgebungstemperatur bestimmen zu können, wurden in den Jahren 2009 bis 2011 externe Datenlogger an einzelnen Fischen in Italien und Malta befestigt. Hierfür wurden Temperatur [°C] und Tiefe [m] (Druck [bar]) aufzeichnende Datenlogger (DST milli TD [2009], DST milli-F TD [2010 und 2011], Star-Oddi) verwendet. Die Star-Oddi-Logger wurden speziell zur Aufzeichnung des Bewegungsverhaltens aquatischer Organismen hergestellt und bereits vielfach erprobt, wie unter anderem an Seesternen (z.B. Lamare *et al.*, 2009), Schildkröten (z.B. Hazel *et al.*, 2009) und Fischen (z.B. Pampoulie *et al.*, 2008).

Für die zylindrischen Datenlogger (Länge 38 mm, \varnothing 13 mm) wurden von der Zentralwerkstatt Biologie Trägerhülsen (Länge 12 cm, \varnothing 2 cm) aus sinkendem Polypropylen oder schwimmendem syntaktischen Schaum (DOSEY Syntactic Foam, DOSEY GmbH & Co. KG) hergestellt. Doppelsträngiges Nylonmonofilament mit einer Stärke von 0,8 mm (Anticurl, BroxxLine Ltd.), überzogen mit 12 cm Polyolefin-Schlauch, stellte die Verbindung zwischen Pfeilkopf und Trägerhülse her.

Zwischen 2008 und 2011 wurden in Italien und Malta insgesamt 14 Fische mit den oben beschriebenen Datensammlern versehen. Die Implantation der hergestellten Datenlogger erfolgte unter Wasser mittels Harpune. Sowohl die Datenverarbeitung als auch die Programmierung und das Auslesen der Logger wurde mit Hilfe der Software *Sea Star* (Sea Star, Version 4.2.5, Star-Oddi) vorgenommen.

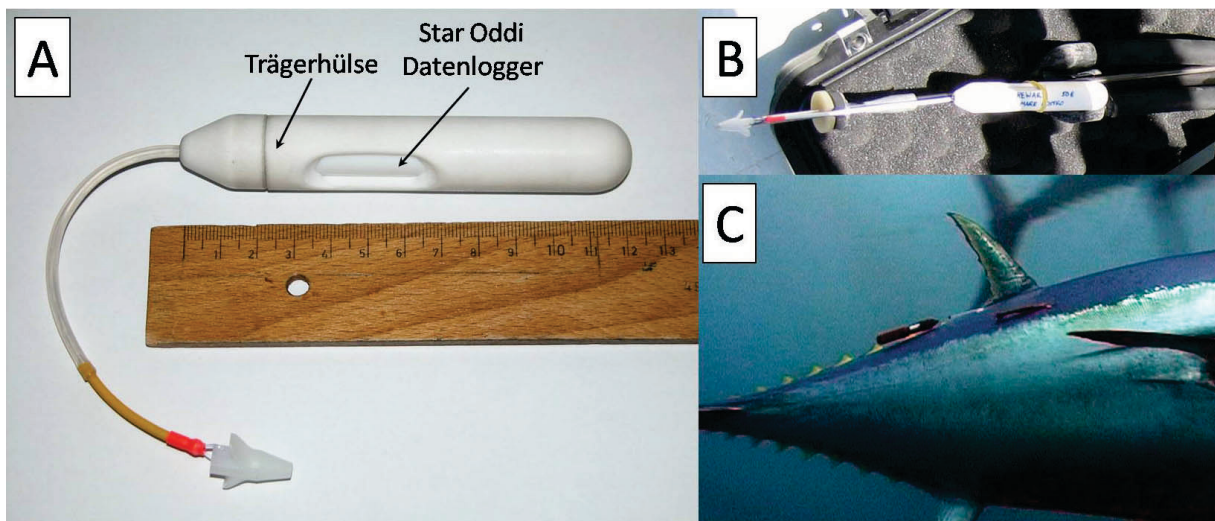


Abbildung 2.5: Aufbau und Implantation der Fisch-Datenlogger

A: Temperatur- und Tauchtiefen-Erfassungssystem bestehend aus einer Trägerhülse (syntaktischer Schaum), integriertem Star Oddi Datenlogger, Pfeilkopf, Nylonmonofilament und Polyolefin-Schläuchen. **B:** Harpune mit implantationsfähigem Fisch-Datenlogger. **C:** Implantierter Datenlogger in einer Polypropylen-Trägerhülse.

2.5 Etablierung einer sicheren und stressfreien Injektionsnarkose bei Teleostern

Ziel dieser Versuchsreihe war die Etablierung einer Injektionsnarkose bei verschiedenen Teleostern mit möglichst kurzer Induktionszeit und geringer Stressinduktion bei einer gleichzeitigen, vollständigen Kurzzeitimmobilisation.

2.5.1 Injektionsnarkose am Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) und Goldbrassen (*Sparus aurata*)

Die gewählten Anästhetika wurden zunächst am Modellorganismus *O. niloticus* erprobt. Diese Versuche dienten zunächst der Exploration des allgemeinen Dosis-Wirkungsverhältnisses, dementsprechend geeignete Narkosekonzentrationen für Tilapien ermittelt wurden. Erkenntnisse aus diesen Experimenten galt es auf weitere Teleostere wie den Goldbrassen und den Blauflossen-Thunfisch zu übertragen.

2.5.1.1 Verwendete Narkotika

Zur Induktion einer pharmakologisch hervorgerufenen Narkose bei Knochenfischen wurden fünf anästhetisch wirksame Substanzen sowie vier Mischungen derselben verwendet. Die applizierten Narkotika waren: Ketamin, Xylazin, Detomidin, Medetomidin und Propofol.

Ketamin-Hydrochlorid

Das Ketaminmolekül (Synonym: 2-(2-Chlorphenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon hydrochlorid, Sigma Aldrich) besitzt durch sein Chiralitätszentrum zwei optische Isomere [(R)-Ketamin und (S)-Ketamin]. Beide Enantiomere verfügen über eine anästhetische und analgetische Wirkung, wobei das (S)-Ketamin etwa dreifach potenter ist als das (R)-Enantiomer (Adams & Werner, 1997). Ketamin-HCl weist mit 200 mg/ml eine gute Wasserlöslichkeit auf (Plumb, 2008).

In den durchgeführten Versuchen wurde ausschließlich das racemische Gemisch aus (R)- und (S)-Ketamin verwendet.

Im Gegensatz zu allen anderen klinisch verwendeten Anästhetika ruft Ketamin eine dissoziative Anästhesie hervor. Unter diesem einzigartigen Narkosezustand versteht man einen unvollständigen Bewusstseinsverlust, bei dem eine elektrophysiologische Trennung zwischen Thalamus und limbischen System stattfindet (White *et al.*, 1982). Seinen für die Narkose relevanten pharmakologischen Effekt entfaltet Ketamin an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren des Zentralnervensystems (ZNS). NMDA-Rezeptoren gehören zur Klasse der ionotropen Glutamatrezeptoren und stellen einen für Natrium-, Kalium- und Calciumionen zeitweise permeablen Ionenkanal dar (Kress, 1997). Durch seine Bindung an den im Inneren des Ionenkanals liegenden Phencyclidin (PCP)-Rezeptor kommt es zu einer nicht-kompetitiven Hemmung des NMDA-Rezeptors, wodurch der Ionenfluss erliegt (Lodge & Johnson, 1990). Zusätzlich sind weitere pharmakologische Effekte an GABA-Rezeptorkanälen und Opioidrezeptoren bekannt (Kress, 1997).

Vom Komitee für Veterinärmedizinprodukte der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) liegt keine Beschränkung der Ketamin-Rückstandshöchstmenge (engl. maximum residue limit) in allen zur Lebensmittelgewinnung dienenden Tieren vor, was auf die geringe Halbwertszeit von 2-2,5 h zurückzuführen ist (EMA, 1997).

Xylazin-Hydrochlorid

Xylazin (Synonym: 2-(2,6-Dimethylphenylamino)-5,6-dihydro-4H-thiazin hydrochlorid, Sigma Aldrich) zählt zu den in der Veterinärmedizin weit verbreiteten α_2 -Adrenozeptor-Agonisten. Bisher wurden vier Subtypen des α_2 -Adrenozeptors identifiziert und auf ihre Bindungsaffinität für verschiedene Pharmaka untersucht. Jedoch weist keiner der verwendeten α_2 -Adrenozeptor-Agonisten eine selektive Affinität zu einem bestimmten Subtyp auf. Zusätzlich sind dosis- und substanzabhängige Wechselwirkungen mit α_1 -Adrenozeptoren bekannt (Schwartz & Clark, 1998).

Xylazin wirkt sowohl auf die prä- als auch auf die postsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren. Der narkotisierende Effekt wird vor allem auf der präsynaptischen Seite durch eine stark reduzierte Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Noradrenalin hervorgerufen (Starke, 2005). Die analgetische Wirkung beruht auf einer Stimulierung der postsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren und führt ferner zu einer Aktivierung des membranständigen G-Proteins. Dies hat zur Folge, dass Kaliumkanäle geöffnet werden, Kalium in den Extrazellulärraum fließt und die Nervenzelle unempfindlich für exzitatorische Reize wird (Hoffman & Taylor, 2001).

Eine Beschränkung der Rückstandshöchstmenge über die EMA in Lebensmitteln für den menschlichen Verzehr ist aufgrund der geringen Halbwertszeit von 2-3 h nicht erteilt (EMA, 1999).

Detomidin-Hydrochlorid und Medetomidin-Hydrochlorid

Wie Xylazin-HCl sind auch Detomidin-HCl (Synonym: 4-(2,3-Dimethylphenyl)methyl)-1H-imidazol hydrochlorid) und Medetomidin-HCl (Synonym: 4-1-(2,3-Dimethylphenyl)ethyl)-1H-imidazol hydrochlorid) α_2 -Adrenozeptor-Agonisten. Detomidin-Hydrochlorid (Cepesedan RP, 10 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH) und Medetomidin-Hydrochlorid (Domitor, 1 mg/ml, Orion Pharma) wurden jeweils als fertige Injektionslösung bezogen.

Beide Imidazolderivate besitzen im Vergleich zum Xylazin eine etwa 100-fach höhere Affinität für alle α_2 -Adrenozeptor Subtypen, was zur Folge hat, dass deutlich geringere Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt werden können (Schwartz & Clark, 1998). Medetomidin besitzt mit einer α_2/α_1 -Adrenozeptor-Bindungsselektivität von 1620 eine etwa 10-fach höhere Affinität zu α_2 -Adrenozeptoren als Detomidin ($\alpha_2/\alpha_1 = 260$) und Xylazin ($\alpha_2/\alpha_1 = 160$) (Virtanen & Nyman, 1985; Virtanen *et al.*, 1988).

Die narkotisierenden und anxiolytischen Eigenschaften der α_2 -Adrenozeptor-Agonisten Detomidin und Medetomidin beruhen ebenfalls auf einer Ausschüttungsblockade des Neurotransmitters Noradrenalin (Sinclair, 2003). Der hypnotische Effekt wird vor allem durch die Aktivierung zentraler α_2 -Adrenozeptoren im Locus caeruleus, einem Teil der Formatio reticularis im Rhombencephalon, ausgelöst (Doze *et al.*, 1989; Correa-Sales *et al.*, 1992).

Ebenso wie alle anderen verwendeten α_2 -Adrenozeptor-Agonisten vermitteln die Imidazolderivate Detomidin und Medetomidin eine dosisabhängige Analgesie (Sinclair, 2003). Aufgrund der schnellen Metabolisierung und Exkretion von Detomidin-HCl und Medetomidin-HCl (Halbwertszeit < 24 h), wurde durch die EMA keine Rückstandshöchstmenge festgelegt (EMA, 1996).

Propofol

Im Gegensatz zu allen anderen experimentell verwendeten Narkotika besitzt das Hypnotikum Propofol (Synonym: 2,6-Bis(isopropyl)phenol, Sigma Aldrich) keine analgetischen Eigenschaften (Reinhold *et al.*, 1998; Schaffrath *et al.*, 2004).

Obwohl der gänzliche Wirkmechanismus bisher noch nicht vollends aufgeklärt ist (Plumb, 2008), resultiert der maßgebliche hypnotische Effekt des Propofols aus der allosterischen Modulation von GABA_A-Rezeptoren (Hales & Lambert, 1991; Olsen & Li, 2011). Die Aktivierung führt dazu, dass die Permeabilität für Chloridionen durch GABA_A-Rezeptor-Chlorid-Ionophoren erhöht wird, wodurch es zu einer synaptischen Hyperpolarisation und einer gleichzeitigen Reduktion der neuronalen Erregbarkeit kommt (Hara *et al.*, 1993).

Um wasserunlösliches Propofol in Kombination mit einem weiteren Narkotikum verabreichen zu können, musste eine Öl-Wasser-Emulsion hergestellt werden (Ward *et al.*, 2002). Hierzu wurden 100 mg/ml Sojabohnenöl (Sigma Aldrich), 2,5 mg/ml Glycerol (Roth), 12 mg/ml Natriumhydroxid (BDH Prolabo) und 12 mg/ml Asolectin (Sigma Aldrich) mit der gewünschten Menge Propofol versetzt und auf einem Vortex-Laborschüttler vermischt (Plumb, 2008). Anschließend erfolgte die Zugabe des in Ringerlösung angesetzten Narkosemittels. Das Mischungsverhältnis zwischen den hydrophilen und hydrophoben Bestandteilen lag in der fertigen Emulsion bei etwa 6:1. Direkt vor dem Befüllen der Narkosespritze wurde die Injektionslösung sorgfältig mit Hilfe eines Vortex durchmischt, um die Applikation einer homogenen Emulsion zu gewährleisten.

Eingesetzte Konzentrationen und Mischungen sowie deren Anästhetische-Potenz sind im Ergebnisteil unter Absatz 3.3 beschrieben.

2.5.1.2 Narkosevorbereitungen

Die ausgewählten Tilapien wurden 24 Stunden vor dem eigentlichen Narkoseversuch aus dem Haltungsbecken entnommen und auf bereits implantierte ID-Chips untersucht. Anschließend erfolgte eine leichte Sedierung der Versuchstiere durch eine dreiminütige Immersion in einem Betäubungsbad bei 25 °C. Als Inhalationsanästhetikum wurde Benzocain in einer Konzentration von 25 mg/l eingesetzt (Neiffer & Stamper, 2009). Sedierte Fische wurden gewogen, gegebenenfalls mit einem PIT ausgestattet und bis zum Versuchsvorhaben in einem 200 l Glasaquarium mit Filter und Sauerstoffversorgung gehältert.

Durch die 24-stündige Erholungsphase wurde sichergestellt, dass Folgeeffekte der Versuchsvorbereitung, wie eine erhöhte Stresshormonkonzentration durch Handhabung und Sedierung (Kiessling *et*

al., 2009) sowie weiterhin im Körper vorhandenes Benzocain (Hayton *et al.*, 1996), ausgeschlossen werden konnten.

Für alle verwendeten Anästhetika, Konzentrationen oder Mischungen wurde eine eigene Stammlösung hergestellt und mit roter Lebensmittelfarbe angefärbt. Als Lösungsmittel für die Feststoffe Ketamin-Hydrochlorid und Xylazin-Hydrochlorid sowie für die Fertigpräparate mit den Wirkstoffen Medetomidin-Hydrochlorid und Detomidin-Hydrochlorid diente die unter Absatz 2.3 beschriebene physiologische Salzlösung. Das wasserunlösliche Propofol wurde als Öl-Wasser-Emulsion (vgl. Absatz 2.5.1.1 Propofol) injiziert. Das Injektionsvolumen der jeweiligen Stammlösung wurde über das Versuchstiergewicht berechnet.

Intramuskuläre Injektionen wurden mit 1 ml Spritzen (1 ml Luer-Slip-Spritze mit Kanüle Neolus 27Gx20mm, Terumo), intraperitoneale Applikationen mit 0,3 ml Insulinspritzen (Einmalspritze Insulin 0,30 ml mit Kanüle 29Gx13mm, Terumo) gesetzt. Sämtliche Narkoseversuche an Tilapien wurden bei einer konstanten Wassertemperatur von 25 °C durchgeführt.

An Goldbrassen wurden ausschließlich intraperitoneale Narkoseversuche durchgeführt. Acht Fischen wurde im Jahr 2010 eine für Tilapien sichere und wirksame Dosis des dissoziativen Anästhetikums Ketamin verabreicht (vgl. Absatz 3.3.2). Ungefütterte Versuchstiere wurden mit einem Netz aus dem Hälterungsbecken entnommen, gewogen und nach der Injektion der gewichtsspezifischen Wirkstoffkonzentration in ein 4 m³ Becken überführt. Die Versuchsreihe wurde am 17.07.2010 bei einer Wassertemperatur von 20 °C durchgeführt. Narkoseverlauf sowie Wirkungseintritt und -dauer wurden protokolliert und unter Absatz 3.3.2 ausgewertet und grafisch dargestellt.

2.5.1.3 Applikationsweg

Da eine gezielte intravenöse Injektion bei nicht narkotisierten Fischen nahezu unmöglich ist, wurden während der durchgeführten Versuche lediglich der intramuskuläre sowie der intraperitoneale Applikationsweg untersucht.

Intramuskulär

Nach 24-stündiger Ruhephase im Versuchsbecken wurden die Versuchstiere mit einem Netz gefangen und auf eine feuchte Schaumstoffmatte gelegt. Die Applikation des vorbereiteten Narkosemittels in die sinistrale Dorsalmuskulatur (i.m.) erfolgte bei einer Injektionstiefe von etwa 1 cm. Durch Spritzenaspiration sollte vermieden werden das Anästhetikum intravenös (i.v.) zu injizieren. Anschließend wurde das Versuchstier umgehend in das Versuchsbecken zurückgesetzt. Der beschriebene Vorgang dauerte maximal eine Minute.

Intraperitoneal

Auch die intraperitonealen (i.p.) Injektionen wurden erst nach der 24-stündigen Ruhephase vorgenommen. Das Anästhetikum wurde sinistral zwischen Brust- (Pectotale) und Bauchflosse (Ventrale) in die Leibeshöhle appliziert (vgl. Abbildung 2.6). Durch einen Injektionswinkel von etwa 45 ° und den Gebrauch von Insulinspritzen mit kurzen Nadeln (13 mm) sollte eine Applikation in ein Organ vermie-

den werden. Auch bei diesen Versuchen wurde eine Eingriffszeit von einer Minute nicht überschritten und eine intravenöse Injektion durch Spritzenaspiration vermieden.

2.5.1.4 Beurteilung der Narkosetiefe und -dauer

Die Beurteilung der Narkosetiefe erfolgte nach dem Schema von Bonath (1977). Hiernach wird der Narkoseverlauf von Fischen in vier Hauptstadien unterteilt, wobei das dritte Narkosestadium zusätzlich in drei Ebenen untergliedert ist (vgl. Tabelle 2.2). Der vollständige Verlust des Gleichgewichts, gleichzusetzten mit dem Übergang ins Narkosestadium III.1 (chirurgisches Stadium), wurde als Referenzpunkt für eine gelungene Anästhesie festgelegt.

Tabelle 2.2: Narkosestadien bei Fischen

Auflistung der Narkosestadien, der allgemeinen Zustandsbezeichnungen sowie des Fischverhaltens und der einhergehenden physiologischen Reaktion (modifiziert nach Bonath, 1977).

Narkosestadium	Bezeichnung	Verhalten und physiologische Reaktion
0	normal	aktives Schwimmen Atemfrequenz normal Gleichgewichtssinn normal reaktiv auf externe Stimuli
I	oberflächliche Sedierung (frühe Einleitungs- bzw. späte Aufwachphase)	ruckartige Schwimmbewegungen Atemfrequenz erhöht Gleichgewichtssinn reduziert (Schwanken) Reaktivität auf externe Stimuli vermindert
II	tiefe Sedierung (späte Einleitungs- bzw. frühe Aufwachphase)	unkontrolliertes Torkeln Atemfrequenz erhöht, Amplitude reduziert unphysiologische Körperhaltung keine Reaktion auf leichte externe Stimuli
III.1	Toleranzstadium (chirurgisches Stadium)	Gleichgewichtsverlust (Seiten-/Rückenlage) minimale Reaktion auf schmerzhafte Stimuli hochfrequente Flatteratmung
III.2	Toleranzstadium (chirurgisches Stadium)	Flossenbewegungen eingestellt keine Reaktion auf schmerzhafte Stimuli Atmung flach, setzt zum Teil aus
III.3	Toleranzstadium (chirurgisches Stadium)	keine Reizantwort völliger Atemstillstand Wiederbelebung zum Teil möglich
IV	irreversibles Narkosestadium	Herz- und Atemstillstand Abspreizen der Kiemendeckel Wiederbelebung unmöglich

Um Wirkungseintritt und -dauer der eingesetzten Narkotika vergleichen zu können, wurde die Zeit zwischen Applikation und Gleichgewichtsverlust (Induktionszeit) sowie zwischen Gleichgewichtsverlust und Wiedererlangen desselbigen (Narkosedauer) bestimmt. Als Gleichgewichtsverlust wurde der Zeitpunkt definiert, an dem das Versuchstier die normale Schwimmhaltung ohne Fremdeinwirkung nicht mehr beibehalten und sich auch nicht mehr selbstständig aufrichten konnte. Der Zeitpunkt der

Gleichgewichtswiedererlangung war erreicht, sobald sich das Versuchstier von alleine wieder in die normale Schwimmposition begab, ohne diese erneut zu verlieren (Narkosestadium II, frühe Aufwachphase).

2.5.1.5 Eingriffe unter Narkose

Sobald ein Versuchstier Narkosestadium III.1 erreichte, wurde es zur Blutentnahme aus dem Versuchsbecken entnommen und in eine mit feuchtem Zellstoff ausgelegte Präparierschale überführt. Da Fische aufgrund von fehlenden Augenliedern sehr empfindlich auf Lichtreflexe reagieren, wurden die Augen unmittelbar nach der Entnahme abgedeckt. Diese als „Blinkering“ bekannte Methode diente dazu, lichtinduzierte Stressreaktionen zu minimieren (Brown, 1993).

Die für weitere Untersuchungen verwendete Blutprobe (2 ml) wurde aus der dorsalen Aorta entnommen. Um das ventral der Wirbelsäule anliegende Gefäß zu punktieren, wurde eine 5 ml Spritze (5 ml Luer-Slip-Spritze mit Kanüle Neolus 23Gx30mm, Terumo) zwischen Anale und Caudale, – unmittelbar unterhalb des Seitenlinienorgans – eingestochen und in einem 45 ° Winkel in dorso-cranialer Richtung bis unter die Wirbelsäule geschoben (vgl. Abbildung 2.6).

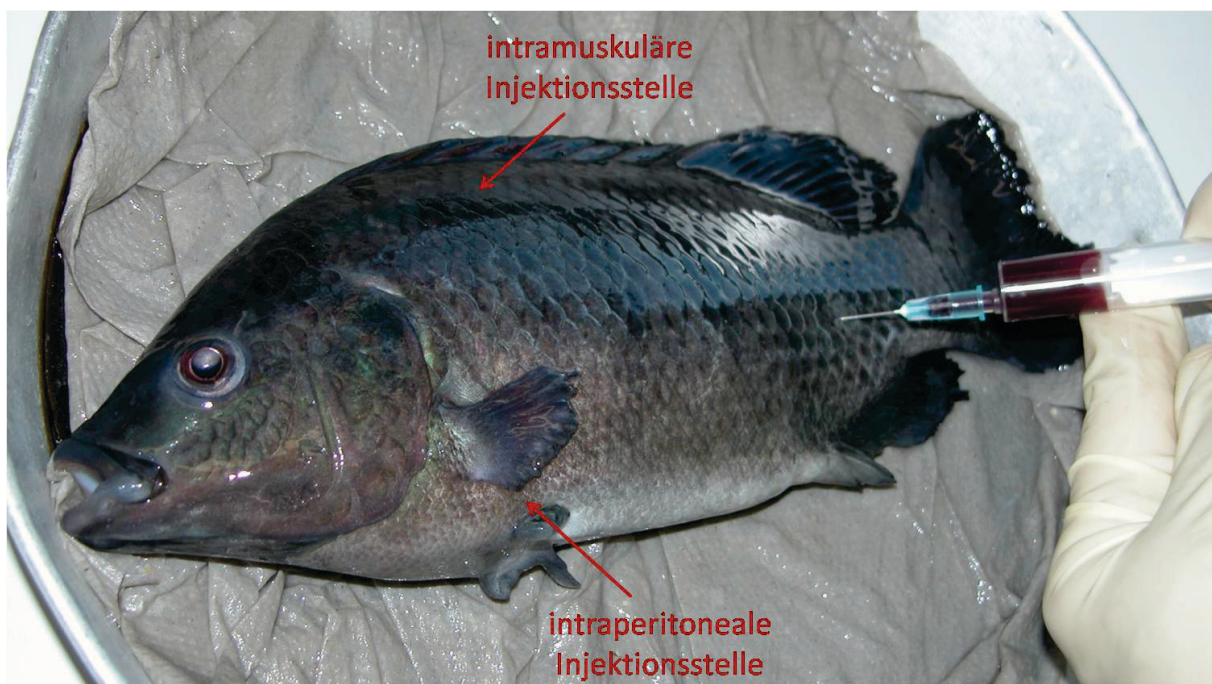


Abbildung 2.6: Blutentnahme am narkotisierten Nil-Tilapia

Zusätzlich zur demonstrierten Blutentnahme aus der dorsalen Aorta ist die intraperitoneale sowie die intramuskuläre Injektionsstelle zur Narkosemittelapplikation mit einem roten Pfeil markiert.

Verwendete Spritzen und Kanülen wurden vor dem Eingriff mit heparinierter Fisch-Ringerlösung gespült (Heparin-Natrium, Caelo), um einer Koagulation des Blutes vorzubeugen (Hattingh, 1975). Die entnommene Blutprobe wurde auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und durch Invertieren gemischt. Anschließend erfolgte bei einer zehnmütigen Zentrifugation (14000 rpm bei 4 °C, Centri-

fuge 5417 R, Eppendorf) die Trennung von Plasma und zellulären Bestandteilen. Das Blutplasma wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die mit dem Zurücksetzen ins Versuchsbecken endende Behandlung wurde innerhalb von maximal 1,5 min abgeschlossen, wodurch eine künstliche Beatmung des Versuchstieres nicht notwendig war (Neiffer & Stamper, 2009).

Verwendete Kontrolltiere wurden nach dem Wiegen und 24-stündiger Hälterung aus dem Versuchsbecken entnommen und umgehend mittels Kopfschlag getötet. Der Fang- und Tötungsvorgang sowie die kardiale Blutentnahme wurden in maximal 30 s durchgeführt.

2.5.2 Injektionsnarkose am Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus thynnus*)

Die zuvor am Modellorganismus Tilapia ermittelten optimalen Anästhetika-Konzentrationen sowie die von Williams *et al.* (2004) publizierten Resultate wurden in den Jahren 2008 und 2010 an freischwimmenden NBFT in Malta getestet.

Die 22 Versuchsfische hatten bei einer Körpergröße zwischen 130 und 160 cm ein Gewicht von 40-70 kg. Im Jahr 2008 wurden die Narkoseversuche im November bei einer mittleren Wassertemperatur von $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. 2010 fanden Versuche der gleichen Art im Juli bei einer Wassertemperatur von durchschnittlich $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt.

Verwendet wurden die unter Absatz 2.5.1.1 näher beschriebenen Anästhetika Detomidin-HCl, Ketamin-HCl und Xylazin-HCl.

2.5.2.1 Narkosevorbereitungen und Equipment

Um freischwimmenden NBFT, die im offenen Meer in der Lage sind Geschwindigkeiten von bis zu 80 km/h zu erreichen (Wardle *et al.*, 1989), mehrere Milliliter eines Narkosemittels verabreichen zu können, mussten spezielle Gerätschaften angeschafft, weiterentwickelt und konstruiert werden.

Verwendet wurde der automatisch entladende Jabstick der Firma Dan-Inject (CATS, Dan-Inject, vgl. Abbildung 2.7).



Abbildung 2.7: Injektionsstab mit Spritzen und Kanülen

Abgebildet ist der verwendete Aluminiuminjektionsstab (Länge bis zu 2 m) mit passenden 10 ml Luer-Lock-Spritzen und Kanülen mit Frontalöffnung (modifiziert nach Quelle: Dan-Inject, www.dan-inject.com).

Durch den internen, federbetriebenen Mechanismus bestand die Möglichkeit, innerhalb eines Sekundenbruchteils Volumina von bis zu 10 ml zu applizieren. Bei ausreichendem Fischkontakt kam es zu einer Entladung der gespannten Feder, wodurch der Spritzenkolben schlagartig nach vorne geschoben und das Narkotikum über eine passende Kanüle appliziert wurde. Drei verschiedene Kanü-

lenmodelle (Eigenbau Zentralwerkstatt Biologie der Heinrich-Heine Universität) mit einer Länge von jeweils 6 cm und entweder zwei bzw. zwölf Lateralöffnungen oder einer Frontöffnung wurden eingesetzt.

Wie bei der Thunfischmarkierung wurde auch bei den Narkoseversuchen zunächst das Käfigvolumen durch Anheben des Bodens und ein Stellnetz stark reduziert, um die Fische in Reichweite des oder der Taucher/-s zu bringen. Anschließend wurde unter Wasser das Fischgewicht geschätzt und die entsprechende Narkosemittelkonzentration angemischt. Mit Lebensmittelfarbe angefärbte Ringerlösung diente als Lösungsmittel und optische Injektionskontrolle für alle verwendeten Anästhetika.

2.5.2.2 Applikationsweg

Da eine punktgenaue Applikation bei den permanent in Bewegung befindlichen Thunfischen generell nicht möglich ist, wurden vor dem Versuch Injektionsbereiche definiert. Dementsprechend versuchte der ausführende Taucher die Injektion möglichst präzise entweder in die dorsale Rückenmuskulatur zwischen Kopf und Dorsale (i.m.) oder ventral in den Intraperitonealraum zwischen die Pectoralen und Anale (i.p.) zu setzen.

2.5.2.3 Handling und Eingriffe unter Narkose

Im Fall einer gelungenen Injektion wurden die Versuchstiere bis zu 45 Minuten von über sowie von unter Wasser aus beobachtet. Veränderungen im Schwimmverhalten sowie Narkosesymptome wurden protokolliert (vgl. Absatz 3.5).

Sobald ein Fisch das zweite Narkosestadium erreichte, versuchten zwei Taucher das Tier zur Beruhigung auf den Rücken zu drehen und nach dem vollständigen Verlust der Gegenwehr in eine Trage zu führen. Mit Hilfe eines Bootskrans konnte das Versuchstier an Bord gehievt und anhand einer integrierten Hängewaage dessen Gewicht bestimmt werden, wodurch die nachträgliche Berechnung der applizierten Wirkstoffkonzentration(en) in mg/kg möglich war.

Zur künstlichen Beatmung wurde frisches Meerwasser mittels einer Kreiselpumpe oral über die Kiemen geleitet. Die Versuchstiere, deren Augen während der gesamten Behandlung mit einem nassen Tuch abgedeckt waren, wurden mit einem ID-Tag (vgl. Absatz 2.2.2) markiert. Gleichzeitig erfolgte die Entnahme einer Gewebeprobe (vgl. Abbildung 3.24). Nach dem Zurücksetzen in den Käfig assistierten zwei Taucher dem Fisch beim Schwimmen, bis dies wieder selbstständig möglich war. Im Anschluss erfolgte erneut eine 45-minütige Beobachtung mit eventueller Hilfeleistung bei wiederholtem Gleichgewichtsverlust oder einer Kollision mit der Käfigwand. Eine letzte Kontrolle wurde 24 Stunden nach dem Versuch durchgeführt.

2.6 Quantitative Konzentrationsbestimmung der Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol in Tilapia-Plasma

Zur Quantifizierung des durch die Narkose induzierten Stressniveaus wurden die Plasmakonzentrationen des Steroidhormons Cortisol sowie der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin bei zuvor betäubten Tilapien gemessen.

2.6.1 Bestimmung der Plasmacortisolkonzentrationen mittels enzymgekoppelten Immunabsorptionstest

Cortisol (F, Synonym: 11 β -17,21-Trihydroxy-4-pregnene-3,20-dione, Sigma Aldrich) ist das vorherrschende Glucocorticoid der Actinopterygii (Barton *et al.*, 1998). Es wird als primäre Antwort auf einen externen Stressor ausgeschüttet und kann im Plasma quantitativ nachgewiesen werden (Barton, 2002).

Die Bestimmung der Cortisolkonzentrationen erfolgte mittels eines adaptierten, enzymgekoppelten Immunabsorptionstests (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) nach Cuisset *et al.* (1994), Nash *et al.* (2000) und Susca (2001).

2.6.1.1 Cortisolextraktion aus Tilapia-Plasma

Die Steroidextraktion erfolgte nach einem geringfügig abgewandelten Protokoll von Nash *et al.* (2000). Hierzu wurden die bei -80 °C gelagerten Plasmaproben zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Zur Extraktion wurden 200 μ l Plasma zusammen mit 5 ml Dichlormethan (DCM, J. T. Baker) in ein Extraktionszentrifugenröhrchen (Glaswerkstatt der Heinrich-Heine Universität) überführt. Durch kräftiges Mischen per Hand und Vortex (mindestens 10 Sekunden) wurde das Plasmacortisol in die organische Phase ausgeschüttelt. Bei einer anschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 3000 rpm (Minifuge RF II, Hereaus) kam es zur Phasentrennung. Hierauf wurde die untere organische Phase mit einer Glaspipette in ein Rollrandglas überführt und die verbleibende wässrige Phase ein weiteres Mal auf die gleiche Art extrahiert. Über Nacht wurden die steroidhaltigen 10 ml DCM unter dem Abzug bei 37 °C auf einer Temperierplatte (Präzitherm PZ 44, Störk-Tronic) evaporiert, anschließend mit 400 μ l Ethanol p.a. (Sigma Aldrich) resuspendiert und in Mikrotiterplatten mit geringer Bindungsaffinität (96 well, Low-Cell-Binding, Nunc) transferiert. Das Ethanol wurde bei 37 °C abgedampft und der Cortisoltransfer auf die Mikrotiterplatten wurde zwei weitere Male wiederholt. Nach vollständiger Evaporation des Ethanols konnten die Probenplatten mit einer selbstklebenden Abdeckfolie (Roth) verschlossen und für mehrere Tage bei 4 °C oder für mehrere Wochen bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.6.1.2 Herstellung des Cortisol-Tracers und verwendete Antikörper

Die zur Konzentrationsbestimmung erforderliche Farbreaktion wurde durch das Steroid-Enzym-Konjugat Cortisol-Carboxymethyloxim-Acetylcholinesterase (F-CMO-AChE) katalysiert. Die Herstellung dieses auch Tracer genannten Konjugats erfolgte nach den Angaben von Nash *et al.* (2000).

Hierzu wurde zunächst 1 mg Acetylcholinesterase (AChE, Sigma Aldrich) in 500 µl Natriumphosphatpuffer (100 mmol/l, pH 7.0) gelöst. Durch Zugabe von 25 µl Trypsinlösung (25 mg/ml Trypsin in 100 mmol/l Natriumphosphatpuffer pH 7, Sigma Aldrich) startete der Verdau der AChE in seine globuläre Form, bestehend aus vier katalytisch aktiven Untereinheiten (G_4 -AChE, Massoulié & Bon, 1982). Nach dem 24-stündigen Verdau bei RT wurde die Lösung zur Entfernung von Salzen gegen 200 ml eines 100 mmol/l Boratpuffer (pH 8.5, 4 °C) dialysiert. Während der 24-stündigen Dialyse wurde der Boratpuffer mehrfach gewechselt und das entsalzte Produkt (1 ml) schließlich in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend wurden 174 µg (400 nmol/l) Cortisol-Carboxymethyloxim (F-CMO, Steraloids) in 38 µl N-Hydroxysuccinimid-Lösung (1 mg/ml in wasserfreiem Dimethylformamid, beides Sigma Aldrich) gelöst und über Nacht mit 32 µl N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung (2 mg/ml in wasserfreiem Dimethylformamid, Sigma Aldrich) versetzt.

Um das Steroid-Enzym-Konjugat herzustellen, wurden 30 µl der aktivierten F-CMO-Lösung und 200 µl der G_4 -AChE-Lösung mit 1 ml Steroid-Assay-Puffer (100 mmol/l $K_2HPO_4 \times 3H_2O$, 100 mmol/l KH_2PO_4 , 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0,1 % Rinderserumalbumin (BSA), 0,15 mmol/l NaN_3 , pH 7.4, Sigma Aldrich) gemischt und für zwei Stunden im Dunkeln (RT) inkubiert. Mit Hilfe einer Gelfiltration über eine PD10 Säule (PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare; Elutionspuffer: 10 mmol/l Tris, 1 M NaCl, 10 mmol/l $MgCl_2$, 0,15 mmol/l NaN_3 , pH 7.4) wurde das nun kovalent gebundene F-CMO-AChE-Konjugat aufgereinigt und konzentriert. Nachdem das Ausschlussvolumen verworfen wurde, konnten Fraktionen zu je 200 µl in Reaktionsgefäßen aufgefangen werden, in denen jeweils 1 ml Steroid-Assay-Puffers vorgelegt war.

Die enzymatische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe des AChE-Substrats Acetylthiocholin-Iodid nach der von Ellman *et al.* (1961) entwickelten Methode bestimmt. Pro Fraktion wurden 5 µl zusammen mit 200 µl Ellman's Reagenz (20 mmol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7.4, 0,75 mmol/l Acetylthiocholin Iodid, 0,5 mmol/l 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), Sigma Aldrich) auf eine Mikrotiterplatte (96 well, F96 MaxiSorp, Nunc) gegeben. Während der zweistündigen Inkubationszeit lief in den F-CMO-AChE-haltigen Fraktionen die katalytische Umsetzung der Ellman's Reagenz ab, wobei Acetylthiocholin zu Thiocholin und Acetat hydrolysierte. Die photometrisch messbare Farbentwicklung entstand durch eine Reaktion der Sulfhydrylgruppe des Thiocholins mit DTNB, wodurch Thionitrobenzoat entstand. In einem Mikrotiterplatten-Photometer (Sunrise, Tecan) wurde die Absorption aller Fraktionen bei 405 nm (Referenzwellenlänge 605 nm) gemessen und die Fraktionen, welche mindestens 30 % der maximalen Aktivität (Absorption) zeigten, vereinigt. Der so hergestellte Cortisol-Tracer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Cortisolkonzentrationen wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt. Polyclonale Ziegenimmunoglobine gegen Kaninchenimmunoglobine (Goat α -Rabbit IgG, Sigma Aldrich) dienten als Erstantikörper (1. Ak). Der Zweitantikörper, also das Antiserum gegen Cortisol, wurde von der Firma Pineda-Antikörper-Service im Jahr 2006 hergestellt und bestand aus polyklonalen Kaninchenimmunoglobinen (Rabbit α -Cortisol IgG).

Um die optimalen Tracer- und Zweitantikörperkonzentrationen für den Cortisol-ELISA zu bestimmen, wurde eine Schachbrett-Titration (vgl. Absatz 2.6.1.3) durchgeführt.

2.6.1.3 Schachbrett-Titration

Die optimale Verdünnung des Tracers und Zweitantikörpers (2. Ak) sowie deren effektivstes Verhältnis wurden mittels einer sogenannten Schachbrett- oder Checkerboard-Titration nach Crowther (2000) und Nash *et al.* (2000) ermittelt. Hierzu wurden serielle Verdünnungen des 2. Ak (Zeilen 1-10) und des Tracers (Reihen A-H) in eine Mikrotiterplatte mit hoher Bindungsaffinität (96 well, F96 MaxiSorp, Nunc) pipettiert. Zeile 11 diente zur Bestimmung der unspezifischen Tracerbindung und enthielt keinen Antikörper. Die zwölfte Zeile indizierte die maximale Enzymaktivität. Alle Verdünnungen wurden mit Steroid-Assay-Puffer hergestellt, wobei die Anfangsverdünnungen für den 2. Ak und den Tracer 1:1000 bzw. 1:50 betragen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde die Checkerboard-Platte bis auf Zeile 12 gewaschen und alle 96 Kavitäten (wells) mit 175 µl Ellman's Reagenz befüllt. Die nun ablaufende enzymatische Farbreaktion fand ebenfalls bei RT statt und wurde beendet, sobald die Extinktion einer Probenkammer einen Wert von 1,5 erreichte (ausgenommen Zeile 12, maximale Enzymaktivität). Zur Auswertung wurden die Absorptionen der Antikörperverdünnungen gegen die logarithmisch aufgetragenen Tracerverdünnungen abgebildet.

2.6.1.4 Das Cortisol-ELISA-Verfahren

Im Fall des durchgeführten indirekten, kompetitiven ELISA konkurrierten enzymgekoppelte Cortisolmoleküle (Tracer) mit dem Cortisol aus Probe oder Standard um die Bindungsplätze des spezifischen Zweitantikörpers. Durch die enzymatische Farbreaktion des Tracers, deren Intensität direkt von der Cortisolkonzentration der Probe bzw. des Standards abhängig war, ließ sich mit Hilfe einer Standardreihe die Steroidkonzentration berechnen.

Mikrotiterplattenvorbereitung

Mikrotiterplatten mit 96 wells und einer hohen Bindungsaffinität wurden mit Goat α -Rabbit IgG beschichtet (engl. coating). Die Adsorption der eingesetzten Antikörper an die Polystyroloberfläche beruhte auf nicht-kovalenten, intramolekularen Wechselwirkungen, den so genannten Van-der-Waals-Kräften (Esser, 2010). Verdünnt in einem 50 mmol/l Kaliumphosphatpuffer (Verdünnungsfaktor 1:1850, pH 7.4) wurden jeweils 150 µl der Erstantikörperlösung in jede der 96 Probenkammern pipettiert. Die ELISA-Platten wurden mit Abdeckfolie verschlossen und über Nacht bei RT inkubiert. Freie Bindungsplätze der Polystyroloberfläche wurden anschließend über Nacht bei RT mit jeweils 100 µl einer 3 %igen BSA-Lösung (100 mmol/l Kaliumphosphatpuffer, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l NaN_3 , pH 7.4, Sigma Aldrich) gesättigt (engl. blocking). Die gecoateten und geblockten Platten wurden verschlossen und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Vor dem Gebrauch wurden die Platten mit Hilfe eines automatischen Mikrotiterplatten-Waschgeräts mit 20 mmol/l Kaliumphosphatpuffer, versetzt mit 0,05 % (v/v) Tween-20 (pH 7.4, Sigma Aldrich), dreifach gewaschen.

Probenvorbereitung

Das auf Mikrotiterplatten mit geringer Bindungsaffinität extrahierte Plasmacortisol wurde zunächst mit 300 μ l Ethanol auf einem Mikrotiterplattenschüttler (10 min bei 600 rpm, Titramax 100, Heidolph) rückgelöst. Jeweils 40 μ l des cortisolhaltigen Ethanols wurden in neue Low-Cell-Binding-Kavitäten transferiert und ebenfalls bei 37 °C abgedampft. Anschließend erfolgte die finale Cortisolrücklösung mit 110 μ l Steroid-Assay-Puffer. Jeweils 50 μ l (Doppelbestimmung) dieser Lösung wurden im ELISA eingesetzt.

ELISA Durchführung

Die vorbereiteten und gewaschenen Mikrotiterplatten wurden ähnlich dem Protokoll von Nash *et al.* (2000) belegt (vgl. Tabelle 2.3). Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Reihen A und B dienen in jedem ELISA als Standardreihe, in die durch eine serielle Verdünnung Cortisolkonzentrationen von 400-0,78 pg in 100 μ l Steroid-Assay-Puffer bis einschließlich well 10 vorgelegt wurden. Die beiden verbliebenen Kavitäten dienen zur Bestimmung der maximalen Bindung ($B_0 = 0$ pg Cortisol) und der unspezifischen Bindungen (NSB = Non-specific Binding). Hierzu wurden 100 μ l Steroid-Assay-Puffer in die wells A und B 11 sowie 125 μ l Steroid-Assay-Puffer in die wells A und B 12 pipettiert. Die Reihen C bis H dienen zur Messung des Plasmacortisols oder eines internen Standards zur Überprüfung der Wiederfindungsrate und enthielten neben 50 μ l Steroid-Assay-Puffer 50 μ l Probenlösung. Anschließend wurden alle 96 wells mit 25 μ l Tracer versetzt und der ELISA durch Zugabe von 25 μ l des 2. Ak, ausgenommen der NSB-wells, gestartet. Das Endvolumen in allen Kavitäten betrug 150 μ l.

Tabelle 2.3: Schematische Plattenbelegung des Cortisol-ELISA

Jeweils als Doppelbestimmung wurden aufgetragen: Std. 1-10 = Standardreihe von 400-0,78 pg/well, B_0 = maximale Extinktion bzw. Bindung, NSB = unspezifische Bindung, P1-P36 = Kavitäten für Plasmaproben oder interne Standards.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 7	Std. 8	Std. 9	Std. 10	B_0	NSB
B	Std. 1	Std. 2	Std. 3	Std. 4	Std. 5	Std. 6	Std. 7	Std. 8	Std. 9	Std. 10	B_0	NSB
C	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12
D	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12
E	P 13	P 14	P 15	P 16	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24
F	P 13	P 14	P 15	P 16	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24
G	P 25	P 26	P 27	P 28	P 29	P 30	P 31	P 32	P 33	P 34	P 35	P 36
H	P 25	P 26	P 27	P 28	P 29	P 30	P 31	P 32	P 33	P 34	P 35	P 36

Die Inkubation der verschlossenen Mikrotiterplatten erfolgte für zwei Stunden bei RT auf einem Mikrotiterplattenschüttler (300 rpm). Nach vollendeter Inkubation wurden die Platten erneut mit dem Mikrotiterplatten-Waschgerät gesäubert, um ungebundene Antikörper und Tracer restlos zu

entfernen. Die enzymatische Farbreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl Ellman's Reagenz induziert. Nach einer etwa 12-stündigen Entwicklungszeit bei RT und unter Lichtabschluss konnten die Absorptionen im Mikrotiterplatten-Photometer bei 405 nm (Referenzwellenlänge 605 nm) gemessen werden. Mit Hilfe des Microsoft Excel Add-Ins XFlour (Tecan) wurden die Absorptionen digitalisiert.

2.6.1.5 ELISA Auswertung

Die Berechnung der Plasmacortisolkonzentrationen erfolgte nach Cuisset *et al.* (1994) und Wesendonk (2006). Zunächst wurden die Absorptionsmittelwerte der Doppelbestimmungen berechnet und durch Subtraktion der mittleren Absorption der NSB-wells korrigiert. Messfehler durch Eigenzerfall des Acetylthiocholins, hervorgerufen durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten, konnten hierdurch ausgeschlossen werden. Im Anschluss erfolgte die Berechnung des prozentualen Verhältnisses aller Extinktionswerte (B) zur maximalen Extinktion (B_0). Die so erhaltenen %B/ B_0 -Werte der Standardreihe wurden gegen die entsprechenden, logarithmierten Cortisolkonzentrationen aufgetragen. Zur Linearisierung dieser meist sigmoiden Kurven wurde der jeweilige Logit-Wert nach folgender Funktion berechnet:

Formel 2.1: Logit-Transformation

$$\text{logit } \% \frac{B}{B_0} = \ln \left[\frac{\% \frac{B}{B_0}}{(1 - \% \frac{B}{B_0})} \right]$$

Nur die Standardkonzentrationen mit einem %B/ B_0 -Wert zwischen 30 % und 80 % wurden für die Bestimmung der Standardgeraden berücksichtigt und als Ergebnis der Logit-Funktion (logit %B/ B_0 , Ordinate) gegen die logarithmierten Cortisolkonzentrationen (pg/ml, Abszisse) aufgetragen. Die tatsächlichen Standardkonzentrationen sowie die Cortisolkonzentrationen der Plasmaproben konnten durch die anhand logarithmischer Regressionsanalyse bestimmte Geradengleichung und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren berechnet werden.

2.6.2 Bestimmung der Plasmakatecholaminkonzentrationen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin werden als Antwort auf einen externen oder internen Stressor aus dem Nebennierenmark freigesetzt. Während Adrenalin ins Blut ausgeschüttet wird und hierdurch der Transport bis an die Zielzellen erfolgt, fungiert Noradrenalin durch seine Ausschüttung an Nervenenden der Zielzellen beinahe ausschließlich als Neurotransmitter des Sympathikus (Reid *et al.*, 1998). Beide Katecholamine sind Abkömmlinge der Aminosäure Tyrosin und werden durch enzymatische Umsetzungen aus diesem gebildet (Axelrod & Reisine, 1984).

Durch Narkosestress hervorgerufene Plasmakatecholaminkonzentrationen wurden über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) ermittelt.

2.6.2.1 Katecholaminextraktion aus Tilapia-Plasma

Die aluminiumbasierte Extraktion von Katecholaminen wurde erstmals von Anton und Sayre (1962) beschrieben. In Anlehnung an dieses Protokoll und der dargestellten Vorgehensweise im Plasma Catecholamine Methodology Book (ESA Biosciences, Plasma Catecholamine Analysis Kit) erfolgte die gleichzeitige Adrenalin- und Noradrenalinextraktion.

Mit zweimolarer Salzsäure aktiviertes Aluminiumoxid (Type WA-4: Acid, Sigma Aldrich) wurde zu je 20 mg in 2 ml Einmalspritzen gegeben, die zuvor mit einer ausgestanzten Polyäthylenplatte (Cellpor, 3.0 mm stark, Porengröße 80-130 μm , Esters Filtertechnik) bestückt wurden. Nach dem Verschließen der Spritzen am unteren Ende wurden 150 μl erneut abzentrifugiertes Plasma (10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 14000 rpm), 1 ml 0,5 mol/l Tris/HCl-Puffer (pH 8.6) sowie 30 μl des internen Standards 2,3-Dihydroxybenzoesäure (1000 nmol/l, DHBA, Sigma Aldrich) hinzugegeben. Beim gegebenen pH-Wert erfolgte während zehnmütigen Schüttelns (600 rpm, Thermomixer 5436, Eppendorf) die Adsorption der Katecholamine an das oxidierte Aluminium (Al^{3+}). Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einer Membran-Vakuumpumpe (MZ 2C, Vakuubrand) durch die Polyäthylenplatte abgesaugt und mit 8 ml Millipore-Wasser gewaschen. Die Elution der Katecholamine erfolgte beim Schütteln der Aluminiumpartikel (10 min, 600 rpm) mit 150 μl 4 %iger Essigsäure. Mit Hilfe des Spritzenstempels wurde das Eluat aus der Spritze gedrückt, in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und bis zum Auftragen auf die HPLC auf Eis gelagert.

2.6.2.2 Katecholamin-HPLC-Verfahren

Mit Hilfe des HPLC-Verfahrens können Komponenten aus einem Flüssigkeitsgemisch binnen kurzer Analysezeit nachgewiesen, aufgetrennt und quantifiziert werden. Hierbei werden die Zielmoleküle von einer mobilen Phase über eine Trennsäule transportiert und deren Retentionszeit durch auftretende Wechselwirkungen mit der stationären Phase erhöht.

Zur quantitativen Bestimmung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurde die Technik der Reversed-Phase Chromatographie (RP-HPLC) mit einer polaren mobilen Phase und einer unpolaren stationären Phase verwendet. Aufgrund ihrer Hydrophilie wäre die Retentionszeit der reinen Katecholamine zu kurz und eine genaue Auftrennung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde dem Laufmittel Heptansulfonsäure (HSS) als Ionenpaarreagenz hinzugegeben, wodurch sich ungeladene Ionenpaare zwischen den Katecholaminen und der Ionenpaarreagenz bildeten. Erst diese Konjugate konnten Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen (Morier & Rips, 1982). Der abschließende Nachweis der Zielmoleküle erfolgte über einen elektrochemischen Detektor.

Der verwendete elektrochemische Detektor (Modell 5100A Coulochem II Multi-Electrode Electrochemical Detector mit einer High-sensitivity Analytical cell Modell 5011, ESA) bestand aus einer coulometrischen Arbeitselektrode und einer amperometrischen Messelektrode. Die Messpotentiale

der beiden Elektroden wurden von Berenbrink (1994) über ein hydrodynamisches Voltammogramm ermittelt. Die Arbeitselektrode, mit einem Messpotential von +50 mV, sorgte dafür, dass alle elektroaktiven Substanzen innerhalb des Laufmittels, mit Ausnahme der Katecholamine, oxidiert wurden. Die Messelektrode wurde mit +300 mV auf das maximale Oxidationspotential der Katecholamine eingestellt, wodurch diese vollständig oxidiert wurden. Der hierbei fließende Strom wurde verstärkt, digitalisiert und mit der *HSM D-7000 Chromatography Data Station Software* (Version 4.0, Merck-Hitachi) integriert.

Das HPLC-System bestand weiterhin aus einer Pumpe (L-6000 Pump, Merck-Hitachi), einem Pulsdämpfer (Modell 5563, SSI-ESA, ESA) zur Eliminierung auftretender Druckschwankungen sowie einer Vor- und Trennsäule. Die Vorsäule (LiChrospher 100 RP-18, 4 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße, Merck) schützte die mit einem Kieselgelderivat gepackte Trennsäule (Supelcosil LC-18-DB-Säule 150 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße, Supelco) vor Verunreinigungen. Die Retention der Katecholamine sowie des internen Standards wurde durch die oberflächengebundenen unpolaren Alkylgruppen des Kieselgels innerhalb der Trennsäule hervorgerufen.

Über ein Rheodyne-Injektionsventil (Modell 7125, Cotati) wurden jeweils 20 µl des Katecholamine-luats mittels einer 100 µl Hamiltonspritze (Microliter 710, VWR) auf die 20 µl fassende Probenschleife aufgetragen. Das verwendete Laufmittel bestand aus 50 mmol/l NaH₂PO₄, 2,23 mmol/l HSS, 0,25 mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 10 % (v/v) Methanol (mit H₃PO₄ auf pH 3.6 eingestellt und entgast, alles Sigma Aldrich). Alle durchgeführten Messungen erfolgten bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min und einem Druck zwischen 100 und 110 bar auf der Trennsäule.

2.6.2.3 HPLC Auswertung

Der aus der Oxidation der Katecholamine und des Standards resultierende Strom wurde von der *Chromatography Data Station Software* als Funktion der Stromstärke gegen die Zeit aufgezeichnet. Gleichzeitig erfolgte die Peakflächenintegration im aufgezeichneten Chromatogramm.

Mit Hilfe einer täglich durchgeführten Standardbestimmung (50 nmol/l und 500 nmol/l Adrenalin, Noradrenalin und DHBA sowie 1000 nmol/l DHBA) konnte die Wiederfindungsrate des internen Standards und gleichzeitig der prozentuale Katecholaminverlust bei der Probenextraktion berechnet werden. Um die tatsächlichen Plasmakatecholaminkonzentrationen zu bestimmen, wurden alle Proben auf eine Wiederfindung von 100 % hochgerechnet. Proben mit einer Wiederfindungsrate unter 60 % wurden erneut extrahiert und gemessen.

2.7 Individuen- und Artidentifizierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Mit Hilfe des molekularbiologischen Verfahrens des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP, engl. restriction fragment length polymorphism) wurde versucht einen Schnelltest zur Indivi-

duenunterscheidung beim Blauflossen-Thunfisch sowie zur Artunterscheidung innerhalb der Gattung *Thunnus* und einer verwandten Art zu entwickeln.

Die Technik des RFLP beruht auf der spezifischen, endonukleolytischen DNA-Spaltungsaktivität von Restriktionsenzymen (RE) (Nathans & Smith, 1975). Aus Sequenzunterschieden innerhalb einer RE-Erkennungsstelle – hervorgerufen durch Deletion, Addition oder Substitution eines oder mehrerer Nukleotide – resultieren Größenunterschiede der verdauten DNA-Fragmente. Dieser Längenpolymorphismus kann über verschiedene Gelelektrophoresetechniken sichtbar gemacht werden (Botstein *et al.*, 1980; Liu & Cordes, 2004).

Mit der RFLP Technik können sowohl Bereiche mit bekannter Genaktivität (molekulare Typ I Markierungen) als auch Abschnitte unbekannter Genaktivität und nicht codierende Bereiche (molekulare Typ II Markierungen) untersucht werden (O'Brien, 1991).

2.7.1 RFLP-Analyse zur Individuenidentifizierung von *Thunnus thynnus* in Gefangenschaft

Mittels RFLP-Analyse der mitochondrialen Kontrollregion wurde angestrebt den Haplotyp jedes einzelnen Broodstock-Individuums zu identifizieren. Diese auch d-loop genannte Region innerhalb der zirkulären mitochondrialen DNA (mtDNA) ist – mit Ausnahme der Promotoren des inneren und äußeren Strangs – hochvariabel und weist sowohl große inter- als auch intraspezifische Sequenzunterschiede auf (Saccone *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1995).

2.7.1.1 Primerdesign

Um die hochvariable d-loop-Sequenz via Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifizieren zu können, wurden Primerpaare (vgl. Tabelle 2.4) in konservierte Bereiche vor und hinter die 865 Basenpaar (bp) umfassende Kontrollregion gelegt (Manchado *et al.*, 2004). Hierzu dienten die Gensequenzen von Cytochrom b und tRNA-Pro (Vorwärtsprimer) sowie der 12S rRNA (Rückwärtsprimer). Die benötigten Sequenzen wurden über die Onlinedatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) unter den Informationsnummern DQ080266.1 - DQ080270.1, EF439242.1, EU036522.1, EU036523.1, EF141185.1, EF427611.1, EF427612.1, EF439243.1, EF439608.1, EF439609.1 (Cytochrome b) sowie AB106283.1 - AB106311.1, AB176805.1, DQ854647.1, AY507951.1, AY507952.1 (tRNA-Pro und 12S rRNA) bezogen und mit dem Programm *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Version 7.0.9.0, Hall, 1999) ausgerichtet.

Beim Primerdesign mit dem webbasierten Programm *GeneFischer 2.0* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefischer2/>, Giegerich *et al.*, 1996) wurde darauf geachtet, dass Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowohl im Bereich homologer DNA-Sequenzen aller Haplotypen, als auch außerhalb des d-loop-Bereiches lagen. Die ausgewählten Primer entsprachen den eingestellten Vorgaben von einer Primerlänge zwischen 18-20 bp, einem G:C-Gehalt zwischen 45-60 % und einer Schmelztemperatur (T_m) zwischen 50 und 60 °C. Die Synthese aller verwendeten Oligonukleotide (Synthesemaßstab 0,01 µmol, HPSF Reinigung) übernahm die Firma Eurofins MWG Operon.

Tabelle 2.4: Primersequenzen zur Amplifikation der mitochondrialen Kontrollregion von *T. thynnus*

Aufgelistet sind die Basensequenzen von Vorwärts- und Rückwärtsprimer (5' → 3'), die spezifische Annealingtemperatur sowie die erwartete Größe der PCR-Produkte.

<i>T. thynnus</i>	Primersequenzen d-loop		T _a [°C]	Größe [bp]
	Vorwärts	Rückwärts		
<i>T.t.d</i> -loop long (F,R)	5'-TCTCCCCTAACCTCCTAGGA-3'	5'-TGACAGTAAAGTCAGGACCA-3'	55	2003
<i>T.t.d</i> -loop short (F,R)	5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGGA-3'	5'-GTCCTTTGGGTTTCAAGCTA-3'	55	1003
<i>T.t.d</i> -loop short (F) long (R)	5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGGA-3'	5'-TGACAGTAAAGTCAGGACCA-3'	55	1496
<i>T.t.d</i> -loop long (F) short (R)	5'-TCTCCCCTAACCTCCTAGGA-3'	5'-GTCCTTTGGGTTTCAAGCTA-3'	55	1512

2.7.1.2 DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe des DNeasy Blood-and Tissue Kits (Qiagen) wurde die DNA von 20 adulten NBFT, die im Jahr 2009 für das SELFDOTT Work Package 4 getötet wurden, extrahiert. Die Extraktion von jeweils 25 mg Muskelgewebe erfolgte nach Herstellerangaben (Qiagen, DNeasy Blood & Tissue Handbook).

Mittels PCR-Technik wurden die zu analysierenden d-loop-Sequenzen amplifiziert (verwendete PCR-Geräte MyCycler und C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad). Die PCR-Ansätze beinhalteten bei einem Gesamtvolumen von 14,3 µl jeweils 1x Colorless GoTaq-Flexi Puffer (Promega), eine dNTP Konzentration von 0,175 mM pro Nukleotid (dNTP Mix, Fermentas), 2 mM MgCl₂ (Promega), 0,2 µM pro Primer, 0,25 Units Taq-Polymerase (GoTaq, Promega), 7,25 µl H₂O (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf) sowie 1,5 µl DNA-Extrakt (Template). Des Weiteren wurde bei jeder durchgeführten PCR eine Negativkontrolle (1,5 µl H₂O anstatt Template-DNA) durchgeführt. Aufgrund der großen Menge benötigten PCR-Produkts wurde das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze auf 42,9 µl verdreifacht.

Das verwendete PCR-Programm zur Amplifikation der 1-2 kb großen d-loop-Sequenzen ist in Tabelle 2.5 angegeben.

Tabelle 2.5: PCR-Programm zur d-loop Amplifikation

Angegeben sind die Zyklenanzahl mit jeweiliger Dauer und Temperatur sowie die Funktion jedes einzelnen PCR-Schritts.

Zyklenanzahl	Dauer	Temperatur	Funktion
1x	5 min	94 °C	einleitende Denaturierung
36x	45 s	94 °C	Denaturierung
	45 s	55 °C	Primerhybridisierung (annealing)
1x	60 s	72 °C	Elongation
	5 min	72 °C	finale Elongation
	∞	10 °C	

2.7.1.3 Restriktionsverdau

Vierzehn verschiedene Restriktionsenzyme (*BseGI*, *Bsh1236I*, *Eco32I*, *HinfI*, *TaqI*, *RsaI*, *SmoI*, *SspI*, *TaiI*, *MboII*, Fermentas; *BstNI*, *HpyAV*, *SpeI*, *XhoI*, New England Biolabs), die innerhalb virtueller Restriktionsverdaue von 122 NBFT d-loop-Sequenzen (NCBI-Informationsnummern AY699888.1-AY699946.1 und DQ087532.1-DQ087594.1) variable RFLP-Muster erzeugten, wurden mit Hilfe des webbasierten Programms *NEBcutter* (Version 2.0, <http://tools.neb.com/NEBcutter2>, New England Biolabs) ermittelt. Bei der Auswahl wurde darauf geachtet, dass die spezifischen Erkennungs- und

Schnittsequenzen der RE innerhalb der hochvariablen Bereiche des d-loops, sprich außerhalb der Promotoren, lagen. Zusätzlich wurden zwei Mehrfachverdauungen mit acht bzw. fünf RE ohne bekannte Erkennungssequenz innerhalb der d-loop-Region auf ihre Restriktionsaktivität überprüft. Der verwendete 8-RE-Mix bestand aus den Enzymen *HpaI*, *NcoI*, *NheI*, *PmeI*, *SacI*, *SacI*, *XbaI*, *XmaI*, der 5-RE-Mix aus den Enzymen *AscI*, *NotI*, *PstI*, *SallI*, *StyI* (New England Biolabs).

Die DNA-Konzentrationen aller PCR-Produkte wurden bestimmt (BioMate 3, Thermo Fisher) und mit H₂O auf eine Arbeitskonzentration von 10 µg/ml eingestellt. Die Restriktionsansätze sowie eine jeweilige Negativkontrolle (Gesamtvolumen ~18 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäßen) wurden für 2 h bei der jeweiligen Optimaltemperatur inkubiert (vgl. Tabelle 2.6). Zum Aufrechterhalten der maximalen Enzymaktivität und zur Stabilisierung der RE wurde den Restriktionsansätzen *BstNI*, *HpyAV*, *SpeI* und *XhoI* sowie dem 5- und 8-RE-Mix neben dem spezifischen Puffer auch eine BSA-Konzentration von 0,125 mg/ml zugegeben (Williams *et al.*, 1996).

Anhand dieser Angaben wurde das RFLP-Muster von 20 im Jahr 2009 getöteten Broodstock-Tieren auf individuelle Unterschiede untersucht.

Tabelle 2.6: Pipettierschema zur RFLP-Analyse der mitochondrialen Kontrollregion von *T. thynnus*

Angegeben sind die Zusammensetzungen sowie die optimalen Inkubationstemperaturen aller 16 Restriktionsansätze. Jeweils 10 µl PCR-Produkt (DNA-Konzentration 10 µg/ml) wurden mit einem Enzymüberschuss (2 U bzw. je 1 U pro Ansatz bei Mehrfachverdauen) verdaut.

	<i>BseG I</i>	<i>Bsh1236 I</i>	<i>BstN I</i>	<i>Eco32 I</i>	<i>Hinf I</i>	<i>HpyA V</i>	<i>Mbo II</i>	<i>8-RE-Mix</i>
H₂O	6 µl	6 µl	4 µl	6 µl	6 µl	4 µl	6 µl	3 µl
Puffer	2 µl (Tango)	2 µl (Red)	2 µl (NEB2)	2 µl (Red)	2 µl (Tango)	2 µl (NEB4)	2 µl (Blue)	2 µl (NEB4)
BSA (1 mg/ml)	/	/	2 µl	/	/	2 µl	/	2 µl
PCR-Produkt	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Enzym	2 U	2 U	2 U	2 U	2 U	2 U	2 U	je 1 U
Temperatur	55 °C	37 °C	60 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
	<i>Rsa I</i>	<i>Smo I</i>	<i>Spe I</i>	<i>Ssp I</i>	<i>Tai I</i>	<i>Taq I</i>	<i>Xho I</i>	<i>5-RE-Mix</i>
H₂O	6 µl	6 µl	4 µl	6 µl	6 µl	6 µl	4 µl	3,75 µl
Puffer	2 µl (Tango)	2 µl (Tango)	2 µl (NEB4)	2 µl (Green)	2 µl (Red)	2 µl (TaqI)	2 µl (NEB4)	2 µl (NEB3)
BSA (1 mg/ml)	/	/	2 µl	/	/	/	2 µl	2 µl
PCR-Produkt	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Enzym	2 U	2 U	2 U	2 U	2 U	2 U	2 U	je 1 U
Temperatur	37 °C	55 °C	37 °C	37 °C	65 °C	65 °C	37 °C	37 °C

2.7.1.4 Gelelektrophorese der PCR- und RFLP-Produkte

Die Auftrennung und Visualisierung der PCR- und RFLP-Produkte erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Hierzu wurden neben einem DNA-Größenstandard 3 µl PCR-Produkt oder 10 µl RFLP-Produkt mit 0,5 bzw. 2 µl 6x Loading Dye (Fermentas) versetzt und auf ein 2 %iges Agarosegel (Ultra-Pure Agarose, Invitrogen; in Tris-Acetat-EDTA-Puffer [TAE-Puffer: 40 mmol/l Tris-Base, 1 mmol/l EDTA, 40 mmol/l Essigsäure, pH 8.3]) aufgetragen. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurden der flüssigen Agaroselösung 5 µl SYBR-Safe Gel Stain (Invitrogen) pro 100 ml zugesetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für 30 min in 40 mmol/l TAE-Puffer (PowerPac 3000, Bio-Rad). Zur Auswertung wurden die Gele anschließend auf einer UV-Durchlichtplatte (Molecular Imager ChemiDoc, Bio-Rad) eingescannt.

2.7.2 RFLP-Analyse zur Speziesidentifizierung verschiedener Thunfischarten

Mittels RFLP-Analyse des mitochondrial codierten Gens Cytochrom-C-Oxidase (Subunit 1, *COXI*) wurde angestrebt, einen schnellen und zuverlässigen molekularbiologischen Test zur Speziesidentifizierung verschiedener Thunfischarten zu entwickeln.

Untersucht wurden 182 Muskel-, Flossen- und Eiprobe sechs verschiedener Arten (*Thunnus albacares* [19], *Thunnus alalunga* [12], *Thunnus thynnus* [117], *Thunnus maccoyii* [24], *Thunnus obesus* [5], *Katsuwonus pelamis* [5]) aus bis zu drei unterschiedlichen Regionen (vgl. Absatz 2.3).

2.7.2.1 Primerdesign

Zur universellen Amplifikation eines möglichst großen Bereichs des 1551 bp umfassenden *COXI*-Gens (Manchado *et al.*, 2004) innerhalb der Gattung *Thunnus* und beim Echten Bonito wurden alle vollständig sequenzierten *COXI*-Sequenzen (vgl. Tabelle 2. 7) nach konservierten Abschnitten untersucht.

Tabelle 2.7: NCBI-Informationsnummern der *COXI*-codierenden Sequenzen

Spezies	NCBI Nummer	Spezies	NCBI Nummer
<i>T.thynnus</i>	AB097669.1	<i>T.orientalis</i>	AB185022.1
	AY302574.2		GU256524.1
	GU256522.1		NC_008455.1
	NC_014052.1	<i>T.maccoyii</i>	GU256523.1
	NC_004901.2		NC_014101.1
<i>T.alalunga</i>	AB101291.1	<i>T.albacares</i>	GU256528.1
	GU256526.1		NC_014061.1
	NC_005317.1	<i>T.obesus</i>	GU256525.1
AB101290.1	NC_014059.1		
<i>K.pelamis</i>	GU256527.1	<i>T.tonggol</i>	GU799568.1
	NC_005316.1		

Durch Alignments (BioEdit) und anschließendem Primerdesign (GeneFisher 2.0) gelang es ein Primerpaar anzufertigen, welches homolog zu allen *Thunnus*-Sequenzen war (vgl. Tabelle 2.8). Das resultierende PCR-Produkt umfasste bei einer Größe von 1545 bp nahezu das gesamte *COXI*-Gen. Der Vorwärtsprimer *COXI(F)* lag überlappend auf den Gensequenzen für tRNA-Tyr und Cytochrom-C-Oxidase Subunit 1. Der Rückwärtsprimer *COXI(R)* befand sich am 3'-Ende des Cytochrom-C-Oxidase (Subunit 1)-Gens und wies beim Bonito (*K. pelamis*) drei Basenfehlpaarungen auf.

Tabelle 2.8: Primersequenzen zur Amplifikation des *COXI*-Gens

Die drei farbig hervorgehobenen Basen des Rückwärtsprimers kennzeichnen die Fehlpaarungen zwischen Primersequenz und der korrespondierender *COXI*-Gensequenz des Bonitos.

<i>Thunnus</i>	Primersequenzen <i>COXI</i>		T _a [°C]	Größe [bp]
	Vorwärts	Rückwärts		
<i>COXI (F,R)</i>	5'-GCCATCCTACCTGTGGCAA-3'	5'-AACGAATGCAGGCTCTTCGA-3'	57	1545

2.7.2.2 DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die DNA-Extraktion von Muskel- und Flossenproben (25 mg bzw. 30 mg) sowie die Zusammensetzung der PCR-Ansätze erfolgte analog zu den unter Absatz 2.7.1.2 beschriebenen Methoden. Das PCR-Programm (vgl. Tabelle 2.5) wurde lediglich durch eine Erhöhung der Annealingtemperatur auf 57 °C abgeändert.

2.7.2.3 Restriktionsverdau

Vier verschiedene RE (*BccI*, *MnlI*, *XcmI*, New England Biolabs; *BseGI*, Fermentas) wurden aufgrund ihrer Erkennungssequenzen im Bereich nicht homologer Basen für die RFLP-Analyse ausgewählt. Die Restriktion der Amplifikate erfolgte sowohl durch Einfachverdau mit jedem einzelnen RE, als auch durch Doppelverdau mit dem RE-Mix *MnlI/XcmI*. Die Inkubationszeit jedes Restriktionsansatzes betrug 2 h.

Tabelle 2.9: Pipettierschema zur RFLP-Analyse der COXI-Region

Restriktionsverdau der *COXI*-Gensequenz (PCR-Produktkonzentration: 10 µg/ml) mit einem Gesamtvolumen von ~8,5 µl. Ansätze mit den Enzymen *BccI* und *MnlI* sowie der Zweifachverdau *MnlI/XcmI* enthielten eine BSA-Konzentration von 0,1 mg/ml.

	<i>BseGI</i>	<i>BccI</i>	<i>MnlI</i>	<i>XcmI</i>	<i>MnlI/XcmI</i>
H₂O	2,5 µl	1,75 µl	1,75 µl	2,5 µl	1,75 µl
Puffer	1 µl (Tango)	1 µl (NEB1)	1 µl (NEB4)	1 µl (NEB2)	1 µl (NEB2)
BSA (1 mg/ml)	/	0,75 µl	0,75 µl	/	0,75 µl
PCR-Produkt	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Enzym	1 U	1 U	1 U	1 U	je 1 U
Temperatur	55 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C

2.7.2.4 Gelelektrophorese der PCR- und RFLP-Produkte

Die Auftrennung der *COXI*-PCR-Produkte sowie der *BccI*-, *XcmI*- und *BseGI*-RFLP-Produkte erfolgte analog der unter Absatz 2.7.1.4 beschriebenen Durchführung.

Die Restriktionsprodukte des Verdau mit dem RE *MnlI* sowie dem Zweifachverdau mit *MnlI/XcmI* wurden mittels hochauflösender, vertikaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Neben Fertiggelen (NuPAGE Novex Bis-Tris Mini-Gel 4-12 %, 10-17 Probenaschen, Invitrogen), die sofort mit Proben beladen werden konnten, wurden Gele in einem 270 x 350 mm großen Protean-3 cell system (Bio-Rad) gegossen. Die benötigten Volumina zur Herstellung von 8 %igen Polyacrylamidgelen mit

Formel 2.2: Acrylamid und Bisacrylamid Volumenberechnung

$$V_a = \frac{[T \cdot (100 - C) \cdot V_t]}{3000}; V_b = \frac{(T \cdot C \cdot V_t)}{200}$$

$V_t = \text{Gesamtvolumen (10 ml für 2 Gele)}$
 $T = \text{Gelkonzentration in \%}$
 $C = \text{Crosslink in \%}$
 $V_a = \text{Volumen Gellösung A (ml)}$
 $V_b = \text{Volumen Gellösung B (ml)}$

Tabelle 2.10: Pipettierschema zur Herstellung von zwei 8 %igen Polyacrylamidgelen

Reagenz	Volumen
Gellösung A	2,58 ml
Gellösung B	1,2 ml
0,5 mol/l Tris-HCl Puffer, pH 8.8	2,5 ml
add. 10 ml H ₂ O	3,56 ml
10 % APS (w/v)	100 µl
TEMED	10 µl

einem Crosslink von 3 % (Acrylamidlösung 30 % (v/v), Bisacrylamidlösung 3,5 % (v/v), Rotiphorese, Roth; Ammoniumperoxodisulfat [APS], Roth; Tetramethylethyldiamin [TEMED], Merck) wurden anhand der Formel 2.2 berechnet und gemäß Tabelle 2.10 zusammenpipettiert.

Jeweils 2 µl Restriktionsprodukt wurden mit dem gleichen Volumen 6x Loading Dye gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde 1 µl HyperLadder V (Bioline) verwendet, welcher zuvor in einem Verhältnis von 1:2 (v/v) mit 6x Loading Dye verdünnt wurde.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer befüllten vertikalen Gelkammern (XCell SureLock, Invitrogen oder Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) für eine Dauer von 45 min und bei einer Stromstärke von 200 V. Danach erfolgte die Visualisierung der DNA-Banden mittels Silberfärbung nach dem Protokoll von Mean *et al.* (2004). Hierbei wurde die DNA zunächst zweimalig für 3 min mit einer Fixierlösung (10 % Ethanol v/v, 0,5 % Essigsäure v/v) im Gel fixiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation in einer 0,1 %igen Silbernitratlösung mit zwei darauf folgenden Waschschritten in Millipore-Wasser, wodurch Silbernitratreste entfernt und eine starke Hintergrundfärbung vermieden wurden. Die Färbung der DNA-Fragmente wurde durch Zugabe von 1,5 %iger Natriumhydroxidlösung, versetzt mit 0,1 % Formaldehyd (v/v), eingeleitet. Die Gele verblieben so lange in der Inkubationslösung, bis ein hinreichender Farbkontrast erreicht war (ca. 30 min). Nach einem letzten Waschschriff mit Millipore-Wasser wurde die Gelfärbung mit einer weiteren Fixierlösung (0,75 % Natriumcarbonat) stabilisiert (alle Chemikalien Sigma Aldrich).

Gefärbte Gele wurden luftdicht in Druckverschlussbeuteln verpackt und eingescannt (Pixma MX850, Canon).

2.8 Elternschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels Mikrosatelliten-DNA-Analyse

Um die Elternschaft, den individuellen Fortpflanzungserfolg sowie die prozentuale Beteiligung jedes einzelnen Fisches am Ablanchprozess zu bestimmen, wurden acht verschiedene, hoch polymorphe Mikrosatelliten-Loci (*Tth-004*, *Tth-152*, *Tth-208*, *Tth-217*, *Tth-1-31*, *Tth-265*, *Tth-254*, *Tth-62*) des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches untersucht. Aufgrund ihrer kodominanten Vererbung nach den Mendelschen Regeln eignen sich Mikrosatelliten, neben ihrem Gebrauch bei Genomkartierungen, Populationsstudien und Kopplungsanalysen sowie für forensische Tests, besonders gut zur Durchführung von Abstammungsanalysen (Rubinsztein *et al.*, 1995; Liu & Cordes, 2004; Buschiazzo & Gemmell, 2006). Die acht verwendeten Primerpaare (vgl. Tabelle 2.11) wurden aus den 25 von Clark *et al.* (2004) charakterisierten Mikrosatelliten-Primerpaaren ausgewählt.

Die DNA-Extraktion der durch Biopsie gewonnenen Muskelproben erfolgte analog zu der unter Absatz 2.7.1.2 beschriebenen Methode. Die DNA einzelner Eier (\emptyset ~1 mm, 20 µg) wurde mit einem abgewandelten Chelex-100-Protokoll nach Walsh *et al.* (1991) und Perez *et al.* (2005) extrahiert. Hierzu wurde eine 10 %ige Chelex-100-Lösung (Chelex 100 sodium form, Sigma Aldrich) in Millipore-Wasser angesetzt, welche bei Gebrauch durch ständiges Schütteln homogen zu halten war. Die zu

analysierenden Eier wurden in Millipore-Wasser gewaschen und zusammen mit 50 µl Chelex-100-Lösung, 10 µl 5x Colorless GoTaq-Flexi Puffer und 10 µl Proteinase K (Qiagen) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden für 15 s gevortext, abzentrifugiert und für eine Stunde bei 55 °C und unter ständigem Schütteln (750 rpm) inkubiert. Bei einem weiteren Inkubationsschritt (20 min, 100 °C, 750 rpm) vollzog sich die Inaktivierung der Proteinase K und die Aktivierung des Chelex-100-Harzgranulats (Perez *et al.*, 2005). Polyvalente Metallionen, die bei der Zelllyse freigesetzt wurden und eine PCR-inhibierende Wirkung besitzen bzw. als Cofaktoren DNA-degradierender Proteine dienen, bildeten hierbei einen Chelatkomplex mit dem Chelex-Granulat und konnten so aus dem DNA-Extrakt entfernt werden (Phillips *et al.*, 2011). Abschließend wurden die Proben bei 14000 rpm abzentrifugiert und der klare Überstand als Template-DNA in die PCR eingesetzt. Mit Hilfe des abgewandelten Chelex-100-Protokolls konnten im Gegensatz zur Kit-Extraktion durchschnittlich 20-fach höhere DNA-Konzentrationen pro µl Extrakt gemessen werden (Beemelmans, 2010).

Tabelle 2.11: Primersequenzen zur Amplifikation von acht Mikrosatelliten-Loci bei *T. thynnus*

Aufgelistet sind das Repeat-Motiv, die Basensequenzen von Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die Annealingtemperatur, die von Clark *et al.* (2004) bestimmte Allelzahl (N_A) sowie der erwartete Größenbereich der PCR-Produkte jedes einzelnen Mikrosatelliten-Locus.

<i>T. thynnus</i>		Mikrosatelliten Primersequenzen		T_a [°C]	N_A	Größe [bp]
Locus	Motiv	Vorwärts	Rückwärts			
<i>Tth-004</i>	(GT) ₁₆	5'-GAAACGCAGCCGGAGAGGAAAGAG-3'	5'-AATGTGAGGGGGATGGGAGCTTGT-3'	60	22	198-244
<i>Tth-152</i>	(CT) ₁₀	5'-ATGCCGCTCTGATGAGGTTA-3'	5'-CTTGTTCTTCCCGACACTG-3'	60	3	171-179
<i>Tth-208</i>	(GA) ₁₈	5'-GAGAGGGAAAGCAAAGAAG-3'	5'-GTTGAGCTGCTGACACAGA-3'	60	22	148-204
<i>Tth-217</i>	(CA) ₁₈	5'-ACTTTCCTACCTGGTGATAT-3'	5'-GTTGTAACCACTAATGGTAAAC-3'	57	17	219-259
<i>Tth-1-31</i>	(AC) ₁₁	5'-ATGCACAAGTCATTTATCACCT-3'	5'-AGATGCATGGATTACATTCTACC-3'	60	13	96-136
<i>Tth-265</i>	(CA) ₁₇	5'-TCGGTGGGAGGGGAGACGC-3'	5'-CAGGTGGTGCAATTAATGGAAAA-3'	60	12	187-211
<i>Tth-254</i>	(AG) ₂₁	5'-TGGGAGACAGTGACATACGAG-3'	5'-CACACAAACAAAGGATTACT-3'	60	23	79-135
<i>Tth-62</i>	(GT) ₁₆	5'-GGTATATGTGTTGTAGGCGTGTG-3'	5'-TTTTCCAATGCGACTGATGA-3'	60	6	95-107

Die Vervielfältigung der acht Mikrosatelliten-Loci jedes einzelnen Fisches und Eis erfolgte mittels PCR. Alle Ansätze wurden nach dem unter Absatz 2.7.1.2 beschriebenen Schema zusammenpipettiert und mit Hilfe des in Tabelle 2.12 angegebenen PCR-Programms amplifiziert. Verunreinigungen mit Fremd-DNA wurden durch permanente Überprüfung von Negativkontrollen ausgeschlossen.

Tabelle 2.12: PCR-Programm zur Mikrosatelliten-Amplifikation

Angegeben sind die Zyklenanzahl mit jeweiliger Dauer und Temperatur sowie die Funktion jedes einzelnen PCR-Schritts. Die Annealingtemperatur variierte mit dem jeweiligen Temperaturoptimum der angewandten Primer.

Zyklenanzahl	Dauer	Temperatur	Funktion
1x	3 min	94 °C	einleitende Denaturierung
36x	30 s	94 °C	Denaturierung
	30 s	57 °C bzw. 60 °C	Primerhybridisierung (annealing)
1x	45 s	72 °C	Elongation
	10 min	72 °C	finale Elongation
	∞	10 °C	

Der Amplifikationserfolg jedes PCR-Ansatzes wurde durch Auftragen von 3 μl PCR-Produkt auf ein 2 %iges Agarosegel und Visualisierung mit SYBR-Safe Gel Stain überprüft. Im Fall einer unzureichenden oder ausgebliebenen Vervielfältigung der Mikrosatelliten wurde eine zweite PCR-Reaktion mit dem jeweiligen PCR-Produkt als Template-DNA durchgeführt.

Zur Bestimmung der exakten Allelgrößen der untersuchten Mikrosatelliten wurde das QIAxcel System (Qiagen) verwendet (Wang *et al.*, 2009). Das QIAxcel System basiert auf einer Multikapillargelelektrophorese mit integrierter Fluoreszenzdetektion der Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Fragmente (vgl. Abbildung 2.8). Über die ermittelten Migrationszeiten eines Größenstandards (10 ng/ μl , QX DNA Size Marker 25-450 bp) wurden die Fragmentgrößen der Proben berechnet.

Die elektrophoretische Probenauftrennung erfolgte mit dem QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen) sowie der vorinstallierten Methode OL700, die im Bereich zwischen 100 und 500 bp eine Auflösungsgenauigkeit von 3-5 bp gewährleistet. Bei dieser Methode wurden die DNA-Proben während einer 20-sekündigen Injektionszeit mit 8 kV in die Kapillaren aufgenommen und bei 3 kV für 700 s aufgetrennt. Neben der Proben-DNA wurde in jede der 12 Kapillaren automatisch ein Alignmentmarker injiziert (QX Alignment Marker 15 bp/500 bp, Qiagen), der den Analysebereich begrenzte und zur späteren einheitlichen Justierung der Elektrophoreseläufe diente.

Die anschließende Visualisierung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte über digitale Gelbilder und Elektropherogramme, die mittels *BioCalculator* Software (Version 3.2, Qiagen) erstellt wurden.

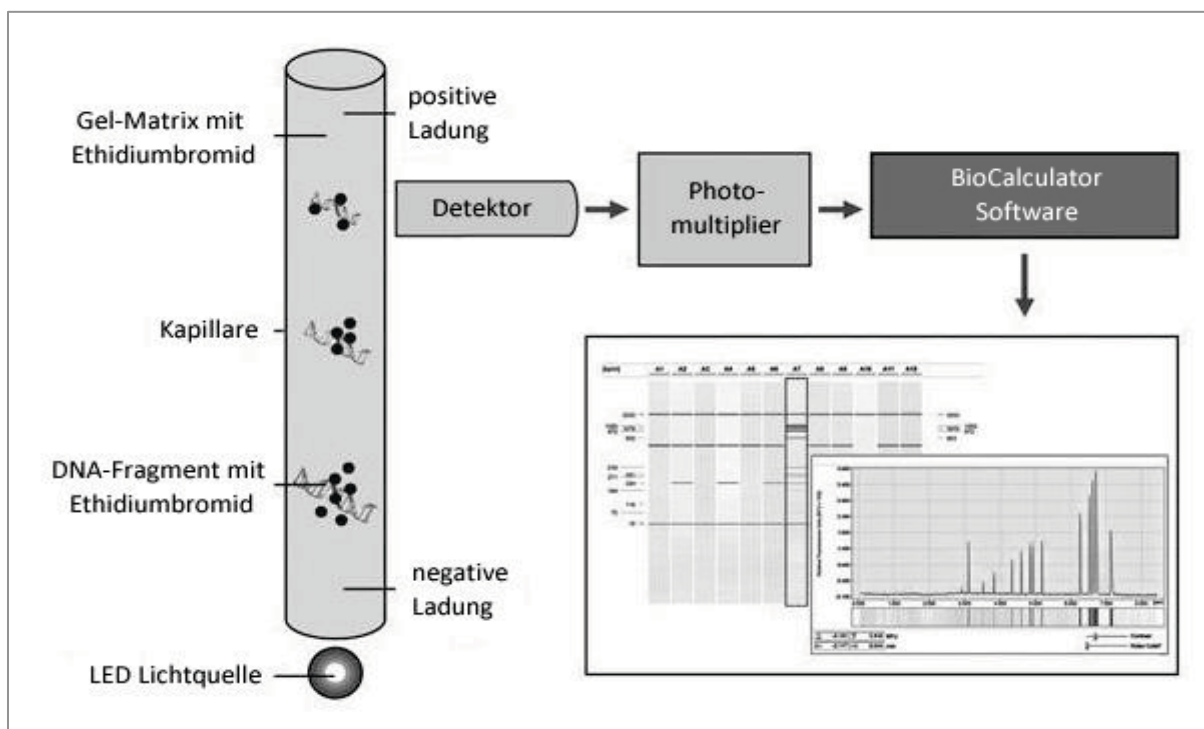


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Fragmentauftrennung und -detektion mittels QIAxcel System

Die Separation der injizierten Mikrosatelliten-DNA erfolgte in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe. Während der Migration zum Plus-Pol interkalierten Ethidiumbromid-Moleküle der Gel-Matrix in die DNA-Doppelstränge, wodurch diese vom Detektor erfasst wurden. Abschließend wurde das verstärkte Signal mittels *BioCalculator* Software als digitales Gelbild sowie als Elektropherogramm dargestellt (modifiziert nach QIAxcel DNA Handbook, Second Edition, Qiagen).

Die ermittelten Allellängen wurden in die Software *Colony2* (Version 2.0.1.1) exportiert und die Wahrscheinlichkeiten zur möglichen Elternschaft sowie der Verwandtschaftsgrad innerhalb der Nachkommenschaft über implementierte Likelihood-Funktionen berechnet (Wang, 2004; Wang & Santure, 2009; Jones & Wang, 2010).

Aufgrund einer fehlenden Geschlechtsbestimmung des maltesischen und italienischen Broodstocks wurde sowohl für die männlichen als auch für die weiblichen Tiere der gleiche Genotyp (Malta 19 Tiere, Italien 23 Tiere) angegeben. Da keinerlei Geschlechtinformationen in die Berechnungen einfließen, teilte die Software während der Analyse die Elterntiere lediglich in zwei Gruppen auf. In welcher dieser Gruppen die potentiellen Mütter bzw. Väter vereinigt wurden, ist ohne weitere Analysen nicht ersichtlich. Von einer signifikanten Reduktion der Berechnungswahrscheinlichkeiten durch das Fehlen der Geschlechtinformation ist bei ausreichenden genetischen Informationen (mindestens fünf Mikrosatelliten-Loci) nicht auszugehen (User's Guide to Colony, Version 2.0). Neben den eingegebenen Parental- und Filialgenotypen wurden die Berechnungsparameter gemäß Tabelle 2.13 eingestellt.

Tabelle 2.13: Programmeinstellungen der *Colony* Software

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Mating System I	Female Polygamy	Sibship Size Prior	Without Prior
	Male Polygamy	Marker Type	Codominant
Mating System II	Without Inbreeding	Error Rate	0.0000 - 0.0001
Species	Dioecious	Allele Frequency	Unknown
	Diploid	Prob of dad in male candidates	1
Length of Run	Medium	Prob of dad in female candidates	1
Analysis Method	Full-Likelihood	Known Paternal Sibs	0
Likelihood Precision	Medium	Known Maternal Sibs	0
Run Specifications	Update allele frequency	Excluded Paternity	0
	1 Number of cores/CPU's	Excluded Maternity	0
	1 Number of Run	Excluded Paternal Sibs	0
	1234 Random Number Seed	Excluded Maternal Sibs	0

Mittels oben beschriebener Mikrosatelliten-Analytik wurde die Eltern- und Verwandtschaft von 20 verstorbenen Jungfischen (3-6 cm, 10 Tiere mit sowie 10 Tiere ohne morphologische Anomalien) und 48 Eiern (jeweils 12 Eier für die Laichtage 16., 18., 19. und 20.07.2010) ausgehend von 23 genetisch erfassten italienischen Elterntieren bestimmt. Für den maltesischen Broodstock, von dem 19 Elterntiere genetisch untersucht werden konnten, wurde versucht die Verwandtschaft von 84 Eiern (jeweils 12 Eier für die Laichtage 20., 21., 25., 26., 28. und 30.06.2010 sowie 01.07.2010) zu analysieren.

Die grafische Darstellung der von *Colony* ermittelten Rohdaten zur Elternschaftsanalyse erfolgte mit dem Programm *Pedigree Viewer* (Version 6.4d, von Kinghorn & Kinghorn).

Weitere populationsgenetische Analysen, wie die Bestimmung der beobachteten (H_{obs}) und erwarteten (H_{exp}) Heterozygotie, die Verifizierung des Polymorphismus aller verwendeten Marker ($P_{(0,95)}$ -Wert) und eine Faktorielle-Korrespondenz-Analyse (FAC = Factor Analysis of Correspondence) wurden mit dem Programm *GENETIX* (Version 4.05, Belkhir *et al.*, 1996) durchgeführt.

Die beobachtete Heterozygotie (H_{obs}), mit der die genetische Variabilität einer Population erfasst und beschrieben werden kann, wurde für jeden untersuchten Locus mit folgender Formel berechnet:

$$H_{obs} = \frac{\text{Anzahl heterozygoter Individuen eines Locus}}{\text{Anzahl der untersuchten Individuen}}$$

Bei der erwarteten Heterozygotie (H_{exp}) handelt es sich um eine statistische Abschätzung des Anteils an Individuen, die heterozygot für einen bestimmten Locus sein sollten. Diese Erwartungswerte wurden anhand bekannter Allelfrequenzen einiger Individuen nach folgender Formel bestimmt:

$$H_{exp} = 1 - \sum_i^{Allele} f_i^2$$

Hierbei ist f als die Frequenz des i -ten Allels eines Markers definiert. Voraussetzung für die Berechnung der beobachteten und der erwarteten Heterozygotie war die Annahme, dass sich die Populationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befanden.

Zusätzlich wurde der $P_{(0,95)}$ -Wert bestimmt, der die Wahrscheinlichkeit angibt, dass ein untersuchter Locus als polymorph bewertet werden kann, falls das am zahlreichsten detektierte Allel eine Häufigkeit von 95 % nicht übersteigt (Beebee & Rowe, 2008).

Die Faktorielle-Korrespondenz-Analyse (FAC) stellt eine Möglichkeit dar, systematische Übereinstimmungen zwischen Individuen und deren Allelen in einem dreidimensionalen Raum abzubilden. Indem jedes Allel als eine unabhängige Variable betrachtet wurde, konnte analog zur Berechnung der physikalischen Trägheit (Inertia) eines Objekts, die Trägheit jedes Individuums zum Zentrum (gemittelter Schwerpunkt, Zentroid) in Prozent berechnet werden (Belkhir *et al.*, 1996; Papa, 2009). Hierdurch konnte jedes Individuum als Punkt einer Punktwolke mit einer definierten Distanz (Chi-Quadrat Distanz) zum jeweiligen Zentroid abgebildet werden. Ausschlaggebend für die Lokalisation jedes Tiers im dreidimensionalen Raum war der prozentuale Anteil aller Allele zur totalen Trägheit.

2.9 Mutterschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels mitochondrialer Kontrollregion

Zur Durchführung eines nachträglichen Mutterschaftstests, der via Mikrosatelliten-DNA überprüften italienischen Broodstock-Tiere, wurde die Vererbung der mitochondrialen Kontrollregion untersucht. Ausschlaggebend für das Erhalten einer weiblichen Geschlechtsinformation und dem daraus hervorgehenden Rückschluss auf die Mutterschaft ist der maternale Erbgang mitochondrialer DNA (Giles *et al.*, 1980; Liu & Cordes, 2004; Lo Presti *et al.*, 2009). Grund für diese Art der Vererbung ist die Ubiquitinierung und anschließende Lysierung paternaler Mitochondrien im Plasma der Oocyte (Sutovsky *et al.*, 1999). Da es sich bei der d-loop-Region um einen Bereich mit einem hohen Grad intraspezifischer Sequenzunterschiede handelt (vgl. Absatz 2.7.1) und die durchschnittliche Mutationsrate von 3,6 % pro Millionen Jahre die Wahrscheinlichkeit auf eine oder mehrere Mutationen in der ers-

ten Filialgeneration relativ gering hält, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Mütter und die jeweilige Nachkommenschaft die gleiche Basensequenz, folglich den gleichen Haplotyp, teilen (Donaldson & Wilson, 1999; Carlsson *et al.*, 2004).

Um die 865 bp umfassende d-loop-Sequenz vergleichen zu können, wurde ein neuer Vorwärtsprimer designet, der zusammen mit dem unter Absatz 2.7.1.1 beschriebenen Rückwärtsprimer „T.t. d-loop short (R)“ eine einseitig gerichtete aber dennoch vollständige Sequenzierung ermöglichte. Die Modellierung des passenden Primers erfolgte analog zu den Angaben unter Absatz 2.7.1.1.

Tabelle 2.14: Primersequenzen zur Amplifikation der vollständig sequenzierbaren d-loop-Region

<i>T. thynnus</i>	Primersequenzen d-loop Sequenzierung		T _a [°C]	Größe [bp]
	Vorwärts	Rückwärts		
<i>d-loop seq (F,R)</i>	5'-CTTCCACTTG CAGGCTGA-3'	5'-TGACAGTAAAGTCAGGACCA-3'	58	1115

Untersucht wurden zehn mittels *Colony* Software ermittelte Elterntiere (vgl. Absatz 3.8) sowie sechs zufällig gewählte Nachkommen (vier Larven, zwei Eier). Die verwendeten DNA-Extrakte wurden aus dem unter Absatz 2.8 beschriebenen Versuch übernommen.

Zusätzlich galt es die im Jahr 2011 in Malta erfolgte Reproduktion zu analysieren. Da keine Gewebeproben der Elterntiere vorlagen, wurden der generelle Abreicherfolg sowie die prozentuale Reproduktionsbeteiligung einzelner Mutterfische allein über die Sequenzanalyse der d-loop-Region von 60 Eiern der Laichtage 01.07. bis 06.07. (je n = 10) bewertet. Die DNA-Extraktion der Eier erfolgte nach dem unter Absatz 2.8 beschriebenen Chelex-100- Protokoll.

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Die zurechtgeschnittenen d-loop-Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des Programms *BioEdit Sequence Alignment Editor* verglichen.

2.10 Statistische Auswertung und grafische Darstellung

Die nachfolgenden grafischen Darstellungen der gewonnenen Ergebnisse erfolgten mit den Softwarepaketen *OriginPro* (8.5.0G SR1 b161, OriginLab Corporation), *Adobe Photoshop* (CS4, Version 11.0.1, Adobe Systems Inc.), *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Version 7.0.9.0, Hall, 1999), *Colony2* (Version 2.0.1.1, © Jianliang Wang, ZSL, 2008), *GENETIX* (Version 4.05, Belkhir *et al.*, 1996) und *Pedigree Viewer* (Version 6.4d, von Kinghorn & Kinghorn).

Statistische Datenüberprüfungen wurden mit dem Programm *SigmaStat* (Version 3.5, Build 3.5.0.54, Systat Software Inc.) vorgenommen. Grundsätzlich wurde versucht alle statistischen Analysen mittels parametrischer Prüfverfahren wie dem t-Test oder der Varianzanalyse (ANOVA) durchzuführen. Der t-Test überprüft die Nullhypothese, welche besagt, dass sich zwei Erwartungswerte auf dem festgelegten Signifikanzniveau nicht unterscheiden. Demnach wird von ausgebliebenen Behandlungseffekten gesprochen, wenn die Nullhypothese ($H_0: y_1 = y_2$) nicht verworfen werden kann, wobei y_1 und y_2 die Erwartungswerte der beiden Datenreihen bezeichnen. Andererseits kann ein signifikanter

Unterschied zwischen den Testgruppen angenommen werden, wenn die Nullhypothese verworfen wird. Im Gegensatz zum t-Test, mit dem die Erwartungswerte zweier Stichproben auf signifikante Unterschiede überprüft werden, dient die einfaktorielle ANOVA (engl. analysis of variance) dazu, die Erwartungswerte mehrerer unabhängiger Gruppen gleichzeitig anhand ihrer Varianzen zu analysieren. Die Nullhypothese ($H_0: y_1 = \dots = y_k$) unterstellt dabei, dass die Erwartungswerte (y_i) der untersuchten Probengruppen gleich sind. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn mindestens zwei Erwartungswerte ungleich sind ($H_A: y_i \neq y_k$) (Sachs & Hedderich, 2006).

Allerdings benötigen diese Tests die Voraussetzung, dass die Daten normalverteilt sind und zudem die gleiche Varianz aufweisen. In Fällen, bei denen diese Bedingungen nicht erfüllt waren, wurde auf nicht-parametrische Testverfahren zurückgegriffen. In einem solchen Fall wurden bei zwei Stichproben die Rangsummentests von Mann-Whitney (1947) und Wilcoxon (1945), bei mehr als zwei Stichproben der Rangsummentest von Kruskal-Wallis (1952) verwendet. Daneben wurde der medianprüfende Post-hoc-Test von Dunn (1961) angewandt. Für diese Tests ist die einzige Anforderung die Varianzhomogenität der Datenreihen (Sachs & Hedderich, 2006).

Aus oben genannten Gründen wurde das zu untersuchende Datenmaterial zunächst mit dem Kolmogorow-Smirnow-Lilliefors-Test auf Normalverteilung getestet (Lilliefors, 1967), bevor ein jeweils passendes Testverfahren ausgewählt und angewandt wurde. Das Signifikanzniveau α aller durchgeführten Tests wurde hierbei auf 5 % festgelegt.

Der statistische Vergleich zweier Regressionsgeraden (vgl. Abbildung 3.2.1) erfolgte anhand eines F-Tests nach folgender Formel (Glantz, 1998):

$$F = \frac{S^2_{x \times y \text{ verb}}}{S^2_{x \times y p}},$$

wobei

$S^2_{x \times y \text{ verb}}$ = die Differenz der Summe der Quadrate der Residuen um die Regressionsgerade; und $S^2_{x \times y p}$ = den gepoolten Schätzwert der Varianz um die beiden Regressionsgeraden, darstellt. Auch in diesem Test wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung gelungener Markierungs- und Biopsieversuche beim Atlantischen Blauflossen-Thunfisch

Zur Verifizierung der entwickelten ID-Tag-Implantations- und Biopsiemethodik sowie der verwendeten Apparatur (vgl. Absatz 2.2.2, 2.3 & Abbildung 2.2, 3.2) wurden die prozentualen Erfolgsquoten für eine gelungene Tag-Implantation, eine erfolgreiche Muskelbiopsie und ein gleichzeitiges Gelingen von Markierung und Probennahme berechnet.

Eine Fischmarkierung wurde als erfolgreich definiert, wenn der Tag unbeschädigt und bis zum Beginn des individuellen Farbcodes (Tiefe ca. 4 cm inklusive des 2,5 cm langen Reporters) implantiert war. Die Überprüfung und Bewertung jeder Markierung erfolgte unter Wasser und wurde entweder vom durchführenden Taucher oder eigenständig ausgeführt.



Abbildung 3.1: Thunfische mit farbigen Identifikationsmarkierungen

Die abgebildeten Atlantischen Blauflossen-Thunfische (Größe ca. 140 cm, Gewicht ca. 50 kg) wurden im März 2008 in einem Käfig vor Malta markiert. Neben den erfolgreich implantierten Farbmarkierungen (vorderer Fisch mit Farbcode: gelb-violett-weiß; 2,5 cm langer Reporter [Farbe: pink] nicht sichtbar) ist auch die Einstichstelle der Biopsienadel zu erkennen.

Die Effizienz der Markierung bzw. Biopsie wurde in vier Schritte unterteilt:

	Bezeichnung	Observation
1.	Misserfolg	fehlgeschlagene Markierung und Biopsie
2.	Minimalerfolg	gelungene Markierung aber fehlgeschlagene Biopsie
3.	Teilerfolg	Markierung und Biopsie gelungen (Biopsie ausreichend für DNA-Analysen, < 10 mg Muskelgewebe bzw. nur Schuppen oder Haut)
4.	Erfolg	Markierung und Biopsie gelungen (Biopsie ausreichend für DNA- und Proteinanalysen, ≥ 10 mg Muskelgewebe)

Ein gleichzeitiges Misslingen von Markierung und Biopsie wurde nur dann beobachtet, wenn der Einstichwinkel $\leq 45^\circ$ war. Das Fehlschlagen einer Markierung bei gleichzeitig gelungener Muskelbiopsie wurde nicht beobachtet.

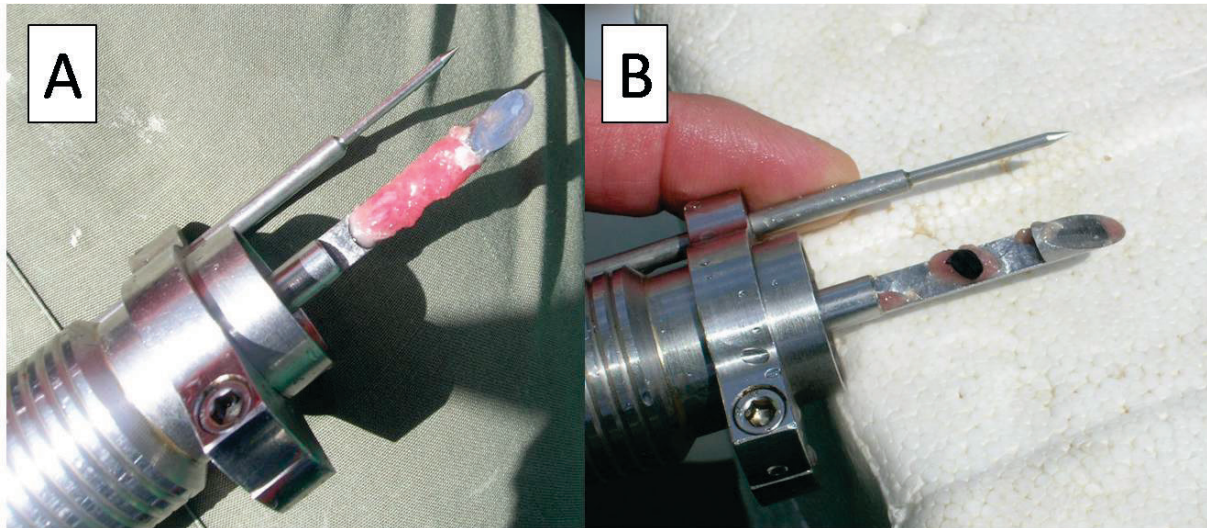


Abbildung 3.2: Muskelbiopsie aus freischwimmenden Atlantischen Blauflossen-Thunfischen

Zu sehen sind zwei erfolgreich entnommene Muskelproben nach gleichzeitiger Fischmarkierung (Malta, 2009). **A:** maximale Probe (ca. 3 g); **B:** durchschnittliche Probe (ca. 0,5 g). Neben der roten Muskelprobe ist jeweils auch ein durch Melanophoren dunkel gefärbtes Stück Dermis zu erkennen.

Ausgewertet wurden fünf Markierungs- bzw. Biopsievorgänge, durchgeführt im März 2008 (35 Tiere) und 2009 (zwei Käfige à 30 Tiere) sowie im Juli 2010 (25 Tiere) in Marsaxlokk, Malta, und im September 2010 (30 Tiere) in Vibo Valentia Marina, Italien. Die jeweilige Fischanzahl wurde von Tauchern geschätzt bzw. vom verantwortlichen Unternehmen angegeben und betrug in den fünf Versuchskäfigen insgesamt etwa 150 Tiere.

Während der fünf Markierungs- und Biopsieversuche wurden insgesamt 126 Käfigtiere behandelt. Beim Vergleich der Einzelversuche kann eine negative Korrelation ($r = -0,86$) zwischen der jeweiligen Tieranzahl im Käfig und den prozentual behandelten Fischen festgestellt werden. Dieses Verhältnis besagt, dass der prozentuale Anteil markierter und beprobter Individuen mit zunehmender Tieranzahl im Käfig geringer war.

Von den 126 behandelten Thunfischen konnten zu 85,7 % ($\pm 4,9$), wobei \pm in diesem und in allen nachfolgenden Fällen die berechnete Standardabweichung angibt, Gewebeproben entnommen werden, die mindestens für DNA-Untersuchungen ausreichend waren (≥ 10 mg). Zusätzlich konnte über die Jahre 2008 bis 2010 ein kontinuierlicher Anstieg der als Erfolg bewerteten Markierungs- und Biopsieversuche verzeichnet werden. So konnten im Jahre 2008 lediglich 55,2 % der Käfigtiere erfolgreich markiert und Gewebe entnommen werden. Im Folgejahr lag der Anteil der als Erfolg bewerteten Behandlungen bereits bei 60,4 %, welcher im Jahr 2010 mit 65,2 % (Malta) bzw. 65,4 % (Vibo) erneut gesteigert werden konnte.

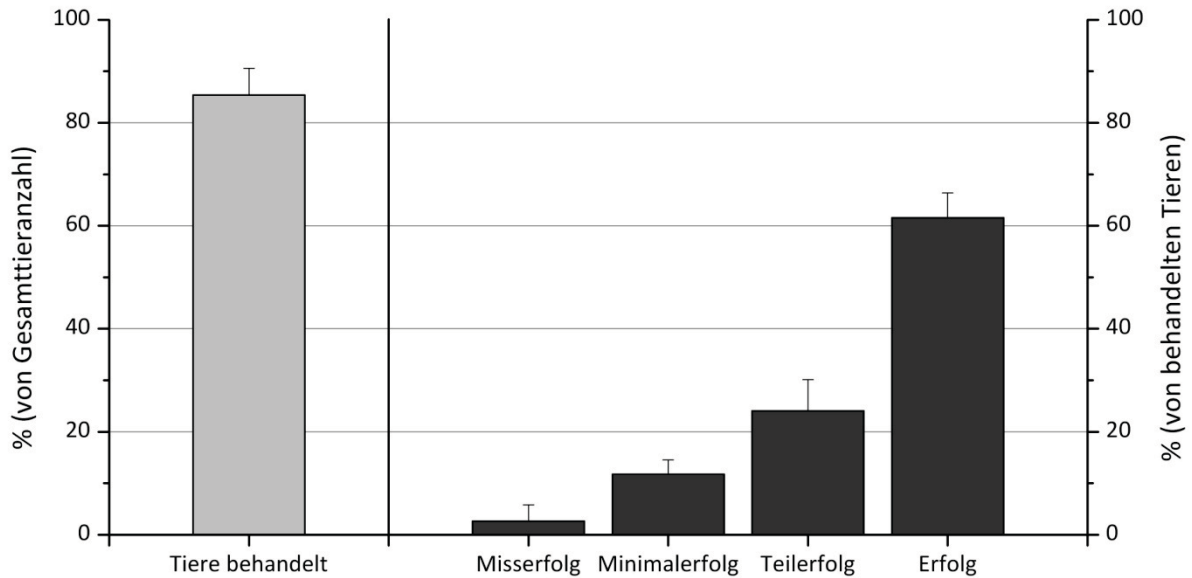


Abbildung 3.3: Prozentuale Auswertung der durchgeführten Markierungs- und Biopsieversuche

Linker Abbildungsbereich: Durchschnittlicher prozentualer Anteil behandelter Tiere, ausgehend von der jeweiligen Gesamtanzahl (\bar{x} : 85,4 %, \pm 5,2). Rechter Abbildungsbereich: Durchschnittliche prozentuale Erfolgsauswertung, ausgehend von den jeweils behandelten Käfigtieren. Im Mittel konnten 61,6 % (\pm 4,8) der Markierungs- und Biopsieversuche als Erfolg gewertet werden. Ein Teilerfolg war in 24,1 % (\pm 6,1) zu verzeichnen, eine gelungene Markierung bei gleichzeitigem Fehlschlagen der Biopsie in 11,8 % (\pm 2,8) der Fälle. Misserfolge bei Markierung und Biopsie traten nur zu 2,6 % (\pm 3,2) auf.

3.2 Physikalische Umweltparameter und Fischverhalten innerhalb der Netzkäfige

Die über mehrere Jahre an drei verschiedenen Orten gesammelten Temperatur-, Tiefen- und Lichtintensitätsdaten dienen dazu, die vom Thunfisch während der Laichzeit präferierten Umgebungsparemeter zu bestimmen und ausgehend davon ereignete oder ausgebliebene Reproduktionsvorgänge zu erklären. Weiterhin wurden die bezogenen Daten nach Regelmäßigkeiten untersucht, mit deren Hilfe es galt einen möglichen fortpflanzungsauslösenden Temperaturreiz zu bestimmen, um zukünftige Prognosen für den bestmöglichen Hormonimplantationszeitpunkt zu geben und die Standortgüte neuer Käfigpositionen zu beurteilen.

3.2.1 Stationäre HOB0-Datenlogger

Insgesamt 91 Datenlogger erhoben während der vier Projektjahre (2008 bis 2011) in 10, 15 oder 20 minütiger Taktung Temperatur- und Lichtintensitätsdaten in allen vier Himmelsrichtungen und zwei bis drei unterschiedlichen Tiefen. Um zunächst einen Gesamtüberblick über den Verlauf von Temperatur und Beleuchtungsstärke zu erhalten, wurde mit Projektstart in Malta damit begonnen, die Temperatur und Beleuchtungsstärke für die Dauer eines Jahres aufzuzeichnen. Ausgehend von dieser Messung (vgl. Abbildung 3.4) und der zwischen April und Juni stattfindenden Laichwanderung ins

Mittelmeer wurde der Auswertungs- bzw. Messzeitraum auf die Periode zwischen April und August beschränkt (Medina *et al.*, 2002). Weitere Ganzjahresmessungen wurden aufgrund des hohen Material- und Arbeitsaufwands nicht durchgeführt.

Die in Abbildung 3.4 deutlich sichtbaren Messunterschiede in der Beleuchtungsstärke können mit dem Auslese- bzw. Reinigungsrythmus der Datenlogger in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz zum etwa dreitägigen Rhythmus ab April 2009 lag die Zeit zwischen den Auslese- und Reinigungszeitpunkten im Jahr 2008 bei etwa einem Monat. Wie aus Abbildung 3.5A ersichtlich ist, nahm die detektierte Beleuchtungsstärke jedoch bereits wenige Tage nach der Reinigung des Lichtsensors deutlich ab. Da eine tägliche Reinigung und Ausrichtungsüberprüfung der Datenlogger an keinem der untersuchten Standorte möglich war, wurde die aufgezeichnete Beleuchtungsstärke bei weiteren Auswertungen vernachlässigt.

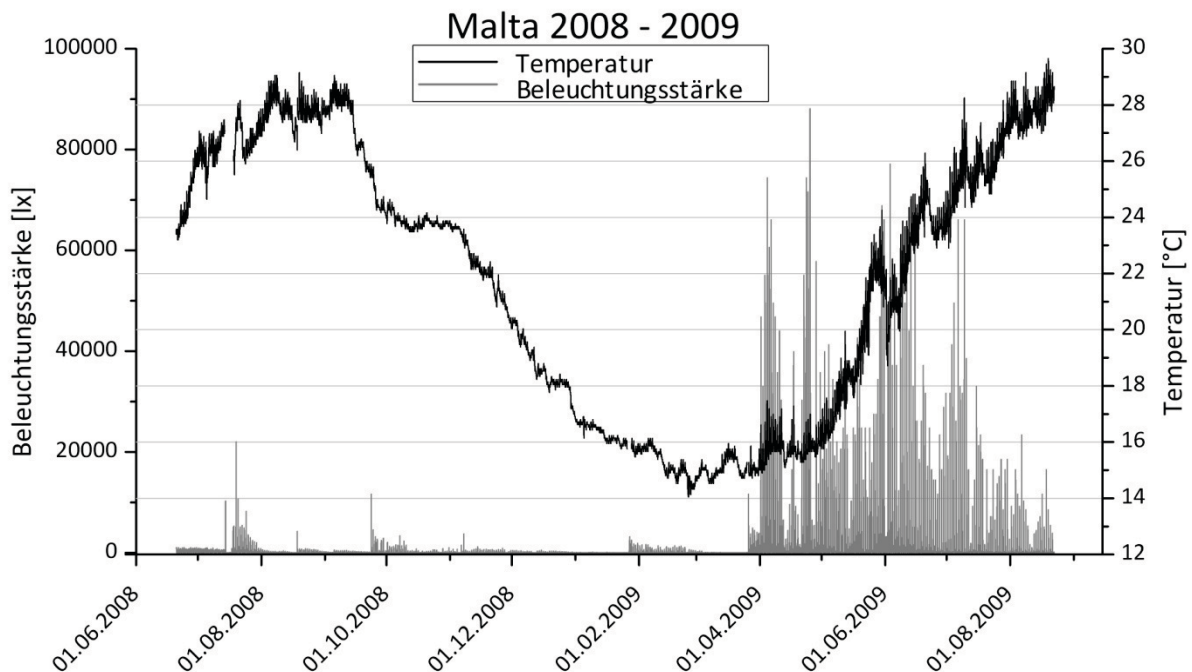


Abbildung 3.4: Jahresaufzeichnung von Temperatur und Beleuchtungsstärke in einem Netzkäfig

Die Abbildung zeigt den Jahresverlauf von Temperatur und Beleuchtungsstärke zwischen dem 20.06.2008 und dem 22.08.2009 in einem maltesischen Thunfischkäfig gemessen in einem Meter Tiefe. Die Maximaltemperaturen konnten mit bis zu 29,5 °C im August, die Minimaltemperaturen mit 14 °C im Februar gemessen werden. Die Aufzeichnung der Beleuchtungsstärke zeigt, im Gegensatz zum parabolischen Verlauf der Temperaturmessung, eine deutliche Heterogenität zwischen den ersten neun und den letzten fünf Messmonaten.

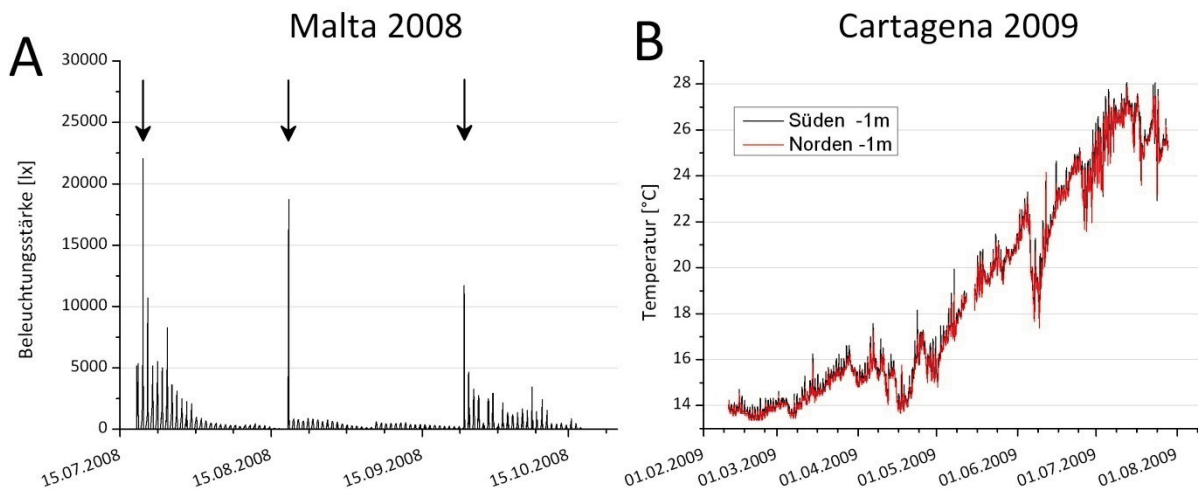


Abbildung 3.5: (A) Zeitabhängige Abnahme der Beleuchtungsstärke

Während der dargestellten dreimonatigen Messung ist jeweils eine schnelle und deutliche Reduktion der detektierten Beleuchtungsstärke nach einer Reinigung des Datenloggers zu erkennen. Reinigungs- und Auslesezeitpunkte sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

(B) Himmelsrichtungsbezogener Temperaturvergleich

Abgebildet sind die Temperaturaufzeichnungen des südlichen und nördlichen Datenloggers, angebracht in einem Meter Tiefe (Cartagena, 2009). Mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon (1945) und Mann & Whitney (1947) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Tagesmittelwerten festgestellt werden ($p = 0,5$).

Für die folgende Temperatúrauswertung wurde zunächst mittels t-Test überprüft, ob signifikante Temperaturunterschiede zwischen Datenloggern, angebracht in gleicher Tiefe aber unterschiedlicher Himmelsrichtung, sowie zwischen Datenloggern in gleicher Himmelsrichtung aber unterschiedlicher Tiefe, messbar waren. An keinem Standort bzw. Käfig konnte ein statistischer Unterschied zwischen den Tagesmittelwerten einer Messtiefe festgestellt werden (als Beispiel vgl. Abbildung 3.5B). Signifikanztests zwischen Temperaturaufzeichnungen unterschiedlicher Tiefen zeigen uneinheitliche Ergebnisse (vgl. Tab. 3.1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für nachfolgende Auswertungen ausschließlich die gemittelten Temperaturaufzeichnungen der südlichen Datenlogger verwendet.

Tabelle 3.1: Signifikanztests zwischen Datenloggern unterschiedlicher Tiefen

Aufgelistet sind die Ergebnisse der durchgeführten Rangsummentests zwischen den Temperaturaufzeichnungen verschiedener Wassertiefen der Jahre 2009 bis 2011 für die Standorte Malta und Cartagens sowie der Jahre 2009 und 2010 des italienischen Käfigs. Über die Versuchsjahre konnten neun signifikante und neun nicht signifikante Temperaturunterschiede zwischen den verschiedenen Messtiefen eines Käfigs festgestellt werden.

Malta 2009	Signifikanz	Malta 2010	Signifikanz	Malta 2011	Signifikanz
-1m zu -10m	nein ($p = 0,051$)	-1m zu -10m	ja ($p = 0,048$)	-1m zu -10m	nein ($p = 0,343$)
Vibo 2009	Signifikanz	Vibo 2010	Signifikanz		
-1m zu -8m	ja ($p = 0,01$)	-1m zu -8m	ja ($p < 0,001$)		
-1m zu -16m	ja ($p < 0,001$)	-1m zu -16m	ja ($p < 0,001$)		
-8m zu -16m	nein ($p = 0,06$)	-8m zu -16m	ja ($p < 0,001$)		
Cartagena 2009	Signifikanz	Cartagena 2010	Signifikanz	Cartagena 2011	Signifikanz
-1m zu -8m	nein ($p = 0,291$)	-1m zu -8m	nein ($p = 0,573$)	-1m zu -8m	nein ($p = 0,474$)
-1m zu -16m	ja ($p = 0,01$)	-1m zu -16m	nein ($p = 0,083$)	-1m zu -16m	ja ($p = 0,002$)
-8m zu -16m	nein ($p = 0,069$)	-8m zu -16m	nein ($p = 0,271$)	-8m zu -16m	ja ($p = 0,005$)

Um ausgebliebene Abblanchvorgänge bzw. eine geringfügige Eianzahl (Malta 2009 bis 2011, vgl. Tabelle 3.2) gegebenenfalls über die Temperatur erklären und um die präferierte Laichtemperatur der mediterranen NBFT-Population bestimmen zu können, wurden neben dem Temperaturüberblick (April bis August = Langzeitmessung), die durchschnittliche Temperatur während des Abblanchens sowie die Temperaturentwicklung zwei Wochen vor der Hormoninduktion (Kurzzeitmessung) untersucht und verglichen. Die nachfolgend als Laichzeit definierten Perioden beschreiben jeweils den Zeitraum, in dem täglich mehr als 10000 Eier pro Versuchskäfig vorgefunden werden konnten.

Um die folgenden Temperaturdiagramme (vgl. Abbildungen 3.6 bis 3.8) in Kontext mit dem jeweiligen Hormoninduktionszeitpunkt, der Laichperiodendauer und der vorgefundenen Eianzahl setzen zu können, ist in Tabelle 3.2 ein Überblick über die Beobachtungen und durchgeführten Maßnahmen in allen Versuchskäfigen gegeben.

Tabelle 3.2: Übersicht über beobachtete bzw. durchgeführte Vorgänge innerhalb der Messzeiträume

Aufgelistet sind die Zeitspannen beobachteter Laichperioden, die Zeitpunkte der Hormoninduktion und die Anzahl vorgefundener Eier. Es ist zu erkennen, dass der mit Abstand geringste Reproduktionserfolg am maltesischen Standort erzielt wurde. In den Jahren 2010 und 2011 konnte in Cartagena ein spontanes Abblanchen der Broodstock-Tiere – ohne Hormongabe – beobachtet werden.

Standort	Laichzeit	Hormoninduktion	Eianzahl
Malta 2009	nicht beobachtet	27.06. + 03.07.	0
Malta 2010	20.06. - 07.07.	05.06. + 25.06.	350 Tsd.
Malta 2011	01.07. - 08.07.	14.06.	780 Tsd.
Vibo 2009	30.06. - 10.07.	27.06. + 02.07.	37 Mio.
Vibo 2010	16. - 19.06. + 08. - 22.07.	13.06. + 06.07.	110 Mio.
Cartagena 2009	29.06. - 15.07.	26.06.	140 Mio.
Cartagena 2010	20.06. - 16.07.	nicht durchgeführt	50 Mio.
Cartagena 2011	11.06. - 11.07.	nicht durchgeführt	170 Mio.

2009

Anhand der drei folgend dargestellten Langzeitmessungen des Jahres 2009 (vgl. Abbildungen 3.6A, C & E) ist ersichtlich, dass sowohl in Malta, Vibo und Cartagena nach einem mehr oder weniger ausgeprägten Temperaturplateau im ersten Aufzeichnungsmonat zwischen 15 und 16 °C eine kontinuierliche Erwärmung des dreidimensionalen Wasserkörpers stattfand. Ab Anfang Mai bildete sich vor allem in Malta und Vibo eine vertikale Temperaturdifferenz innerhalb der Käfige aus, welche anhand der divergierenden spezifischen Kurvenverläufe ersichtlich wird. Im Vergleich dazu verlief die Erwärmung der Wasserschichten in Cartagena bis Ende Juni nahezu homogen. Zusätzlich ist in Abbildung 3.6E zu Anfang des Monats Juni ein starker Temperaturabfall von bis zu 4 °C erkennbar, welcher als Folge eines starken Sturms und der damit einhergehenden Durchmischung mit kaltem Tiefenwasser anzusehen ist.

In den gleichfalls dargestellten Kurzzeitmessungen sind neben der gegebenenfalls registrierten Laichperiode auch die Zeitpunkte der Hormoninduktionen sowie der 14-tägige Temperaturanstieg im Vorfeld der Hormoninduktion angegeben (vgl. Abbildungen 3.6B, D & F). Vor allem die Aufzeichnungen der Standorte Malta und Vibo sind aufgrund identischer Hormonimplantationszeitpunkte und

der analogen Temperaturverläufe vergleichbar. Jedoch konnte am italienischen Standort im Gegensatz zum maltesischen eine erfolgreiche Reproduktion der Versuchstiere drei Tage nach der Hormonbehandlung nachgewiesen werden. Auch der spanische Broodstock konnte durch die Hormoninduktion erfolgreich für 17 Tage zum Ablachen gebracht werden.

Eine umfassende tabellarische Auflistung der Messwerte ist in Tabelle 8.7 im Anhang zu finden.

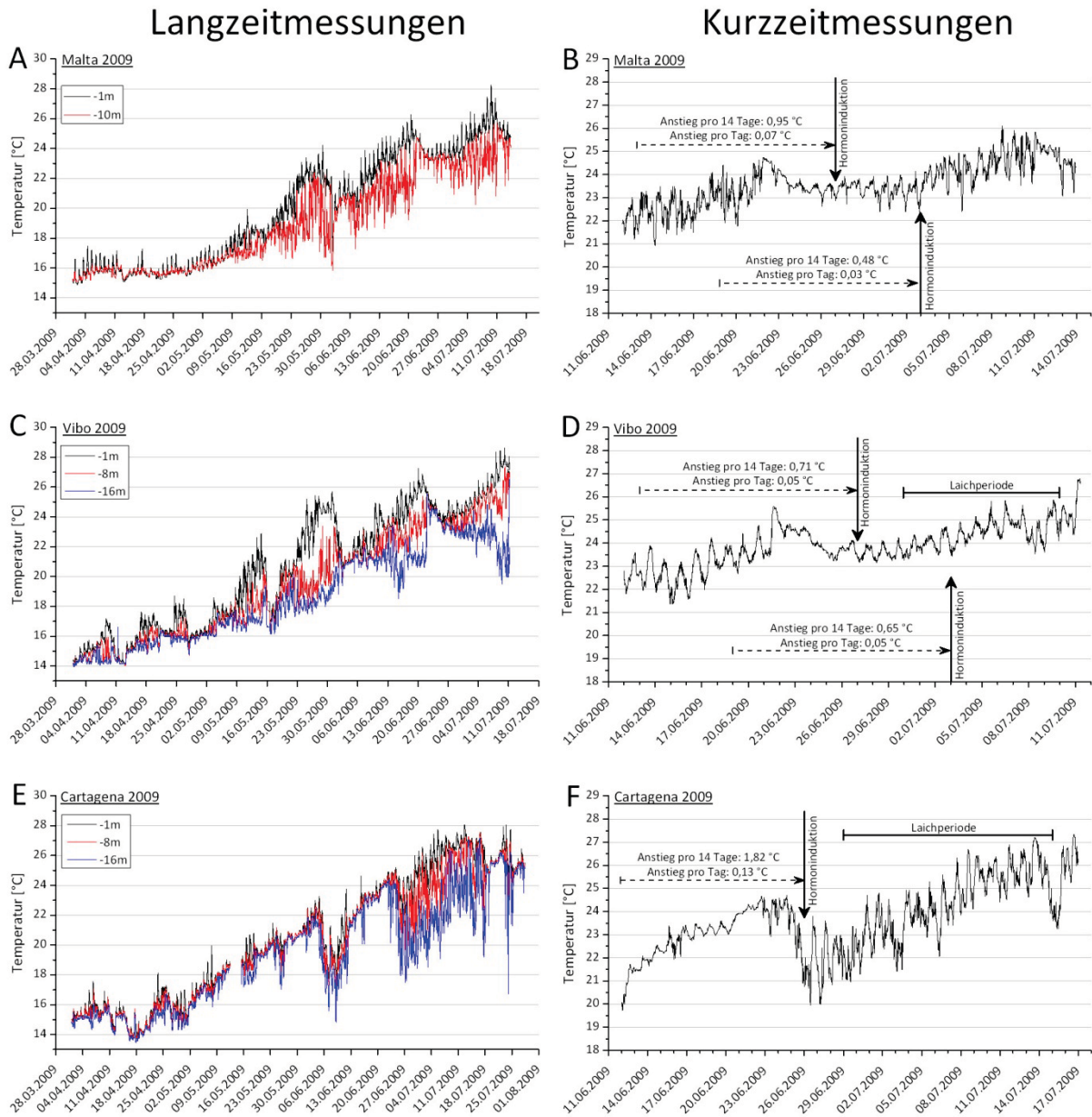


Abbildung 3.6: Temperaturaufzeichnungen der stationären Käfigdatenlogger (2009)

Abgebildet ist neben den kontinuierlichen Temperaturaufzeichnungen der drei Käfigstandorte Malta (A), Vibo (C) und Cartagena (E) der jeweils zugehörige durchschnittliche Temperaturverlauf vor und während der Laichzeit (B, D & F). Die Zeitpunkte der Hormoninduktion sind jeweils mit einem vertikalen Pfeil, die Laichperiode mit einem horizontalen Balken und der zweiwöchige Berechnungszeitraum des Temperaturanstiegs mit einem unterbrochenen, horizontalen Pfeil gekennzeichnet.

2010

Auch im Jahr 2010 wurden die Temperaturentwicklungen in der vertikalen Wassersäule mittels HO-BO-Datenlogger aufgezeichnet und in den Abbildungen 3.7A-F sowohl als Langzeit- und Kurzzeitmessungen dargestellt.

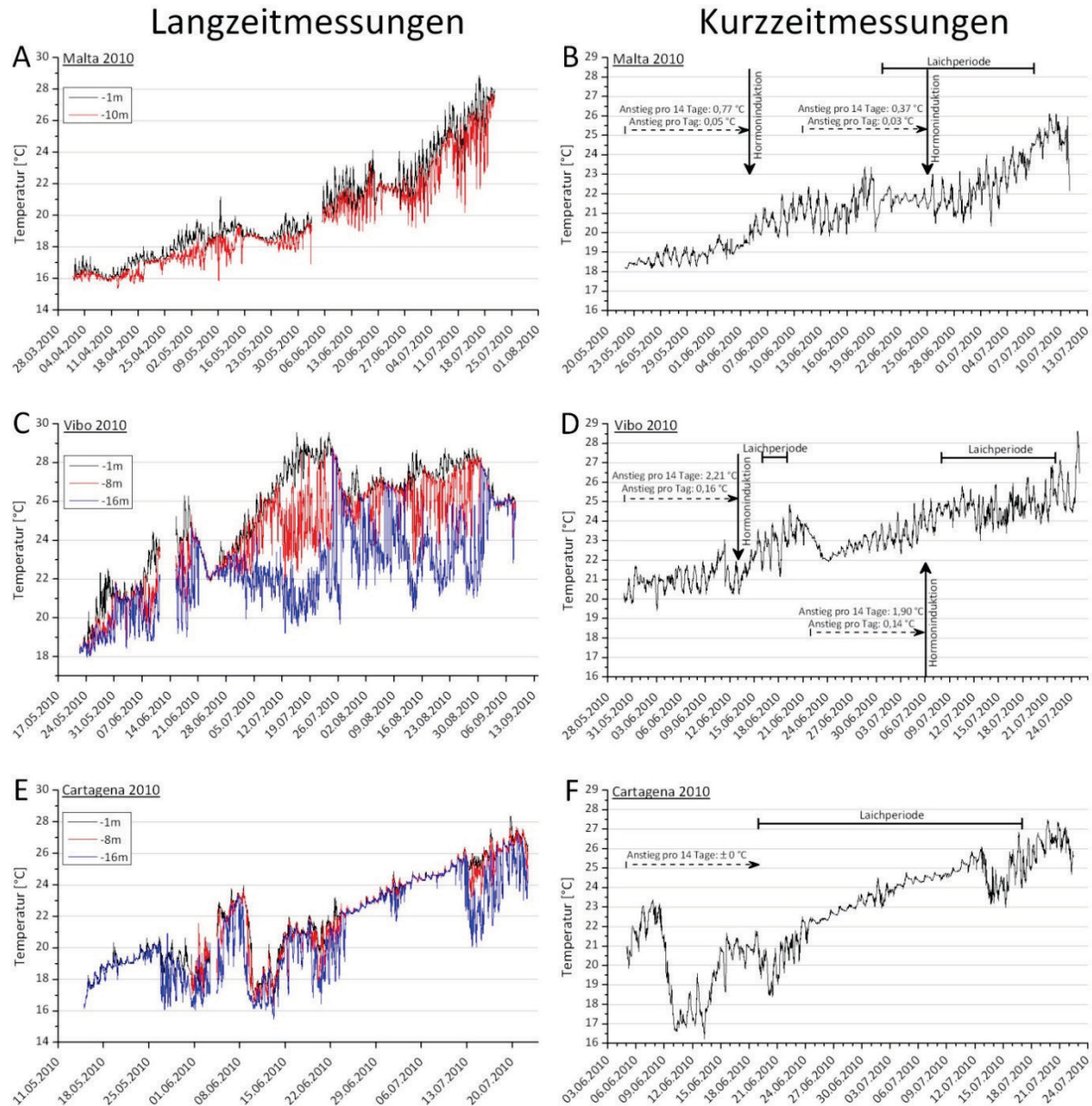


Abbildung 3.7: Temperaturentwicklungen der stationären Käfigdatenlogger (2010)

Abgebildet ist neben den kontinuierlichen Temperaturentwicklungen der drei Käfigstandorte Malta (A), Vibo (C) und Cartagena (E) der jeweils zugehörige durchschnittliche Temperaturverlauf vor und während der Laichzeit (B, D & F). Die Zeitpunkte der Hormoninduktion sind jeweils mit einem vertikalen Pfeil, die Laichperiode mit einem horizontalen Balken und der zweiwöchige Berechnungszeitraum des Temperaturanstiegs mit einem unterbrochenen, horizontalen Pfeil gekennzeichnet.

Im Vergleich zum Vorjahr konnte am Standort Malta des Jahres 2010 zwar bereits ab Mitte April ein sukzessiver Temperaturanstieg festgestellt werden, jedoch verlaufen beide skizzierten Temperaturkurven deutlich flacher, weshalb die Oberflächenwassertemperatur etwa drei Wochen später die

20 °C-Marke dauerhaft überschritt. Die Kurvenverläufe der Abbildung 3.7C verdeutlichen ein evident vertikales Temperaturgefälle, welches sich zahlenmäßig in den berechneten signifikanten tiefenspezifischen Temperaturunterschieden ($p < 0,001$) ausdrücken lässt (vgl. Tabelle 3.1). Im Gegensatz dazu steht die Langzeittemperaturmessung des Standorts Cartagena, wo im Jahr 2010 eine insgesamt sehr homogene Temperaturentwicklung aufgezeichnet werden konnte. Diese ist ausschlaggebend für die nicht zu verwerfenden Nullhypothesen in den durchgeführten Signifikanztests (vgl. Tabelle 3.1, $p = 0,083$ bis $0,573$).

Neben der zuvor beschriebenen langsameren Temperaturentwicklung am Standort Malta kann auch anhand der abgebildeten Kurzzeitmessungen eine im Vergleich zu den anderen Messstationen geringere datumsspezifische und laichzeitumfassende Durchschnittstemperatur abgelesen werden. Zusätzlich wurde die erste Hormoninduktion des maltesischen Broodstocks bei einer etwa 2 °C geringeren Wassertemperatur durchgeführt als beim italienischen. Dennoch konnte mit ca. 350000 abgefischten Eiern erstmalig eine Reproduktion von in Gefangenschaft lebenden NBFT in Malta nachgewiesen werden. Die Laichzeit am Standort Vibo ist in zwei Reproduktionsabschnitte zu unterteilen, welche drei bzw. zwei Tage nach jeweiliger Hormonbehandlung induziert wurden. Die zwischenzeitliche Einstellung der Fortpflanzung ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein Erdbeben der Stärke 3,7 (Richterskala) zurückzuführen, dass am 19.07.2010 den Käfigstandort erschütterte. Im Gegensatz zu den Standorten Malta und Vibo wurde in Cartagena eine spontane, nicht hormoninduzierte Reproduktion über einen Zeitraum von 29 Tagen beobachtet.

Eine umfassende tabellarische Auflistung der Messwerte ist in Tabelle 8.7 im Anhang zu finden.

2011

Hinsichtlich des beendeten ALLOTUNA Projekts wurden im Jahr 2011 nur die Standorte Malta und Cartagena mit HOBO-Datenlogger ausgestattet. Im Vergleich der beiden Langzeitmessungen konnte in Malta eine deutlich konstantere, homogenere und stärkere Wassererwärmung aufgezeichnet werden. Zusätzlich wurde in Malta ab April eine durchschnittlich 0,5 °C höhere Temperatur im Kontrast zum Vorjahr gemessen.

Mit einem 14-tägigen Temperaturanstieg von 1,33 °C vor der Hormoninduktion konnte im Gegensatz zum 0,4 °C betragenden Anstieg vor der spanischen Laichzeit eine deutlich stärkere Wassererwärmung in Malta gemessen werden. Jedoch ging diese rapide Erwärmung nicht mit einer beginnenden Reproduktionsphase einher, die erst 18 Tage nach der Hormonbehandlung nachgewiesen werden konnte. In Spanien konnte mit etwa 170 Millionen abgefischten Eiern das quantitativ erfolgreichste Reproduktionsjahr konstatiert werden (vgl. Tabelle 3.2).

Eine umfassende tabellarische Auflistung der Messwerte ist in Tabelle 8.7 im Anhang zu finden.

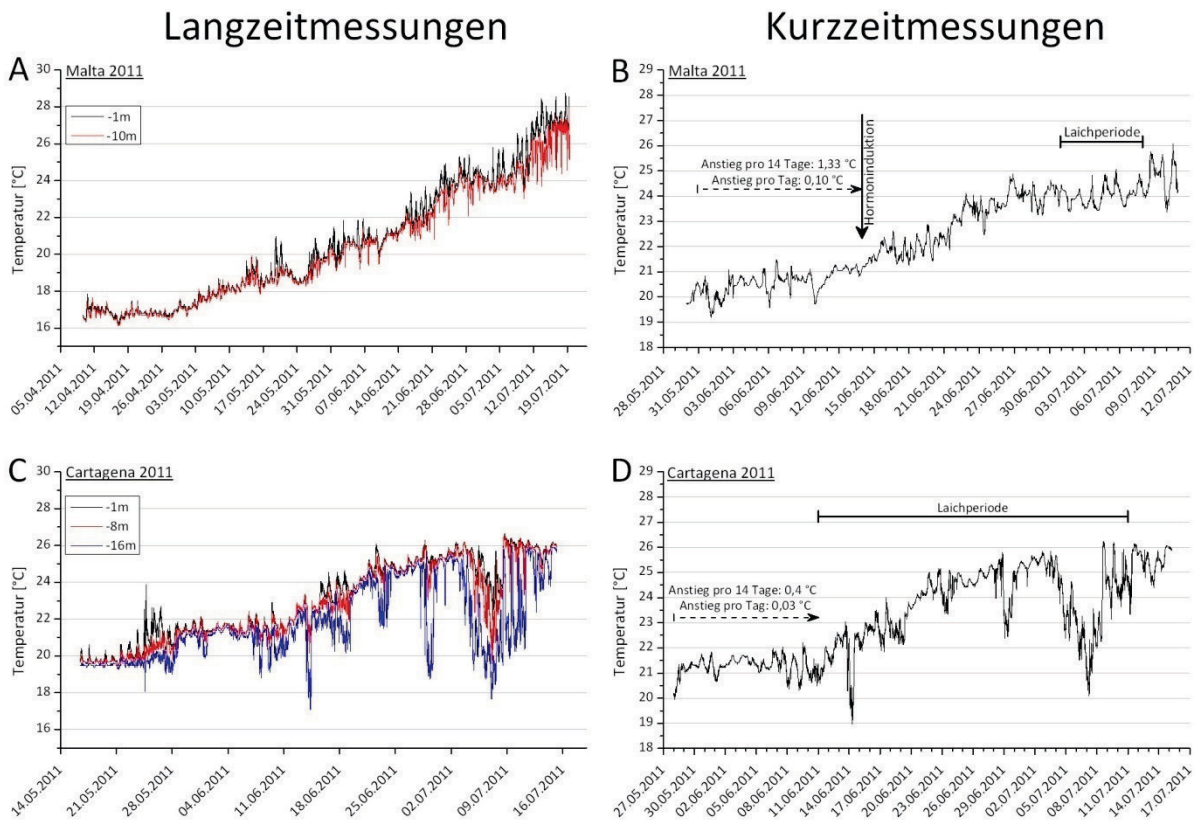


Abbildung 3.8: Temperaturaufzeichnungen der stationären Käfigdatenlogger (2011)

Abgebildet ist neben den kontinuierlichen Temperaturaufzeichnungen der beiden Käfigstandorte Malta (A) und Cartagena (C) der jeweils zugehörige durchschnittliche Temperaturverlauf vor und während der Laichzeit (B & D). Der Zeitpunkt der Hormoninduktion (Malta) ist mit einem vertikalen Pfeil, die Laichperioden mit horizontalen Balken und die zweiwöchigen Berechnungszeiträume des Temperaturanstiegs mit unterbrochenen, horizontalen Pfeilen gekennzeichnet.

Gegenüberstellung der Temperaturaufzeichnungen

Anhand der oben dargestellten acht Messreihen und deren Auswertung ist ersichtlich, dass der durchschnittliche Temperaturanstieg mit der Anbringungstiefe der Datenlogger korrelierte. Es kann festgehalten werden, dass ein geringerer Temperaturanstieg mit einer zunehmenden Käfigtiefe einherging.

Die berechneten Temperaturanstiege vor der Hormoninduktion bzw. vor dem Ablachen zeigen keinen eindeutigen Trend, der mit der Qualität des jeweiligen Reproduktionsvorgangs einhergeht. Jedoch muss beachtet werden, dass sich die kalkulierbare Temperaturerhöhung durch Vergrößerung oder Verkürzung des Betrachtungszeitraums zum Teil beträchtlich verändern kann.

An den Standorten Cartagena und Vibo lässt sich über die drei bzw. zwei Versuchsjahre ein Trend zu einer mehrwöchigen Laichzeitverschiebung erkennen. Befand sich die Reproduktionsphase im Jahr 2009 noch am Ende des Monats Juni (Vibo ab dem 30.06., Cartagena ab dem 29.06.), so konnten im Folgejahr bereits ab dem 16.06. (Vibo) bzw. 20.06. (Cartagena) Eier abgefischt werden. Im letzten Jahr des SELFDOTT-Projekts verfrühte sich die Laichzeit in Cartagena etwa um eine weitere Woche auf den 11.06.2011. Beim maltesischen Broodstock, der im Gegensatz zu den anderen Standorten jährlich ausgewechselt wurde, konnte dieses Verhalten nicht beobachtet werden.

Eine weitere Feststellung lässt sich aus der Verknüpfung der aufgezeichneten Temperatur, dem durchschnittlichen Temperaturanstieg, dem Hormoninduktionszeitpunkt und dem Auftreten einer Reproduktion sowie der Dauer der Laichperiode ableiten. Beim Vergleich dieser Parameter kann festgestellt werden, dass an den Standorten Malta und Vibo (2009) statistisch identische Durchschnittstemperaturen herrschten, die Zeitpunkte der Hormoninduktion deckungsgleich waren und zudem kein signifikanter Unterschied in den Temperaturanstiegen vor den Induktionen vorlagen. Trotz nahezu identischer Versuchsparameter konnten in Malta, im Kontrast zum Standort Vibo (~ 37 Mio. Eier), keine Eier nachgewiesen werden.

Mittels Rangsummentests nach Dunn (1961) wurden die in den Abbildungen 3.6 (D & F), 3.7 (B, D & F) und 3.8 (B & D) dargestellten Durchschnittstemperaturen der Laichperioden untereinander ver-

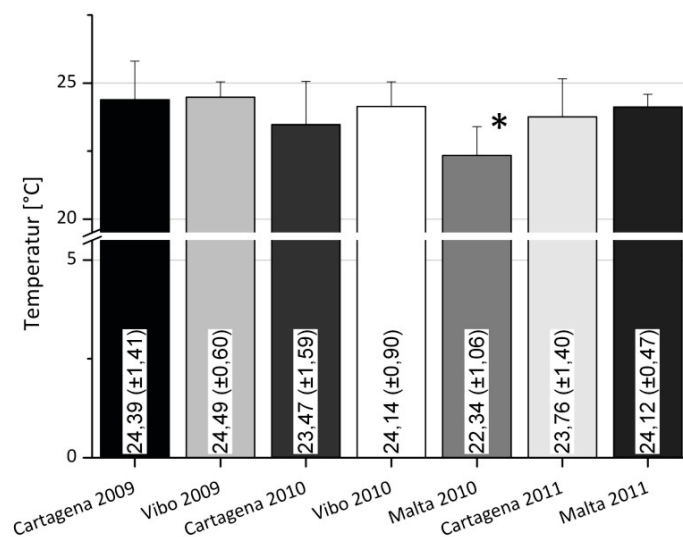


Abbildung 3.9: Käfigdurchschnittstemperaturen zur Laichzeit
Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aller Datenlogger während der beobachteten Laichperioden. Die Datenreihe „Malta 2010“ weist einen signifikanten Temperaturunterschied zu allen anderen Messungen auf (*, $p \leq 0,05$).

glichen. Allein die Messung Malta 2010 kann statistisch gegenüber allen anderen Messungen separiert werden. Ein äquivalentes Ergebnis liefert eine einfaktorische Varianzanalyse der Laichzeittemperaturen (one-way ANOVA nach Holm-Šidák; Šidák, (1967) & Holm, (1979)). Hierbei kann festgestellt werden, dass die gemessene Temperatur während der 18-tägigen Laichperiode „Malta 2010“ signifikant geringer als bei den anderen Messungen war (vgl. Abbildung 3.9). Aus den sieben in Abbildung 3.9 dargestellten Einzelmittelwerten ergibt sich eine allgemeine Käfigdurchschnittstemperatur von $23,8 \text{ °C} (\pm 0,74)$. Vernachlässigt man den signifikant abweichenden Datensatz

„Malta 2010“ bei der Berechnung der durchschnittlichen Laichtemperatur lässt sich ein Wert von $24,06 \text{ °C} (\pm 0,38)$ bestimmen. Dieser Wert liegt deutlich über der beobachteten Wassertemperatur von $22,3 \text{ °C} (\pm 0,97)$ des Jahres 2010 in Malta.

Neben der Käfigdurchschnittstemperatur wurden zusätzlich die Temperaturen am Käfigboden untersucht, da die tieferen Wasserschichten eine geringere Schwankungsamplitude zeigten (STABW Oberfläche = $1,4 \text{ °C}$, STABW Boden = $0,9 \text{ °C}$). Auch in diesem Fall waren die aufgezeichneten Laichzeittemperaturen der Messung „Malta 2010“ ($21,9 \text{ °C} \pm 1,09$ in 10 m Tiefe) mit statistischer Sicherheit ($p \leq 0,05$) niedriger als die Reproduktionstemperaturen jeder anderen Messung, die im Mittel eine Temperatur von $22,6 \text{ °C} (\pm 0,89)$ in 16 m Tiefe und $22,9 \text{ °C} (\pm 1,59)$ in 8 m Tiefe aufwiesen.

Um eine mögliche fortpflanzungsauslösende Schwellentemperatur ermitteln zu können, wurden die durchschnittlichen Tagestemperaturen des ersten Reproduktionstags aller Wassertiefen bestimmt. Die ermittelten Werte sind zusammen mit der jeweiligen Laichzeitdurchschnittstemperatur in den Abbildungen 3.10 bis 3.12 dargestellt. Eine statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels Rangsummentests nach Dunn (1961).

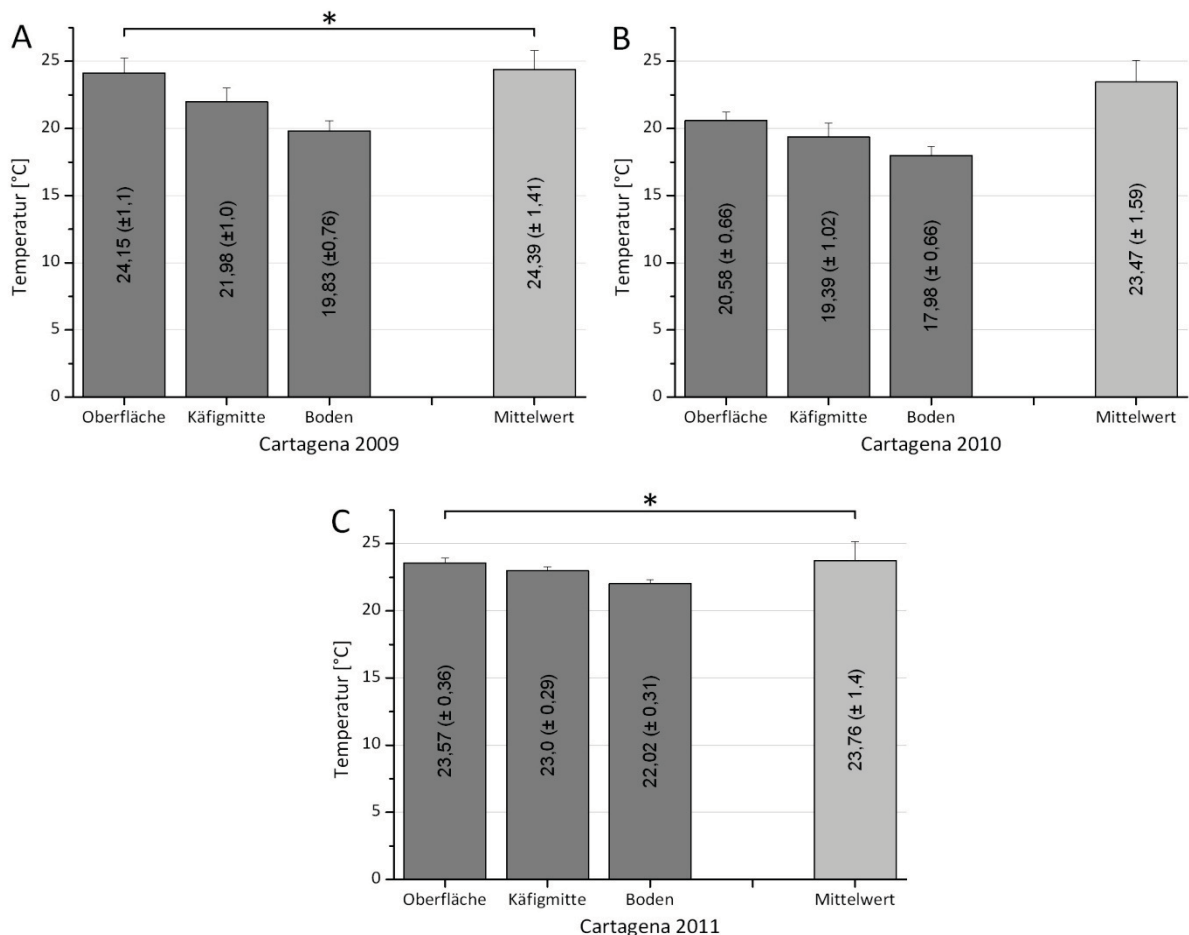


Abbildung 3.10: Durchschnittstemperaturen des ersten Reproduktionstags und der Laichperiode (Cartagena)

Dargestellt ist der Temperaturmittelwert der Wasseroberfläche (-1 m), der Käfigmitte (-8 m) und des Käfigbodens (-16 m) zu Laichzeitbeginn für den Standort Cartagena der Jahre 2009 (A), 2010 (B) und 2011 (C) mit der jeweilig gemessenen Durchschnittstemperatur während der Laichzeit (Mittelwert). Untereinander nicht signifikante Datensätze sind mit einem Stern (*, $p > 0,05$) gekennzeichnet. In allen Abbildungsteilen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Temperaturdaten „Oberfläche“, „Käfigmitte“ und „Käfigboden“ festgestellt werden. Nur für das Versuchsjahr 2010 (B) konnte zusätzlich ein statistischer Unterschied zwischen der Durchschnittstemperatur während der Laichzeit und der Oberflächentemperatur zu Beginn der Laichsaison berechnet werden.

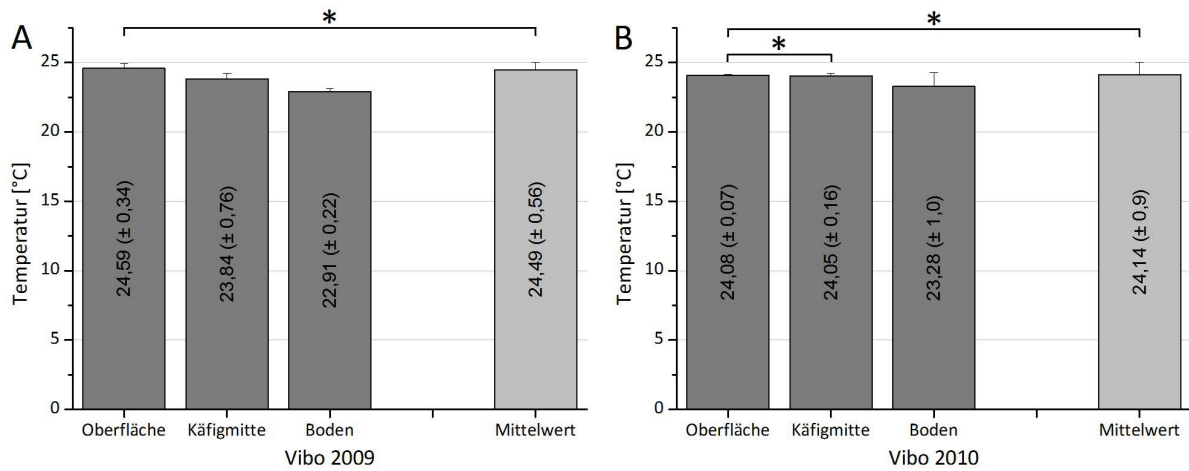


Abbildung 3.11: Durchschnittstemperaturen des ersten Reproduktionstags und der Laichperiode (Vibo)

Dargestellt ist der Temperaturmittelwert der Wasseroberfläche (-1 m), der Käfigmitte (-8 m) und des Käfigbodens (-16 m) zu Laichzeitbeginn für den Standort Vibo der Jahre 2009 (A) und 2010 (B) mit der jeweilig gemessenen Durchschnittstemperatur während der Laichzeit (Mittelwert). Untereinander nicht signifikante Datensätze sind mit einem Stern (*, $p > 0,05$) gekennzeichnet. In beiden Versuchsjahren sind die aufgezeichneten Temperaturdaten der Messreihen „Oberfläche“ und „Mittelwert“ nicht signifikant unterscheidbar. Zusätzlich konnten im Jahr 2010 die Oberflächentemperaturen gegenüber den Temperaturen der Käfigmitte nicht abgegrenzt werden. Alle anderen Datensätze weisen signifikante Unterschiede auf.

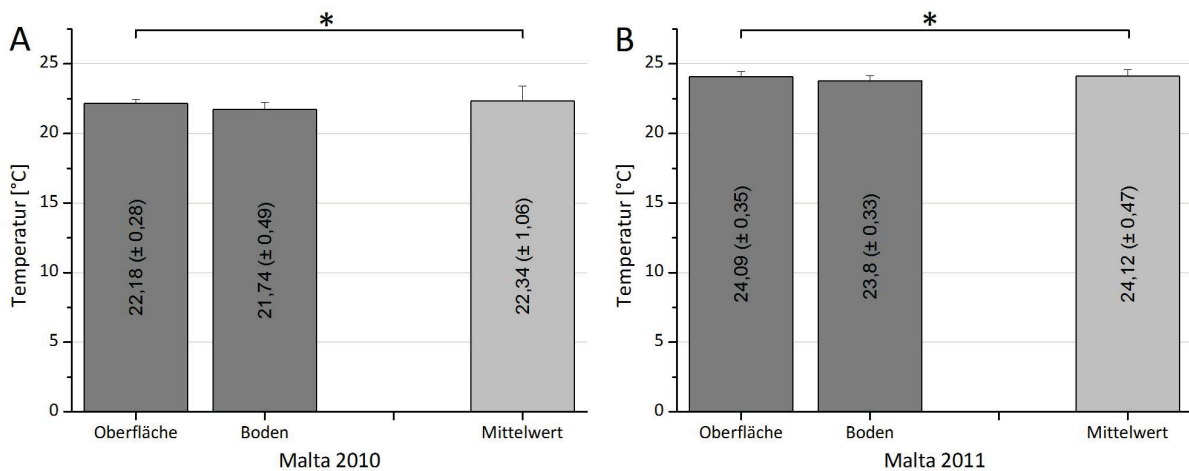


Abbildung 3.12: Durchschnittstemperaturen des ersten Reproduktionstags und der Laichperiode (Malta)

Dargestellt ist der Temperaturmittelwert der Wasseroberfläche (-1 m) und des Käfigbodens (-10 m) zu Laichzeitbeginn für den Standort Malta der Jahre 2010 (A) und 2011 (B) mit der jeweilig gemessenen Durchschnittstemperatur während der Laichzeit (Mittelwert). Untereinander nicht signifikante Datensätze sind mit einem Stern (*, $p > 0,05$) gekennzeichnet. In beiden Versuchsjahren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Datenreihen „Oberfläche“ und „Mittelwert“ berechnet werden.

Beim Vergleich der oben dargestellten Daten ist – mit Ausnahme der Messung Cartagena 2010 – eine Korrelation zwischen der Oberflächentemperatur zu Beginn der Reproduktion und der durchschnittlichen Laichtemperatur zu erkennen. In sechs von sieben Fällen ist zwischen den untersuchten Datenreihen kein signifikanter Temperaturunterschied bestimmbar.

Im Mittel lag die Oberflächentemperatur zu Beginn der Laichsaison bei $23,32\text{ °C}$ ($\pm 1,43$). Bei einem gewählten Signifikanzniveau α von 0,05 ist dieser Wert nicht von der Laichzeitdurchschnittstemperatur von $23,8\text{ °C}$ zu unterscheiden ($p = 0,62$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass während der Laichzeit keine signifikanten Temperaturunterschiede zwischen den Messreihen Vibo 2009/10, Cartagena 2009/10/11 und Malta 2009/11 vorlagen. Einzige Ausnahme stellt die Datenreihe Malta 2010 dar, bei der im gesamten Käfigbereich statistisch erwiesene Temperaturunterschiede zu den anderen Messungen festgestellt werden konnten.

Ein Zusammenhang zwischen dem 14-tägigen Temperaturanstieg und dem Fortpflanzungserfolg konnte nicht dargelegt werden.

Die Käfigdurchschnittstemperatur während der sieben beobachteten Reproduktionsereignisse lag bei $23,8\text{ °C}$, die Oberflächentemperatur zu Beginn der Laichzeit im Mittel bei $23,3\text{ °C}$.

3.2.2 Fisch-Datenlogger

Während der vier Projektjahre wurden insgesamt 14 externe Star-Oddi-Logger zur Messung der Tauchtiefe und der Umgebungstemperatur implantiert. Von diesen 14 Datenloggern lösten sich sieben Logger bereits vor der Laichzeit vom Fisch ab und lieferten somit nur unzureichende Aufzeichnungsergebnisse. Drei Datenlogger gingen während durchgeführter Fischtransfers verloren bzw. wurden nach mehrmonatiger erfolgreicher Implantation nicht wiedergefunden. Nur drei der eingesetzten Datensammler, nachfolgend Malta 1, 2 und 3 genannt, waren im Jahr 2010 bzw. 2011 über eine laichzeitumfassende Periode von vier Monaten an je einem Broodstock-Tier eines Käfigs befestigt und konnten anschließend zur Datenauswertung verwendet werden. Ein weiterer Datenlogger ist bis dato an einem maltesischen Zuchtfisch befestigt.

Über die aufgezeichneten Tauchtiefen wurde untersucht, ob sich das Schwimm- bzw. Tauchverhalten der Zuchtfische vor, während und nach der Laichzeit unterschied. Außerdem wurden die Temperatureaufzeichnungen zum einen zur Berechnung der durchschnittlichen Umgebungstemperatur während der Laichzeit verwendet, zum anderen dienten sie dem Vergleich mit den Messergebnissen der stationären Datenlogger.

Beim Vergleich der aufgezeichneten Temperatur- und Tiefendatensätze während der Laichzeit können keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchstieren (Malta 1 & Malta 2) aufgezeigt werden. Mit einer durchschnittlichen Tauchtiefe von $3,75\text{ m}$ ($\pm 2,25\text{ m}$, Malta 1) bzw. $3,51\text{ m}$ ($\pm 2,23\text{ m}$, Malta 2) und einer durchschnittlich präferierten Umgebungstemperatur von $21,85\text{ °C}$ ($\pm 1,04\text{ °C}$, Malta 1) bzw. $21,87\text{ °C}$ ($\pm 1,05\text{ °C}$, Malta 2) zeigten beide Fische im Zeitraum vom 20.06. bis zum 07.07.2010 ein vergleichbares Schwimmverhalten.

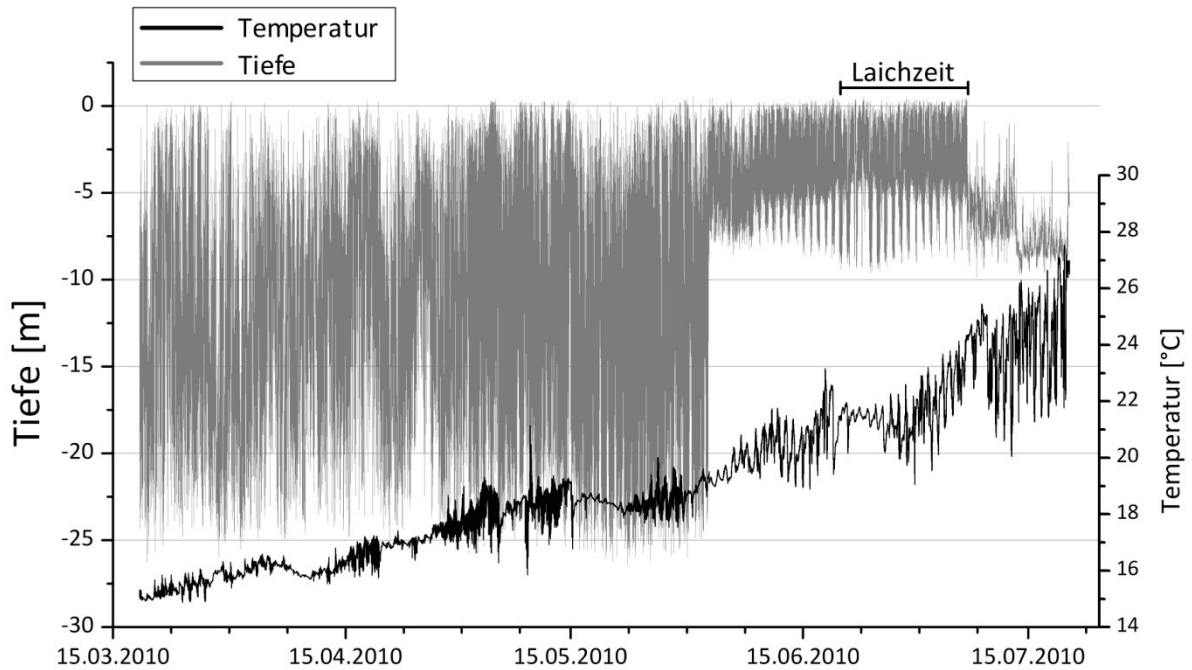


Abbildung 3.13: Übersicht der Tiefen- und Temperaturaufzeichnung des Fischdatenloggers Malta 1

Der Datenlogger Malta 1 wurde am 18.03.2010 implantiert und zeichnete bis zum 30.04. in fünfminütiger Taktung Umgebungstemperatur und Tauchtiefe auf. Ab dem 1. Mai wechselte der Logger in einen einminütigen Rhythmus. Die deutlich verringerte Amplitude der Tauchtiefe ab dem 02.06. lässt sich durch einen Positionswechsel des Käfigs in flacheres Wasser erklären. Hierdurch wurde die Käfigtiefe auf 10 m beschränkt. Nach der markierten Laichzeit (20.06. bis 07.07.) ist ein eindeutiger Wechsel im Schwimmverhalten des Versuchstiers zu erkennen. Am 20.07. wurde der Fisch getötet und die Messung beendet.

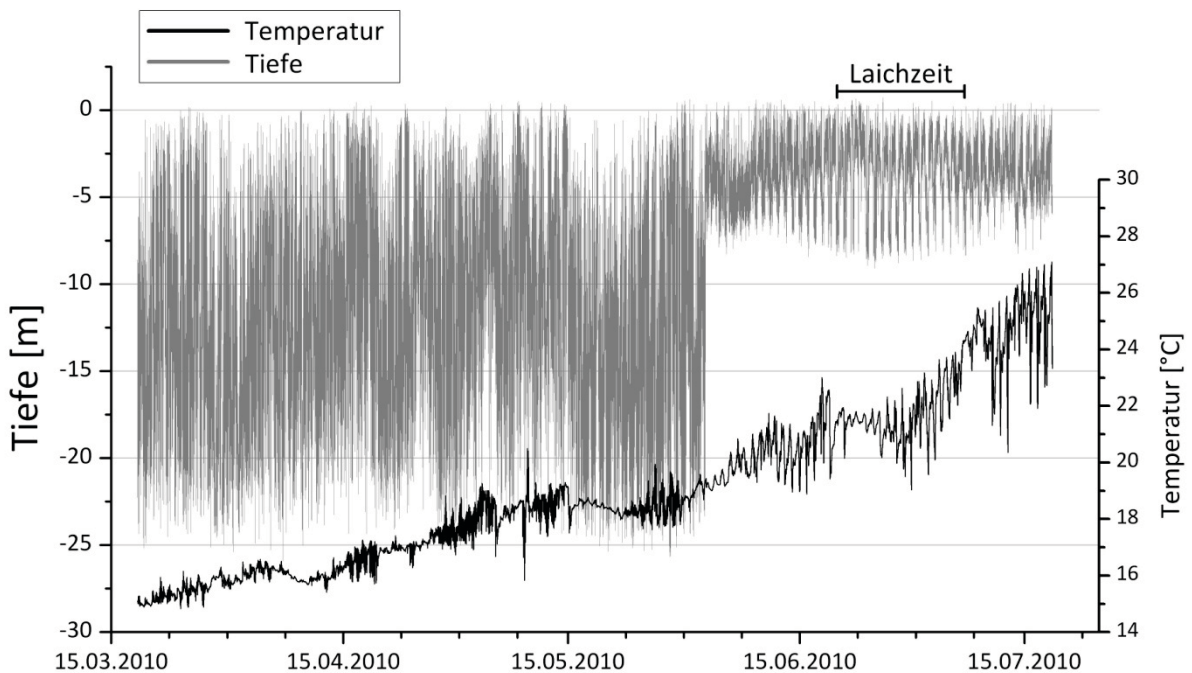


Abbildung 3.14: Übersicht der Tiefen- und Temperaturaufzeichnung des Fischdatenloggers Malta 2

Der Datenlogger Malta 2 wurde am 18.03.2010 implantiert und zeichnete Umgebungstemperatur und Tauchtiefe durchgehend in einem fünfminütigen Rhythmus auf. Die Veränderung der Käfigposition und die damit einhergehende verringerte Käfigtiefe ab dem 02.06. sind anhand der aufgezeichneten Tauchtiefe ebenfalls

deutlich zu erkennen. Eine ausgeprägte Tauchtiefenveränderung nach der Laichzeit ist beim zweiten Versuchstier nicht zu erkennen. Am 18.07. wurde der Fisch getötet und die Messung beendet.

Bringt man die parallel gemessenen Temperaturdaten der stationären Käfigdatenlogger mit den Aufzeichnungen der Fischdatenlogger in Verbindung, kann festgestellt werden, dass die am Tier gemessenen stündlichen Durchschnittstemperaturen während der Laichzeit mit statistischer Sicherheit ($p < 0,001$) niedriger sind als die Oberflächentemperatur und die durchschnittliche Käfigtemperatur. Erst im Vergleich mit den in zehn Metern Tiefe gemessenen Temperaturen ($\bar{x} = 21,74$ °C) kann eine Übereinstimmung zu den am Fisch gemessenen Werten gefunden werden.

Anhand stündlich gemittelter Tiefendaten während und nach der Laichzeit kann gezeigt werden, dass die bevorzugte Schwimmtiefe innerhalb der Reproduktionsphase in einem signifikant flacheren Bereich liegt als danach (Malta 1: $p < 0,001$; Malta 2: $p = 0,017$). Gleichzeitig kann mittels der Ergebnisse weiterer Tests nicht davon ausgegangen werden, dass sich das Schwimmverhalten der beiden Versuchstiere eine Woche vor dem Auffinden der ersten Eier von dem während der Laichzeit unterschied. Zur Veranschaulichung des Schwimmverhaltens während und nach der Laichzeit werden in Abbildung 3.15 zwei jeweils 24-stündige Tiefenaufzeichnungen des Fischdatenloggers Malta 2 grafisch gegenübergestellt.

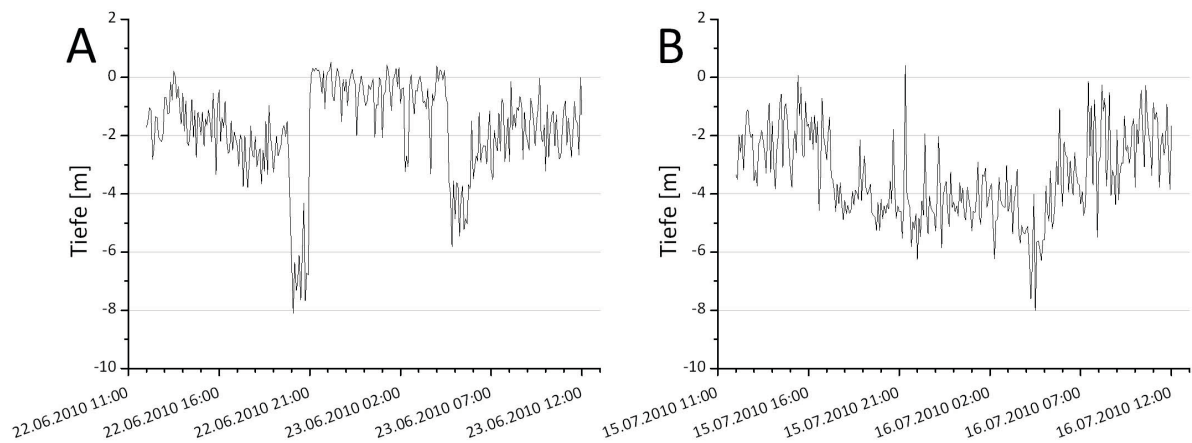


Abbildung 3.15: 24-stündige Tiefenaufzeichnungen während (A) und nach (B) der Laichzeit

Anhand der 24-stündigen Messungen, beginnend am 22.06. (A) und 15.07. (B) um 12 Uhr, ist ein deutlicher Unterschied im Schwimmverhalten des Versuchstieres zu erkennen. In Abbildungsteil A zeigt das Versuchstier im Gegensatz zum Vergleichstag zwischen 21 und 4 Uhr eine eindeutige Präferenz für geringere Tiefen.

Das in Abbildung 3.15A zu erkennende Verhalten ist zwischen dem 13.06. und dem 07.07. an zwölf weiteren Tagen beim Versuchstier Malta 1 und an elf weiteren Tagen beim Versuchstier Malta 2 zu erkennen.

Anhand der beiden ausgewerteten Fischdatenlogger konnte demonstriert werden, dass die Versuchstiere während der Laichzeit (Malta 2010) ein abweichendes Schwimmverhalten gegenüber der Zeit nach der Reproduktionsphase zeigten. Dieser statistisch verifizierbare Unterschied resultiert

hauptsächlich aus der nächtlichen Präferenz für Tiefen zwischen 0 und -3 m. Beim Vergleich mit den stationären Datenloggern konnte gezeigt werden, dass die Temperaturaufzeichnungen der Versuchstiere am ehesten mit den in -10 m aufgezeichneten Temperaturen korrelierten.

Am 11.09.2011 konnte ein weiterer Datenlogger (Malta 3) zurückgewonnen werden, der über eine laichzeitumfassende Periode von 4,5 Monaten an einem Zuchtfisch in Malta befestigt war (vgl. Abbildung 3.16A). Im Gegensatz zu den in 2010 gewonnenen Daten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Tauchverhalten während und nach der observierten Laichperiode festgestellt werden. Jedoch wurde im Zeitraum zwischen dem 26. und 29.06. eine deutliche und zugleich signifikante Präferenz für eine flachere Schwimmtiefe im Vergleich zu je drei Vor- und Folgetagen gemessen (vgl. Abbildung 3.16B). Da im genannten Zeitraum täglich jedoch nur zwischen 50 und 5000 Eiern im Käfig vorgefunden wurden, entsprachen diese Tage nicht der oben angegebenen Laichzeit-Definition (≥ 10000 pro Tag). Die rapide Veränderung des aufgezeichneten Tauchprofils ist mit dem Transfer des Versuchstiers in einen größeren und tieferen Käfig (Produktionskäfig) zu erklären.

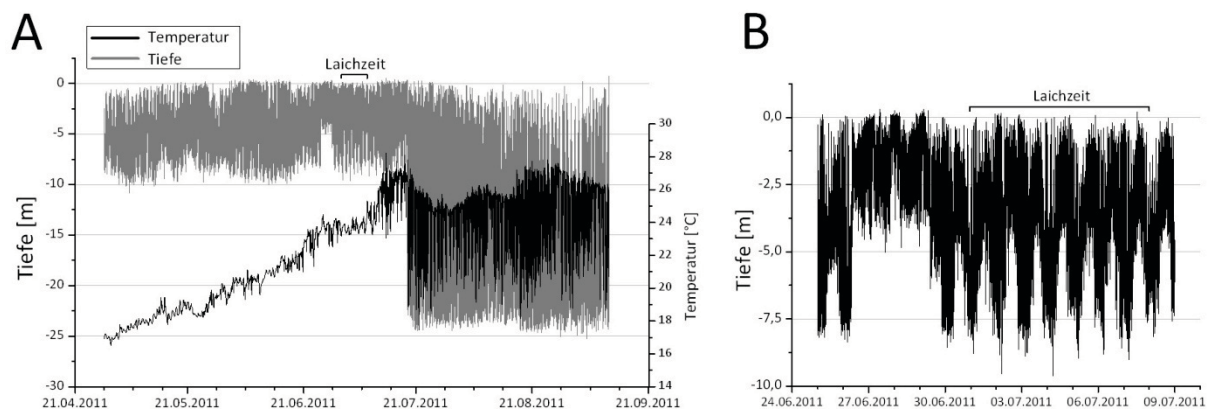


Abbildung 3.16: Datenaufzeichnungen des Fischdatenloggers Malta 3

(A) Übersicht der Tiefen- und Temperaturaufzeichnung während der gesamten Messperiode. Der Datenlogger Malta 3 wurde am 29.04.2011 implantiert und zeichnete beide Parameter durchgehend in einem fünfminütigen Rhythmus auf. Der Transfer in den Produktionskäfig und die damit einhergehende vergrößerte Käfigtiefe ab dem 20.07. ist in der aufgezeichneten Tauchtiefe deutlich zu erkennen.

(B) 13-tägige Tiefenaufzeichnung vor und während der Laichzeit. Neben einem deutlich erkennbaren circadianen Tauchrhythmus während der markierten Laichzeit, wies das Versuchstier eine dreitägige Präferenz für eine geringere Schwimmtiefe (26.-29.06.) auf.

Vier weitere Datenaufzeichnungen über einen Monat (Malta 2008), drei Monate (Malta 2009), neun Tage (Malta 2009) sowie eineinhalb Monate (Malta 2009) befinden sich im Anhang (vgl. Abbildungen 8.1, 8.2, 8.3 & 8.4), wurden jedoch nicht weiter ausgewertet, da sich die Messzeiträume außerhalb der Laichzeit befanden.

3.3 Injektionsnarkose am Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) und Goldbrassen (*Sparus aurata*)

3.3.1 Intramuskuläre Injektion

In Anlehnung an die Veröffentlichungen von Oswald (1978) und Williams *et al.* (2004) und im Hinblick auf eine problemlos durchführbare Injektionsmöglichkeit bei freischwimmenden Thunfischen wurde die Versuchsreihe mit intramuskulären Narkosemittelapplikationen an Tilapien begonnen.

Ketaminkonzentrationen zwischen 30 und 200 mg/kg und Ketamin-/Detomidinkonzentrationen zwischen 4 bzw. 0,8 mg/kg und 200 bzw. 5mg/kg wurden aufgrund oben genannter Publikationen getestet. Bei keinem der eingesetzten Versuchstiere (500 bis 800 g) konnte der als Referenzpunkt gesetzte Übergang ins chirurgische Narkosestadium beobachtet werden.

Unabhängig von der Versuchstiergröße lag das maximal intramuskulär injizierbare Volumen bei 100 µl. Größere Volumina traten unmittelbar nach der Applikation aus der Einstichstelle aus, was durch die angefärbten Narkosemittel leicht erkennbar war. Aufgrund dieser Volumenbegrenzung und durch die begrenzte Löslichkeit der verwendeten Anästhetika konnten die Injektionskonzentrationen nicht weiter gesteigert werden.

Basierend auf diesem Erfahrungshintergrund wurde im weiteren Versuchsverlauf auf intramuskuläre Injektionen verzichtet und eine neue Versuchsreihe zum Dosis-Wirkungsverhältnis intraperitoneal verabreichter Anästhetika gestartet.

Ebenso wurde auf intramuskuläre Injektionen an Goldbrassen verzichtet.

3.3.2 Intraperitoneale Injektion

Im Gegensatz zur intramuskulären Injektion konnte die beobachtete Problematik des begrenzten Applikationsvolumens bei der intraperitonealen Injektion nicht beobachtet werden. Dies konnte anhand von Kontrollversuchen ohne Anästhetika verifiziert werden. In diesen Vorversuchen wurden Volumina von bis zu 500 µl in den Intraperitonealraum 150 g schwerer Tilapien injiziert, ohne dass ein Austreten der angefärbten Injektionslösung beobachtet werden konnte.

Nachfolgend werden die Ergebnisse und Beobachtungen der Dosisoptimierung, getrennt nach den verwendeten Substanzen bzw. Substanzgemischen, dargelegt. Der Terminus „Induktionszeit“ definiert den Zeitraum zwischen Injektion und dem Erreichen des chirurgischen Narkosestadiums. Die Zeitspanne, in der das Narkosestadium III.1 durch die gegebene Narkosemittelkonzentration aufrechterhalten wurde, ist nachfolgend als „Narkosedauer“ bezeichnet. Jede eingesetzte Konzentration wurde an sechs Versuchstieren (3 ♀, 3 ♂) erprobt. Versuchsergebnisse einer Wirkstoffklasse wurden mittels one-way ANOVA nach Holm-Šidák auf signifikante Unterschiede geprüft ($\alpha = 0,05$).

Ketamin

Der anästhetische Effekt fünf verschiedener Ketaminkonzentrationen wurde zu Beginn der Versuchsreihe an jeweils sechs Tilapien getestet. Mit 40 mg/kg wurde eine Startkonzentration gewählt, die etwa einem Drittel der von Oswald (1978, Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*, 130 mg/kg i.m.)

bzw. von Williams *et al.* (2004, Pazifische Makrele, *Scomber japonicus*, \bar{x} = 112 mg/kg i.m.) publizierten Werte, entsprach.

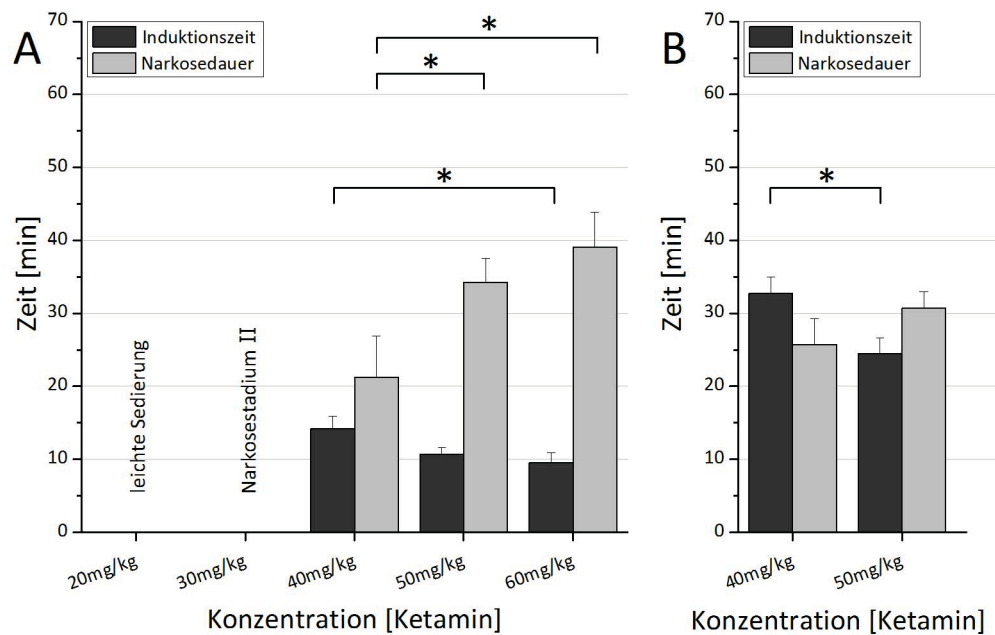


Abbildung 3.17: Dosis-Wirkungs-Kurven des Narkotikums Ketamin bei Tilapien (A) und Goldbrassen (B)

A: Dargestellt sind ggf. observierte Induktionszeiten und die zugehörige Narkosedauer fünf verschiedener Ketaminkonzentrationen bei Tilapien ($n = 6$). **B:** Observierte Induktionszeiten und die zugehörige Narkosedauer zwei verschiedener Ketaminkonzentrationen bei Goldbrassen ($n = 4$). Standardabweichungen und signifikante Unterschiede zwischen den Datenreihen (*, $p \leq 0,05$) sind angegeben.

Die Ergebnisse der Ketaminversuche an Tilapien sind in Abbildung 3.17A dargestellt. Bei einer Ketamingabe ≥ 40 mg/kg konnten alle verwendeten Versuchstiere erfolgreich ins chirurgische Narkosestadium versetzt werden. Die beobachteten Induktionszeiten sanken mit steigender Konzentration von 14,2 min (40 mg/kg) über 10,7 min (50 mg/kg) auf 9,6 min (60 mg/kg). Gleichzeitig erhöhte sich die Narkosedauer von 21,3 min über 34,25 min auf maximale 39,1 min. Signifikante Unterschiede innerhalb der Narkosedauer konnten sowohl zwischen den Datenreihen „40 mg/kg“ und „50 mg/kg“ bzw. „40 mg/kg“ und „60 mg/kg“, als auch zwischen den Induktionszeitmessungen „40 mg/kg“ und „60 mg/kg“ beobachtet werden. Nach intraperitonealer Verabreichung von 20 mg/kg Ketamin konnte nur eine leichte Sedierung der Versuchstiere festgestellt werden. 30 mg/kg Ketamin versetzte alle behandelten Tilapien in das Narkosestadium II. Die minimal effektive Dosis (MED) wird nachfolgend als die Narkosemittelkonzentration definiert, bei welcher der gewünschte Effekt (Übergang ins Narkosestadium III.) mit möglichst geringer Wirkstoffkonzentration erreicht wurde. Im Fall des Ketamins lag die bestimmte MED bei 40 mg/kg.

Im Gegensatz zu den an Tilapien gewonnenen Ergebnissen konnte beim Goldbrassen nach intraperitonealer Ketamininjektion von 40 bzw. 50 mg/kg eine signifikant höhere Induktionszeit von 32,8 min ($\pm 2,2$) bzw. 25,4 min ($\pm 2,1$) beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.17 B). Beim Vergleich der Narkosedauer waren beim Goldbrassen keine signifikanten Änderungen zu den Auswirkungen äquivalenter

Ketamingaben an Tilapien festzustellen. Beim Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven muss jedoch darauf geachtet werden, dass zum einen eine 5 °C geringere Versuchstemperatur bei den Narkoseexperimenten an Goldbrassen vorlag und zum anderen das Gewicht der bereitgestellten Versuchstiere mit 1087 g (\pm 186) etwa doppelt so hoch lag wie das der verwendeten Tilapien (448 g, \pm 88).

Ketamin-Detomidin bzw. Ketamin-Medetomidin

Aufgrund der Ergebnisse der Ketaminreihe wurden die Versuche zum Dosis-Wirkungsverhältnis von Ketamin-Detomidin- bzw. Ketamin-Medetomidin-Mischungen mit einer verringerten Ketaminkonzentration von 20 mg/kg begonnen. Die beigemischte Konzentration der α_2 -Adrenozeptor-Agonisten Detomidin bzw. Medetomidin wurde mit 0,5 mg/kg erneut geringer als die von Williams *et al.* veröffentlichten Daten (*S. japonicus*, \bar{x} = 1,76 mg/kg i.m.) gewählt. Versuche an jeweils sechs Tilapien wiesen, bei einer durchschnittlichen Induktionszeit von 9,5 min (\pm 1,7) und einer mittleren Narkosedauer von 29,3 min (\pm 7,1) für die Ketamin-Detomidin-Mischung sowie einer Induktionszeit von 10,2 min (\pm 1,5) und einer Narkosedauer von 28,6 min (\pm 5,8) für die Ketamin-Medetomidin-Mischung, keine signifikanten Unterschiede auf. Aufgrund des tendenziell besseren Wirkungsverhältnisses und der 10-fach höheren Wirkstoffkonzentration der Detomidin-Stammlösung wurde – im Hinblick auf eine Volumenreduktion – im weiteren Verlauf der Messreihe auf die Medetomidin-Mischung verzichtet.

Die konzentrationsbezogenen Induktionszeiten mit zugehöriger Narkosedauer sowie weitere Beobachtungen nach intraperitonealer Gabe der Ketamin-Detomidin-Mischungen sind in Abbildung 3.18A dargestellt. Statistische Auswertungen der Versuchsergebnisse belegen eine signifikante Differenzierung der detektierten Narkosedauer nach Verabreichung von 25 mg/kg Ketamin und 0,5 mg/kg Detomidin gegenüber den anderen Messreihen. Zusätzlich kann nach Injektion der getesteten Maximalkonzentration eine signifikant kürzere Induktionszeit gegenüber der Ketamin-Detomidin-Mischung von 15 bzw. 0,5 mg/kg ermittelt werden. Der Übergang ins chirurgische Narkosestadium konnte nach Applikation von 5 bzw. 10 mg/kg Ketamin mit 0,5 mg/kg Detomidin bei keinem Versuchstier festgestellt werden. Trotz zum Teil deutlicher Sedierungserscheinungen, wie dem Absinken zum Beckenboden, war ein Verlust des Gleichgewichts und des Fluchtreflexes nie protokollierbar.

Eine Verdopplung der Detomidinkonzentration führte zu einer dreifach verlängerten Narkosedauer bei gleichbleibender Induktionszeit. Infolgedessen und aus Gründen einer besseren Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse wurden Konzentrationsveränderungen nur am Wirkstoff Ketamin vorgenommen. Die MED konnte mit 15 mg/kg Ketamin und 0,5 mg/kg Detomidin beziffert werden.

Unmittelbar nach Injektion der Detomidin- bzw. Medetomidin-Mischungen war eine sich von der Einstichstelle ausbreitende Entfärbung des Versuchstiers zu erkennen, die sich innerhalb weniger Minuten über den ganzen Körper ausbreitete. Dieser Farbwechsel von oliv-grün zu silber-weiß konnte noch bis zu 24 Stunden nach Versuchsbeginn beobachtet werden.

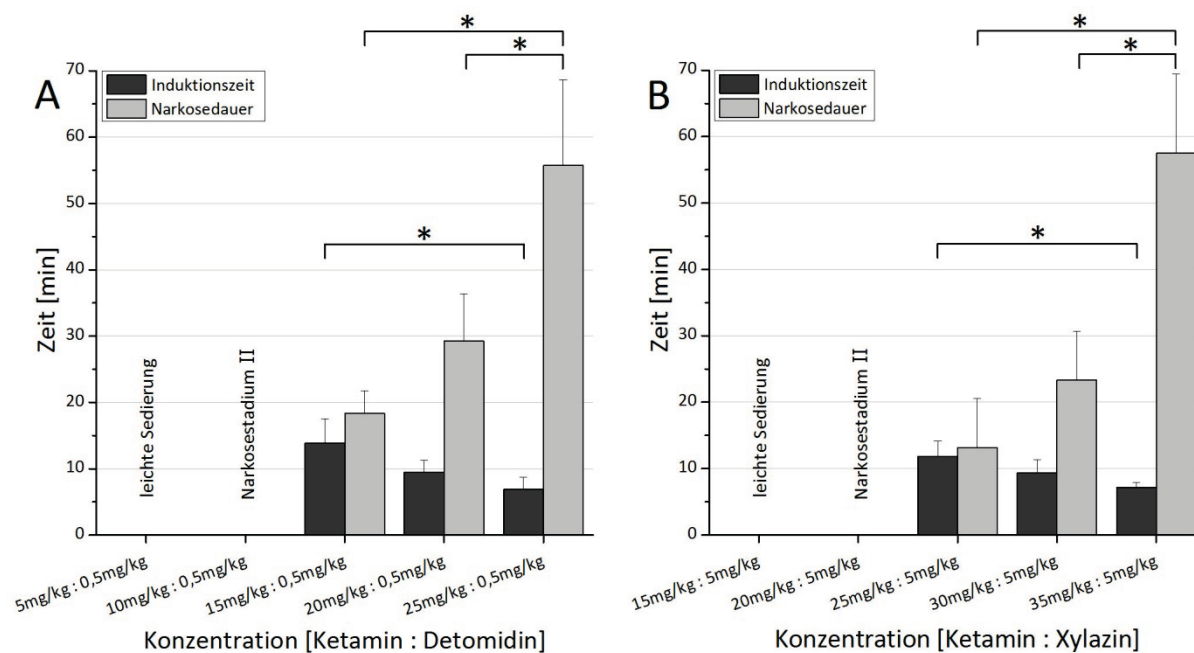


Abbildung 3.18: Dosis-Wirkungs-Kurven der Ketamin-Detomidin- bzw. Ketamin-Xylazin-Mischungen

Dargestellt sind ggf. observierte Induktionszeiten und die zugehörige Narkosedauer fünf verschiedener Ketamin-Detomidin- (A) sowie Ketamin-Xylazin-Mischungen (B). Standardabweichungen und signifikante Unterschiede zwischen den Datenreihen (*, $p \leq 0,05$) sind angegeben ($n = 6$).

Ketamin-Xylazin

Mit dem Xylazin wurde ein weiterer α_2 -Adrenozeptor-Agonist in Kombination mit dem dissoziativen Narkotikum Ketamin auf seine anästhetische Potenz untersucht. Aufgrund seiner, im Vergleich zu den Imidazolderivaten Detomidin und Medetomidin, geringeren Affinität zu α_2 -Adrenozeptoren (vgl. Absatz 2.5.1.1) wurde die Xylazinkonzentration zu Versuchsbeginn um das 10-fache erhöht. Die Anfangskonzentration von 20 mg/kg Ketamin wurde gegenüber der vorherigen Versuchsreihe nicht verändert.

Die Injektion des zuvor beschriebenen Konzentrationsverhältnisses führte in allen sechs Fällen lediglich zu einer tiefen Sedierung der Versuchstiere, gleichzusetzen mit dem Narkosestadium II. Die Erhöhung der Xylazinkonzentration – bei gleichbleibender Ketaminkonzentration – auf 10, 25 oder 50 mg/kg ging nicht mit einer Steigerung der anästhetischen Wirksamkeit einher. Vielmehr konnten ungewünschte Nebenwirkungen wie unkontrollierbare Muskelkontraktionen, hektische Augenbewegungen und panische Fluchtversuche mit heftigen Kollisionen gegen die Beckenwand und sogar der Tod eines Versuchstiers beobachtet werden. Aus diesen Gründen wurde die Xylazinkonzentration bei 5 mg/kg belassen und mit einer Veränderung der Ketaminkonzentration reagiert. Ab einer Injektion von 25 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin konnte das Eintreten eines chirurgischen Narkosestadiums festgestellt werden (MED).

Die mit den anderen Versuchsreihen vergleichbaren Ergebnisse sind in Abbildung 3.18B dargestellt. Eine statistische Untersuchung der Messergebnisse lieferte vergleichbare Ergebnisse zur Ketamin-Detomidin-Reihe. So kann zum einen die Narkosedauer der Maximalkonzentration signifikant gegenüber den Messwerten der beiden nächst geringeren Konzentrationen abgegrenzt werden. Zum ande-

ren ist die Induktionszeit bei Injektion von 35 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin signifikant geringer als bei einer Verabreichung von 25 bzw. 5 mg/kg.

In allen durchgeführten Versuchen können mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,001$ negative Korrelationen zwischen den verabreichten Wirkstoffkonzentrationen und den Induktionszeiten vorgefunden werden. Gleichmaßen existieren positive Korrelationen zwischen der verabreichten Wirkstoffkonzentration und der gemessenen Narkosedauer. Aus diesem Grund lässt sich die Aussage treffen, dass alle verwendeten Wirkstoffe bzw. Gemische – beim Versuchstier Tilapia und innerhalb der untersuchten Konzentrationsspannen – dem erwarteten Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve folgen (De Lean *et al.*, 1978). Je höher die injizierte Wirkstoffkonzentration war, desto kürzer die Induktionszeit und desto länger die Narkosedauer.

Um die zuvor dargestellten Dosis-Wirkungs-Kurven besser vergleichen zu können, sind in Abbildung 3.19 die Kurvenverläufe der protokollierten Induktionszeiten und die dazugehörige Narkosedauer in Abhängigkeit zur jeweils injizierten Ketaminkonzentration abgebildet. Dies ist möglich, da die Konzentrationen der Wirkstoffe Detomidin bzw. Xylazin innerhalb der Versuchsreihe konstant gehalten wurden.

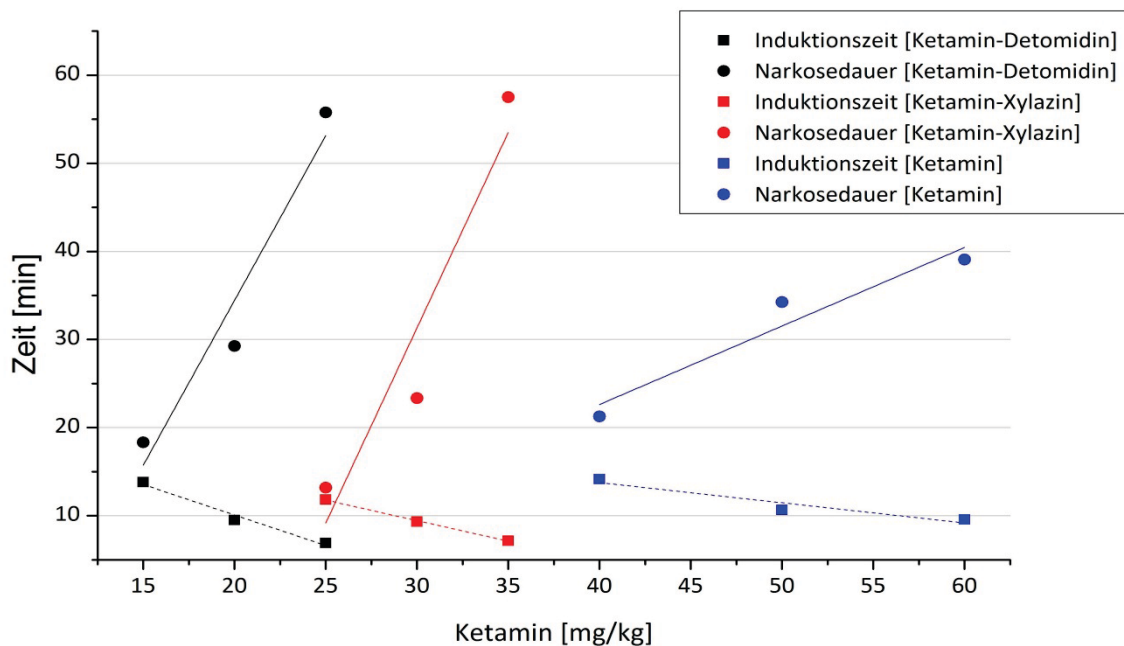


Abbildung 3.19: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Verhältnisse

Dargestellt sind die zeitlichen Dosis-Wirkungs-Verhältnisse der Versuchsreihen „Ketamin-Detomidin“, „Ketamin-Xylazin“ und „Ketamin“ in Abhängigkeit zur verabreichten Ketaminkonzentration. Mit einer Steigung $m = 3,7$ für die Ketamin-Detomidin-Mischungen und $m = 4,4$ für die Ketamin-Xylazin-Gemische sind deutlich steilere Anstiege in den zugehörigen linearen Regressionen der Narkosedauer zu erkennen als bei der alleinigen Ketamingabe $m = 1,8$. Bei der Untersuchung der Induktionszeiten ist im Vergleich zur Ketamin- ($m = -0,46$) und zur Ketamin-Xylazin-Reihe ($m = -0,47$) die deutlichste Steigung nach Injektion der Ketamin-Detomidin-Mischungen ($m = -0,70$) zu erkennen. Die in den Abbildungen 3.17A und 3.18A und B angegebenen Standardabweichungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit vernachlässigt.

Wie aus Abbildung 3.19 zu entnehmen ist, konnte die benötigte Ketaminkonzentration zur Einleitung eines chirurgischen Narkosestadiums durch Beimischung von 0,5 mg/kg Detomidin im Vergleich zur alleinigen Ketamingabe um 62,5 % (25 mg/kg) gesenkt werden. Durch Zugabe von 5 mg/kg Xylazin konnte die Dosis zur Erreichung der anästhetisch wirksamen Schwelle des Ketamins um 15 mg/kg reduziert werden. Zusätzlich ist an der abzulesenden Steilheit der Narkosedauer-Kurven zu erkennen, dass der anästhetische Effekt bei einer Erhöhung der Ketaminkonzentration und Beimischung einer konstanten Menge eines α_2 -Adrenozeptor-Agonisten deutlich schneller verlängert wird, als bei einer Monoanästhesie mit Ketamin.

Alle Versuchstiere, die mit den oben genannten Wirkstoffkonzentrationen behandelt wurden, überstanden die Narkose sowie Blutentnahme und Markierung während der Anästhesie unbeschadet, nahmen am Folgetag wieder Futter auf und konnten daraufhin ins Hälterungsbecken zurückgesetzt werden.

Propofol

Injektionen von 30, 45, 60, 90 und 120 mg/kg Propofol führten zu keinem befriedigenden Narkoseresultat. Keines der eingesetzten Versuchstiere ($n = 3$) zeigte eine deutliche Narkosereaktion auf die Gabe der Propofolemulsion oder des Reinstoffs. Zwar waren bei den Konzentrationen von 90 bzw. 120 mg/kg erste Sedierungserscheinungen zu beobachten, jedoch wurde auf weitere Konzentrationserhöhungen aufgrund des ansteigenden Injektionsvolumens verzichtet.

Ketamin-Propofol

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Emulsionen aus Ketamin und Propofol auf ihre anästhetische Potenz getestet. Injektionen von 10 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Propofol führten nicht zur Einleitung eines chirurgischen Narkosestadiums. Eine Verdopplung der Wirkstoffkonzentrationen resultierte in einer durchschnittlichen Induktionszeit von 16,5 min ($\pm 2,5$, $n = 4$). Dieses Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied zu den kleinstmöglichen anästhesieeinleitenden Konzentrationen der Versuchsreihen „Ketamin“, „Ketamin-Detomidin“ und „Ketamin-Xylazin“. Im Gegensatz dazu lag die beobachtete Narkosedauer mit Werten zwischen 80 und 300 min ($\bar{x} = 160$ min, ± 96) deutlich über den bisherigen Versuchsergebnissen. Während der Narkosephase konnte bei allen Versuchstieren das Aussetzen der Atmung und damit der Übergang ins Narkosestadium III.2 bzw. III.3 festgestellt werden. Erst nach zum Teil einstündiger künstlicher Beatmung setzten erneut Kiemenbewegungen ein. Eine vollständige Erholung von den Narkoseauswirkungen dauerte zwischen 24 und 30 Stunden. Aufgrund der schlechten Praktikabilität, der nicht abschätzbaren Narkosedauer und der fehlenden Aussicht die Versuchsergebnisse auf den Thunfisch übertragen zu können, wurden keine weiteren Versuche mit Ketamin-Propofol-Mischungen durchgeführt.

3.4 Quantitative Konzentrationsbestimmung der Stresshormone Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol in Tilapia-Plasma

3.4.1 Evaluierung des Cortisol-ELISA

Anhand der unter Absatz 2.6.1.3 beschriebenen Schachbrett-Titration wurden die optimalen Konzentrationen des 2. Ak (Rabbit α -Cortisol IgG) und des Steroid-Enzym-Konjugats (Antigen) bestimmt. In Abbildung 3.20 sind die resultierenden Titrationskurven dargestellt. Hierbei sind die durch konstante Antikörperverdünnungen hervorgerufenen Absorptionen gegen serielle Tracerverdünnungen aufgetragen. Bei der Auswahl der optimalen Ak- und Tracerverdünnungen wurde darauf geachtet, eine Titrationskurve mit einer Plateauphase bei einem Extinktionswert von etwa 1,5 zu wählen, da einerseits Titrationskurven mit höheren Extinktionswerten zunehmend inakkurat werden und andererseits bei Kurven ohne sichtbares Plateau noch keine Sättigung des 2. Ak durch den Tracer stattgefunden hat. Im dargestellten Beispiel erzeugte eine 2. Ak-Verdünnung von 1:128000 die Titrationskurve, welche am ehesten den genannten Kriterien entspricht. Da in der Plateauphase ein Tracerüberschuss vorliegt, wurde aus der gewählten Antikörperverdünnung eine Tracerverdünnung aus dem linearen Kurvenbereich ausgesucht. Aufgrund der durch die Schachbrett-Titration gewonnen Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf alle ELISA-Messungen mit einer 2. Ak-Verdünnung von 1:128000 und einer Tracerverdünnung von 1:400 durchgeführt.

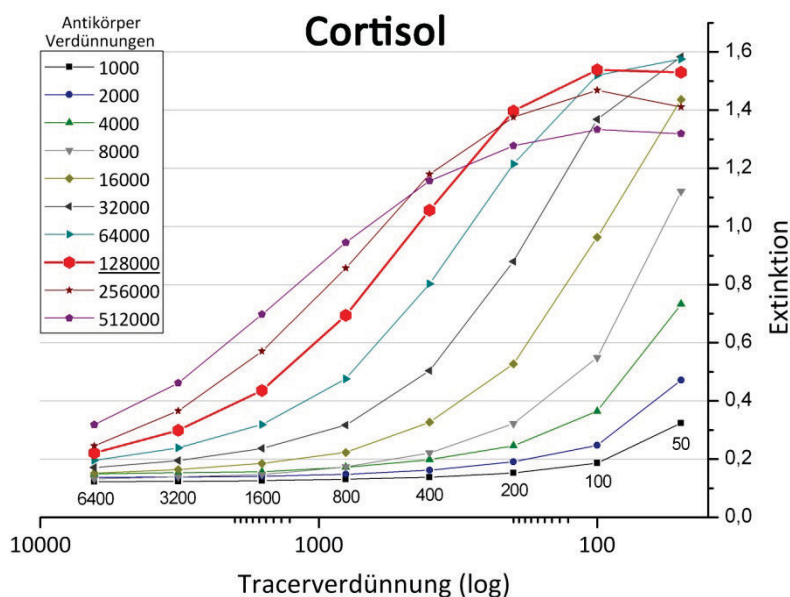


Abbildung 3.20: Titrationskurven der Schachbrett-Titration
Aufgetragen sind die detektierten Extinktionswerte konstanter 2. Ak-Verdünnungen gegen logarithmisch aufgetragene serielle Tracerverdünnung (1:50 bis 1:6400).

Um das angestrebte kompetitive Verhältnis zwischen dem hergestellten Tracer und dem Proben- bzw. Standard-Cortisol zu beweisen, sind in Abbildung 3.21A kompetitive Bindungskurven der Standardkurve, des internen Standards und einer Plasmaverdünnung dargestellt. Anhand des angedeuteten sigmoiden Kurvenverlaufs der seriellen Cortisolverdünnungen kann der kompetitive Zusammenhang bestätigt werden. Eine Erhöhung der eingesetzten Standardkonzentration führte zur Darstellung des in Abbildung

3.21A nicht gezeigten unteren Teils der Sigmoidkurve. Diese Konzentrationen konnten im Standard-ELISA-Verfahren jedoch vernachlässigt werden, da sie weit außerhalb des Messbereichs lagen. Durch die Logit-Transformation (vgl. Formel 2.1) kann in Abbildung 3.21B die Analogie der jeweiligen kompetitiven Antikörper-Antigen-Reaktionen verdeutlicht werden. Die nahezu identischen Steigungen

der logarithmierten Ausgleichsgeraden von Standardkurve, internem Standard und Plasmaverdünnung sowie die mit Hilfe von F-Tests ermittelten Signifikanzen zwischen den Datenreihen ($p > 0,05$) belegen eine kongruente Antikörper-Antigen-Bindung in allen Ansätzen.

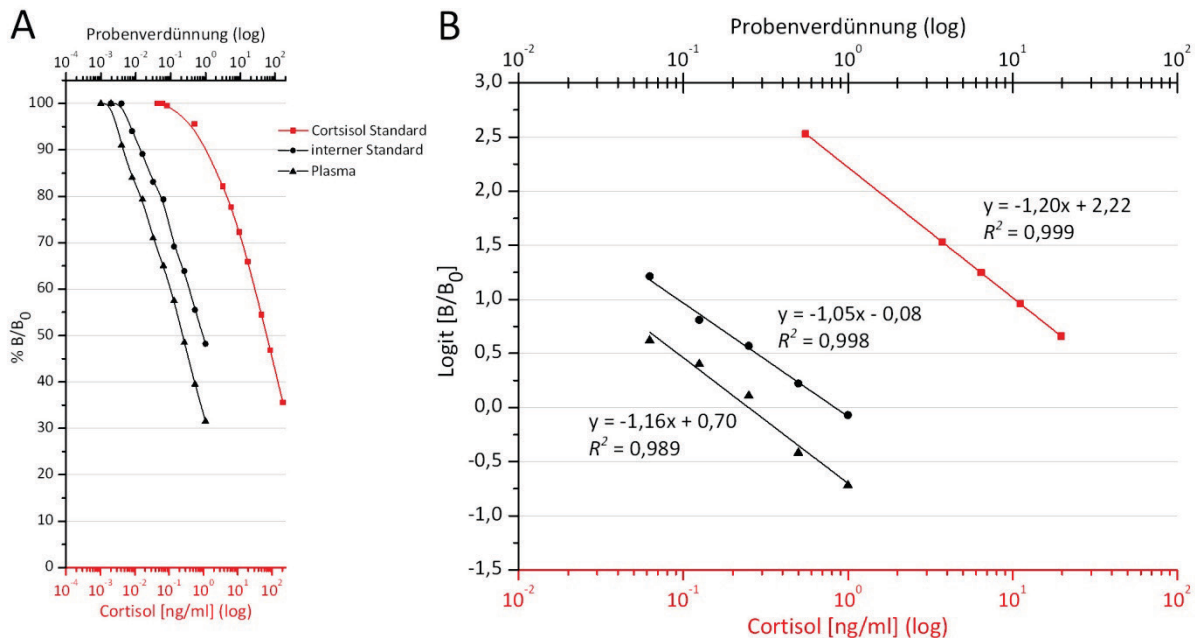


Abbildung 3.21: Kompetitive Bindungskurven

A) Dargestellt sind die logarithmisch aufgetragenen kompetitiven Bindungskurven ($\%B/B_0$) zwischen Tracer und Proben- bzw. Standardcortisol um den 2. Ak. Alle drei Kurven deuten einen sigmoiden Verlauf an und bestätigen somit das kompetitive Verhältnis.

B) Korrespondierende Linearisierung der in Abbildungsteil A dargestellten Bindungskurven. Abgebildet sind die mittels Logit-Funktion transformierten prozentualen Bindungsverhältnisse ($\%B/B_0$) zwischen 30 und 80 %. Die berechneten Steigungen von $m = -1,20$ für die Standardreihe, $m = -1,05$ für den seriell verdünnten internen Standard und $m = -1,16$ für die seriell verdünnte Plasmaprobe zeigen keine signifikanten Unterschiede und deuten somit auf einheitliche Antikörper-Antigen-Reaktionen hin.

Da zur Berechnung der Plasmacortisolkonzentrationen lediglich die prozentualen Bindungsverhältnisse ($\%B/B_0$) der Standardkurven aus dem linearen Bereich (zwischen 30 und 80 %) herangezogen wurden, ließ sich der Messbereich zwischen 5,33 und 0,08 ng/ml definieren.

3.4.2 Quantifizierung der Plasmacortisolkonzentrationen

Da eine Blutentnahme nur bei vollständig betäubten bzw. getöteten Tilapien durchgeführt wurde, sind nachfolgend ausschließlich die Plasmacortisollevel wirksamer Narkosemittelkonzentrationen und die der Kontrolltiere angegeben. In Abbildung 3.22A-C sind jeweils negative Korrelationen zwischen den verabreichten Narkosemittelkonzentrationen und dem resultierenden Plasmacortisol zu erkennen. Diese belegen, dass Steigerungen der Wirkstoffkonzentrationen mit geringeren Plasmacortisolwerten einhergehen. So konnten mit 79,7 ng/ml ($\pm 18,8$; A), 75,2 ng/ml ($\pm 30,8$; B) bzw. 83,9 ng/ml ($\pm 25,8$; C) die höchsten Plasmacortisollevel in jenen Tieren nachgewiesen werden, die mit den niedrigsten anästhetisch wirksamen Narkosemittelkonzentrationen von 40 mg/kg Ketamin sowie

Mischungen aus 15 mg/kg Ketamin und 0,5 mg/kg Detomidin bzw. 25 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin behandelt wurden. Varianzanalysen bestätigten in allen drei Fällen signifikante Unterschiede zwischen den bestimmten Plasmacortisolkonzentrationen hervorgerufen durch die Gabe der MED und den Cortisolkonzentrationen der Kontrolltiere ($22,1 \text{ ng/ml} \pm 4,0$) bzw. der Tiere mit maximaler Wirkstoffadministration ($38,7 \text{ ng/ml} \pm 13,9$, Ketamin; $24,5 \text{ ng/ml} \pm 8,5$, Ketamin-Detomidin; $21,2 \text{ ng/ml} \pm 8,5$, Ketamin-Xylazin).

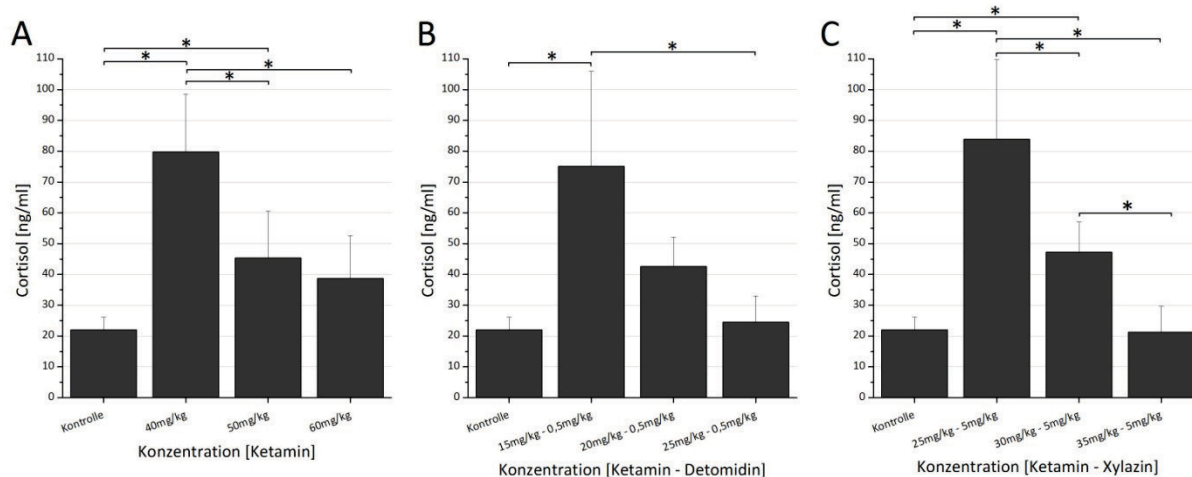


Abbildung 3.22: Plasmacortisolkonzentrationen

Dargestellt sind die via ELISA bestimmten Plasmacortisolkonzentrationen der Kontrollgruppe und jene der mit verschiedenen Wirkstoffen (A: Ketamin, B: Ketamin-Detomidin, C: Ketamin-Xylazin) und Konzentrationen behandelten Tilapien ($n = 6$). Standardabweichungen und signifikante Unterschiede zwischen den Datenreihen (*) sind angegeben.

Bei weiteren Varianzanalysen zwischen den Testgruppen der Ketamin-Detomidin-Reihe konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Im Gegensatz hierzu können innerhalb der Ketamin bzw. Ketamin-Xylazin-Reihen weitere signifikante Unterschiede der gemessenen Cortisolkonzentrationen aufgezeigt werden. So konnten neben signifikant höheren Cortisolwerten nach Applikation der MED gegenüber allen anderen Datenreihen auch cortisolbezogene Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mittleren Wirkstoffkonzentrationen gefunden werden. Zusätzlich musste die Nullhypothese beim gewählten Signifikanzniveau α von 0,05 auch zwischen der mittleren und maximal untersuchten Narkosemittelkonzentration in der Ketamin-Xylazin-Reihe verworfen werden. Beim Vergleich aller Testreihen ist eine deutliche Homogenität zwischen den Messwerten zu erkennen. Die Verabreichung der MED sowie der mittleren und maximal untersuchten Wirkdosen resultierte im Inter-Assay-Vergleich in nicht signifikant unterscheidbaren Cortisolkonzentrationen.

3.4.3 Quantifizierung der Katecholaminkonzentrationen

Auch die Plasmakonzentrationen der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin wurden nur bei den vollständig betäubten bzw. getöteten Tilapien quantifiziert. Aufgrund der steten Zugabe und gleichzeitigen Messung eines internen Standards zu allen Plasmaproben und der täglichen Konzentrations-

überprüfung neu angesetzter Standardlösungen konnten die Wiederfindungsraten jeder einzelnen Probe berechnet und auf weitere Evaluierungen der Messmethode verzichtet werden.

Die gewonnenen Ergebnisse und deren zugehörige Standardabweichung – dargestellt in Abbildung 3.23A, B & C – verdeutlichen die große Streubreite der detektierten Plasmaadrenalin-konzentrationen innerhalb der Messreihen. Zwar ist eine ähnliche Tendenz hin zu einer höheren Adrenalin-konzentration nach Verabreichung niedriger Wirkstoffdosen, wie bereits zuvor bei der Cortisol-messreihe, zu erkennen, jedoch konnte die angenommene Nullhypothese in keinem der untersuchten Fälle verworfen werden.

Im untersuchten Tilapiaplasma konnten Adrenalin-konzentrationen zwischen 2,7 und 18,9 nM gemessen werden. Die Kontrolltiere wiesen mit einer durchschnittlichen Konzentration von 3,5 nM ($\pm 2,2$), mit Ausnahme der Ketaminreihe (2,7 nM $\pm 4,2$ nach Gabe von 60 mg/kg Ketamin), die geringsten Plasmawerte auf.

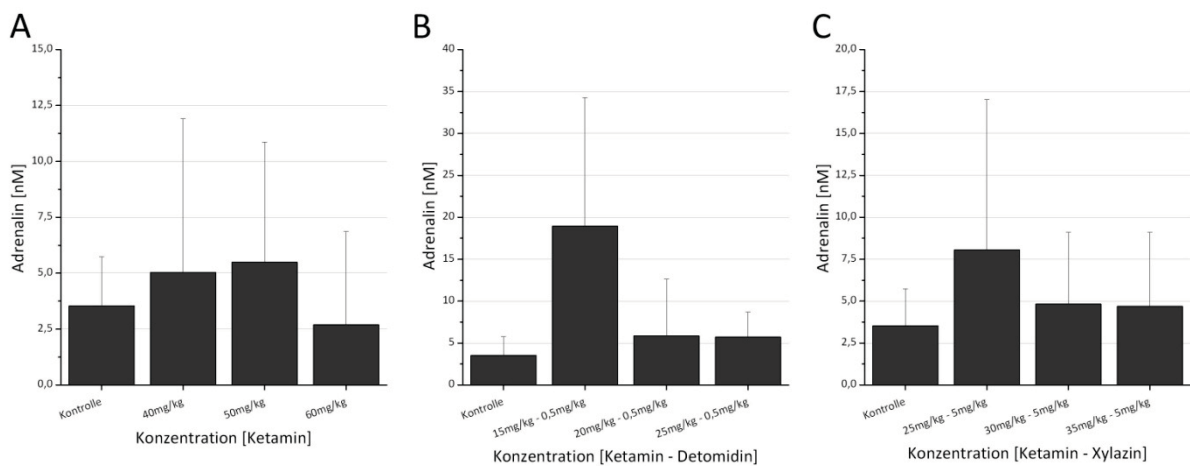


Abbildung 3.23: Plasmaadrenalin-konzentrationen

Dargestellt sind die via HPLC bestimmten Plasmaadrenalin-konzentrationen der Kontrollgruppe und die der mit verschiedenen Wirkstoffen (A: Ketamin, B: Ketamin-Detomidin, C: Ketamin-Xylazin) und Konzentrationen behandelten Tilapien. Zwischen den Datenreihen ($n = 6$) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Fehlerbalken indizieren die jeweilige Standardabweichung.

Bis auf die Kontrolltiere in denen 4,0 nM ($\pm 0,97$) **Noradrenalin** nachgewiesen werden konnte, war in keiner weiteren untersuchten Plasmaproben das als Neurotransmitter und Hormon fungierende Katecholamin zu finden.

3.5 Injektionsnarkose am Blauflossen-Thunfisch

Von den insgesamt 22 behandelten Versuchstieren konnten durch Injektionsnarkose lediglich drei Fische ausreichend narkotisiert werden, so dass Untersuchungen bzw. Probennahmen möglich waren. Eine intramuskuläre Applikation der Injektionslösungen mit einem Volumen von bis zu 5 ml erwies sich nach fünf untersuchten Thunfischen schnell als nicht praktikabel. Nach der Injektion konnte

bei allen fünf Tieren ein schnelles Austreten der mit Hilfe von Lebensmittelfarbe angefärbten Narkoselösungen aus der Einstichstelle beobachtet werden. Diese Beobachtung zeigte sich unabhängig vom verwendeten Kanülenmodell. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde versucht, alle weiteren Injektionen in den Intraperitonealraum zu verabreichen.

Bei zuvor geschlachteten Fischen ähnlicher Größe, wie die zur Verfügung gestellten Versuchstiere, wurde die Dicke der Bauchdecke bestimmt. Bei einer durchschnittlichen Dicke von 4,5 cm ($\pm 0,5$) mussten Kanülen mit einer Länge von mindestens 6 cm eingesetzt werden, um den Intraperitonealraum zu erreichen.

Drei Hauptprobleme kristallisierten sich während der durchgeführten intraperitonealen Narkoseversuche heraus:

1. Das Fischgewicht und damit auch gleichzeitig die injizierten Wirkstoffkonzentrationen konnten nur abgeschätzt werden. Da der Gewichtsunterschied innerhalb eines Versuchskäfigs zum Teil bis zu 30 kg betrug, war eine sukzessive Annäherung an die optimale Dosis schwer zu bewerkstelligen.
2. Wurde die Bauchhöhle verfehlt, oder war der Einstichwinkel zu flach, trat ein Teil der Injektionslösung wieder aus, wodurch es unmöglich wurde, die im Fisch verbliebene Dosis zu bestimmen. Dieses Problem wurde bei mindestens fünf Versuchstieren beobachtet.
3. Mindestens sechs der verwendeten Kanülen mit einer Länge von 6 cm verbogen sich oder brachen während des Injektionsvorgangs ab. Ähnlich dem zuvor beschriebenen Problem konnte in einem solchen Fall nicht länger von einer vollständigen Wirkstoffapplikation ausgegangen werden.

Alle intraperitonealen Narkoseversuche wurden mit Gemischen aus Ketamin-Detomidin bzw. Ketamin-Xylazin durchgeführt. Verabreicht wurden Dosen zwischen 200 mg Ketamin mit 25 mg Detomidin und 2700 mg Ketamin mit 50 mg Detomidin (4 mg/kg Ketamin mit 0,5 mg/kg Detomidin bis 54 mg/kg Ketamin mit 1 mg/kg Detomidin bei einem 50 kg schweren Fisch) sowie Ketamin-Xylazindosen zwischen 400 mg Ketamin mit 300 mg Xylazin und 600 mg Ketamin mit 600 mg Xylazin (8 mg/kg Ketamin mit 6 mg/kg Xylazin bis 12 mg/kg Ketamin mit 12 mg/kg Xylazin bei einem 50 kg schweren Fisch).

Als wirksam erwiesen sich Konzentrationen von 7,1 mg/kg Ketamin mit 0,45 mg/kg Detomidin bei einem 55 kg schweren und 142 cm langen Fisch (Tier 1), 21,4 mg/kg Ketamin mit 0,36 mg/kg Detomidin bei einem 56 kg schweren und 145 cm langen Fisch (Tier 2) sowie ein Gemisch aus 43,2 mg/kg Ketamin mit 0,8 mg/kg Detomidin bei einem 62,5 kg schweren und 157 cm langen Fisch (Tier 3). Alle drei Tiere konnten ca. 30 min nach erfolgter Wirkstoffinjektion von Tauchern in eine Trage geführt und per Boots Kran an Bord gehievt werden. Nach maximal 3 min, in denen die Fische künstlich beatmet, vermessen und beprobt wurden, erfolgte die Rückführung in den Versuchskäfig. Innerhalb von 10 min, in denen den Fischen beim Schwimmen assistiert wurde, erfolgte das Wiedererwachen aus der Narkose bei den Tieren 1 und 2. Das 3. Versuchstier verstarb etwa 15 min nach Rückführung in den Käfig. 24 h nach dem Versuch konnte zusätzlich der Tod des 1. Thunfischs festgestellt werden.

Wie bereits zuvor an Tilapien beobachtet, war eine deutliche Entfärbung der mit Detomidin behandelten Fische zu erkennen. Zusätzlich verlangsamten drei Fische, denen eine erfolgreiche Injektion gesetzt wurde, ihre Schwimmggeschwindigkeit und fielen deutlich aus dem im Käfig kreisenden Schwarm zurück. Jedoch erholten sich diese leicht sedierten Tiere wieder von der Narkosewirkung, ohne dass diese zur weiteren Behandlung an Bord gebracht werden konnten.

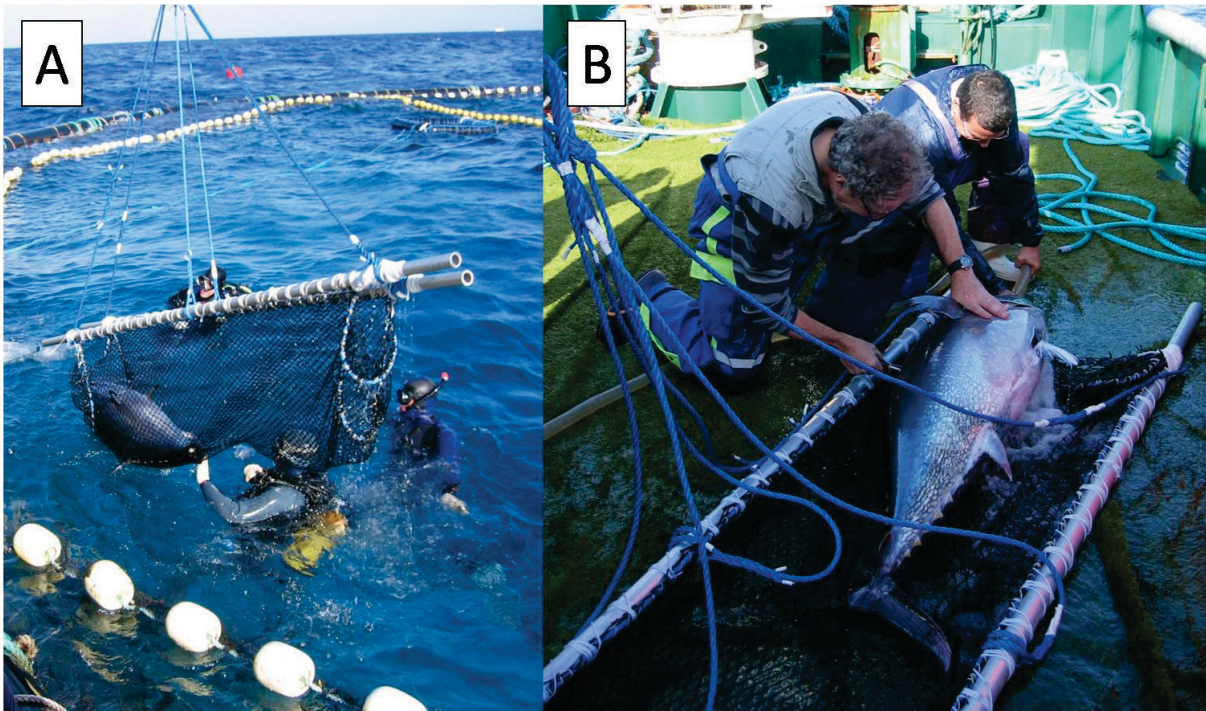


Abbildung 3.24: Behandlung eines narkotisierten Blauflossen-Thunfisches

A: Bergungsvorgang eines betäubten Thunfisches aus dem mit einem Stellnetz halbierten Versuchskäfig. Mit Hilfe eines Bootskrans wurde die Trage samt Fisch an Bord gehievt. Durch eine integrierte Hängewaage fand simultan dazu die Gewichtsbestimmung statt. **B:** Sobald der Fisch auf dem Deck lag, wurde mit der künstlichen Beatmung sowie mit der Vermessung, Markierung und Probennahme begonnen.

3.6 Individuenidentifizierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Mit Hilfe aller unter Absatz 2.7.1.1 beschriebenen Primerpaare konnten scharf abgegrenzte, definierte Banden im erwarteten Größenbereich amplifiziert werden (vgl. Abbildung 3.25). Um eine allgemeine Vergleichbarkeit der Restriktionsverdauung zu gewährleisten und aufgrund einer besseren Visualisierbarkeit der Restriktionsfragmente, wurden alle RFLP-Versuche mit den 2003 bp langen PCR-Produkten (Primerpaar *T.t. d-loop long F* und *R*) durchgeführt.

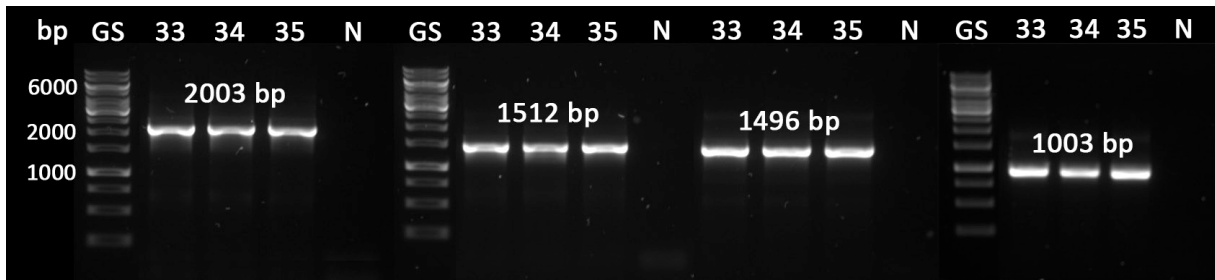


Abbildung 3.25: Funktionalitäts- und Spezifitätstests verwendeter d-loop-Primerpaare

Dargestellt ist ein Zusammenschnitt aus drei Agarosegelen (jeweils 1,5 %) mit je 1 kb Größenstandards (GS, 2,5 μ l, GeneRuler, Fermentas) nach jeweiliger 30-minütiger elektrophoretischer Auftrennung bei 100 V. Von links nach rechts aufgetragen sind die PCR-Produkte (5 μ l) der Primerpaare *T.t. d-loop long F* und *R* (Größe 2003 bp), *T.t. d-loop long F* und *T.t. d-loop short R* (Größe 1512 bp), *T.t. d-loop short F* und *T.t. d-loop long R* (Größe 1496 bp) sowie *T.t. d-loop short F* und *R* (Größe 1003 bp) von jeweils drei Blauflossen-Thunfischen (MN#33, 34, 35). Leere Geltaschen zeigen die primerspezifischen Negativkontrollen (N).

Zur Detektion aller Haplotypen innerhalb der 20 Tiere umfassenden Stichprobe wurden die 14 Einzelverdaue und die beiden Mehrfachverdaue jeder DNA-Probe separat aufgetragen. Stellvertretend für die Ergebnisse der jeweils 16 Restriktionsverdaue sind die visualisierten Restriktionsmuster der Tiere MN#33, 34 und 35 in den Abbildungen 3.26 und 3.27 dargestellt.

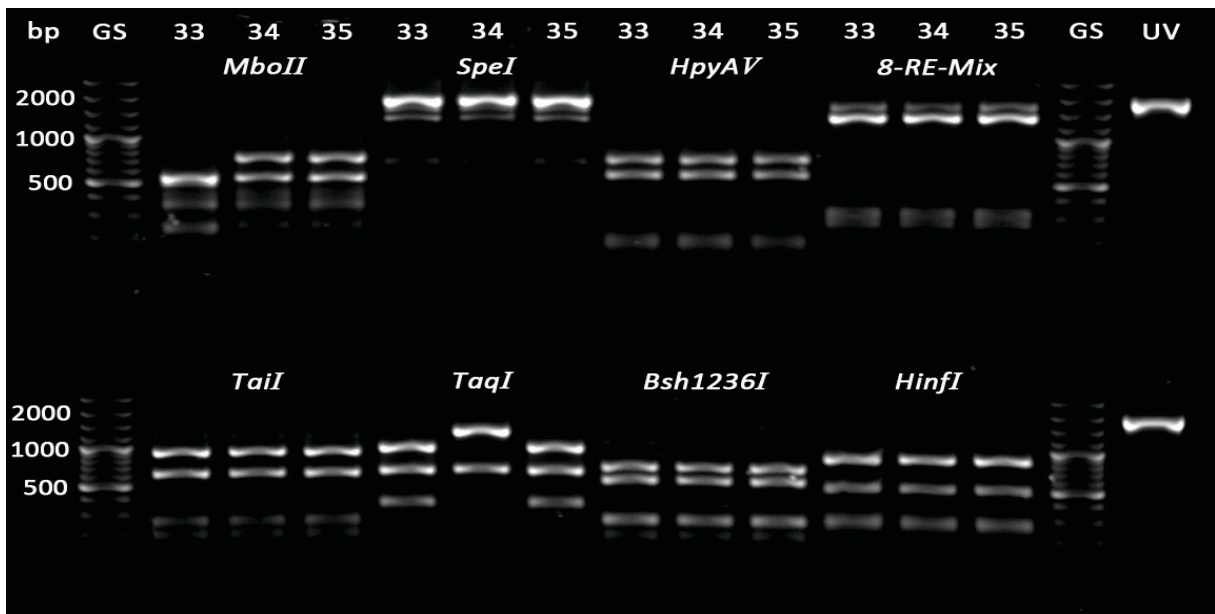


Abbildung 3.26: Restriktionsmuster der Versuchstiere MN#33, 34 und 35 (1)

Das dargestellte Agarosegel zeigt acht visualisierte Restriktionsverdaue (je 10 μ l) der Versuchstiere MN#33, 34 und 35. Die 2003 bp langen PCR-Produkte wurden mit folgenden Enzymen verdaut: 1. Zeile: *MboII*, *SpeI*, *HpyAV*, *8-RE-Mix*; 2. Zeile: *TaiI*, *TaqI*, *Bsh1236I*, *HinfI*. Zusätzlich sind in den Geltaschen 1 und 14 jeder Zeile 3 μ l eines 100 bp Größenstandards (GS, GeneRuler Plus, Fermentas) sowie in den Taschen 15 je 5 μ l des unverdauten PCR-Produkts (UV) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 45 min bei 100 V auf einem 1,5 %igen Agarosegel.

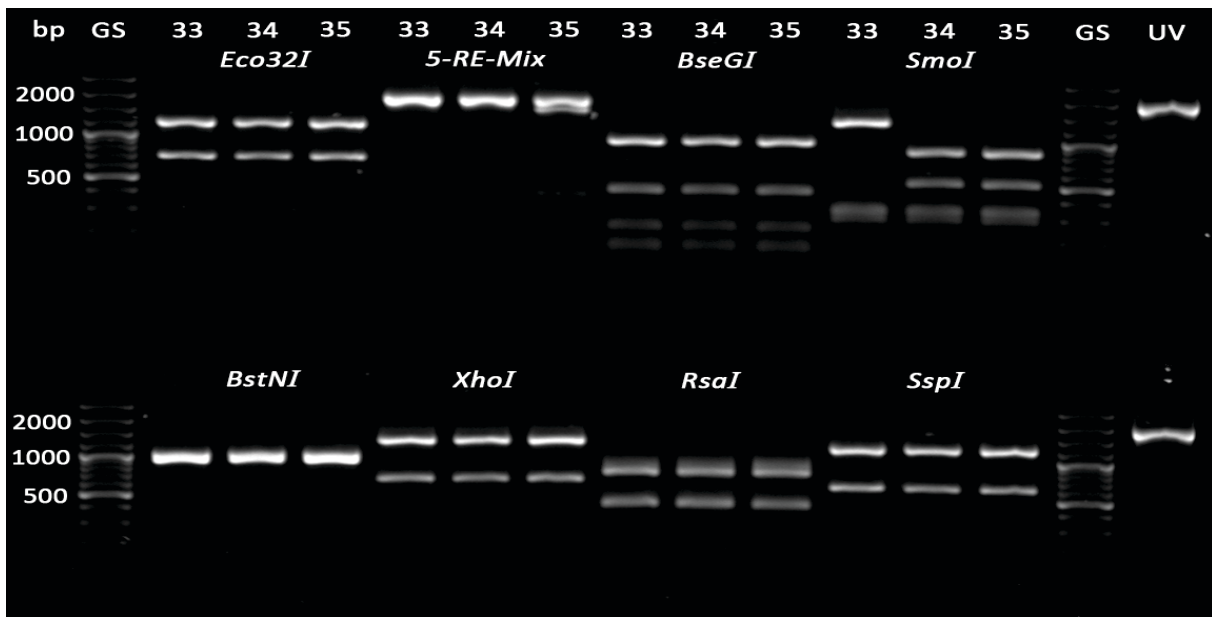


Abbildung 3.27: Restriktionsmuster der Versuchstiere MN#33, 34 und 35 (2)

Das dargestellte Agarosegel zeigt weitere acht visualisierte Restriktionsverdauungen (je 10 µl) der Versuchstiere MN#33, 34 und 35. Die 2003 bp langen PCR-Produkte wurden mit folgenden Enzymen verdaut: 1. Zeile: *Eco32I*, *5-RE-Mix*, *BseGI*, *SmoI*; 2. Zeile: *BstNI*, *XhoI*, *RsaI*, *SspI*. Zusätzlich sind in den Geltaschen 1 und 14 jeder Zeile 3 µl eines 100 bp Größenstandards (GS, GeneRuler Plus, Fermentas) sowie in den Taschen 15 je 5 µl des unverdauten PCR-Produkts (UV) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 45 min bei 100 V auf einem 1,5 %igen Agarosegel.

Um die Versuchsergebnisse besser vergleichen zu können, wurden die visualisierten Restriktionsmuster in Tabelle 3.3 zusammengefasst und mit Buchstaben (A, B) codiert. Bei keinem der verwendeten Restriktionsenzyme wurden mehr als zwei verschiedene Schnittmuster beobachtet.

Tabelle 3.3: Observierte Haplotypenmuster

Aufgelistet sind die bestimmten Haplotypen innerhalb der 20 untersuchten Thunfischindividuen. Das Restriktionsfragmentmuster wurde mit den Buchstaben A und B beschrieben.

Haplotyp	<i>MboII</i>	<i>SpeI</i>	<i>HpyAV</i>	<i>8-RE-Mix</i>	<i>TaiI</i>	<i>TaqI</i>	<i>Bsh1236I</i>	<i>HinfI</i>
1	A	A	A	A	A	A	A	A
2	B	A	A	A	A	A	A	A
3	A	A	A	A	A	B	A	A
4	A	A	A	A	A	A	A	A
5	A	A	A	A	A	A	A	A
Haplotyp	<i>Eco32I</i>	<i>5-RE-Mix</i>	<i>BseGI</i>	<i>SmoI</i>	<i>BstNI</i>	<i>XhoI</i>	<i>RsaI</i>	<i>SspI</i>
1	A	A	A	A	A	A	A	A
2	A	A	A	B	A	A	A	A
3	A	A	A	A	A	A	A	A
4	A	A	A	A	A	A	B	A
5	A	B	A	A	A	A	A	A

Anhand Tabelle 3.3 wird ersichtlich, dass innerhalb der 20 untersuchten Fische fünf verschiedene Restriktionsmuster vorzufinden waren. Eine eindeutige Identifizierung jedes einzelnen Individuums konnte mittels RFLP-Technik nicht bewerkstelligt werden.

Jedoch ist zu beobachten, dass keiner der bestimmten Haplotypen eindeutig dominierte. Neben fünf Tieren, die Haplotyp 1 zugeordnet werden konnten, bildeten die Haplotypen 2 und 3 mit jeweils vier Individuen die zweitstärksten Gruppen. Mit drei bzw. zwei Tieren zählten die wenigsten Individuen zu den Haplotypgruppen 4 und 5.

3.7 Speziesidentifizierung mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

Bei allen untersuchten Individuen des Tribus *Thunnini* (n = 182) konnte die *COXI*-Region mittels des gewählten Primerpaars erfolgreich aus Muskel-, Ei- bzw. Flossen-DNA-Extrakten amplifiziert werden. Zudem konnten trotz dreier Basenfehlpaarungen zwischen den veröffentlichten Sequenzen des Bonitos und des verwendeten Rückwärtsprimers, Amplifikate passender Größe aus allen fünf Bonito-DNA-Extrakten gewonnen werden (vgl. Abbildung 3.28).

Auf nachstehenden Gelbildern ist die Probenherkunft wie folgt abgekürzt: B = Bali, CR = Kroaten, H = Hawaii, M = Malta, V = Vibo.

Die sechs untersuchten Spezies waren: NBFT = Atlantischer Blauflossen-Thunfisch (n = 117), YFT = Gelbflossen-Thunfisch (n = 19), BET = Großaugen-Thunfisch (n = 5), AT = Weißer-Thunfisch (n = 12), SBFT = Pazifischer Blauflossen-Thunfisch (n = 24), SJT = Echter Bonito (n = 5).

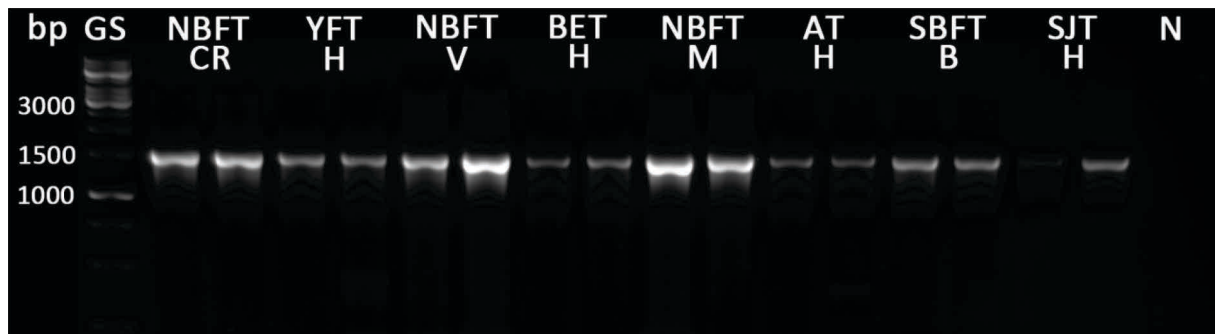


Abbildung 3.28: Funktionalitäts- und Spezifitätstests des verwendeten *COXI*-Primerpaars

Abgebildet ist das visualisierte Resultat 16 individueller PCR-Ansätze mit Größenstandard (GS, 2,5 µl, 1 kb GeneRuler, Fermentas) und Negativkontrolle (N). Mit den spezifischen *COXI*-Primern konnte aus allen verwendeten DNA-Extrakten das gewünschte PCR-Produkt mit einer Länge von 1545 bp amplifiziert werden. Pro Art und Standort wurden jeweils zwei Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (je 5 µl) erfolgte für 30 min bei 100 V auf einem 1,5 %igen Agarosegel.

Nachfolgend sind die Resultate der Restriktionsverdauung an zwei bis sechs Individuen jeder Art dargestellt. Die abgebildeten Ergebnisse stehen exemplarisch für die Gesamtheit aller untersuchten Proben.

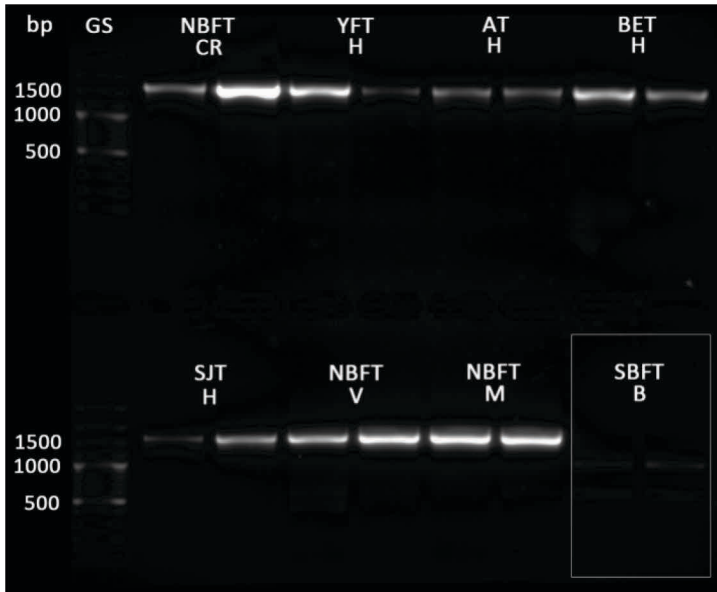


Abbildung 3.29: COXI-Restrictionsverdau mit dem Enzym *XcmI*
 Ein Restriktionsverdau der 1545 bp langen Ausgangssequenz mit dem Enzym *XcmI* konnte nur beim SBFT festgestellt werden (eingerahmt). Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (je 8 μ l) erfolgte für 30 min bei 100 V auf einem 1,5 %igen Agarosegel. Größenstandards (GS) je 3 μ l 100 bp GeneRuler Plus (Fermentas).

XcmI-Verdau

Alle 24 untersuchten Proben des Südlichen Blauflossen-Thunfischs (SBFT, *Thunnus maccoyii*) konnten eindeutig über das resultierende Restriktionsmuster nach *XcmI*-Verdau identifiziert werden. Im Gegensatz zu den anderen fünf untersuchten Arten, bei denen keine Erkennungssequenz für das Enzym *XcmI* in der amplifizierten COXI-Region vorzufinden war, wurde das 1545 bp lange PCR-Produkt beim SBFT in ein \sim 950- und ein \sim 600-Basenpaarfragment gespalten (vgl. Abbildung 3.29).

BseGI-Verdau

Anhand eines Restriktionsverdaus mit dem Enzym *BseGI* konnten alle zwölf Proben des Weißen-Thunfischs (AT, *Thunnus alalunga*) sowie die fünf Gewebeproben des Bonitos (SJT, *Katsuwonus pelamis*) durch ein artspezifisches Schnittmuster identifiziert werden. Im Gegensatz zu den drei vorhandenen *BseGI*-Erkennungssequenzen beim NBFT, SBFT, BET und YFT und den daraus resultierenden vier Banden (619, 610, 199 und 117 bp) konnten beim Weißen-Thunfisch vier Schnittstellen respektive fünf Banden sowie fünf Schnittstellen respektive sechs Banden beim Bonito identifiziert werden (vgl. Abbildung 3.30 links).

BccI-Verdau

Der Verdau mit dem Enzym *BccI* zeigte bei allen Arten der Gattung *Thunnus* ein identisches Restriktionsmuster mit zwei Banden (845 und 700 bp). Im Gegensatz dazu konnten beim Bonito deutlich mehr *BccI*-Erkennungssequenzen innerhalb der COXI-Region nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.30 rechts). Damit ist anhand des hieraus hervorgehenden spezifischen Bandenprofils eine eindeutige Identifizierung des Bonitos möglich.

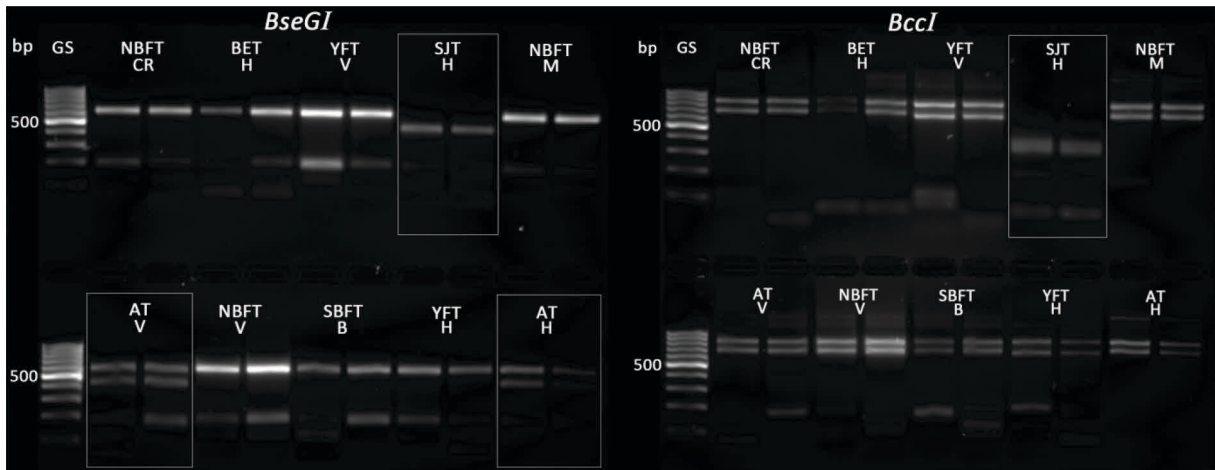


Abbildung 3.30: *COXI*-Restriktionsverdaue mit den Enzymen *BseGI* und *BccI*

Anhand der visualisierten Restriktionsverdaue der 1545 bp langen Ausgangssequenzen mit dem Enzyme *BseGI* (links) konnten DNA-Proben des Weißen-Thunfischs und des Bonitos eindeutig identifiziert werden. Gewebeproben des Bonitos konnten zusätzlich durch Restriktion der *COXI*-Region mit dem Enzym *BccI* (rechts) von allen anderen untersuchten Spezies abgegrenzt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (je 8 μ l) erfolgte für 30 min bei 100 V auf einem 1,5 %igen Agarosegel. Artsspezifische Restriktionsmuster sind eingerahmt. Größenstandards (GS) je 3 μ l 100 bp GeneRuler (Fermentas).

MnlI-Verdau

Neben den zuvor beschriebenen RE mit fünf bzw. sechs Basenpaar-Erkennungssequenzen wurde mit dem Enzym *MnlI*, dessen spezifische Erkennungssequenz lediglich vier Basenpaare umfasst, ein Enzym mit höherer Restriktionsfrequenz gewählt. Stellvertretend für die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.31 zwei Polyacrylamidgele dargestellt, welche die Auftrennung der *MnlI*-Restriktionsprodukte aller Arten und aller untersuchter Standorte zeigen. Beim Vergleich des Restriktionsmusters kann festgestellt werden, dass der Verdau der *COXI*-Region beim NBFT, AT, YFT und SJT zu einem artsspezifischen Restriktionsmuster führt. Lediglich beim Großaugen-Thunfisch und beim Südlichen Blauflossen-Thunfisch konnten über *MnlI*-Verdau identische Restriktionsfragmente identifiziert werden.

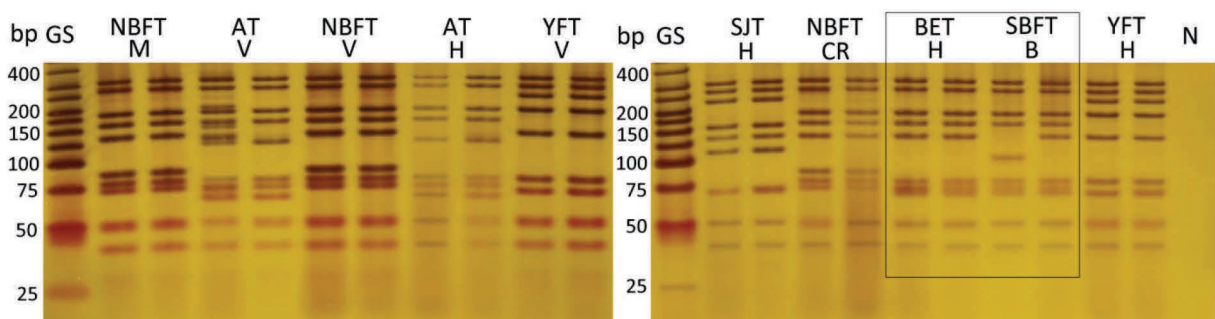


Abbildung 3.31: *COXI*-Restriktionsverdaue mit dem Enzym *MnlI*

Der Verdau der jeweils 1545 bp langen Ausgangssequenz resultierte in artsspezifischen Restriktionsmustern beim NBFT, AT, YFT und SJT. Alle fünf BET-Individuen sowie 23 SBFT-Individuen zeigten ein identisches Schnittmuster. Bei einem SBFT-Individuum (linke der beiden SBFT-Geltaschen) konnte ein abweichendes Restriktionsmuster, gleichzusetzen mit einem zweiten Haplotyp, gefunden werden. Artunspezifische Bandenmuster

sind eingerahmt. Größenstandards (GS) je 1 µl HyperLadder V (Bioline). Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (je 2 µl) erfolgte für 45 min bei 200 V auf NuPAGE Novex Bis-Tris Mini-Gelen, 4-12 %. N = Negativkontrolle.

MnlI- und XcmI-Doppelverdau

Anhand der bis dato gesammelten Ergebnisse wurde angestrebt alle Spezies per Doppelverdau mit den Enzymen *MnlI* und *XcmI* eindeutig zu identifizieren. Die Ergebnisse einer solchen Mehrfachrestriktion sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

Allen sechs untersuchten Spezies konnte mittels *MnlI/XcmI*-Doppelverdau ein artspezifisches jedoch populationsunabhängiges Restriktionsfragmentmuster zugeordnet werden. Die Sicherheit der Methode konnte durch 100 %ige Zuordnung der 182 Muskel-, Flossen- und Eiprobe verifiziert werden. Zusätzlich konnten 20 unbekannte Proben in einem Blindversuch der jeweils richtigen Spezies zugeordnet werden.

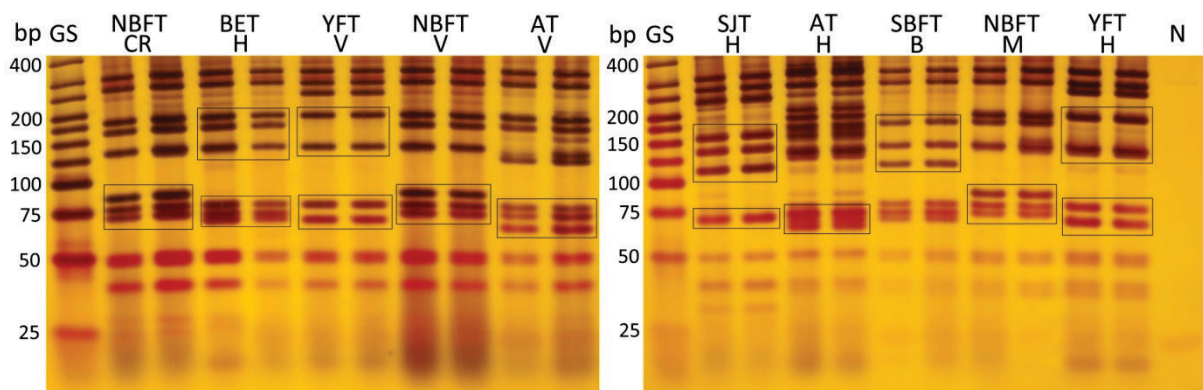


Abbildung 3.32: COXI-Doppelverdaue mit den Enzymen *MnlI/XcmI*

Der Doppelverdau der jeweils 1545 bp langen Ausgangssequenz resultierte in spezifischen Restriktionsmustern bei allen sechs Arten. Die jeweils spezieskennzeichnenden Bandenmuster sind eingerahmt. Aufgrund steigender Unschärfe wurde auf eine Auswertung unter 50 bp verzichtet. Größenstandards (GS) je 1 µl HyperLadder V (Bioline). Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (je 2,5 µl) erfolgte für 45 min bei 200 V auf 8 %igen Polyacrylamidgelen (Rotiphorese, Roth). N = Negativkontrolle.

Artspezifisches Restriktionsfragmentmuster der sechs Thunfischarten nach *MnlI/XcmI*-Doppelverdau:

Kürzel	Spezies	Bandenmuster
NBFT	Atlantischer Blauflossen-Thunfisch	Dreifachbande bei ca. 75, 80 und 90 bp
YFT	Gelbflossen-Thunfisch	Doppelbanden bei ca. 125 und 200 bp sowie 70 und 80 bp
AT	Weißer-Thunfisch	Dreifachbande bei ca. 60, 75 und 80 bp
SJT	Echter Bonito	Dreifachbande bei ca. 110, 130 und 160 bp, Einzelbande bei ca. 70 bp
SBFT	Pazifischer Blauflossen-Thunfisch	Dreifachbande bei ca. 125, 150 und 180 bp
BET	Großaugen-Thunfisch	Dreifachbande bei ca. 125, 160, 180 bp, Dreifachbande bei ca. 65, 70 und 80 bp

3.8 Elternschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels Mikrosatelliten-DNA-Analyse

Die Auswahl der acht Primerpaare, die für den Elternchaftstest herangezogen wurden, erfolgte anhand des observierten Amplifikationserfolgs sowie der Anzahl detektierter Allele. Hierzu wurden 13 Primerpaare an jeweils acht parentalen DNA-Proben getestet und der PCR-Erfolg überprüft. PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren *Tth-185* und *Tth-260* führten nicht zur Amplifikation der erwarteten Mikrosatelliten-Loci. Schwache oder unvollständige Amplifikationsprodukte wurden nach PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren *Tth-7-16*, *Tth-112* und *Tth-211* detektiert. Die in Tabelle 2.11 aufgelisteten Primer der Mikrosatelliten-Loci *Tth-004*, *Tth-152*, *Tth-208*, *Tth-217*, *Tth-1-31*, *Tth-265*, *Tth-254* und *Tth-62* gewährleisteten im durchgeführten Test einen umfassenden PCR-Erfolg. Die Vervielfältigung der acht ausgewählten Loci erfolgte bei allen 194 untersuchten Proben.

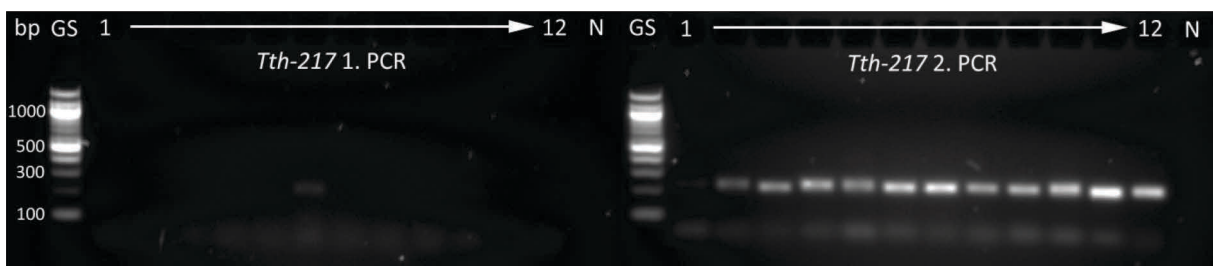


Abbildung 3.33: Überprüfung des PCR-Erfolgs mittels Agarose-Gelelektrophorese

Im Falle eines unzureichenden PCR-Erfolgs (linke Bildhälfte) wurde eine 2. PCR-Reaktion durchgeführt (rechte Bildhälfte). Im dargestellten Beispiel konnte durch die Reaktionswiederholung der Amplifikationserfolg von 12 Eiern des 19.06.2010 (Vibo) mit dem Primerpaar *Tth-217* sichergestellt werden. Vervielfältigte Mikrosatelliten sind in der rechten Bildhälfte im Bereich zwischen 220 und 250 bp zu erkennen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben (je 2,5 µl) erfolgte für 30 min bei 100 V auf einem 2 %igen Agarosegel. Größenstandards (GS) je 1,5 µl 100 bp GeneRuler Plus (Fermentas). N = Negativkontrolle.

Bei den Eiern der Laichtage 19.07.2010 (Vibo) sowie 25. und 26.06. (Malta) konnten nach durchgeführter PCR-Reaktion nur unzureichende Amplifikationen der Mikrosatelliten-Loci beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.33). In diesem Fall wurde eine zweite PCR-Reaktion mit dem jeweilig erzeugten PCR-Produkt als Template-DNA durchgeführt. Diese Vorgehensweise stellte sich als notwendig heraus, da auch durch eine Volumensteigerung des eingesetzten DNA-Templates keine Verbesserung des PCR-Erfolgs erzielt werden konnte. Nur durch eine Wiederholung der PCR-Reaktion konnte bei Eiern der drei erwähnten Laichtage gewährleistet werden eine ausreichende Amplifikatkonzentration zu generieren.

Mittels Kapillargelelektrophorese auf dem QIAxcel System wurden die Allellängen der zuvor amplifizierten Mikrosatelliten bestimmt. Aufgrund der mittels Agarose-Gelelektrophorese ermittelten Größenunterschiede der untersuchten Loci wurden pro Tier die PCR-Produkte der Mikrosatelliten *Tth-004/Tth-254*, *Tth-217/Tth-152*, *Tth-265/Tth-1-31* und *Tth-208/Tth-62* vor dem Auftragen auf das QIAxcel System im Verhältnis 1:1 gemischt. Demnach wurden für die Evaluierung aller Proben 776 Einzelläufe mit jeweils zwei Mikrosatelliten-Loci ausgewertet.

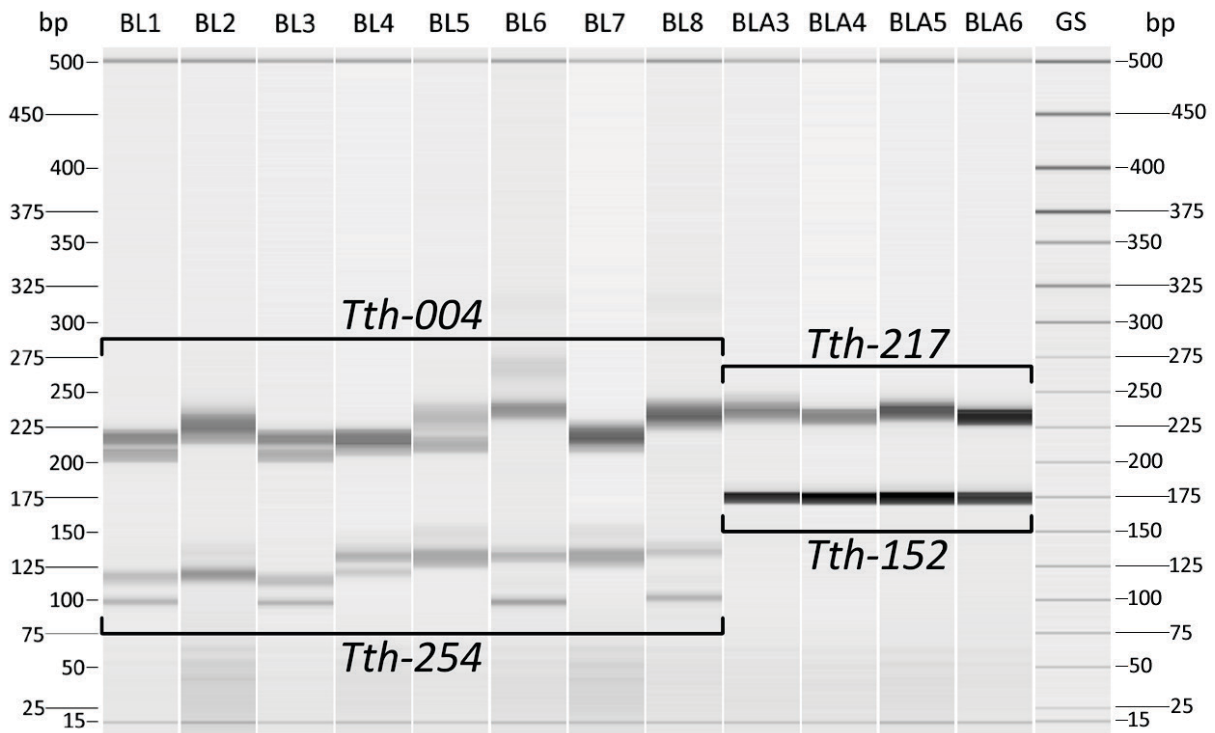


Abbildung 3.34: QIAxcel-Auswertung, virtuelle Gelbilder

Abgebildet ist ein mittels *BioCalculator* Software erstelltes virtuelles Gelbild. Zu erkennen sind die PCR-Produkte der Mikrosatelliten *Tth-004/Tth-254* für acht Jungfische ohne Anomalien (BL1-8), die PCR-Produkte der Mikrosatelliten *Tth-217/Tth-152* für vier Jungfische mit Anomalien (BLA3-6) und der verwendete Größenstandard (GS, QX DNA Size Marker) zwischen 25 und 450 bp. Zusätzlich ist in allen 13 Spalten der aufgetragene Alignmentmarker bei 15 bzw. 500 bp sichtbar, der den Messbereich begrenzte und zur Ausrichtung der Einzelläufe diente. Einzelbanden zeigen die Homozygotie eines Individuums im untersuchten Locus an, Doppelbanden spiegeln eine Heterozygotie wider.

Aufgrund der begrenzten Reliabilität des Messgeräts, dem Auftreten sogenannter Stotterbanden bzw. Stotterpeaks (Walsh *et al.*, 1996; Daniels *et al.*, 1998) und der sequenzunabhängigen Addition eines Adenosinmonophosphats an das 3'-Ende der PCR-Produkte (Plus-A Addition; Clark, 1988; Hu, 1993), wurde ein Toleranzbereich von 4 bp definiert, in dem detektierte Peaks zu einem Allel zusammengefasst wurden. Anhand der „gerundeten“ Allellängen und auf Basis des Programms *Colony2* wurden anschließend die Wahrscheinlichkeiten für mögliche Elternschaften sowie die Verwandtschaftsgrade zwischen den Nachkommen berechnet.

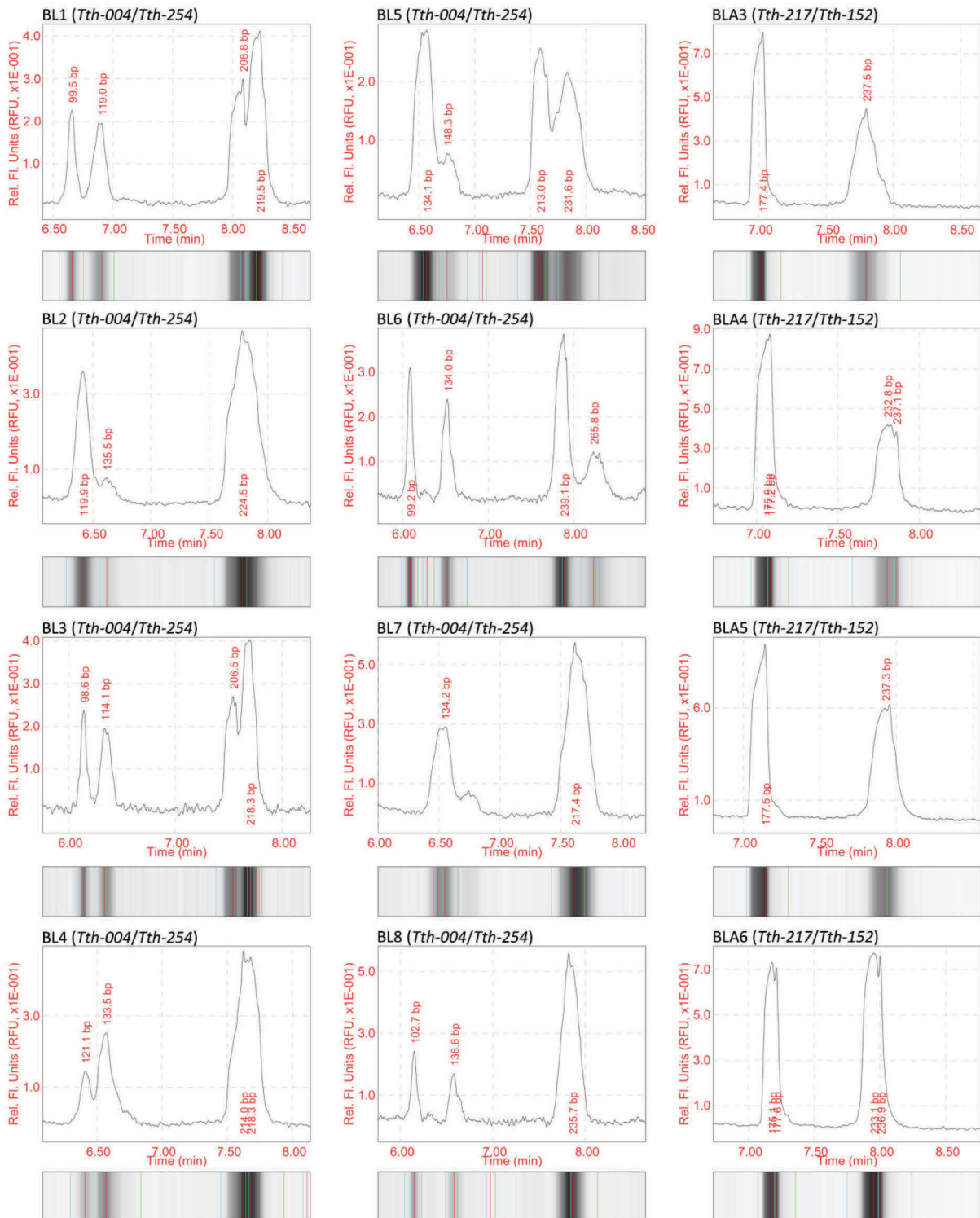


Abbildung 3.35: QIAxcel-Auswertung, Elektropherogramme

Dargestellt sind die Abbildung 3.34 zugehörigen Elektropherogramme (*BioCalculator* Software). Aufgetragen ist die jeweils detektierte Fluoreszenz (Relative Fluorescence Units, RFU) gegen die Laufzeit (Time [min]) der DNA-Fragmente in der Gelmatrix. Unterhalb von jedem Elektropherogramm ist zusätzlich ein horizontaler Ausschnitt des virtuellen Gelbilds abgebildet. Die Größe der detektierten DNA-Peaks wurde automatisch anhand der ermittelten Laufzeit des Größenstandards berechnet und angegeben. Homo- bzw. Heterozygoten sind anhand der Peakanzahl (1 bzw. 2) im erwarteten Größenbereich des jeweiligen Locus leicht abzulesen. So konnte z.B. bei der Probe BL1 eine Heterozygotie in beiden aufgetragenen Mikrostelliten-Loci detektiert werden. Versuchstier BL8 zeigte hingegen eine Homozygotie im Locus *Tth-004* und eine Heterozygotie im Locus *Tth-254*. Mit den Jungfischen BLA3-6 sind zusätzlich vier Proben zu erkennen, die zwei homozygote Loci aufwiesen.

Nachfolgend wird eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der Elternschaftsanalysen der Standorte Vibo und Malta des Jahres 2010 dargelegt. In den Abbildungen 3.36A-C und 3.39A-C sind die Ergebnisse der via *Colony* Software berechneten Wahrscheinlichkeiten aller untersuchten Reproduktionseignisse der Standorte Vibo und Malta (2010) visualisiert. Hierbei sind die observierten Vater- bzw. Mutterschaften, das Verwandtschaftsverhältnis der Nachkommen, ein umfassender Stammbaum (Abstammungsdiagramm) und die prozentuale Abtaichbeteiligung jeweils separat dargestellt. Übereinstimmungen innerhalb des eingegebenen Allelmusters zwischen Vater bzw. Mutter und Nachkomme von $p \geq 0,9$ führten hierbei zur Bestätigung einer möglichen Vater- oder Mutterschaft. Wurde ein Zuchttier mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 1$ als Vater- bzw. Muttertier identifiziert, erfolgte eine feste Zuordnung zum berechneten Geschlecht.

Observierte Elternschaften Vibo (2010)

Für den Standort Vibo konnte die Vaterschaft für 35 der 68 untersuchten Nachkommen zugeordnet werden (51,5 %). Ursächlich für die nicht 100 %ige Zuordnungsmöglichkeit der Nachkommen war die Tatsache, dass nicht alle Zuchtfische beprobt und damit untersucht werden konnten. Die berechneten 35 Vaterschaften teilen sich hierbei auf fünf der 23 in Frage kommenden Broodstocktiere auf (vgl. Abbildung 3.36A). Der Anteil berechneter Mutterschaften liegt mit 42 von 68 Nachkommen um 10,3 % höher als jener der identifizierten Vaterschaften. Zudem konnten sechs der untersuchten 23 Zuchtfische als potentielles Muttertier zugeordnet werden (vgl. Abbildung 3.36B). Wie Abbildung 3.36C zu entnehmen ist, teilten sich 53 der 68 Nachkommen (77,4 %) ein identisches Elternpaar. Zudem konnten 541 Möglichkeiten (23,7 %) zur Bildung von Halbgeschwisterpaaren berechnet werden, die zumindest ein Elternteil gemeinsam haben.

Aus dem 23 Tiere umfassenden Probenpool konnten mittels durchgeführter Mikrosatelliten-Analyse und anschließender Elternschaftsberechnung elf Fische direkt als Väter bzw. Mütter identifiziert werden. Anhand der parallel durchgeführten Kalkulation der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den untersuchten Nachkommen bestand die Möglichkeit, Wahrscheinlichkeiten für die Existenz weiterer hypothetischer Elterntiere zu folgern. Im Fall der untersuchten Reproduktionseignisse des Standorts Vibo konnten hierdurch zwei zusätzliche Mutter- bzw. drei weitere Vatertiere bestimmt werden. Ein umfassender Stammbaum (Abstammungsdiagramm), der einen Gesamtüberblick über die Elternschaft aller 48 untersuchten Eier sowie der 20 Jungfische liefert, ist in Abbildung 3.37 dargestellt.

Nachfolgende Probenkürzel der Reproduktionsanalyse Vibo (2010):

Kürzel	DNA-Probe
VB1-23	beprobte Elterntiere
BLA1-10	Proben gestorbener Jungfische mit Anomalien (n = 10)
BL1-10	Proben gestorbener Jungfische ohne Anomalien (n = 10)
16.07. 1-12	Eiprobe des 16.07.2010 (n = 12)
18.07. 1-12	Eiprobe des 18.07.2010 (n = 12)
19.07. 1-12	Eiprobe des 19.07.2010 (n = 12)

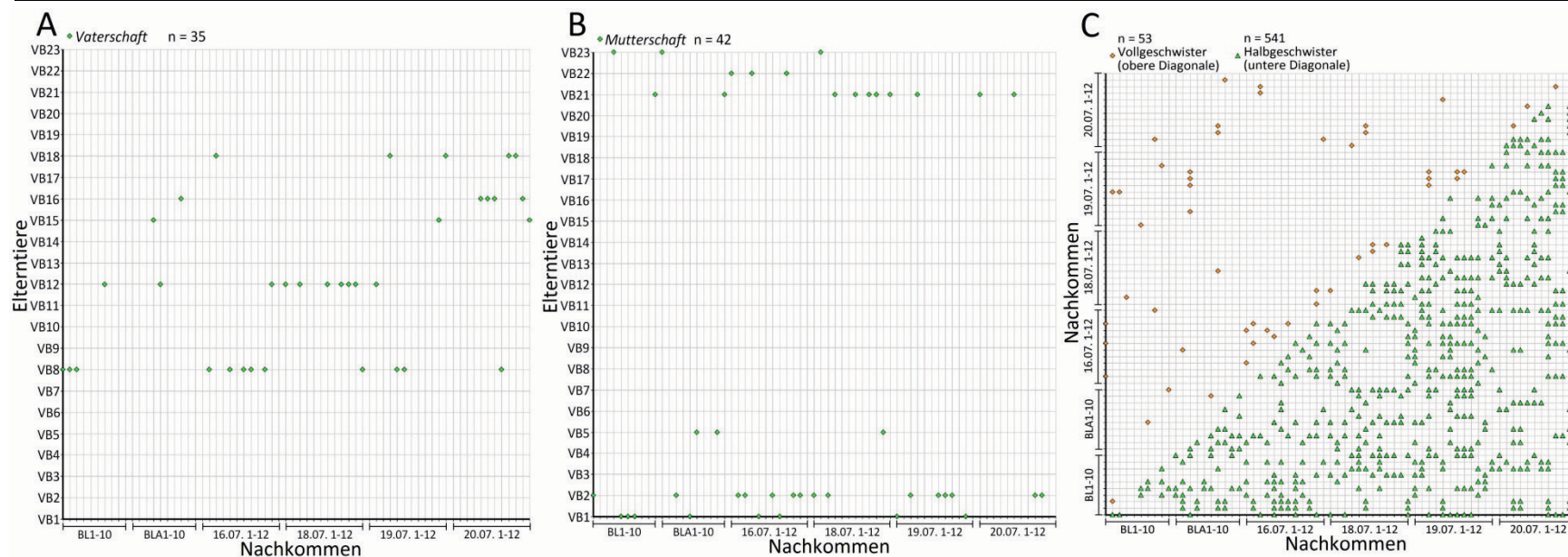


Abbildung 3.36A-C: Observierte Vaterschaften, Mutterschaften und Verwandtschaftsgrade zwischen den Nachkommen aller untersuchten Abblanchvorgänge (Vibo 2010)
 VB = Vibo Broodstock; BL = Jungfische ohne Anomalien (n = 10); BLA = Jungfische mit Anomalien (n = 10); 16., 18., 19. und 20.07. = untersuchte Laichtage mit je 12 Eiern (grafische Darstellung via *Colony* Software).

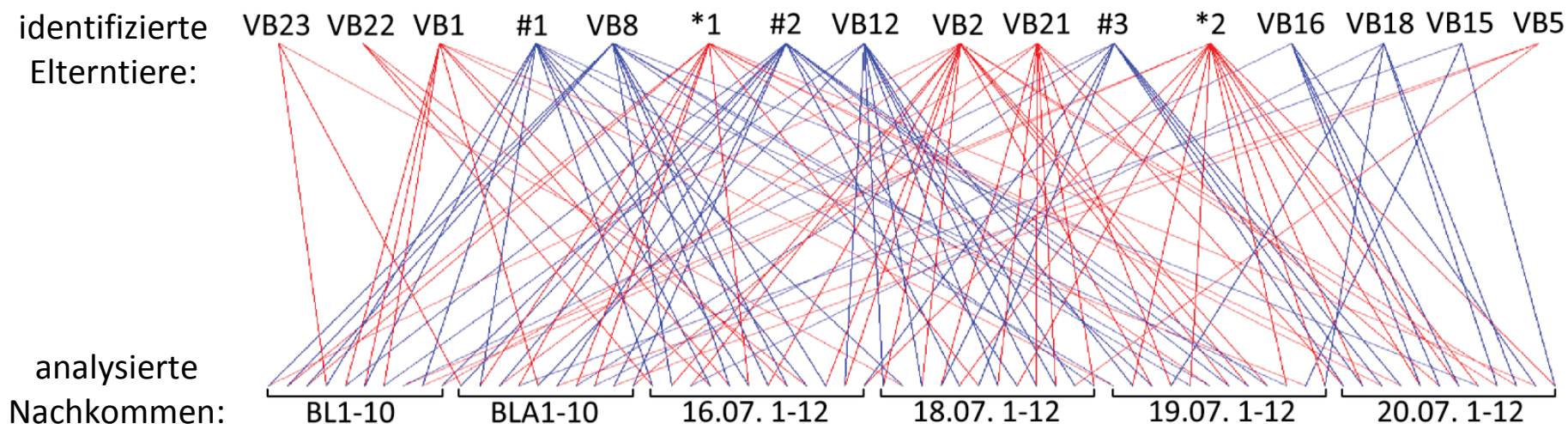


Abbildung 3.37: Abstammungsdiagramm der observierten und hypothetischen Elternschaften aller untersuchten Nachkommen (Vibo 2010)
 Rote Verbindungslinien zeigen die berechneten Mutterschaften, blaue Verbindungslinien die berechneten Vaterschaften an. Hypothetische Mütter sind mit einem Stern (*), hypothetische Väter mit einer Raute (#) gekennzeichnet. Abkürzungen siehe Beschriftung Abbildung 3.36 (grafische Darstellung via *Pedigree Viewer* Software).

Anhand des Abstammungsdiagramms konnte die prozentuale Beteiligung der einzelnen Zuchtfische am gesamten Reproduktionsvorgang berechnet werden. Wie den Abbildungen 3.38A und B zu entnehmen ist, verteilen sich sowohl die observierten Vater- als auch Mutterschaften auf je acht Tiere mit prozentualen Anteilen zwischen 4,41 bis 19,11 % für die Väter und 4,41 bis 22,06 % für die Mütter. Demnach waren von den geschätzten 30 Käfigtieren (vgl. Tabelle 2.1), von denen im Jahr 2010 20 Individuen mit einem Hormonimplantat versorgt wurden (je 10 Tiere am 13.06. und 06.07.), nachweislich 53,3 % am Fortpflanzungsprozess beteiligt.

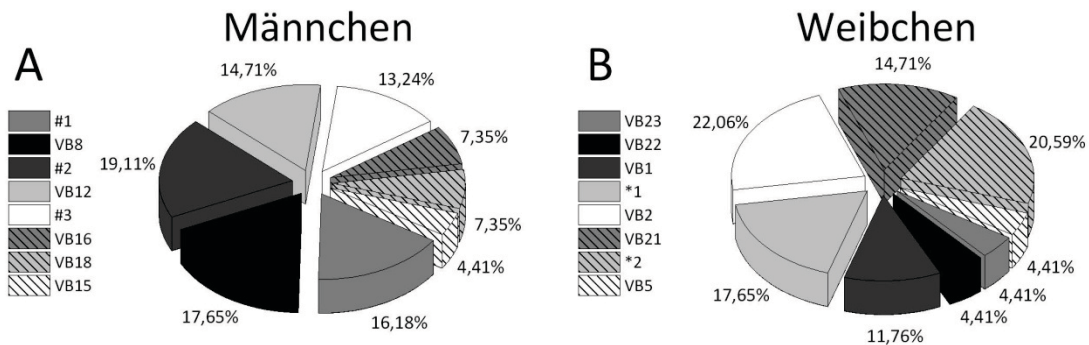


Abbildung 3.38: Prozentuale Reproduktionsbeteiligung männlicher (A) und weiblicher (B) Zuchtfische (Vibo)

In den abgebildeten Kreisdiagrammen sind die via Colony Software kalkulierten prozentualen Reproduktionsbeteiligungen männlicher (A) und weiblicher (B) Tiere des Standorts Vibo (2010) dargestellt. Die 68 untersuchten Nachkommen stellen 100 % dar. Hypothetische Mütter sind mit einem Stern (*), hypothetische Väter mit einer Raute (#) gekennzeichnet. VB = Vibo Broodstock.

Tabelle 3.4: Detektierte Allele und zugehörige Allelfrequenzen (Vibo)

Aufgelistet sind die via QIAXcel System detektierten und gerundeten Allele sowie deren zugehörige Allelfrequenz des Standorts Vibo (2010).

Allele Locus	Allel-frequenz	Allele Locus	Allel-frequenz	Allele Locus	Allel-frequenz	Allele Locus	Allel-frequenz
<i>Tth-62</i>		<i>Tth-208</i>		<i>Tth-254</i>		<i>Tth-004</i>	
87	0,1095	155	0,0474	99	0,3133	208	0,1991
97	0,4571	165	0,1421	105	0,012	215	0,1852
102	0,2905	177	0,3579	110	0,0422	220	0,3981
113	0,1333	185	0,2789	115	0,0663	230	0,0741
123	0,0095	193	0,0211	120	0,259	237	0,1019
		200	0,1421	127	0,0361	244	0,0093
		216	0,0105	134	0,2711	254	0,0324
Allele Locus	Allel-frequenz	Allele Locus	Allel-frequenz	Allele Locus	Allel-frequenz	Allele Locus	Allel-frequenz
<i>Tth-152</i>		<i>Tth-217</i>		<i>Tth-1-31</i>		<i>Tth-265</i>	
170	0,0089	205	0,0227	96	0,0548	187	0,0096
174	0,1518	226	0,0227	105	0,1644	194	0,1298
178	0,8393	232	0,0625	110	0,5274	198	0,2596
		237	0,7784	120	0,1918	206	0,5721
		245	0,017	126	0,0137	230	0,0288
		255	0,0966	134	0,0479		

Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die nachgewiesenen Allele der acht untersuchten Mikrosatelliten-Loci und deren berechnete Allelfrequenzen. Pro Locus konnten zwischen drei und sieben Allele nachgewiesen werden. Die aufgelisteten Allelfrequenzen spiegeln die relative Häufigkeit wider, mit der das jeweilige Allel in der Population nachgewiesen werden konnte. Die erwiesenen Wahrschein-

lichkeiten für das Auftreten eines bestimmten Allels an einem definierten Locus reichten von 0,89 bis zu 84,93 %. Vor allem die Allele 178 (Locus *Tth-152*), 237 (Locus *Tth-217*), 110 (Locus *Tth-1-31*) und 206 (Locus *Tth-265*) deuten mit Allelfrequenzen von über 0,5 auf eine relativ geringe genetische Vielfalt des jeweiligen Locus hin. Aufgrund der fehlenden Geschlechtsinformation ist jedoch zu beachten, dass die mittels *Colony* berechneten Ergebnisse mit identischer Wahrscheinlichkeit komplementär sein könnten (vgl. Absatz 2.8). Aus diesem Grund wurden die dargestellten und beschriebenen Ergebnisse in einem späteren Versuch verifiziert (vgl. Absatz 3.9.1).

Observierte Elternschaften Malta (2010)

Anhand der detektierten Mikrosatelliten-Allele wurde eine äquivalente Auswertung für 19 beprobte Zuchtfische und sieben Laichtage á zwölf Eiern zur Charakterisierung des maltesischen Reproduktionserfolgs (2010) durchgeführt. Mit 38 observierten Vater- (45,2 %) und 35 bestimmten Muttertieren (41,7 %) konnten prozentual deutlich weniger Nachkommen einem Elterntier bzw. einer vorhandenen Probe zugeordnet werden. Insgesamt teilten sich die eindeutig identifizierten Vater- bzw. Mutterschaften auf jeweils sechs der 19 untersuchten Broodstockindividuen auf (vgl. Abbildung 3.39A und B). Gleichermaßen konnten im Gegensatz zum italienischen Reproduktionsvorgang mit einer Anzahl von 47 (56,0 %) eindeutig weniger Vollgeschwister im untersuchten Probenpool gefunden werden. Die numerische Anzahl berechneter Halbgeschwisterkombinationen lag mit 607 Möglichkeiten zur Bildung von Halbgeschwisterpaaren zwar höher als beim zuvor untersuchten Fall, jedoch ist auch hier der prozentuale Anteil mit 17,4 % klar niedriger.

Erstellte Verwandtschaftscluster der Nachkommenschaft und daraus berechnete Wahrscheinlichkeiten legen die Existenz von fünf weiteren hypothetischen Muttertieren sowie für vier zusätzliche Vätertiere nahe. Im Abstammungsdiagramm (vgl. Abbildung 3.40) ist die parentale Herkunft aller 84 untersuchten Nachkommen dargestellt. Mitsamt den hypothetischen Elterntieren konnte die Anzahl der am Reproduktionsvorgang beteiligten Individuen auf 21 determiniert werden.

Dem erstellten Stammbaum folgernd konnte eine prozentuale Reproduktionsbeteiligung für männliche Tiere ($n = 10$) zwischen 2,39 und 17,86 % sowie zwischen 3,58 und 11,9 % für die weiblichen Tiere ($n = 11$) berechnet werden (vgl. Abbildung 3.41). Hierdurch konnte unter der Annahme, dass sich 25 Elterntiere im Käfig befanden (vgl. Tabelle 2.1), von denen zwölf am 05.06. sowie sieben am 25.06. mit einem Hormonimplantat versorgt wurden, eine Reproduktionsbeteiligung von 84 % erfasst werden.

Wie bereits zuvor beschrieben, muss mit gleicher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die erzielten und beschriebenen Ergebnisse komplementär sein könnten, da keine Geschlechtsinformationen der Broodstocktiere erhoben und ins *Colony* Programm übertragen wurden.

Nachfolgende Probenkürzel der Reproduktionsanalyse Vibo (2010):

Kürzel	DNA-Probe	Kürzel	DNA-Probe
MB1-19	beprobte Elterntiere	26.06. 1-12	Eiprobe des 26.06.2010 ($n = 12$)
20.06. 1-12	Eiprobe des 20.06.2010 ($n = 12$)	28.06. 1-12	Eiprobe des 28.06.2010 ($n = 12$)
21.06. 1-12	Eiprobe des 21.06.2010 ($n = 12$)	30.06. 1-12	Eiprobe des 30.06.2010 ($n = 12$)
25.06. 1-12	Eiprobe des 25.06.2010 ($n = 12$)	01.07. 1-12	Eiprobe des 01.07.2010 ($n = 12$)

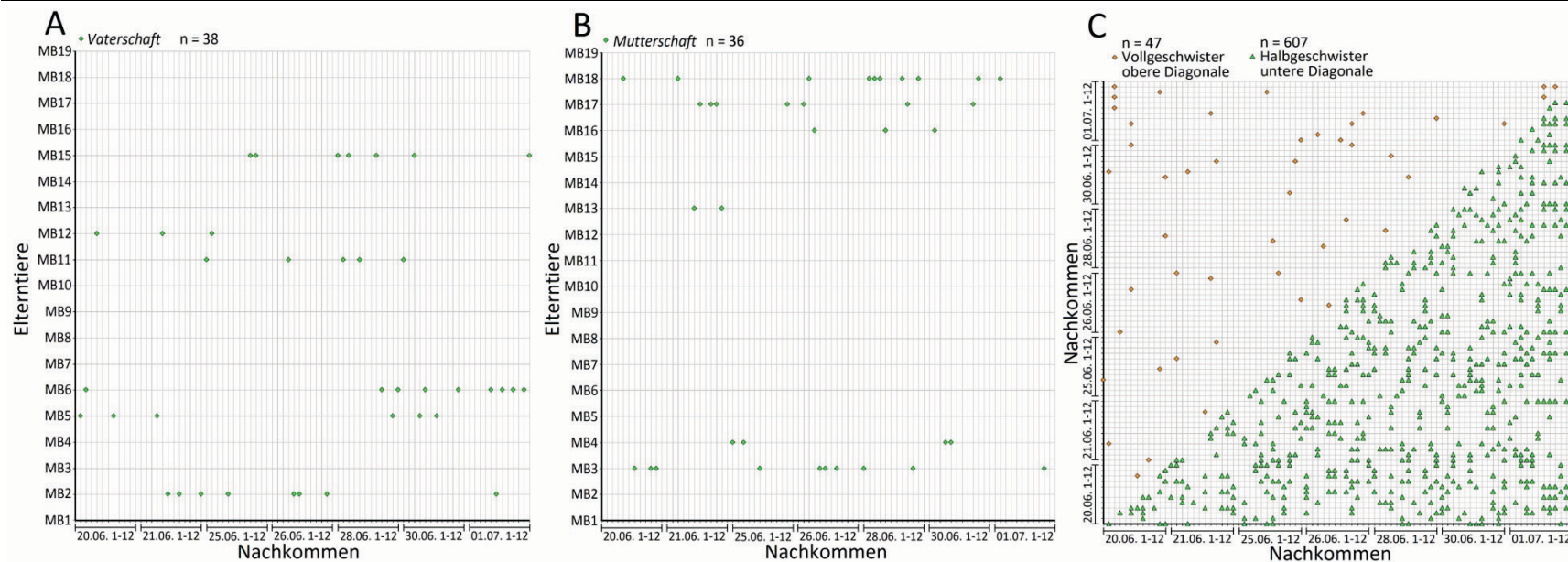


Abbildung 3.39A-C: Observierte Vaterschaften, Mutterschaften und Verwandtschaftsgrade zwischen den Nachkommen aller untersuchten Ablachvorgänge (Malta 2010)
 MB = Malta Broodstock; 20., 21., 25., 26., 28. und 30.06. sowie 01.07. = untersuchte Laichtage mit je 12 Eiern (grafische Darstellung via *Colony* Software).

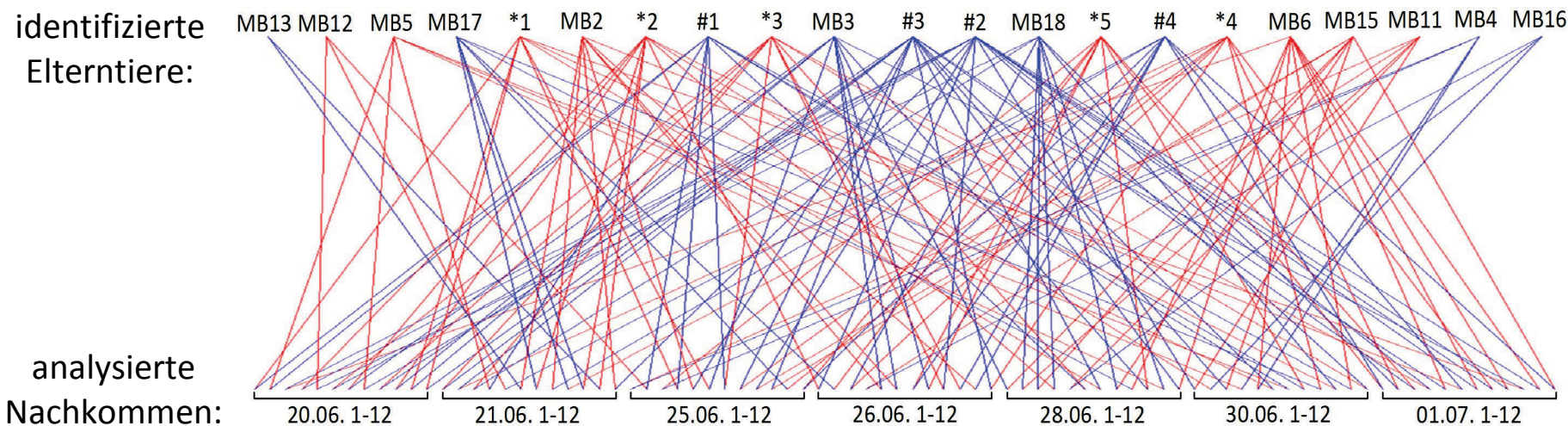


Abbildung 3.40: Abstammungsdiagramm der observierten und hypothetischen Elternschaften aller untersuchten Nachkommen (Malta 2010)
 Rote Verbindungslinien zeigen die berechneten Mutterschaften, blaue Verbindungslinien die berechneten Vaterschaften an. Hypothetische Mütter sind mit einem Stern (*), hypothetische Väter mit einer Raute (#) gekennzeichnet. Abkürzungen siehe Beschriftung Abbildung 3.39 (grafische Darstellung via *Pedigree Viewer* Software).

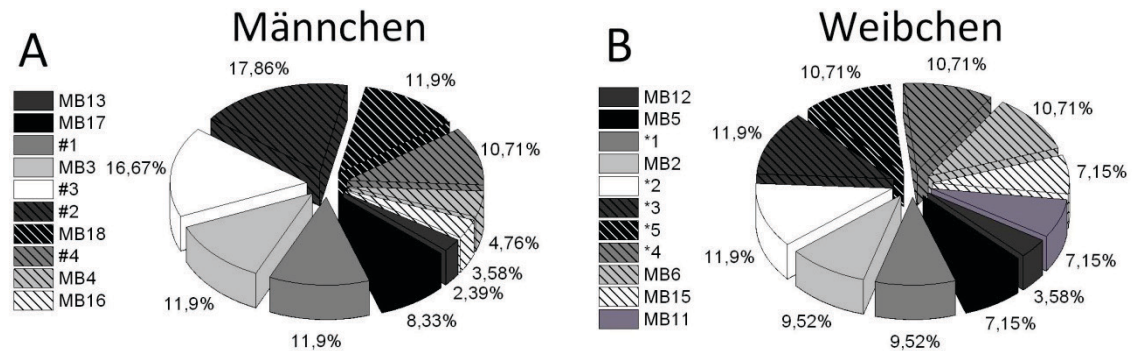


Abbildung 3.41: Prozentuale Reproduktionsbeteiligung männlicher (A) und weiblicher (B) Zuchtfische (Malta)
 In den abgebildeten Kreisdiagrammen sind die via *Colony* Software kalkulierten prozentualen Reproduktionsbeteiligungen männlicher (A) und weiblicher (B) Tiere des Standorts Malta (2010) dargestellt. Die 84 untersuchten Nachkommen stellen 100 % dar. Hypothetische Mütter sind mit einem Stern (*), hypothetische Väter mit einer Raute (#) gekennzeichnet. MB = Malta Broodstock.

Eine Auflistung der detektierten Allele sowie die zugehörigen Allelfrequenzen für den Standort Malta sind im Anhang in Tabelle 8.8 zu finden.

Gegenüberstellung der untersuchten Reproduktionsvorgänge

Ausgehend von den erfassten Allelen der acht untersuchten Mikrosatelliten-Loci konnten die beiden Populationen – Vibo und Malta – miteinander verglichen werden. Die berechneten Größen, welche einen Vergleich bzw. eine Differenzierung der beiden Populationen möglich machten, sind die Anzahlen detektierter Allele der acht Loci, die erwartete und observierte Heterozygotie sowie die Faktorielle-Korrespondenz-Analyse (FAC).

Tabelle 3.5: Populationsgenetische Analysen der acht untersuchten Mikrosatelliten-Loci

Für jeden untersuchten Locus ist die Anzahl detektierter Allele, die observierte (H_{obs}) und erwartete (H_{exp}) Heterozygotie sowie zugehörige Mittelwerte bzw. Standardabweichungen und die Wahrscheinlichkeit auf Polymorphismus des molekularen Markers ($P_{0,95}$) angegeben.

Locus	Anzahl detektierter Allele		H_{obs}		H_{exp}		$P_{(0,95)}$	
	Vibo	Malta	Vibo	Malta	Vibo	Malta	Vibo	Malta
<i>Tth-62</i>	5	5	0,6341	0,542	0,675	0,604	1	1
<i>Tth-208</i>	8	7	0,6575	0,613	0,743	0,79	1	1
<i>Tth-254</i>	7	12	0,9333	0,667	0,743	0,846	1	1
<i>Tth-004</i>	7	7	0,6706	0,506	0,732	0,818	1	1
<i>Tth-152</i>	3	2	0,1556	0,139	0,243	0,266	1	1
<i>Tth-217</i>	6	7	0,3188	0,386	0,319	0,744	1	1
<i>Tth-1-31</i>	6	10	0,62	0,708	0,634	0,835	1	1
<i>Tth-265</i>	5	4	0,55	0,439	0,57	0,548	1	1
	Σ 47	Σ 54	\bar{x} 0,57	\bar{x} 0,5	\bar{x} 0,58	\bar{x} 0,68	1	1
			\pm 0,24	\pm 0,18	\pm 0,2	\pm 0,2		

Im Vergleich der italienischen und maltesischen Thunfischpopulationen (jeweils Broodstocktiere und Nachwuchs) konnten mit Ausnahme der Loci *Tth-254* und *Tth-1-31* annähernd identische Allelanzahlen

len (maximal ein Allel Abweichung) gefunden werden. Bei den besagten Ausnahmen konnten 5 bzw. 4 zusätzliche Allele bei der maltesischen Population detektiert werden. Im Vergleich der observierten Heterozygotie, die im Fall der italienischen Tiere bei einem Durchschnittswert von $0,57 (\pm 0,24)$ bzw. $0,5 (\pm 0,18)$ für die maltesischen Individuen lag, wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Ebenso konnte die Nullhypothese zwischen observierter und erwarteter Heterozygotie der Population Vibo nicht verworfen werden. Im Gegensatz dazu kann mit statistischer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die observierte Heterozygotie der maltesischen Population signifikant geringer war, als die erwartete. Zusätzlich konnte in beiden Populationen bestätigt werden, dass die acht untersuchten Loci einen polymorphen Charakter aufwiesen.

Anhand der grafischen Darstellung der Faktoriellen-Korrespondenz-Analyse können zwei Aussagen getroffen werden (vgl. Abbildung 3.42). Zum einen ist es möglich beide Populationen aufgrund ihrer räumlichen Distanz (Chi-Quadrat Distanz) eindeutig voneinander abzugrenzen. Zum anderen kann beobachtet werden, dass die Streuung der Punktwolke – wobei jedes Quadrat ein Individuum repräsentiert – im Fall der maltesischen Population deutlich größer ist. Hierdurch lässt sich rückschließen, dass die genetische Variabilität der maltesischen Zuchtfische und daher auch der Nachkommenschaft größer war als die genetische Variabilität der italienischen Population.

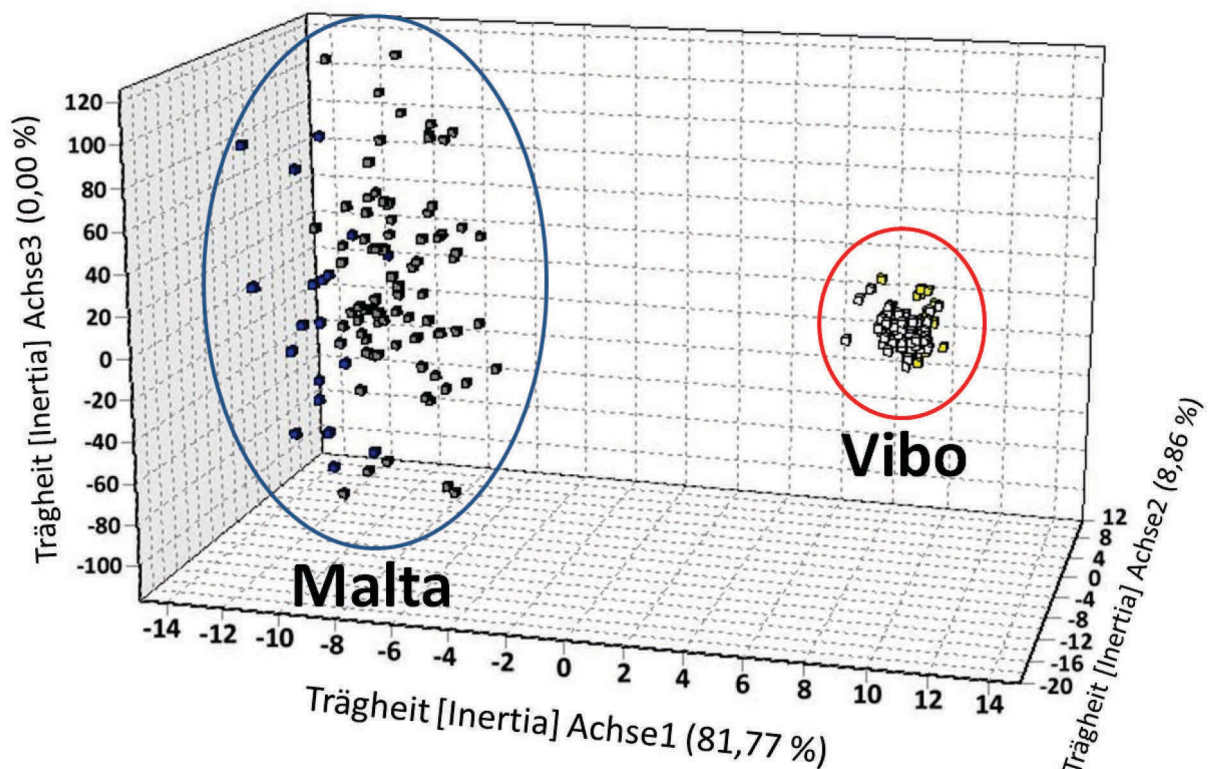


Abbildung 3.42: Grafische Darstellung der Faktoriellen-Korrespondenz-Analyse (FAC) beider Populationen

Im dreidimensionalen Raum sind die als zwei Populationen definierten italienischen ($n = 91$) und maltesischen ($n = 103$) Zuchttiere und deren Nachwuchs anhand ihres jeweiligen prozentualen Anteils ihrer Allele zur totalen Trägheit (Inertia) aufgetragen. Die Chi-Quadrat Distanzen zwischen den einzelnen Individuen und zum zugehörigen Zentroid dienen zur Einschätzung der genetischen Differenzierung zwischen und innerhalb der Populationen (inter- und intrapopulativ). Alle Individuen der maltesischen Population sind blau, alle Mitglieder der italienischen Population rot eingerahmt. ■ = Malta Broodstock, ■ = Malta Nachwuchs, ■ = Vibo Broodstock, □ = Vibo Nachwuchs. Die Visualisierung erfolgte mit dem Programm *GENETIX*.

Auswertungen einzelner Laichtage bzw. Jungfischgruppen (mit und ohne Anomalien) sind nicht separat dargestellt. Durch die geringen Stichprobengrößen ($n = 12$ pro Laichtag bzw. $n = 10$ für die Jungfische) konnten keine ausreichend großen Verwandtschaftsgruppen innerhalb der Nachkommenschaft gebildet werden, anhand derer die Existenz weiterer hypothetischer Elterntiere verlässlich zu belegen war. So erfolgte in den beobachteten Fällen bereits ab einer Wahrscheinlichkeit von $p \geq 0,3$ eine softwarebedingte jedoch unzuverlässige Elternschaftszuordnung zu einem der 23 (Vibo) bzw. 19 (Malta) beprobten und untersuchten Broodstocktiere.

3.9 Mutterschaftstest beim Blauflossen-Thunfisch mittels mitochondrialer Kontrollregion

Um die Ergebnisse der via Mikrosatelliten-Analyse durchgeführten Elternschaftstests zu verifizieren und um nachträglichen Aufschluss über die Geschlechter der am Reproduktionsvorgang beteiligten Individuen zu erhalten, wurde die Vererbung der mitochondrialen Kontrollregion untersucht (vgl. Absatz 3.9.1). Zusätzlich wurden mittels d-loop-Sequenzvergleich die in 2011 beobachteten Reproduktionsvorgänge des Standorts Malta auf ihre Haplotypendiversität untersucht, um eine Abschätzung über die sich fortgepflanzten Weibchen zu erhalten (vgl. Absatz 3.9.2).

3.9.1 Verifizierung des mikrosatellitengestützten Elternschaftstests via mtDNA

Bei allen 16 untersuchten Individuen (10 Elterntiere sowie 6 Nachkommen) des italienischen Broodstocks konnte die gesamte 865 bp umfassende d-loop-Region mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ pro Base sequenziert werden.

Acht der zehn untersuchten Elterntiere (VB 1, 8, 12, 15, 16, 18, 22, 23) wiesen eine Sequenzdivergenz zwischen 97 und 99 % ($\cong 1$ bis 26 Basenpaare) auf. Die Versuchstiere VB2 und VB5 zeigten eine 100 %ige Sequenzhomologie, wodurch insgesamt neun Haplotypen bei zehn Elterntieren identifiziert werden konnten (vgl. Abbildung 3.43). Bei den sechs zufällig ausgewählten Nachkommen wurden nur zwei Haplotypen detektiert. Einer dieser Haplotypen (Jungfisch BLA9 sowie die Eier 6 und 10 des 20.07.) zeigte eine homologe Nukleotidsequenz zu den Elterntieren VB2 und VB5. Der Haplotyp der Proben BL3, BLA4 und BLA8 zeigte eine 1-2 %ige ($\cong 1$ bis 17 Basenpaare) Abweichung zu allen sequenzierten Kontrollregionen der zehn Elterntiere.

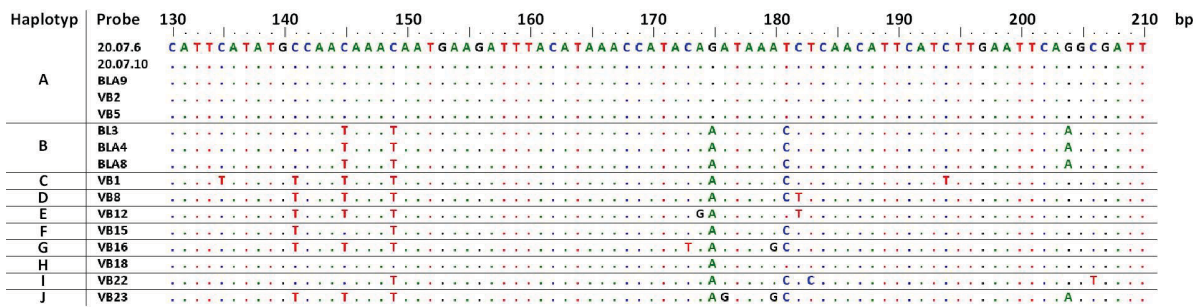


Abbildung 3.43: Teilauszug der verglichenen d-loop-Sequenzen

Dargestellt ist ein 80 bp langer Teilbereich (bp 130-210 der 865 bp langen Gesamtsequenz) des Sequenzalignments der mitochondrialen Kontrollregion aller 16 untersuchten Individuen. Angegeben sind die als Standardsequenz definierte Basenreihenfolge der Haplotypengruppe A sowie alle dazu detektierten Sequenzunterschiede. Identische Basen sind mit einem Punkt (.), Unterschiede mit der jeweiligen Basenabkürzung (A, T, C, G) markiert. Alle neun identifizierten Haplotypen (A-J) sind im abgebildeten Teilstück eindeutig unterscheidbar. VB = Vibo Broodstock; BL = Jungfisch ohne Anomalien; BLA = Jungfische mit Anomalien; 20.07.6 und 10 = Ei 6 und 10 des Laichtags 20.07.2010.

Da die untersuchte Sequenz einem maternalen Erbgang unterliegt, sind nun zusätzliche Aussagen über den unter Absatz 3.8 beschriebenen Elternschaftstest des Standorts Vibo zulässig. So konnte das Hauptanliegen, sprich die Geschlechterzuweisung der an der Reproduktion beteiligten Tiere, erreicht und bestätigt werden. Beide Elterntiere (VB2 und VB5), die aufgrund der homologen d-loop-Sequenz als Muttertiere in Frage kamen, wurden durch vorherige Wahrscheinlichkeitsberechnungen nicht nur dem weiblichen Geschlecht zugeordnet, sondern auch mit einem p-Wert von 1 als Muttertiere der Nachkommen BLA9 (VB5) und 20.07.10 (VB2). Dem Ei 6 des 20.07. wurde trotz homologer d-loop-Sequenz zu den zuvor genannten Weibchen mit dem Elterntier VB21 ein anderes Muttertier zugeordnet. Hierdurch kann davon ausgegangen werden, dass der als Weibchen identifizierte Fisch ebenso der Haplotypengruppe A angehörte wie die Tiere VB2, VB5 und deren Nachkommen. Weiterhin konnte die gemeinsame Abstammung der drei Nachkommen BL3, BLA4 und BLA8, die mittels Sequenzvergleich dem Haplotyp (B) und anhand Mikrosatelliten-Analyse dem unbekanntem Muttertier *1 zugeordnet wurden, bestätigt werden.

3.9.2 Untersuchung der Haplotypendiversität zur Qualifizierung einer Laichperiode

Bei 47 der 60 untersuchten Eiprobe, ausgewählt aus den sechs beobachteten Laichtagen (2011), konnte das erstellte Amplifikat im Bereich der mitochondrialen Kontrollregion erfolgreich sequenziert werden (Fehlerwahrscheinlichkeit pro Base $p \leq 0,01$). Aufgrund unvollständig sequenzierter d-loop-Regionen oder schlechten Sequenzierungsqualitäten wurden 13 Proben zum Schutz vor möglichen Fehlinterpretationen ausgeklammert.

Alignments aller 47 Sequenzen resultierte in der Identifikation acht verschiedener Haplotypen. Hierbei konnten den als Haplotyp A und B definierten Gruppen mit 23 bzw. 13 zugeordneten Eiern ein Großteil (76,6 %) der untersuchten Nachkommen zugeordnet werden. Die verbliebenen elf Eiprobe teilten sich auf die Haplotypen C-H mit numerischen Anteilen von einem bis drei Individuen auf.

Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass mindestens acht unterschiedliche Weibchen an der Reproduktion beteiligt waren (vgl. Abbildung 3.44A).

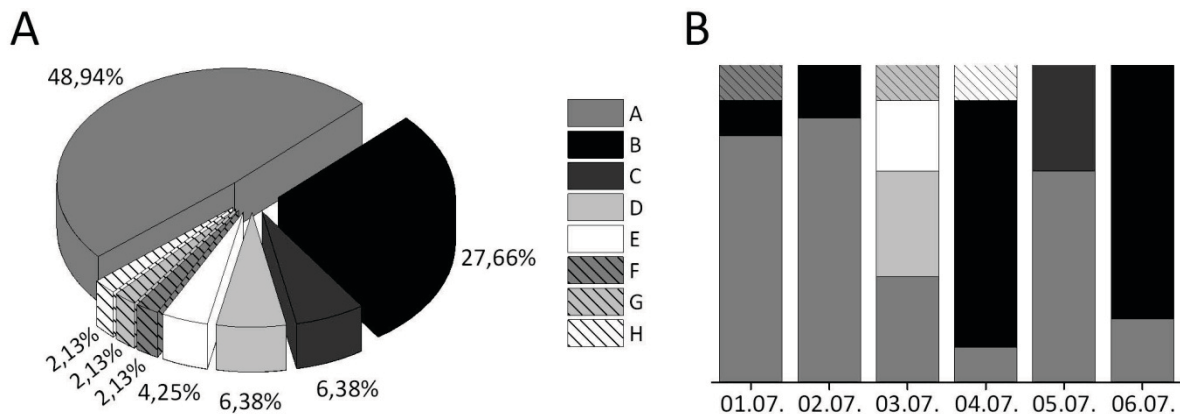


Abbildung 3.44: Prozentuale Anteile der identifizierten Haplotypen

(A) Dargestellt sind die im gesamten Reproduktionszeitraum detektierten Haplotypenhäufigkeiten in Prozent. Innerhalb der 47 Eier umfassenden Stichprobe konnten 8 individuelle Haplotypen ausgemacht werden.

(B) Aufgetragen sind die prozentualen Häufigkeiten vorgefundener Haplotypen in Abhängigkeit zum jeweiligen Laichtag.

Einzelanalysen der sechs beobachteten Laichtage zeigten, dass an jedem dieser Tage Nachkommen, die der Haplotypengruppe A zugeordnet werden mussten, vorgefunden wurden (vgl. Abbildung 3.44B). An der Hälfte aller Reproduktionstage (02.07. n = 6; 05.07. n = 9; 06.07. n = 5) konnten nur zwei verschiedene Haplotypen innerhalb der untersuchten Nachkommen identifiziert werden. Neben dem 01.07. (n = 9) und dem 04.07. (n = 9), an denen je drei Haplotypen identifiziert werden konnten, war mit vier individuellen Sequenzen die größte Haplotypendiversität am 03.07. (n = 9) zu beobachten. Pro Laichtag waren demnach mindestens zwei weibliche Fische an der Fortpflanzung beteiligt.

Im Vergleich mit den unter Absatz 3.9.1 beschriebenen Haplotypen konnte zwischen keiner der gegenübergestellten Sequenzen eine 100 %ige Homologie festgestellt werden. Zusätzlich ist zu erkennen, dass innerhalb der zehn examinierten Elterntiere mit neun Haplotypen ein deutlich höherer prozentualer Anteil an Individuen mit individuellen d-loop-Sequenzen vorgefunden werden konnte als bei den insgesamt 53 Nachkommen (10 Haplotypen).

4 Diskussion

Mit dem Atlantischen Blauflossen-Thunfisch stand eine der kommerziell bedeutendsten aber gleichzeitig bedrohtesten Fischarten im Fokus dieser Dissertation. Die beginnende Domestizierung und Reproduktion dieser Art stellt einen ersten Schritt zum Erhalt und Schutz der Wildtierbestände sowie für den Aufbau einer nachhaltigen und dennoch rentablen Aquakultur dar. Die in diesem Rahmen gewonnenen Versuchsergebnisse zur Narkose, Markierung und Biopsie sowie die molekularbiologischen und umweltfaktoriellen Reproduktionsanalysen werden nachfolgend erläutert, diskutiert und in den Kontext des gegenwärtigen Forschungsstands eingebettet.

4.1 Kritische Betrachtungen

Einer detaillierten Diskussion vorausgehend bedarf es zunächst einiger kritischer Betrachtungen wesentlicher sowie spezifischer Momente der vorliegenden Forschungsarbeit. So ist zu konstatieren, dass der experimentelle Umgang mit einem derart großen, stressanfälligen und seltenen aber auch kostbarem Organismus wie dem Atlantischen Blauflossen-Thunfisch in der Praxis kein einfaches Unterfangen darstellt. Lediglich durch die kooperative Zusammenarbeit mit kommerziellen Unternehmen konnten die notwendigen infrastrukturellen Rahmenbedingungen zur mehrjährigen Haltung der Versuchstiere für die Forschungsprojekte SELFDOTT und ALLOTUNA gewährleistet werden. Diese umfassten neben der Bereitstellung der Käfiganlagen, der Boote und der Arbeitskräfte vor allem die Versorgung mit geschlechtsreifen Versuchstieren. Basierend auf der Notwendigkeit zur Kooperation bei der Durchführung wissenschaftlicher Arbeiten bestand eine dauerhafte Abhängigkeit zu den beteiligten Aquakulturunternehmen bezüglich Material- und Arbeitskraftbereitstellung (De Metrio *et al.*, 2010a; De Metrio *et al.*, 2010b; SELFDOTT, 2010).

Eine weitere Schwierigkeit manifestierte sich in der Tatsache, dass bei den bis zu 150 kg schweren Thunfischen bereits Arbeitsschritte wie die Markierung und Probenentnahme, welche bei anderen Versuchstieren routinemäßig durchführbar sind, nicht als Standardprozeduren betrachtet werden können. Deshalb galt es insbesondere die Effizienz von Basisprozeduren, wie die angewandte Markierungs- und Biopsiemethodik, zu untersuchen. Aufgrund der nur auf Schätzungen beruhenden ermittelten Versuchstierzahlen und einer nahezu unmöglichen kompletten Beprobung eines gesamten Käfigs musste bereits vor der Durchführung der Elternschaftsanalysen von unvollständigen oder teilweise auf Hypothesen basierenden Reproduktionsanalysen ausgegangen werden.

Sonstige unkontrollierbare Einflüsse wie eine stürmische See oder starke Strömungen beeinflussten und behinderten zum Teil notwendige Arbeiten an den Versuchstieren oder den Käfigen, wodurch vereinzelt ganze Versuchsreihen ausfielen oder verschoben werden mussten.

Neben der bisweilen komplexen Versuchsplanung und -durchführung ist an dieser Stelle auch das mit der Etablierung des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches in der Aquakultur ausgeschriebene Ziel der Projekte SELFDOTT und ALLOTUNA kritisch zu betrachten (De Metrio *et al.*, 2010a; SELFDOTT, 2010).

Da der Reproduktionszyklus des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches bislang noch nicht vollständig geschlossen werden konnte, bleibt zu hoffen, dass neue Forschungsprojekte geschaffen werden, um die noch fehlenden Wissenslücken zu schließen und weitere Erfahrungswerte zu sammeln. Doch nicht allein die funktionierende Zucht respektive die Schließung des Lebenszyklus dieser Spezies tragen zur Entwicklung einer nachhaltigen und umweltschonenden Aquakultur und zum Schutz der Wildbestände bei. Vielmehr stellen dahingehende Initiativen lediglich die ersten Schritte in diese Richtung dar. Vor allem die Wasserverschmutzung und die Zerstörung des Meeresbodens an den Käfigpositionen und die bei adulten NBFT schlechte Nahrungskonversionsrate von bis zu 1:25 (kg Gewichtszunahme pro kg Futter) stellen zentrale Probleme dar, die es zukünftig zu lösen gilt (Miyake *et al.* 2003; Aguado-Giménez & García-García, 2005; Volpe, 2005). Um eine nachhaltige, ökologische und ökonomisch vertretbare Thunfischaquakultur zu etablieren, bedarf es in erster Linie einer konsequenten Intensivierung der Forschung auf den Gebieten der landbasierten Fischzucht in Kreislaufanlagen sowie im Bereich der Futtermittelproduktion (Ellis, 2008; Mourente & Tocher, 2009).

4.2 Charakterisierung und Bewertung des angewandten Markierungs- und Biopsieverfahrens

Anders als bei den leicht zu handhabenden Tilapien, die während der Vornarkose mit Benzocain mit passiv integrierten Transpondern (PIT) ausgestattet wurden, anhand derer sie dauerhaft und individuell identifiziert werden konnten, musste bei der Markierung der Broodstock-Thunfische auf eine externe Identifikationstechnik zurückgegriffen werden. Maßgebliche Bedingung für den Einsatz einer äußerlich sichtbaren Markierung war es eine Methodik zu verwenden, welche die ID-Tags ohne direkten Fischkontakt an den freischwimmenden, bis zu 180 cm großen Versuchstieren anbrachte, ohne

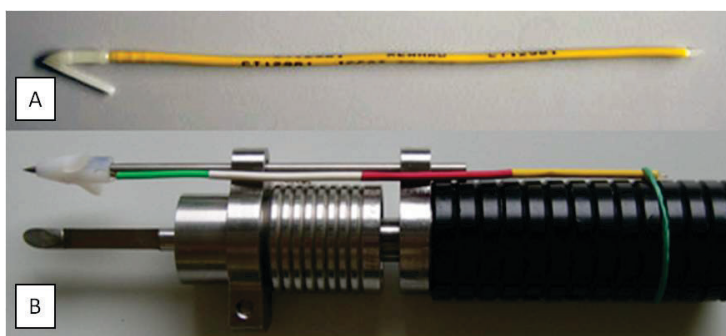


Abbildung 4.1: Vergleich zwischen handelsüblichen und eigenen externen Identifikationsmarkierungen (ID-Tags)

A: Herkömmlicher Spaghetti-Tag (12 cm) mit aufgedrucktem Zahlencode der ICCAT (modifiziert nach Quelle: www.iccat.es).
B: Eigenständig hergestellter ID-Tag mit Farbcode an der dualen Markierungs- und Biopsie-Apparatur.

diese prägnant zu verletzen oder zu behindern. Hierzu wurden nach dem Vorbild herkömmlicher Spaghetti-Tags die unter Absatz 2.2.2 beschriebenen individuellen Identifikationsmarkierungen angefertigt. Der elementare Unterschied zwischen den beiden in Abbildung 4.1 dargestellten Modellen ist die aufgrund des Farbcodes (vgl. Abbildung 4.1B) gegebene Fernidentifizierung einzelner Tiere, die über den Zahlencode

kommerzieller Tags (vgl. Abbildung 4.1A) nicht möglich ist.

Im Gegensatz zu anderen Markierungsexperimenten an NBFT in Käfighaltung, bei denen handelsübliche Tags erst nach vorherigem Fang mit Handleinen außerhalb des Wassers implantiert wurden,

konnte mit der gewählten Methode keine Mortalität bei den 126 behandelten Fischen beobachtet werden. Tičina *et al.* (2006 & 2007) führten in den Jahren 2002 bis 2005 eine solche Markierungsstudie zur Bestimmung des Größenwachstums kleiner Atlantischer Blauflossen-Thunfische während der Mast bei 190 Individuen in Kroatien durch. Obwohl bei dieser Studie nach dem Fang der Tiere alle Tags erfolgreich implantiert werden konnten, lag die Sterblichkeit in den Folgetagen zwischen 9 und 36 %. Hinzukommend konnten bei 19 von 20 Individuen, die zur Probe etwa 50 Tage nach der Markierungsprozedur geschlachtet wurden, negative Wachstumsraten observiert werden. Bei einem vergleichbaren Experiment von Wexler *et al.* (2003) in dem Gelbflossen-Thunfische per Handleine gefangen, mit einem passiven integrierten Transponder versehen und in einen Zuchtkäfig überführt wurden, konnte sogar eine Sterblichkeit von über 50 % festgestellt werden. Zwar ließen sich bei den hiesigen Experimenten aufgrund des Fangverzichts mit 97,4 % nicht alle Markierungsversuche erfolgreich durchführen, jedoch wurden weder versuchsbedingte Veränderungen des Fressverhaltens noch inflammatorische Prozesse oder eine Erhöhung der Mortalitätsrate observiert. Aufzeichnungen über die Sterberate gefangener, markierter und in die Freiheit entlassener Thunfische liegen – bei Wiederfindungsraten zwischen 7,6 und 19,8 % – nicht vor (Block *et al.*, 2003; Tičina, 2007).

Ein bekannter und darüber hinaus während der praktizierten Experimente festgestellter Nachteil externer Markierungen liegt in dem als Biofouling bekannten Bewuchs verschiedenster Organismen auf den äußeren Teilen der Implantate (vgl. Abbildung 4.2, Thorstad *et al.*, 2001; Dicken *et al.*, 2011). Vor allem das Markofouling, bestehend aus Seepocken (*Balanus spec.*), Polypen verschiedener Arten der Klasse *Hydrozoa*, Spezies der Klassen *Bivalva* und *Polychaeta* sowie Algen unterschiedlicher Gruppen (*Rhodophyta*, *Chlorophyta*, *Phaeophyta*), besiedelte innerhalb weniger Wochen die Tags, wodurch diese sukzessiv unkenntlich wurden (vgl. Abbildung 4.2). Auch Behandlungen der Tags mit Antifouling- und Oberflächenbeschichtungsreagenzien wie Nano Silan PSC 704 (www.glance-gmbh.de), Repel-Silane ES (PlusOne, GE Healthcare Life Sciences), Biotard (www.biotard.com) und DBHB (6,6'-dibromohemibastandin-1, Bayer *et al.*, 2011) führten nicht zu einer signifikanten Verzögerung des Foulingprozesses, weshalb auf eine ausführliche Darstellung der Versuchsergebnisse und -durchführung verzichtet wurde.

Entgegen diesen Erfahrungen konnten hingegen auf identisch angefertigten Tags für das australische Aquakulturunternehmen Clean Seas Tuna Ltd. in einem etwa drei Millionen Liter fassenden Becken keine Foulingprozesse über eine Periode von ca. drei Jahren festgestellt werden (Ellis, 2008; unveröffentlichte Resultate). Als ursächlich hierfür ist die mechanische und physikalische Vorreinigung des verwendeten Meerwassers über Biofilter sowie mittels UV- und Ozon-Wasserklärer hervorzuheben, durch welche größere Lebewesen abgefiltert und Mikroorganismen abgetötet werden.

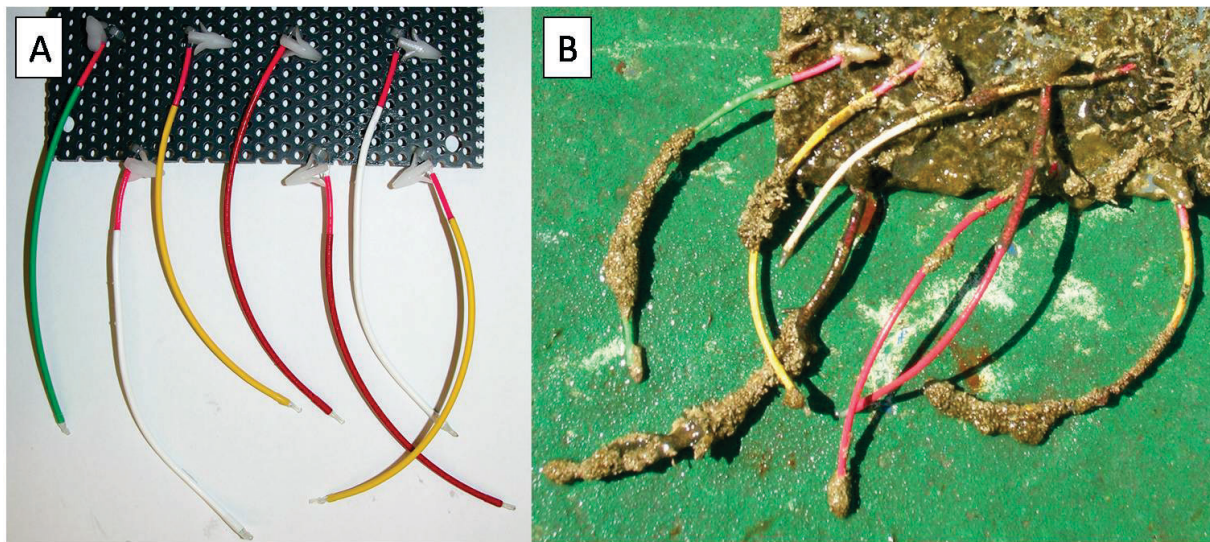


Abbildung 4.2: Biofouling-Prozess

Dargestellt ist der beobachtete Fouling-Prozess an sieben Testidentifikationsmarkierungen, die zwischen dem 01.12.2008 und dem 07.04.2009 an einem maltesischen Zuchtkäfig befestigt waren. Im Laufe des viermonatigen Versuchszeitraums konnte eine sukzessive Bewuchszunahme registriert werden. Abbildungsteil A zeigt die Test-Tags zu Beginn, Abbildungsteil B nach der viermonatigen Versuchsspanne. Ein äquivalentes äußeres Erscheinungsbild zeigten auch die implantierten Tags der Versuchstiere, was zu Komplikationen bei der Identifizierung führte.

Der Hauptvorteil der in dieser Arbeit vorgestellten Markierungsmethode liegt neben der hierbei ausgebliebenen Sterblichkeit in der gleichzeitig realisierbaren Biopsie. Die speziell für diese duale Aufgabe entwickelte Apparatur (vgl. Abbildung 2.2, 3.2 & 4.1) stellt eine bislang einzigartige Möglichkeit dar, Zuchtthunfische bei gleichzeitig sicherer und zuverlässiger Markierung zu beproben. In den durchgeführten Versuchen konnten von 108 der 126 behandelten Thunfische (= 85,7 %) Gewebeproben entnommen werden, die ausreichend für nachfolgende DNA-Analysen waren. Der über die Jahre 2008 bis 2010 von 55,2 % auf durchschnittlich 65,3 % angestiegene Anteil an Biopsieproben von mehr als 10 mg Gewebe ist in der Optimierung der Apparatur zu begründen. Als kritische Kriterien für das optimale Gelingen der Probennahmen erwiesen sich erstens die Stellung zwischen der Schneideöffnung der Biopsienadel und der Implantationsnadel ($\sim 180^\circ$), zweitens die variierbare Längeneinstellung derselbigen sowie drittens der Einstichwinkel in den Fisch, der im besten Fall 90° betrug.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass sich die gewählte Methode im Feldversuch etabliert und mit einer Erfolgsquote von 85,7 % als bislang beste und einzige Möglichkeit zur gleichzeitigen Markierung und Probennahme erwiesen hat. Als Manko der verwendeten externen Markierungen kristallisierte sich die durch den stärker werdenden Bewuchs mit der Zeit fortschreitende reduzierte Visibilität und Differenzierung der Tags heraus. Bisher konnte keine Lösung für dieses Problem gefunden werden, wodurch die Notwendigkeit bestand mehrjährig gehaltene Zuchtfische im annualen Rhythmus zu kennzeichnen.

4.3 Beschreibung und Identifikation der observierten und notwendigen Laichbedingungen

Im nachfolgenden Abschnitt wird angestrebt, anhand der mittels HOBO-Datenlogger aufgezeichneten Standorttemperaturen und Temperaturprofile, die notwendige Reproduktionstemperatur des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs in Käfiganlagen des Mittelmeerraums zu ermitteln. Ergänzend dazu gilt es weitere Standortfaktoren, durchgeführte oder ausgelassene Hormonimplantationen und Unterschiede in den Haltungsbedingungen mit in die Auswertung einfließen zu lassen.

4.3.1 Allgemeine Standortbeschreibungen und Untersuchungen

Die drei observierten Käfigstandorte befanden sich in Marsaxlokk (Malta), Cartagena (Spanien) und Vibo Valentia Marina (Italien). Alle Versuchskäfige waren zwischen 250 und 1000 m der Küste vorge-lagert und befanden sich im offenen Mittelmeer (Marsaxlokk), dem Tyrrhenischen Meer (Vibo Valentia Marina) bzw. dem Alboranischen Meer (Cartagena) über Wassertiefen von 15 bis 70 m.

Anhand der hygrothermischen Klimadiagramme (vgl. Abbildung 4.3) ist zu erkennen, dass sowohl die durchschnittlichen als auch die maximalen und minimalen Monatstemperaturen der drei Standorte beim Vergleich des terrestrischen Klimas korrespondieren (one-way ANOVA $p = 0,8$). Hierdurch ist eine entscheidende Grundvoraussetzung für die Vergleichbarkeit der Standorte und des Reproduktionserfolgs gegeben, da das terrestrische Klima bzw. die Lufttemperatur einen direkten Einfluss auf die Meerestemperatur hat (WBGU, 2006).

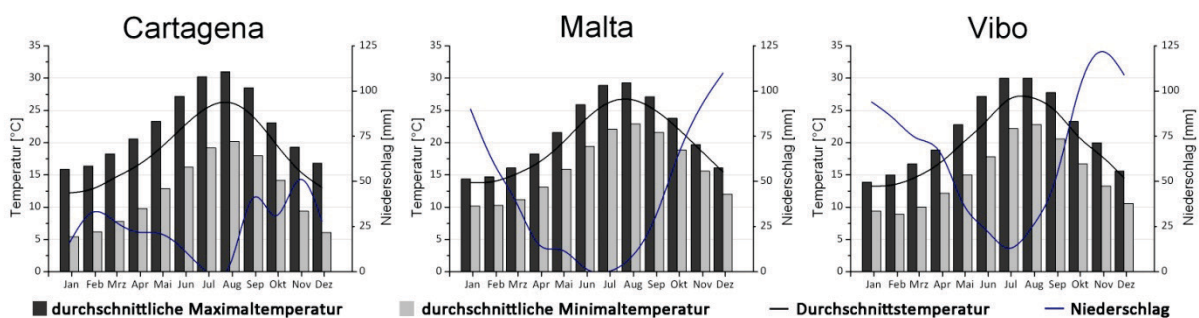


Abbildung 4.3: Hygrothermische Klimadiagramme der terrestrischen Standorte Cartagena, Malta und Vibo

Monatlich aufgetragen sind die Durchschnittstemperaturen, die durchschnittlichen Minimal- und Maximaltemperaturen [°C] sowie der detektierte Niederschlag [mm] der Standorte Cartagena (1919 bis 1936), Malta (1965 bis 1980) und Vibo (Temperatur: 1984 bis 1994, Niederschlag: 1953 bis 1994). Die terrestrischen Klimadaten wurden vom Phytosociological Research Center, Universidad Complutense de Madrid, Spanien, bezogen (Worldwide Bioclimatic Classification System, 1996-2008, www.globalbioclimatics.org).

Der einzige deutliche Unterschied beim Vergleich der landbasierten Wetterdaten ist im detektierten Niederschlag zu finden. Im Gegensatz zu den Standorten Malta und Vibo, an denen ein typisches mediterranes Klima mit humiden Wintermonaten vorzufinden ist, befindet sich die Niederschlagskurve der Messstation Cartagena dauerhaft unterhalb der Durchschnittstemperaturkurve bzw. der detektierten Verdunstung, weshalb man hier von einem ariden Klima sprechen kann (Peel *et al.*,

2007). Die geringere niederschlagsbedingte Süßwasserzufuhr geht am Standort Cartagena allerdings nicht mit einer höheren Salinität des Meerwassers einher. Vielmehr kann im Alboranischen Meer mit durchschnittlich 37 ‰ ein geringerer Salzgehalt gemessen werden als dies in Malta bzw. Vibo (ca. 38 ‰) der Fall ist. Dieser Unterschied lässt sich auf den permanenten Wasseraustausch zwischen Mittelmeer und Atlantik zurückführen. Hierbei strömt schweres und salziges Tiefenwasser an der Straße von Gibraltar aus dem Mittelmeer hinaus, wohingegen Oberflächenwasser mit geringerer Salinität aus dem Atlantik einströmt (Bresseur *et al.*, 1996).

Neben den terrestrischen wurden in Abbildung 4.4 auch die aquatischen Klimadaten der drei Standorte miteinander verglichen. Äquivalent zur Landtemperatur ist auch beim statistischen Vergleich der Wassertemperaturen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,92$) zwischen den Messstationen auszumachen. Vielmehr kann mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 bzw. 92 % davon ausgegangen werden, dass die monatlichen Durchschnittstemperaturen in Cartagena, Malta und Vibo sowohl im Luft- als auch im Wasserraum identisch sind. In einer Gegenüberstellung der Diagramme 4.3 und 4.4 kann anhand der geringeren Schwankungsbreite zwischen Minimal- und Maximaltemperatur sowie zwischen dem jahreszeitlich verzögerten Temperaturanstieg bzw. -abfall die im Vergleich zur Luft höhere Wärmekapazität des Wassers abgelesen werden.

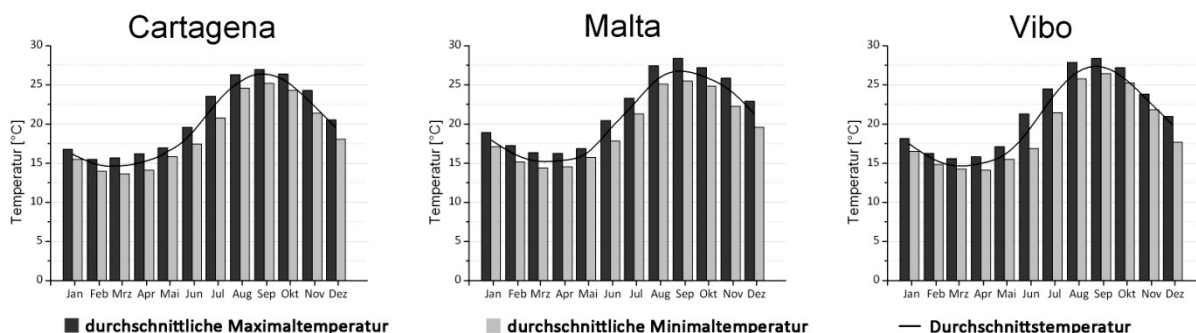


Abbildung 4.4: Meeresoberflächentemperatur-Diagramme der Standorte Cartagena, Malta und Vibo

Monatlich aufgetragen sind die Durchschnittstemperaturen sowie die durchschnittlichen Minimal- und Maximaltemperaturen [°C] der Käfigstandorte Cartagena, Malta und Vibo für die Jahre 2000 bis 2009. Die Daten wurden vom National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) bereitgestellt, über das National Oceanographic Data Center (NODC) im Hierarchical Data Format (hdf) heruntergeladen und beruhen auf satellitengestützten Messungen eines Advanced Very High Resolution Radiometers (AVHRR) in einem Umkreis von 4 km um die angegebene Käfigposition (<http://www.nodc.noaa.gov/SatelliteData/>). Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software AnalyzeHDF (Bridges *et al.*, 2009).

Der Tidenhub des Mittelmeers weist mit 20 bis 40 cm eine vergleichsweise geringe Amplitude auf, in Folge dessen die gezeitenbedingten Strömungen keinen Einfluss auf die Käfigstandorte haben (Day *et al.*, 1995). Generell sind die Strömungen im Mittelmeer deutlich schwächerer Intensität als die der Ozeane. An der Oberfläche trägt hauptsächlich der permanente Wassereinstrom aus dem Atlantik zu einem dauerhaften West-Ost-Fluss bei, der jedoch nur innerhalb der Meerenge von Gibraltar zu starken Strömungen führt (Pinardi & Masetti, 2000). An den einzelnen Standorten spielen demnach

hauptsächlich windinduzierte Oberflächenströmungen, die sogenannten Friktionsströmungen, eine Rolle, die jedoch nicht prognostiziert werden können.

Anhand des Langzeitvergleichs der klimatischen Standortbedingungen ist trotz der maximalen Entfernung von ca. 1400 km eine Vergleichbarkeit zwischen den Käfigpositionen gegeben. Zusätzlich werden zwischen Juni und Juli Wassertemperaturen von über 23 °C erreicht, wodurch die bislang definierten Temperaturkriterien für eine erfolgreiche Reproduktion erfüllt werden (Mather *et al.*, 1995; Schaefer, 2001; Fromentin & Powers, 2005; Mylonas *et al.*, 2007).

4.3.2 Vergleichende Standortanalysen und Identifikation der notwendigen Laichtemperatur

Um die erforderlichen Umweltparameter für eine erfolgreiche Fortpflanzung des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches in Gefangenschaft zu ermitteln, werden nachfolgend die Datenaufzeichnungen der HOBO-Käfigdatenlogger mit den Reproduktionserfolgen bzw. -misserfolgen, den eventuell durchgeführten hormonellen Behandlungen und den jeweiligen Haltungsbedingungen verglichen.

Anhand des Fortpflanzungserfolgs können die drei Standorte in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen in die Positionen Cartagena und Vibo, an denen über die Dauer der drei respektive zwei Projektjahre ein jährliches Abbläichen der Zuchtfische beobachtet werden konnte und zum anderen in den Standort Malta, an dem im Jahr 2008 keine und in den beiden Folgejahren nur eine unzureichende Reproduktion nachgewiesen wurde. Neben der Bestimmung der kritischen Fortpflanzungstemperatur wird versucht diese Divergenz anhand der Messdaten zu erklären.

Einfluss der Photoperiode

Wie unter Absatz 3.2.1 beschrieben, musste aufgrund der hohen Wartungsintensivität auf eine dauerhafte Messung der Beleuchtungsstärke verzichtet werden. Als verantwortlicher Faktor für die Abnahme der detektierten Illuminanz (vgl. Abbildung 3.4 & 3.5A) stellte sich das unter Absatz 4.2 beschriebene Biofouling heraus. Insofern konnten mögliche Auswirkungen der Tageslänge und der Beleuchtungsstärke auf den Reproduktionserfolg nicht untersucht werden, obwohl diese einen großen Einfluss auf die Maturation und den reproduktiven Zyklus bei Fischen haben. So wurde mittlerweile nicht nur festgestellt, dass eine Verlängerung der Photoperiode sowie eine Steigerung der Illuminanz zu einer Reduktion der Plasmakonzentration des Indolamins Melatonin führt, sondern gleichfalls, dass Melatonin einen negativen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Leber-Achse ausübt und somit einen direkten Effekt auf die Gonadogenese sowie die finale Spermatogenese und Oogenese der Knochenfische hat (Bromage *et al.*, 2001).

Einfluss der Umgebungstemperatur

Aus den oben genannten Gründen werden daher hauptsächlich die mehrmonatigen Messungen der Käfigtemperatur zur Charakterisierung der erforderlichen Laichbedingungen herangezogen. Im Gegensatz zu den vertikalen Temperaturaufzeichnungen, bei denen signifikante Differenzen mit zunehmender Tiefe registriert werden konnten (vgl. Tabelle 3.1), waren in den Horizontalebene, sprich der himmelsrichtungsbezogenen Ausrichtung der Datenlogger, keine Temperaturunterschiede

zu verzeichnen. Hervorgehend aus dieser Feststellung resultiert die Erkenntnis den Materialaufwand bei zukünftigen Messungen auf zwei bis drei vertikal angebrachte Datenlogger reduzieren zu können, wodurch ggf. die Möglichkeit zur täglichen Reinigung der Lichtsensoren besteht.

Der teilweise verzeichnete signifikante Temperaturunterschied zwischen Datenloggern, angebracht in unterschiedlichen Tiefen, steht mit der sich im Sommer ausbildenden Oberflächensprungschicht in Verbindung. Die Sprungschicht oder Pyknokline bezeichnet den vertikalen Übergang zwischen Wasserschichten unterschiedlicher Dichte und kann durch Temperaturunterschiede (Thermokline), Salinitätsunterschiede (Halokline) oder durch Konzentrationsunterschiede gelöster Feststoffe (Chemo-kline) entstehen (Garrison, 2011). Im beobachteten Fall bildeten sich die oberflächennahen Thermoklinen und die damit einhergehenden signifikanten vertikalen Temperaturunterschiede durch die starke Wassererwärmung in den Sommermonaten aus. Dies ist auf die zunehmende Dichtereduktion des sich erwärmenden Oberflächenwassers und der damit einhergehenden scharfen Zonierung der Wasserschichten zurückzuführen. Die uneinheitliche Observation einer Thermokline kann mit der standortspezifischen Wetterlage in Verbindung gebracht und anhand der Temperaturlaufzeichnungen der Abbildungen 3.6 bis 3.8 nachvollzogen werden. Perioden mit einer guten und konstanten Wetterlage führten zum Auseinanderdriften der tiefenspezifischen Temperaturlaufzeichnungen, stürmische Phasen hingegen zu einer Durchmischung der Schichtung und einer damit einhergehenden Annäherung der Temperaturen. Jedoch konnte die Existenz oder Absenz einer solchen Sprungschicht in keinen direkten Zusammenhang mit dem Abreicherfolg gebracht werden.

Bei der Analyse aller beobachteten Reproduktionsvorgänge konnte die Käfigdurchschnittstemperatur während der beobachteten Laichzeiträume mit $23,8\text{ °C} (\pm 0,74)$ beziffert werden (vgl. Abbildung 3.9). Vernachlässigt man die signifikant geringere Laichzeittemperatur des Standortes Malta im Jahr 2010, kann die präferierte Laichtemperatur des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches in Käfiganlagen des Mittelmeerraums mit $24,06\text{ °C} (\pm 0,38)$ angegeben werden. Damit entsprechen diese Werte, die sich aus über 11000 Einzelwerten zusammensetzen, den von Schaefer (2001), Fromentin & Powers (2005) und Mylonas *et al.* (2007) publizierten Laichtemperaturen, wobei sie sich jedoch nicht nur auf punktuell gemessene Oberflächentemperaturen, sondern auf den gesamten dreidimensionalen Käfigraum beziehen. In diesem Zusammenhang konnte zusätzlich festgestellt werden, dass die Oberflächendurchschnittstemperaturen des ersten Laichtags – mit Ausnahme der Versuchsreihe „Cartagena 2010“ – den jeweils zugehörigen mittleren Reproduktionstemperaturen entsprachen (vgl. Abbildung 3.10, 3.11 & 3.12). Hieraus lässt sich schließen, dass sowohl die hormongestützte als auch die spontane Reproduktionsphase des NBFT beginnt, sobald die Wasseroberfläche eine Temperatur von $23,8\text{ °C}$ einmalig überschreitet. Schlussfolgernd ist zu vermerken, dass der optimale Zeitpunkt für die Hormoninduktion nicht nur vom reproduktiven Status der Zuchtfische abhängig ist, sondern auch von der vorherrschenden Temperatur bzw. der Wetterlage determiniert wird. In den Projekten REPRODOTT (REPRODOTT, 2006; Mylonas *et al.*, 2007), SELFDOTT (de la Gandara *et al.*, 2010; SELFDOTT, 2010) und ALLOTUNA (De Metrio *et al.*, 2010a; De Metrio *et al.*, 2010b) konnte gezeigt werden, dass der fortpflanzungsinduzierende Reiz der Hormonimplantate nur dann gegeben ist, wenn der Gonado-

somatische-Index (GSI) der Zuchtfische, also das Gewichtsverhältnis zwischen Gonade und Körpermasse ($Gonadengewicht \times 100 \div Körpergewicht$), ausreichend groß war ($\geq 2,5$).

Es bleibt demnach festzuhalten, dass die kritischen Faktoren einer gelungenen Reproduktion neben verschiedenen externen Einflüssen wie Temperatur, Licht, Stress oder dem Nahrungsangebot während der Gonadenreife (Mather *et al.*, 1995) auch zeitgenaue Hormonimplantationen sind. Der Zeitpunkt einer Hormonbehandlung sollte dabei möglichst so gewählt werden, dass eine konstante Wetterperiode vorherrscht, in der die Wasseroberflächentemperatur (Tag-Nacht-Durchschnitt) zwischen 23,3 und 23,6 °C liegt. Diese Temperaturvorgabe setzt sich zum einen aus der gemessenen täglichen Oberflächenwassererwärmung während einer stabilen Wetterlage im Monat Juni (\bar{x} Temperaturanstieg p.d. 0,15 °C) und der publizierten sowie beobachteten Inkubationszeit der Hormonimplantate von zwei bis acht Tagen (vgl. Abbildung 3.6 bis 3.8; de la Gandara *et al.*, 2010; Mylonas *et al.*, 2010) zusammen.

Ein möglicher fortpflanzungsinduzierender Reiz durch einen rapiden Temperaturanstieg innerhalb weniger Tage – ein sogenannter ramping-Effekt – kann durch den Vergleich der 14-tägigen Temperaturverläufe vor der Hormoninduktion bzw. vor der beginnenden Laichzeit ausgeschlossen werden, da keine positive Korrelation zwischen Temperaturanstieg und Ablicherfolg observiert wurde. Gleiches galt auch bei der Betrachtung kürzerer Zeiträume von zwei bis fünf Tagen.

Der Standort Malta im Vergleich

Projektjahr 2009

Für die im Jahr 2009 ausgebliebene Reproduktion der Zuchtfische am Standort Malta kann anhand der komparativen Analyse der Messdaten ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine temperaturbedingte Verursachung handelte. Im ersten Versuchsjahr zeigten nicht nur alle Standorte einen vergleichbaren Temperaturverlauf mit einer durchschnittlichen täglichen Erwärmung der Wasseroberfläche zwischen 0,12 und 0,13 °C, sondern auch die ersten Hormonimplantationen wurden zu vergleichbaren Zeitpunkten am 26. bzw. 27.06. bei Oberflächentemperaturen von 23,4 °C (Cartagena), 23,6 °C (Malta) und 24,1 °C (Vibo) durchgeführt (vgl. Abbildung 3.6). Trotz vergleichbarer Temperaturen konnte in den beiden maltesischen Zuchtkäfigen keine Reproduktion festgestellt werden, weshalb die Ursache in anderen Faktoren wie z.B. der unmittelbaren Nähe der maltesischen Käfige zum Industriehafen (Malta Freeport) und die auf 10 m begrenzte Tiefe der Versuchskäfige zu suchen ist. Als weiterer einflussnehmender Faktor ist das eventuelle Vorhandenseins eines erhöhten Stresspotentials der maltesischen Tiere gegenüber den in Italien oder Spanien gehaltenen Fischen zu nennen. So wurden die Zuchtfische aus Cartagena und Vibo im Gegensatz zu den maltesischen Tieren bereits mehrere Jahre in Käfiganlagen gehalten, was eine Adaptation des italienischen und spanischen Broodstocks an die äußerlichen Bedingungen und dem zu Folge ein reduziertes Stresspotential bewirkt haben könnte.

Projektjahr 2010

Mit etwa 350000 gesammelten Eiern konnte im Folgejahr zwar eine Reproduktion der Zuchtfische in einem maltesischen Käfig nachgewiesen werden, jedoch muss die quantitative Ausbeute im Vergleich

zu den anderen Standorten (Cartagena ~ 50 Mio. Eier, Vibo ~ 100 Mio. Eier, vgl. Tabelle 3.2) und zu den von Medina *et al.* (2002) publizierten Daten als unzureichend klassifiziert werden. Medina *et al.* (2002) beschreibt die Menge an laichbereiten (Stufe 4) Oocyten mit 92,8 Oocyten pro Gramm Körpergewicht, was bei einem 50 kg schweren Weibchen 4,64 Mio. entspricht. Geht man zusätzlich davon aus, dass von den 25 Käfigtieren zwölf Tiere weiblich waren, ist bei einem einmaligen Reproduktionsereignis aller Tiere mit einer Eimenge von etwa 55 Mio. zu rechnen, welche durch die Umwandlung von Stufe 3 in Stufe 4 Oocyten (Portionslaichen) zusätzlich erhöht werden kann (Medina *et al.*, 2002). In Anbetracht der aufgestellten Rechnung können die Reproduktionsereignisse in Spanien und Italien (2009 bis 2011) als erfolgreich bewertet bzw. davon ausgegangen werden, dass nahezu alle Thunfische am Abweichvorgang beteiligt waren. Im Vergleich zum Vorjahr konnten in Malta (2010) sowohl signifikant niedrigere Wassertemperaturen ($p < 0,001$) als auch eine um 1,8 °C geringere Jahresdurchschnittstemperatur der Luft (www.maltaweather.com) detektiert werden. Weiterhin konnte im Kontrast zu den anderen Standorten neben der bereits beschriebenen signifikant geringeren Laichzeittemperatur auch eine signifikant niedrigere Juni-Temperatur ($p < 0,001$) gegenüber dem Standort Vibo gemessen werden.

Zusammenfassend kann für den Standort Malta (2010) festgehalten werden, dass die geringen Wassertemperaturen einen negativen Einfluss auf die Reproduktion des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches besaßen, welcher zudem durch die verhältnismäßig früh durchgeführten Hormoninduktionen (05.06.2010, $\bar{x} = 22,0$ °C und 25.06.2010 $\bar{x} = 22,1$ °C) nicht vollständig kompensiert werden konnte.

Projektjahr 2011

Aus Abbildung 3.8B geht hervor, dass die Hormonimplantation im Jahr 2011 am Standort Malta deutlich zu früh (14.06.2011) bzw. bei einer zu geringen Oberflächenwassertemperatur von 21,5 °C durchgeführt wurde, so dass daraufhin kein unmittelbares Abweich der Fische stattfand. Die registrierte Laichzeit vom 01. bis 08.07.2011 kann aufgrund des großen zeitlichen Abstands zur Hormonimplantation (18 Tage) demnach nur bedingt als direkte Folgeerscheinung der hormonellen Behandlung angesehen werden (Mylonas & Zohar, 2001). Vielmehr lässt sich das Überschreiten der Temperaturschwelle von 23,8 °C mit dem einsetzen der Laichzeit in Zusammenhang bringen. Warum mit etwa 780000 Eiern erneut nur eine vergleichsweise geringe Reproduktionsrate am Standort Malta (2011) nachgewiesen wurde, kann hingegen nicht über die Temperaturlaufzeichnungen erklärt werden.

Zusammenfassende Betrachtung

Da bis auf das Jahr 2010 ein temperaturbedingter Negativeffekt für die maltesischen Zuchtfische auszuschließen ist, müssen andere fortpflanzungsinhibierende Faktoren diskutiert werden. Wie bereits angedeutet, ist von einem negativen Einfluss des benachbarten Industriefhafens (ca. 500 m) und den damit verbundenen Gegebenheiten wie Schiffsverkehr, Wasserverschmutzung und Sedimentaufwühlung auszugehen, da im dort positionierten Käfig in den Jahren 2009 und 2010 keine

Reproduktion beobachtet werden konnte. Desweiteren besaßen ab dem Jahr 2010 alle maltesischen Zuchtkäfige nur eine Tiefe von 10 m und waren somit nur halb so tief wie die Käfige in Spanien und Italien. Da erfolgreiche Reproduktionen mit Eizahlen von mehreren Millionen in Cartagena und Vibo in allen Projektjahren beobachtet werden konnten, kann von einem möglichen kritischen Einfluss der Käfigtiefe ausgegangen werden. Im Gegensatz dazu ist ein negativer Effekt der Nahrungszusammensetzung auszuschließen, da NBFT zum einen ein opportunistisches Nahrungsspektrum (Chase, 2002) besitzen und zum anderen in Malta ein erheblich breiteres Futterangebot, bestehend aus verschiedenen Fischarten und Cephalopoden, bereitgestellt wurde als an den anderen Standorten (SELF-DOTT, 2010).

Als hinzutretender Faktor, der eventuell hinderlich für eine erfolgreiche Fortpflanzung in Malta war, kann das jährliche Austauschen des nicht in Hafennähe positionierten Broodstocks angesehen werden. Für diese These spricht sowohl die langjährige Haltung und der Reproduktionserfolg der Zuchtfische in Spanien und Italien als auch die am Pazifischen Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus orientalis*) und Gelbflossen-Thunfisch (*Thunnus albacares*) sowie anderen marinen Fischarten, wie Felsenbarsch (*Morone saxatilis*) oder Goldbrassen (*Sparus aurata*) gesammelten Erkenntnisse, die für eine zeitliche Domestizierung der Zuchtfische sprechen (Zohar & Mylonas, 2001; Wexler *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2005). Zusätzlich kann durch den erkennbaren Trend hin zu einer jährlich früher beginnenden und gleichzeitig länger andauernden Reproduktionsphase in Cartagena und Vibo von einer Adaptation des Broodstocks an die Käfigbedingungen ausgegangen werden. Ob standortspezifische Oberflächenströmungen Einflüsse auf das Reproduktionsverhalten der Fische oder auf eine mögliche Verdriftung der abgelaichten Eier ausüben, kann nicht ausreichend diskutiert werden, da erst im Jahr 2011 damit begonnen wurde wetterbedingte Friktionsströmungen am Standort Malta mit einem Beschleunigungskraftmesser (HOBO Pendant G Data Logger, Onset Computer Corporation), der die Beschleunigung, Erschütterung und Vibration des Datenloggers in drei Achsen misst, aufzuzeichnen.

4.4 Charakteristika des laichzeitbedingten Schwimmverhaltens

Um nachfolgend die Besonderheiten des Schwimmverhaltens während der Reproduktionsperiode darzustellen, werden die Temperatur- und Tiefenaufzeichnungen der externen Star-Oddi-Logger untereinander und mit den Messdaten der stationären Datenlogger verglichen.

Die drei untersuchten Versuchstiere unbekanntes Geschlechts zeigten – mit Ausnahme der Laichzeit – ein deutliches circadianes Schwimmverhalten (vgl. Abbildungen 3.13, 3.14 & 3.16). Die aufgezeichnete circadiane Rhythmik bestand im Wesentlichen aus einer nächtlichen Präferenz für größere Tiefen und oberflächennahem Schwimmen während des Tages. Ein äquivalentes Schwimmverhalten wurde von Kitagawa *et al.* (2000) und Musyl *et al.* (2003) auch bei Wildtieren der Spezies *Thunnus orientalis* bzw. *Thunnus obesus* festgestellt. Ein Grund für die rhythmischen Tauchgänge der Thunfische in Tiefen von bis zu 500 m wird in der Verfolgung von Migrationsbewegungen ihrer Beuteorganismen vermutet. Dementsprechend besteht einerseits die Möglichkeit zur Annahme, dass die Käfig-

tiere trotz zum Teil mehrjähriger Gefangenschaft fortwährend diesem Tauchrhythmus im kleineren Maßstab folgen oder dass sie sich andererseits an die mehrmaligen Fütterungen während des Tages angepasst haben.

Anhand der aufgezeichneten Tauchtiefen der zurückgewonnenen Datenlogger des Jahres 2010 konnte statistisch untermauert werden, dass beide Versuchstiere ein signifikant verändertes Schwimmverhalten zwischen der registrierten Laichperiode und den darauf folgenden Tagen zeigten (vgl. Absatz 3.2.2 & Abbildung 3.15). Die observierten Unterschiede gehen vornehmlich aus nächtlichen Präferenzen für geringere Wassertiefen hervor, die als Indiz für eine jeweilige Reproduktionsbeteiligung angesehen werden können. Diese Annahme wird durch die Publikationen von Mather (1995), Block *et al.* (2001), Masuma *et al.* (2008) und Mylonas *et al.* (2010) gestützt, in denen berichtet wird, dass die Eiablage des Nachts und nahe der Wasseroberfläche stattfindet. Allerdings konnte die Bevorzugung für ein oberflächennahes Schwimmen eine Woche vor der Laichzeit sowohl anhand des Kurvenverlaufs als auch durch statistische Datenuntersuchungen nicht ausgeschlossen werden, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass es bereits vor dem Auffinden der ersten Eier zu Reproduktionstätigkeiten kam.

Die Daten des einzigen auswertbaren Datenloggers des Jahres 2011 zeigten im Kontrast zu den Aufzeichnungen des Vorjahres keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Laichzeit und den darauf folgenden Tagen. Der signifikante Unterschied im Schwimmverhalten zwischen dem Zeitraum vom 26. bis 29.06.2011 und der anhand von Eifunden belegten Laichzeit zwischen dem 01. bis 08.07.2011 spricht allerdings dafür, dass auch dieses Versuchstier bereits zu einem früheren Zeitpunkt an einem Reproduktionsvorgang beteiligt war (vgl. Abbildung 3.16B). Aufgrund der ausgeprägten ganztägigen Präferenz für den Tiefenbereich zwischen 0 und -3 m wies der untersuchte NBFT vom 26. bis 29.06. das bereits zuvor beschriebene Laichverhalten auf. Da im besagten Zeitraum jedoch nur wenige hundert Eier im Zuchtkäfig vorgefunden wurden, ist davon auszugehen, dass entweder nur eine unvollständige Reproduktion eines oder weniger weiblicher Tiere stattgefunden hat, oder dass die abgelaichten Eier trotz angebrachtem „egg collector“, einem zirkulär im Käfig befestigten Plastikvorhang, aus diesem verdriftet wurden.

Die aufgezeichneten Temperaturdaten der Datenlogger des Jahres 2010 sind aufgrund der zuvor beschriebenen signifikant niedrigeren Jahrestemperatur in Malta (vgl. Absatz 4.3.2) nicht mit der ermittelten erforderlichen Laichtemperatur von 23,8 °C zu vereinbaren. Die beobachtete Reproduktion kann daher als direkte Folge der zweimaligen Hormoninduktion bzw. anderer externer Faktoren wie der Photoperiode angesehen werden. Im Gegensatz dazu kann an den Temperatureaufzeichnungen des Jahres 2011 abgelesen werden, dass sich das markierte Versuchstier bereits ab dem 25.06. dauerhaft in Wasserschichten aufhielt, die der kalkulierten Laichtemperatur von 23,8 °C entsprachen bzw. diese überschritten (vgl. Abbildung 3.16A). Demnach spricht nicht nur das aufgezeichnete Schwimmverhalten, sondern auch die gleichzeitig ermittelte Umgebungstemperatur für ein nicht registriertes Fortpflanzungsereignis.

4.5 Identifikation und Anwendung wirksamer Injektionsnarkotika für Teleosteer

Bislang beschäftigen sich nur wenige wissenschaftliche Arbeiten mit der Beschreibung und Identifikation einer wirksamen sowie sicheren Injektionsnarkose bei Knochenfischen (u.a. Oswald, 1978; Harvey *et al.*, 1988; Graham & Iwama, 1990; Fleming *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005; Neiffer & Stamper, 2009). Ursächlich dafür ist die einfache Anwendung und gute Wirksamkeit von Inhalationsanästhetika, die sich aus einem breiten Spektrum natürlicher und synthetischer Substanzen zusammensetzen (Neiffer & Stamper, 2009). Wie bereits unter Absatz 1.5.1 beschrieben, ist diese Narkosetechnik bei großen und stressanfälligen Fischen wie dem Atlantischen Blauflossen-Thunfisch nicht praktikabel, woraus sich die Notwendigkeit zur Etablierung einer parenteralen (intramuskulären bzw. intraperitonealen) Wirkstoffapplikation herleitet.

Bei den nachfolgend vollzogenen Vergleichen mit anderen wissenschaftlichen Publikationen ist darauf zu achten, dass neben möglichen interspezifischen Akzeptanzunterschieden für die gewählten Anästhetika vor allem die Umgebungstemperatur als ausschlaggebend für die benötigten Wirkstoffkonzentrationen anzusehen ist. Für ektotherme Fische gilt im Allgemeinen, dass eine geringe Umgebungstemperatur mit einer verlängerten Induktionszeit und Narkosedauer assoziiert ist, wobei das Gegenteil bei höheren Temperaturen eintritt (Neiffer & Stamper, 2009).

4.5.1 Grundlegende Betrachtung der Applikationswege

Anhand der zunächst an Nil-Tilapien durchgeführten Narkoseversuche konnte festgestellt werden, dass die intramuskuläre Wirkstoffapplikation nicht den gewünschten anästhesierenden Effekt auslöste bzw. zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führte. Bedingt wurde dies durch die teilweise unvollständigen Narkosemittelapplikationen, die unter Zuhilfenahme von Lebensmittelfarbe sichtbar gemacht werden konnten. Das Einspritzen von mehr als 100 µl Injektionslösung resultierte – unabhängig vom Gewicht des verwendeten Versuchstiers – im sofortigen Austreten eines Teils des applizierten Volumens. Dementsprechend konnte die partiell beobachtete leichte Sedierung nicht auf eine definierte Narkosemittelkonzentration zurückgeführt werden. Gleichzeitig war es unmöglich den sedierenden Effekt durch eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentrationen zu intensivieren, da dies mit einer löslichkeitsbedingten Volumenvergrößerung der Injektionslösungen einherging, was wiederum den oben beschriebenen Narkosemittelaustritt hervorrief bzw. diesen verstärkte. Die unzureichende Akzeptanz intramuskulärer Injektionen bei Knochenfischen ist auf eine Kombination des Tonus der Schwimmmuskulatur und dem Fehlen einer Unterhaut (Subkutis) zurückzuführen (Hawkes, 1974). Wie im beobachteten Fall werden bereits kleine Mengen injizierter Lösungen durch Muskelkontraktionen entlang des Einstichkanals zurückgepresst und aufgrund der fehlenden Subkutis und der festen Verbindung zwischen Muskulatur und Dermis ausgeschieden.

Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Publikationen von Oswald (1978) und Williams *et al.* (2004), welche zu den bislang wenigen zählen, die Resultate zur intramuskulären Narkose bei Knochenfischen präsentieren. Nur in einer der beiden Veröffentlichungen wird das so eben beschriebene Prob-

lem einer intramuskulären Injektionsvolumenbegrenzung aufgegriffen, jedoch mit einem Volumen von mehr als 300 µl angegeben (Oswald, 1978). In einem von Oswald (1978) beschriebenen Experiment wurden bis zu 500 g schwere Regenbogenforellen mit Ketaminkonzentrationen (Ketamin-Hydrochlorid) von bis zu 150 mg/kg behandelt. Bei einer maximalen Löslichkeit des Ketamins von 200 mg/ml (Plumb, 2008) und dem entsprechenden Fischgewicht von etwa 500 g müsste das verabreichte Injektionsvolumen ca. 375 µl betragen haben. Dies entspricht einem Volumen das keinesfalls mit den eigens gesammelten und zuvor beschriebenen Observationen konform geht. Williams *et al.* (2004) beschreibt die effektive Dosis des dissoziativen Anästhetikums Ketamin bei der Pazifischen Makrele sogar mit einer Spanne zwischen 53 und 228 mg/kg. Beim angegebenen Versuchstiergewicht von 350 g entspräche die Injektion von 228 mg/kg Ketamin einem Applikationsvolumen von etwa 3,25 ml. Gleichzeitig wird das Gewicht der in dieser Studie verwendeten Pazifik-Bonitos nicht angegeben, weshalb kein Rückschluss auf das injizierte Volumen bei dieser Spezies gezogen werden kann. Bei der von Flemming *et al.* (2003) durchgeführten Kurzzeimmobilisation am Atlantischen Stör (*Acipenser oxyrinchus*) wird die beschriebene Volumenlimitation ebenfalls nicht erwähnt. Jedoch lag das intramuskulär applizierte Volumen, bei maximalen Ketaminkonzentrationen von 7 mg/kg und einem gleichzeitigen Fischgewicht von ca. 3,6 kg, hier deutlich unterhalb der quantitativen Löslichkeitsbegrenzung von 100 µl Wasser oder Ringerlösung.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Problematik bei intramuskulären Injektionen und der unter Absatz 1.5 dargestellten Notwendigkeit zur Prämedikation bei beabsichtigten intravenösen Applikationen bezieht sich die nachfolgende Beschreibung ausschließlich auf den intraperitonealen Injektionsweg. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass bei dieser Applikationsweise das Einspritzen von 500 µl angefärbter physiologischer Kochsalzlösung in 150 g schwere Versuchstiere nicht mit einem unnachvollziehbaren Wirkstoffverlust einherging. Diesbezügliche Referenzen finden sich aktuell kaum. Bislang wurden lediglich in der Veröffentlichung von Oswald (1978) potente Substanzen für eine intraperitoneal induzierte Narkose bei Knochenfischen beschrieben. Allerdings wurde auch in dieser Studie der Wirkstoff Ketamin ausschließlich intramuskulär verabreicht. Demnach wurde die anästhetische Potenz intraperitoneal applizierten Ketamins und dessen Mischungen mit Xylazin oder Detomidin bei Knochenfischen im Zuge dieser Arbeit erstmalig wissenschaftlich niedergeschrieben.

4.5.2 Erläuterung potenter Wirkstoffe sowie deren Konzentrationsspektren

In den durchgeführten intraperitonealen Injektionsversuchen zum Dosis-Wirkungsverhältnis verschiedener anästhetisch wirksamer Substanzen stellten sich drei Stoffe bzw. deren Mischungen als sichere, kontrollierbare und narkoseinduzierende Wirkstoffe heraus. Vor allem das als NMDA-Rezeptor-Antagonist wirksame Ketamin konnte sowohl als potentes Mono- als auch Mischanästhetikum für Tilapien identifiziert werden. Die nachfolgend diskutierten Versuchsergebnisse an Nil-Tilapien repräsentieren die beobachteten Narkosewirkungen bei einer Wassertemperatur von 25 °C. Die minimal effektive Dosis (MED) des Ketamins, in diesem Fall als jene Dosis definiert, welche einen Übergang ins Narkosestadium III. vermittelte, konnte mit 40 mg/kg beziffert werden (vgl. Abbildung 3.17A). Diese Dosis, die durchschnittlich 14,2 min nach der Injektion zu einer Anästhesie führte, ist

1,25- bis 3,75-fach geringer als alle veröffentlichten Konzentrationen, welche für eine erfolgreiche intramuskuläre Applikation bei 10 °C notwendig waren (Oswald, 1978; Neiffer & Stamper, 2009). Als Ursache für das günstigere Dosis-Wirkungsverhältnis einer intraperitonealen Applikation lässt sich eine Diskrepanz bei der Wirkstoffresorption in den Blutkreislauf nennen, da diese im Kontrast zur gering durchbluteten weißen Muskulatur in der Bauchhöhle der Knochenfische deutlich schneller abläuft (Mosse, 1978). Dementsprechend konnte festgestellt werden, dass eine direkte intravenöse Ketaminapplikation augenblicklich und bereits bei einer Konzentration von 30 mg/kg zu einer Anästhesie bei Zitronenbuntbarschen (*Cichlasoma citrinellum*), Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) führt (Graham & Iwama, 1990; Bruecker & Graham, 1993). Eine Erhöhung der verabreichten Ketaminkonzentration bewirkte eine Verkürzung der Induktionszeit und verlängerte die Narkosedauer, weswegen das resultierende Verhältnis dem erwarteten Verlauf einer Dosis-Wirkungs-Kurve folgt (De Lean *et al.*, 1978).

Auch am Goldbrassen erwies sich die an Tilapien identifizierte MED von 40 mg/kg Ketamin als anästhetisch wirksame Konzentration. Wie jedoch aus Abbildung 3.17 hervorgeht, konnte bei den beiden erprobten Konzentrationen eine – im Vergleich zu den an Tilapien gewonnenen Ergebnissen – verlängerte Induktionszeit und Narkosedauer festgestellt werden. Diese Beobachtung ist vornehmlich auf die 5 °C geringere Wassertemperatur zurückzuführen, welche wie einleitend beschrieben wurde, eine langsamere Narkosewirkung zur Folge hatte (Neiffer & Stamper, 2009). Dieses Ergebnis kann stellvertretend für eine positive interspezifische Übertragbarkeit der an Tilapien ermittelten Wirkstoffkonzentrationen angesehen werden.

Durch die Beimischung eines α_2 -Adrenozeptor-Agonisten wie Xylazin, Medetomidin oder Detomidin, gelang es die MED des Ketamins deutlich zu reduzieren (vgl. Abbildung 3.19). Vor allem die Zugabe des Imidazolderivats Detomidin, welches aus Gründen der Volumenreduktion gegenüber dem Medetomidin bevorzugt wurde (vgl. Absatz 3.3.2), resultierte bei etwa gleichbleibender Induktionszeit von 13,8 min in einer 2,7-fachen Reduktion der Ketaminkonzentration (vgl. Abbildung 3.18A). Die Minimalisierung der Wirkstoffkonzentration, die mit einer Reduktion der Injektionsvolumina einhergeht, war insbesondere in Hinblick auf eine erfolgreiche Narkotisierung adulter NBFT erstrebenswert. Eine Erhöhung der Ketaminkonzentration bei gleichzeitiger Beibehaltung der Detomidinkonzentration von 0,5 mg/kg führte nicht nur zu einer Verkürzung der Induktionszeit auf bis zu 6,9 min, sondern darüber hinaus zu einem signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Narkosedauer auf 55,8 min. Zwar konnte während der gesamten Narkosedauer eine selbstständige Atmung der Tilapien beobachtet werden, jedoch ist eine derart dauerhafte Anästhesie beim NBFT nicht anzustreben, da bei diesem durch den Verlust des opercular- und kiefergestützten Wassertransports über die Kiemen keine selbstständige Atmung gewährleistet werden kann (Muir & Kendall, 1968; Bushnell & Jones, 1994). Eine Aufhebung der Detomidinwirkung mit der 5-fachen Menge des Antidots Atipamezol, einem α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten, der sowohl von Williams *et al.* (2004) als auch Neiffer & Stamper (2009) erfolgreich an Teleostern und Elasmobranchiern erprobt wurde, konnte nicht getestet werden, da das Präparat bzw. der Wirkstoff nicht bezogen werden konnte. Die eigens ermittelten intraperitonea-

len Wirkstoffkonzentrationen (15, 20 bzw. 25 mg/kg : 0,5 mg/kg) können mit bislang publizierten Wirkstoffkonzentrationen für eine erfolgreiche intramuskuläre Narkoseinduktion durch Ketamin-Detomidin-Mischungen beim Offiziersbarsch (*Rachycentron canadum*) oder Gelbschwanz-Schnapper (*Ocyurus chrysurus*) verglichen werden (Neiffer & Stamper, 2009) und sind damit in Folge zuvor genannter Vergleiche und Sachverhalte als zu empfehlende Wirkstoffkompositionen beim NBFT anzugeben.

Die beobachtete, sich von der Injektionsstelle ausbreitende Entfärbung der Versuchstiere nach Detomidin- bzw. Medetomidinapplikation ist auf eine Aggregation der Melaningranula in den Melanophoren zurückzuführen (Horsberg *et al.*, 1996). Eine Konglomeration dieser Granula geht mit einer optischen Aufhellung bzw. einem Farbverlust einher und wird über eine Stimulation von dermalen α_2 -Adrenozeptoren vermittelt (Karlsson *et al.*, 1989). Die erneute Dispersion der Melaningranula wird durch die Metabolisierung der α_2 -Adrenozeptor-Agonisten initiiert und führt im Folgenden zur Rückerlangung der Körperfarbe (Hawkes, 1974).

Durch die Beimischung von 5 mg/kg Xylazin gelang es die MED des Ketamins auf 25 mg/kg zu reduzieren. Die beobachtete Wirkstoffdifferenz zwischen 0,5 mg/kg Detomidin und 5 mg/kg Xylazin bei gleichzeitiger Gabe von 15 bzw. 25 mg/kg Ketamin ist auf die etwa 100-fach höhere Affinität des Detomidins für alle α_2 -Adrenozeptor Subtypen zurückzuführen (Schwartz & Clark, 1998). Dies hat zur Folge, dass deutlich geringere Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt werden können, um einen vergleichbaren anästhetischen Effekt hervorzurufen. Gleichzeitig ist die beschriebene Affinitätsdifferenz für die nicht feststellbare Entfärbung der Versuchstiere nach Xylazingabe verantwortlich. Der anästhetische Effekt einer Wirkstoffkombination von Ketamin und Xylazin, die auch als Hellabrunner Mischung bezeichnet wird, wurde bereits bei Knochenfischen beschrieben, bezieht sich jedoch ausschließlich auf eine inhalative Verabreichung (Geiger, 2007; Al-Hamdani *et al.*, 2010). Aus diesem Grund ist die konstatierte MED von 25 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin nur mit der effektiven Dosis von 12-20 mg/kg Ketamin und 6 mg/kg Xylazin (i.m.) bei Haien vergleichbar (Neiffer & Stamper, 2009).

Die Verstärkung der anästhetischen Wirkung durch die gleichzeitige Verabreichung von Ketamin und Detomidin bzw. Xylazin entsteht durch den synchronen Effekt an zwei Rezeptorgruppen des Nervensystems. Während die Ketaminmoleküle im Inneren der NMDA-Rezeptoren nicht-kompetitiv von den Phenyklidin-Rezeptoren gebunden werden, wodurch der Ionenfluss durch die NMDA-Rezeptoren zum Erliegen kommt, beruht die Wirkung der Detomidin- bzw. Xylazinmoleküle auf ihrem agonistischen Effekt an α_2 -Adrenozeptoren und der damit verbundenen stark reduzierten Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Noradrenalin (Lodge & Johnson, 1990; Starke, 2005). Zusätzlich heben sich die jeweiligen Nebenwirkungen, wie Atemstillstand bei alleiniger Xylazinverabreichung oder Katalepsie nach Monoanästhesie mit Ketamin, durch die duale Wirkstoffapplikation auf (Oswald, 1978; Green *et al.*, 1981).

Im Gegensatz zu den Studien von Fleming *et al.* (2003) und Miller *et al.* (2005), in denen das Hypnotikum Propofol erfolgreich zur Anästhesie des Atlantischen Störs (i.v.) bzw. des Weißgepunkteten Bambushais (*Chiloscyllium plagiosum*) (i.v.) eingesetzt wurde, konnten in der vorliegenden Arbeit keine suffizienten Ergebnisse nach intraperitonealer Applikation des Reinstoffs respektive einer Ketamin-Propofol-Mischung beobachtet werden. Vielmehr korrelieren die gewonnenen Beobachtungen mit denen, die von Alves *et al.* (2007) an Mäusen verzeichnet wurden. An Tilapien waren die ersten Sedierungserscheinungen, die mit einem taumelnden Schwimmen und einem Absinken auf den Boden des Versuchsbeckens einhergingen, nach Injektion von 90 bis 120 mg/kg Propofol (i.p.) zu beobachten, womit ein vergleichbarer Konzentrationsbereich wie bei Mäusen (75 bis 200 mg/kg) identifiziert werden konnte. Gleichfalls wurde in der Vergleichsstudie festgestellt, dass die synchrone Verabreichung anästhetisch wirksamer Konzentrationen von Propofol kombiniert mit einem weiteren Wirkstoff, bei Alves *et al.* (2007) waren dies verschiedene Opioide, nahezu immer mit dem Tod des Versuchstiers assoziiert war. Diese Beobachtung deckt sich mit den observierten Resultaten nach Gabe von 20 mg/kg Ketamin in Kombination mit 40 mg/kg Propofol (i.p.) bei Nil-Tilapien. Im Rahmen dieses Experiments konnte der Tod der vier verwendeten Versuchstiere nur durch mehrstündige künstliche Beatmung abgewendet werden. Die insuffiziente anästhetische Potenz des Propofols und dessen Mischung kann zum einen auf die hohe Metabolisierungsrate in der Leber zurückgeführt werden, welche durch die direkte Resorption in die Pfortader und dem damit begünstigten First-Pass-Effekt (Effekt der ersten Leberpassage) nach intraperitonealer Applikation begünstigt wird. Zum anderen ist der Einsatz von Propofol-Mischungen durch die beobachtete Atemdepression stark limitiert, da die auftretende Hypoxämie und Hyperkapnie – ohne intensive künstliche Beatmung – zum Tod der Versuchstiere führen kann (Alves *et al.*, 2007).

Der folgenden tabellarischen Zusammenfassung sind die eigenen und die bislang publizierten effektiven Narkosemittelkonzentrationen bei Teleostern und Elasmobranchiern zu entnehmen. Es ist zu erkennen, dass die eigens am Modellorganismus *O. niloticus* definierten Wirkstoffspannen annähernd dem Mittelwert der jeweilig veröffentlichten Vergleichskonzentrationen entsprechen.

Tabelle 5.1: Vergleich anästhetisch wirksamer Narkosemittelkonzentrationen

Neben den injizierten Wirkstoffen und deren Dosen, ist der Applikationsweg (i.v. = intravenös, i.m. = intramuskulär, i.p. = intraperitoneal) sowie die Gattung der untersuchten Versuchstiere aufgelistet. Angegeben sind nur die narkoseinduzierenden Konzentrationen aus den angegebenen Referenzen und den eigenen Beobachtungen.

Wirkstoff	Applikationsweg	Gattung	Dosis	Referenz
Ketamin	i.v.	<i>Cichlasoma</i>	30 mg/kg	Bruecker & Graham (1993)
Ketamin	i.v.	<i>Oncorhynchus</i>	30 mg/kg	Graham & Iwama (1990)
Ketamin	i.m.	<i>Oncorhynchus</i>	50-150 mg/kg	Oswald (1978)
Ketamin	i.p.	<i>Oreochromis</i>	40-60 mg/kg	eigene Messung
Ketamin/ Detomidin	i.m.	<i>Rachycentron</i>	6-13,5 mg/kg 0,12-0,24 mg/kg	Neiffer & Stamper (2009)
Ketamin/ Detomidin	i.m.	<i>Ocyurus</i>	27-42 mg/kg 1,1-1,7 mg/kg	Neiffer & Stamper (2009)
Ketamin/ Detomidin	i.m.	<i>Sarda</i>	4 mg/kg 0,4 mg/kg	Williams <i>et al.</i> (2004)
Ketamin/ Detomidin	i.m.	<i>Scomber</i>	53-228 mg/kg 0,6-4,2 mg/kg	Williams <i>et al.</i> (2004)
Ketamin/ Detomidin	i.p.	<i>Oreochromis</i>	15-25 mg/kg 0,5 mg/kg	eigene Messung
Ketamin/ Xylazin	i.m.	<i>Carcharhinus</i>	12-20 mg/kg 6 mg/kg	Neiffer & Stamper (2009)
Ketamin/ Xylazin	i.p.	<i>Oreochromis</i>	25-35 mg/kg 5 mg/kg	eigene Messung
Propofol	i.v.	<i>Acipenser</i>	6,5 mg/kg	Fleming <i>et al.</i> (2003)
Propofol	i.v.	<i>Chiloscyllium</i>	2,5 mg/kg	Miller <i>et al.</i> (2005)

4.5.3 Charakterisierung der narkoseinduzierten Stressantwort

Um eine Aussage über die Narkosetiefe bzw. über die endokrinen Konsequenzen der jeweiligen Anästhesie tätigen zu können, werden nachfolgend die mittels ELISA bestimmten Plasmacortisolkonzentrationen sowie die via HPLC gemessenen Plasmakatecholaminkonzentrationen mit den Ergebnissen der Dosis-Wirkungsexperimente verglichen. Die quantitativen Konzentrationsbestimmungen der Stresshormone erfolgten ausschließlich in Tilapia-Plasma.

Cortisol

Anhand der unter Absatz 3.4.1 beschriebenen Evaluierung des Cortisol-ELISA konnten die Präzision und Sensitivität des gewählten Testverfahrens verifiziert und quantifiziert werden. Der Ruhe-Plasmacortisolspiegel von *O. niloticus* lag mit 22,1 ng/ml ($\pm 4,0$) im erwarteten Größenbereich von 10 bis 30 ng/ml (Barcellos *et al.*, 1999). Gemäß dieser Feststellung können externe Stressoren ausgehend von den Haltungsbedingungen bzw. vom Tötungsvorgang der Kontrolltiere ausgeschlossen werden, womit Veränderungen der Plasmacortisolkonzentration als direkte Folge der Narkose anzusehen sind. In den drei Versuchsreihen „Ketamin“, „Ketamin-Detomidin“ und „Ketamin-Xylazin“ konnte eine signifikante Erhöhung des Plasmacortisolspiegels nach Verabreichung der MED gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.22). Mit durchschnittlich 79,7 ng/ml nach Monoanästhesie mit Ketamin (40 mg/kg), 75,2 ng/ml nach Verabreichung der Ketamin-

Detomidin-Mischung (15 mg/kg und 0,5 mg/kg) und 83,9 ng/ml nach Applikation eines Ketamin-Xylazin-Gemischs (25 mg/kg und 5 mg/kg) waren zusätzlich korrespondierende Cortisolkonzentrationen als Antwort auf die Verabreichung der minimal effektiven Dosen festzustellen. Dementsprechend kann anhand des Plasmacortisols davon ausgegangen werden, dass zum einen alle Versuchstiere ein vergleichbares Narkosestadium erreichten und zum anderen eine identische Stressreaktion von den untersuchten Wirkstoffen oder dem Versuchsprozess ausging. Die Narkotisierung bzw. die Verabreichung der Anästhetika sind demnach als akute Stresssituation für die Versuchstiere anzusehen, welche eine direkte Cortisolausschüttung zur Folge hat. Dennoch liegen die eigens gemessenen Cortisolkonzentrationen deutlich unter den von Barcellos *et al.* (1999) publizierten Ergebnissen, die eine Plasmacortisolkonzentration von durchschnittlich 267 ng/ml als Antwort auf einen akuten Stressor postulieren. Da parallel mit zunehmenden Wirkstoffkonzentrationen eine Reduktion der Plasmacortisolkonzentrationen beobachtet wurde, ist zu vermuten, dass bereits die geringeren Cortisolkonzentrationen nach MED-Applikation gegenüber der Vergleichsstudie als unmittelbare Folge der Anästhesie betrachtet werden können. Gleichzeitig ist die beschriebene Reduktion der nachweisbaren Plasmacortisolkonzentrationen auf die kürzere Induktionszeit und damit auf die gesteigerten Wirkstoffkonzentrationen zurückzuführen. Das Ausmaß der reduzierten Cortisolausschüttung erreichte dabei Werte, die nicht signifikant zu den Cortisolkonzentrationen der Kontrolltiere abzugrenzen waren.

Adrenalin

Auch im Fall der via HPLC erfolgten Quantifizierung des Plasmaadrenalins konnten wirkstoffkonzentrationspezifische Unterschiede in der Adrenalinausschüttung nachgewiesen werden, die allerdings deutlich größere Standardabweichungen aufwiesen als die zuvor beschriebenen Cortisolkonzentrationen, weshalb sich keine signifikanten Unterschiede ergaben (vgl. Abbildung 3.23). Die größere Schwankungsbreite innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen bzw. der Kontrollgruppe kann auf den Ausschüttungsmechanismus des Adrenalins zurückgeführt werden. Im Gegensatz zum Cortisol, dessen Ausschüttung mehrere Minuten bis Stunden dauert, wird Adrenalin bei Knochenfischen als augenblickliche Folge eines Stressreizes aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn abgegeben (Eppele *et al.*, 1989; Barcellos *et al.*, 1999). Aus diesem Grund können schon kleinste Abweichungen im Experiment Unterschiede im Stresslevel und damit einhergehend in der PlasmaadrenalinKonzentration der Versuchstiere hervorrufen. Gegebenenfalls führte auch die zugelassene Spanne der Wiederfindungsrate von 100 bis 60 % des internen Standards zu geringfügigen Messunterschieden, welche bei der Rückkalkulation auf die eingesetzten Standardkonzentrationen entstanden.

Mit 3,5 nM ($\pm 2,2$) konnte bei nicht gestressten Tilapien eine etwa 1,5 nM geringere PlasmaadrenalinKonzentration nachgewiesen werden als bei unbelasteten Regenbogenforellen (Gamperl *et al.*, 1994). In derselben Studie konnte als Antwort auf das Umsetzen in ein neues Versuchsbecken ein Anstieg der AdrenalinKonzentration auf durchschnittlich 12 nM detektiert werden. Eine ähnliche Tendenz wurde auch durch die Verabreichung der minimal effektiven Narkosemittelkonzentrationen an Tilapien beobachtet, konnte allerdings nicht statistisch gesichert werden (vgl. Abbildung 3.23).

Obwohl die Nullhypothese nicht verworfen werden konnte, ist ein zur Cortisolquantifizierung äquivalenter Trend (vgl. Abbildung 3.22) zu erkennen. Diese Tendenz deutet an, dass sich auch der Plasmaadrenalin Spiegel mit zunehmend gesteigerter Narkosemittelkonzentration dem Basiswert, welcher anhand der Kontrolltiere ermittelt wurde, angleicht.

Noradrenalin

Im Gegensatz zum Adrenalin konnte das als Neurotransmitter fungierende Noradrenalin nur in den Plasmaproben der untersuchten Kontrolltiere in einer Konzentration von 4,0 nM ($\pm 0,97$) nachgewiesen werden. Als determinierender Faktor hierfür muss vor allem der Einfluss der verwendeten α_2 -Adrenozeptor-Agonisten angesehen werden. Durch deren Aktivierung aller α -Adrenozeptor Subtypen wird die präsynaptische Noradrenalinfreisetzung blockiert, wodurch ein Anstieg des Plasmaspiegels ausbleibt (Werner, 2005). Auch die Applikation des dissoziativen Anästhetikums Ketamin besitzt eine negative Auswirkung auf die Noradrenalinsekretion, insofern die nicht nachweisbare Plasmakonzentration erklärt werden kann (Smith *et al.*, 1975).

Die mittels HPLC gemessene Plasmanoradrenalin Konzentration der Kontrolltiere liegt im gleichen Größenbereich wie die von Gamperl *et al.* (1994) an nicht gestressten Regenbogenforellen ermittelte Durchschnittskonzentration von etwa 6 nM. Die positive Vergleichbarkeit stützt die aufgestellte These, dass der unterbliebene Noradrenalin nachweis im Plasma anästhesierter Versuchstiere von den applizierten Wirkstoffen induziert wurde.

4.5.4 Injektionsnarkose am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch

Im Zuge zweier Forschungsreisen in den Jahren 2008 und 2010 galt es die an Tilapien gewonnenen Versuchsergebnisse auf adulte Atlantische Blauflossen-Thunfische zu übertragen.

Als Hauptproblem innerhalb der durchgeführten Versuchsreihen kristallisierte sich das bereits zuvor an Tilapien beobachtete Problem einer Injektionsvolumenbegrenzung heraus. Diese Problematik wurde nicht nur bei den fünf willentlich intramuskulär behandelten Fischen ersichtlich, sondern auch während der vollzogenen Injektionsversuche in den Intraperitonealraum. Maßgebliche Gründe für die unvollständige Applikation oder das Entweichen der Wirkstofflösungen waren:

- das Verbiegen oder Brechen der eingesetzten Kanülen während der Injektion trotz Verwendung von Federstahl, wodurch ein Großteil der Narkoselösung nicht in den Fisch appliziert wurde.
- das Verfehlen des Intraperitonealraums, wodurch die Narkoselösung durch Muskelkontraktion aus der Einstichstelle gepresst wurde.
- die Injektion in einem zu flachen Winkel, wodurch die durchschnittlich 4,5 cm dicke Bauchdecke nicht vollständig durchstoßen und ein identischer Wirkstoffverlust wie bei der intramuskulären Applikation beobachtet wurde.

Als zusätzliche Schwierigkeit erwies sich das schwer abschätzbare Fischgewicht und die damit einhergehende unzureichende Kalkulierbarkeit der benötigten Wirkstoffdosen. Die Kombination der beschriebenen Probleme führte im Folgenden dazu, dass zum Teil nicht genau identifiziert werden

konnte, ob das Nichteintreten der Narkose durch eine unvollständige Applikation oder eine zu geringe Wirkstoffkonzentration bedingt war.

Als wirksam erwiesen sich Gemische aus 7,1 bis 43,2 mg/kg Ketamin und 0,36 bis 0,8 mg/kg Detomidin. Vor allem die potenten Gemische aus 7,1 : 0,45 mg/kg und 21,4 : 0,36 mg/kg Ketamin : Detomidin lagen in dem zuvor an Tilapien ermittelten Wirkungsbereich. Die Tendenz zu geringeren Konzentrationen ist auf den höheren Stoffwechsel bzw. die Fähigkeit zur endothermen Wärmeregulation der Atlantischen Blauflossen-Thunfische zurückzuführen, da endotherme Organismen eine erhöhte Narkoseakzeptanz sowie eine geringere Induktionszeit und Narkosedauer zeigen als vergleichbar große ektotherme Organismen (Neiffer & Stamper, 2009).

Das Wirkstoffgemisch aus 43,2 : 0,8 mg/kg Ketamin : Detomidin, das innerhalb von 45 min nach der Injektion zum Tod eines Versuchstiers führte, kann retrospektiv als zu hoch angesehen werden, da wie bereits beschrieben, die alleinige Gabe von 40 mg/kg Ketamin als anästhetisch potent angesehen werden kann. Die wesentlich zu hoch gewählten Wirkstoffdosen beruhen auf einer Fehleinschätzung des Fischgewichts oder der Wahl eines zu kleinen bzw. leichten Thunfisches.

Im Vergleich zur Veröffentlichung von Williams *et al.* (2004), in der die bislang einzigen wissenschaftlichen Versuche zur parenteralen Narkotisierung (i.m.) einer Spezies des Tribus *Thunnini* beschrieben werden, liegen die eigens ermittelten Ketaminkonzentrationen, bei nahezu identischer Detomidinkonzentration, in einem 1,78 bis 6-fach höheren Bereich als beim Pazifik-Bonito. Allerdings ist ein umfassender Vergleich der beiden Ergebnisse nicht gegeben, da einerseits eine intramuskuläre und eine intraperitoneale Injektion gegenübergestellt werden und andererseits in der Studie von Williams *et al.* (2004) kein Gewicht der Versuchstiere angegeben ist. Außerdem liegt ein inverses Verhältnis bei einer Gegenüberstellung mit der Pazifischen Makrele vor, welches besagt, dass zur Narkotisierung des NBFT 7,5 bis 32-fach geringere Ketamin- sowie 1,7 bis 11,7-fach geringere Detomidinkonzentrationen eingesetzt werden können.

Die zuvor am Modellorganismus beschriebene Entfärbung konnte ebenso bei den behandelten NBFT festgestellt werden. Bereits behandelte Fische konnten somit deutlich von den unbehandelten Schwarmfischen differenziert werden. Der sich von der Einstichstelle über den ganzen Körper ausbreitende Farbverlust ging jedoch nicht zwangsläufig mit einem Gleichgewichtsverlust respektive einer Narkose der Versuchstiere einher.

Es bleibt festzuhalten, dass vor allem auf dem Gebiet der Wirkstoffapplikation weitere Forschungsarbeit betrieben werden muss. Längere sowie stabilere Kanülen (≥ 6 cm) oder druckluft- bzw. federbetriebene Injektionsspritzen, die wie von Harvey *et al.* (1988) und Caprioli (2007) beschrieben per Unterwasserbetäubungsgewehr bzw. Harpune verschossen werden, könnten eine effizientere und reproduzierbare Injektion gewährleisten, als dies bislang der Fall war. Auch andere Wirkstoffe wie die Opioido Fentanyl, Carfentanyl und Etorphin (REPRODOTT, 2006), die der Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung (BtMVV) unterliegen und nur gegen die Vorlage einer Approbation erhältlich sind, oder die als Saffan bekannte aber nicht mehr erhältliche Kombination aus Alphadolon und Alphaxalon (Nadeson & Goodchild, 2000) könnten die Narkoseakzeptanz beim Atlantischen Blauflossen-Thunfisch verbessern.

Zusammenfassung der Erkenntnisse

Für den Modellorganismus Nil-Tilapia bleibt festzuhalten, dass die getesteten Maximalkonzentrationen der Wirkstoffe Ketamin (60 mg/kg), Ketamin-Detomidin (25 mg/kg : 0,5 mg/kg) und Ketamin-Xylazin (35 mg/kg : 5 mg/kg) nicht nur eine schnelle, sichere und langanhaltende Anästhesie induzieren, sondern auch stressphysiologisch – durch zum Kontrollwert äquivalente Cortisol- und AdrenalinKonzentrationen – den anderen untersuchten Wirkstoffkombinationen vorzuziehen sind. Alle verwendeten Substanzen induzierten zudem eine Blockade der präsynaptischen Noradrenalinfreisetzung. Im Hinblick auf eine erfolgreiche Kurzzeitnarkose Atlantischer Blauflossen-Thunfische ist eine Wirkstoffmischung aus 20 mg/kg Ketamin und 0,5 mg/kg Detomidin anzuraten, da bei diesem Gemisch die Vorteile eines geringen Applikationsvolumens, vertretbarer Stresshormonkonzentrationen und resultierendem Narkoseeffekt gegenüber den anderen Wirkstoffkombinationen überwiegen.

4.6 Beurteilung der Individuen- und Speziesidentifikation

Die Zielsetzung für die Entwicklung eines DNA-basierten Tests zur Individuen- und Speziesidentifikation lag vor allem in der Etablierung einer einfach und schnell realisierbaren Methode, mit deren Hilfe die Durchführung auch in lediglich grundausgestatteten Laboren praktikierbar ist. Dieser Anspruch an die Methodenentwicklung war notwendig, um die entwickelten Analysen zukünftig gegebenenfalls direkt vor Ort und innerhalb eines Tages durchzuführen.

4.6.1 Individuenidentifikation

Über das molekularbiologische Verfahren des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) wurde angestrebt alle Elterntiere eines Käfigs zu identifizieren (Botstein *et al.*, 1980). Die Voraussetzungen für diesen Test waren zum einen eine gelungene Probennahme mittels der erklärten Biopsiemethode und zum anderen die Existenz einer individuellen Basensequenz der Zuchtfische eines Standorts (ca. 25) und deren Visualisierbarkeit über Restriktionsverdau. Dementsprechend besaß der hypothetische Ansatz des Tests nicht den Anspruch einzelne Tiere in größeren Schwärmen oder innerhalb ganzer Populationen zu identifizieren, sondern konzentrierte sich lediglich auf eine mit maximal 30 Tieren begrenzte Gruppe.

Aufgrund ihrer oftmals beschriebenen Hypervariabilität wurde die mitochondriale Kontrollregion als Zielsequenz der Analyse ausgewählt (u.a. Saccone *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1995). Da jede Zelle etwa 1000 Kopien der zirkulären mtDNA besitzt, reichten bereits kleinste Gewebeproben aus, um die gewünschte Sequenz mit Hilfe der designten Primer und den beschriebenen PCR-Bedingungen in ausreichenden Mengen zu amplifizieren (vgl. Abbildung 3.25; Hartmann *et al.*, 2011). Die anschließend durchgeführten 14 Einfachverdau sowie die beiden Mehrfachverdau mit fünf bzw. acht Restriktionsenzymen ermöglichten lediglich die Identifikation von fünf verschiedenen Haplotypenmustern innerhalb der 20 untersuchten Testfische (vgl. Absatz 3.6). Zudem konnte keiner Probe ein spezifisches Bandenmuster zugeordnet werden, weshalb davon auszugehen ist, dass eine Individu-

enidentifikation – selbst in relativ kleinen Testgruppen von 20 bis 30 Tieren – mit der gewählten Methode nicht möglich ist. Demnach kann angenommen werden, dass entweder zusätzlich vorhandene Sequenzunterschiede innerhalb der d-loop-Region nicht ausgeprägt genug waren, um diese mittels RFLP-Analytik zu registrieren, oder dass eine umfassende Sequenzhomologie zwischen den ermittelten Haplotypengruppen bestand.

Aus den oben genannten Gründen besteht auch in kleinen abgeschirmten Gruppen des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs die Notwendigkeit kostenintensivere Methoden wie die Sequenzierung bestimmter DNA-Bereiche, AFLP-Analysen oder Mikrosatelliten-Untersuchungen zur eindeutigen Individuenidentifikation heranzuziehen.

4.6.2 Speziesidentifikation

Auch dem entwickelten Schnelltest zur Speziesidentifikation liegt das Prinzip des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zugrunde. Im Gegensatz zur Individuenidentifikation wurde beim Speziestest mit der ersten Untereinheit des Cytochrom-C-Oxidase Gens ein anderer Bereich mitochondrialer DNA herangezogen.

Dieser 1551 bp umfassende Genabschnitt wurde ausgewählt, da eine von Ward *et al.* (2005) durchgeführte Studie große interspezifische Unterschiede nach der Sequenzierung eines 655 bp langen Teilstücks bei 207 australischen Fischarten – darunter auch die acht Arten des Genus *Thunnus* – offenbarte. Vier Restriktionsenzyme wurden nach umfassenden Sequenzvergleichen herangezogen, um sechs Spezies des Tribus *Thunnini* zu identifizieren. Die Einfachverdau mit den Restriktionsenzymen *XcmI*, *BccI*, *BseGI* und *MnII* führten anhand spezifischer Restriktionsmuster zur eindeutigen Identifikation von einer, zwei oder vier Arten. So konnte mit Hilfe des *XcmI*-Verdau der Pazifische Blauflossen-Thunfisch eindeutig identifiziert werden, was über das Enzym *BccI* ebenfalls beim Echten Bonito gelang. Durch das Enzym *BseGI* bestand die Möglichkeit neben einer erneuten Bestimmung von *K. pelamis*-Muskelproben auch den Weißen-Thunfisch anhand des visualisierten Schnittmusters von den anderen Arten abzugrenzen. Der Einfachverdau mit dem Enzym *MnII* ermöglichte die eindeutige Zuordnung von vier Arten (*T. thynnus*, *T. alalunga*, *T. albacares* und *K. pelamis*), woraus sich schließlich die endgültige artumfassende Identifikationsmöglichkeit mit dem *MnII/XcmI*-Mix ableiten ließ (vgl. Absatz 3.7).

Über diesen Doppelverdau und darauf folgender Visualisierung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten alle 182 untersuchten Proben eindeutig zu einer der sechs Ausgangsarten zugeordnet werden. Im Gegensatz zu den Veröffentlichungen von Chow & Inoue (1993) und Takeyama *et al.* (2001), in denen ein RFLP-basierter Identifikationstest anhand der mtDNA-Region zwischen der sechsten Untereinheit der ATP-Synthase (*ATP6*) und der dritten Untereinheit des Cytochrom-C-Oxidase-Gens (*COXIII*) über drei separate Einzelverdau und Gelelektrophoresen beschrieben wird, kann der eigens entwickelte Identifikationstest mit nur einem Verdau- und Visualisierungsschritt durchgeführt werden. Die Vorteile der gewählten Methode liegen neben den gut reproduzierbaren Ergebnissen vor allem in der leichten Realisierbarkeit des Testverfahrens. Der Verzicht auf eine direkte Sequenzierung einer Teilregion des *COXI*-Gens (Ward *et al.*, 2005) ermöglicht auch kleinen Labo-

ren bzw. den Aquakulturbetrieben selbst die Durchführung des schnellen und relativ kostengünstigen Testverfahrens.

Die in Tabelle 2.8 beschriebenen Basenfehlpaarungen zwischen dem Rückwärtsprimer und der korrespondierenden *COXI*-Gensequenz des Echten Bonitos fielen beim Amplifikationserfolg nicht ins Gewicht, da sich die so genannten „missmatches“ am 5'-Ende des Primers befanden. Als ausschlaggebend für die erfolgreiche Amplifikation der Bonito DNA kann demnach das Zusammenspiel zwischen passender Annealingtemperatur, der 5'-3'-Syntheserichtung der Polymerase und die Sequenzhomologie am 3'-Ende des Primers angesehen werden (Sommer & Tautz, 1989).

Das Einsatzgebiet des etablierten RFLP-Tests kann in zwei Bereiche aufgegliedert werden. Zum einen ermöglicht das Verfahren den Aquakulturbetrieben eine eigenständige Kontrollmöglichkeit, ob es sich bei den abgefischten Eiern oder den geschlüpften Larven um die Zielspezies handelt. Dieser Nachweis ist notwendig, da die Eier und Larven vieler pelagischer Spezies in ihren frühen Entwicklungsstadien nur unzureichend über morphologische Charakteristika identifiziert werden können (Kawakami *et al.*, 2010). Zum anderen bietet das entwickelte Verfahren eine alternative Möglichkeit zu der von Lowenstein *et al.* (2009) beschriebenen Speziesidentifikation von Filets, Sushi und Sashimi, wodurch Thunfischprodukte aus Arten- und Verbraucherschutzgründen auf ihre richtige Deklaration überprüft werden können.

4.7 Reproduktionsanalysen am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch

Mittels Mikrosatelliten-Analyse und Sequenzierung der mitochondrialen Kontrollregion sowie aus einer Kombination beider Methoden wurden in Absatz 3.8 und 3.9 die Reproduktionsereignisse der Standorte Vibo (2010) und Malta (2010 und 2011) dargestellt. Nachfolgend werden die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und Thesen für das Zustandekommen der ermittelten Verhältnisse formuliert.

4.7.1 Elternschaftstests mittels Mikrosatelliten-Analyse

Mikrosatellitengestützte Elternschafts- und Verwandtschaftsanalysen wurden bereits an vielen aquakulturell interessanten Spezies wie z.B. dem Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) eingesetzt (Norris *et al.*, 2000). Da der Atlantische Blauflossen-Thunfisch allerdings keinen äußerlichen Geschlechtsdimorphismus aufweist und da die Fische nicht näher untersucht werden konnten (z.B. mittels Ultraschall), wurden die Mikrosatelliten-Analysen der Standorte Vibo und Malta des Jahres 2010 ohne Geschlechtsinformationen durchgeführt (Santamaria *et al.*, 2009). Aus diesem Grund muss erwähnt werden, dass die unter Absatz 3.8 dargestellten Ergebnisse auch exakt komplementär sein könnten, wenn die Resultate nicht durch zusätzliche Untersuchungen verifiziert werden (vgl. Absatz 4.7.2).

Vibo 2010

Neben den 110 Millionen abgefischten Eiern und der 18-tägigen Laichperiode sprechen auch die Ergebnisse der Elternschaftsanalyse für ein Reproduktionsereignis, an dem mindestens acht weibliche

Zuchtfische beteiligt waren. Neben sechs potentiellen Weibchen, die aus dem 23 Tiere umfassenden Probenpool ermittelt und als Mütter von 42 der 68 untersuchten Nachkommen identifiziert wurden, konnten zwei weitere hypothetische Mutterfische anhand korrespondierender Mikrosatelliten-Allele der Nachkommen berechnet werden. Demnach nahmen unter der Voraussetzung, dass sich 30 Zuchttiere im Käfig befanden von denen 15 weiblich waren, mit 53,3 % über die Hälfte aller weiblichen Käfigtiere an der Reproduktion teil. Gleichzeitig konnte bewiesen werden, dass die prozentuale Laichbeteiligung der weiblichen Tiere relativ homogen verteilt war, was die Annahme stützt, dass sich alle acht Tiere für mehrere Tage und im etwa gleichen Maßstab fortpflanzten.

Ähnliche Verhältnisse konnten für die Vatertiere ermittelt werden, wodurch behauptet werden kann, dass mindestens die Hälfte aller Zuchtfische im Jahr 2010 am Standort Vibo abgelaicht haben. Da in diesem Jahr 20 Fische – demnach je 10 Weibchen und Männchen – mit einem Hormonimplantat versorgt wurden, kann einerseits davon ausgegangen werden, dass die Verabreichung des Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten zu einer Kompensation der reproduktiven Dysfunktionen führte und andererseits, dass die 16 identifizierten Elterntiere ein Hormonimplantat erhielten.

Anhand der berechneten Allelfrequenzen (vgl. Tabelle 3.4) wird ersichtlich, dass in der untersuchten Käfigpopulation (Elterntiere und Nachkommen) insbesondere die Loci *Tth-152*, *Tth-217*, *Tth-1-31* und *Tth-265* ein dominantes Allel besitzen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass zukünftige Generationen zunehmend mit Inzuchtproblemen konfrontiert werden könnten, falls der Broodstock nicht gelegentlich aufgefrischt oder mit Nachkommen weitergezüchtet wird. Dieses Problem wurde bereits mehrfach in der Aquakultur der unterschiedlichsten Spezies beobachtet und führte zu erhöhten Sterblichkeitsraten und einem reduzierten Wachstum (Bierne *et al.*, 2000; Dunham, 2011).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass an der quantitativ als sehr erfolgreich zu bewertenden Reproduktion wie erwartet mehrere Weibchen beteiligt waren. In Anbetracht der registrierten Laichzeit von 18 Tagen, dem geschätzten Fischgewicht von etwa 70 kg und den acht identifizierten Muttertieren kann mit Hilfe der von Medina *et al.* (2002) beschriebenen Menge von 92,8 laichbereiten Eiern pro Gramm Körpergewicht und einem zwei- bis dreitägigen Fortpflanzungsrhythmus stimmig auf die registrierte Eizahl von 110 Millionen zurückgerechnet werden.

Sowohl die Abstammung der Jungtiere mit als auch die der Nachkommen ohne Anomalien verteilte sich gleichmäßig auf die Elterntiere des Broodstocks. Demzufolge kann das Auftreten morphologischer Deformationen auch nicht auf einen primären Inzuchteffekt zurückgeführt werden. Vielmehr müssen die Gründe in häufig beobachteten Kollisionen mit der Beckenwand und einer unzureichenden Wasserqualität während der Larvalentwicklung gesucht werden (De Metrio *et al.*, 2010).

Malta 2010

Obwohl durch das Auffinden von nur 350000 Eiern am Standort Malta (2010) davon ausgegangen werden muss, dass nur ein oder zwei Weibchen eine sporadische Reproduktion absolvierten, konnte mittels Mikrosatelliten-Analyse ein adverses Szenario offenbart werden. Mit jeweils sechs identifizierten Vater- und Muttertieren konnten zwölf der untersuchten 19 Zuchtfische als potentielle Eltern ermittelt werden. Durch stochastische Kalkulation weiterer hypothetischer Väter und Mütter ließ

sich die Anzahl der fortpflanzungsbeteiligten Thunfische sogar auf 21 (11 Weibchen und 10 Männchen) erhöhen. Da zudem – wie bereits für den Standort Vibo beschrieben – eine homogene prozentuale Ableichbeteiligung festgestellt wurde, muss davon ausgegangen werden, dass nur ein kleiner Teil der abgelaichten Eier abgefischt werden konnte. Mögliche Gründe, welche für die molekularbiologisch gestützte These eines umfassenden Reproduktionsprozesses sprechen, werden in der abschließenden Beschreibung (vgl. Absatz 4.8) diskutiert und in Kontext mit anderen Messergebnissen gesetzt.

Anhand der bestimmten Allelfrequenzen des maltesischen Reproduktionsvorgangs (vgl. Tabelle 8.8) kann im Kontrast zu den Allelfrequenzen des Standorts Vibo eine deutlich homogenere Verteilung der relativen Allelhäufigkeiten eines Locus festgestellt werden. Allein Allel 190 des Locus *Tth-152* weist mit einer relativen Häufigkeit von 0,84 auf eine geringe genetische Vielfalt der Zuchtfische hin. Allerdings kann die ausgesprochen hohe Allelfrequenz, die auch im Locus *Tth-152* des italienischen Broodstocks einen Wert von 0,84 besaß, über die maximal detektierte Allelzahl von Clark *et al.* (2004) erklärt werden. Ebenso wie in vorliegender Arbeit, in welcher drei (Vibo) respektive zwei (Malta) Allele am besagten Locus beschrieben werden konnten, wurden auch in der Pilotstudie maximal drei verschiedene Allele bei 49 untersuchten NBFT identifiziert. Die geringe Heterozygotie dieses Locus, die ebenfalls von Clark *et al.* (2004) beschrieben wird ($H_{\text{obs}} = 0,237$), ist im Zusammenhang mit dem Ungleichgewicht innerhalb der Allelverteilung dafür verantwortlich, dass sich der Locus *Tth-152* nur unzureichend für Inzuchtstudien verwenden lässt.

Gegenüberstellung der Reproduktionsvorgänge

Während der Amplifikation aller Mikrosatelliten-Loci konnten deutliche laichtagspezifische Unterschiede im PCR-Erfolg beider Standorte festgestellt werden. Da die Probleme bei der Mikrosatellitenvervielfältigung primerübergreifend auftraten, muss davon ausgegangen werden, dass die Ursache in einer geringen DNA-Konzentration innerhalb der Eier der betroffenen Laichtage lag. Da sich die NBFT-Embryonen bereits innerhalb von 28 bis 32 Stunden nach der Befruchtung zur schlupfbereiten Larve entwickeln, können schon Unterschiede von wenigen Stunden zwischen Ableich- und Probenahmezeitpunkt zu einer großen Differenz des DNA-Gehalts führen (Mylonas *et al.*, 2007). Für zukünftige Studien ist es demnach ratsam, die aus dem Zuchtkäfig entnommenen Eier einzeln und für mehrere Stunden in 96 well Mikrotiterplatten zu inkubieren, bevor diese schließlich konserviert werden.

Im populationsgenetischen Vergleich (vgl. Tabelle 3.5) zwischen den beiden Zuchtgruppen kann festgestellt werden, dass die Summe aller detektierten Allele im maltesischen Broodstock um 13 % höher lag als im italienischen. Die größere Allelzahl, die vor allem auf einigen wenigen elternspezifischen Allelen beruht, und die niedrigeren Allelfrequenzen sind für die Differenz zwischen erwarteter und observierter Heterozygotie am Standort Malta verantwortlich. Die durch das Wegfallen mancher niederfrequenter Allele in der Nachkommengeneration beobachtete Abweichung kann dabei als Indikator für eine veränderte Populationsdynamik, also als Folge verschiedener externer Faktoren angesehen werden (Horreo *et al.*, 2008). Als externer Faktor ist im untersuchten Beispiel die Hor-

monbehandlung zu nennen, welche die Reproduktion einiger Zuchtfische bevorteilt hat. Derselbe externe Faktor muss natürlich auch dem italienischen Standort beigemessen werden. Da die berechneten Allelfrequenzen, die detektierten Allelzahlen sowie die erwarteten Heterozygotien dieser Zuchtfische allerdings deutlich geringer als diejenigen der maltesischen waren, wirkte sich die Hormonimplantation nicht derart deutlich auf die Differenz zwischen erwarteter und observierter Heterozygotie aus. Die im Vergleich zum Standort Malta geringeren genetischen Distanzen innerhalb der italienischen Zuchtpopulation wurden aus Übersichtsgründen mit Hilfe einer Faktoriellen-Korrespondenz-Analyse im dreidimensionalen Raum dargestellt (vgl. Abbildung 3.42). In diesem Diagramm kann die Streuung um das Zentroid, das den Schwerpunkt der Allelwolke definiert, als die genetische Vielfalt der beiden Populationen angesehen werden (Belkhir *et al.*, 1996).

Letztendlich bleibt insgesamt festzuhalten, dass sich die gewählte Methode bei der Elternschaftsidentifikation am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch in der Praxis bewährt hat. Wie bereits erwähnt, muss bei der Wahrscheinlichkeitsberechnung ohne Geschlechtsinformation darauf geachtet werden, dass die gewonnenen Ergebnisse, sprich die ermittelten Vater- und Mutterschaften, mit ebenso großer Wahrscheinlichkeit umgekehrt sein können. Auch das verwendete QIAxcel System erwies sich trotz einer Gerätegenauigkeit von etwa 4 bp als ausreichend genau. Um den Arbeits- und Kostenaufwand zukünftig reduzieren zu können, besteht darüber hinaus die Möglichkeit zur Etablierung einer Multiplex PCR, welche die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Mikrosatelliten-Allele gewährleistet (Novel *et al.*, 2010).

4.7.2 Mutterschaftstest mittels mitochondrialer Kontrollregion

Der theoretische Hintergrund, welcher dem Mutterschaftstest mittels Sequenzierung der mitochondrialen Kontrollregion zugrunde liegt, ist die Kombination aus maternaler Vererbung und hypervariabler Basensequenz (Giles *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1995). Aufgrund dessen konnte mittels Sequenzierung der d-loop-Region sowohl der mikrosatellitengestützte Elternschaftstest des Standorts Vibo (2010) verifiziert als auch der Abblanchvorgang des Jahres 2011 in Malta qualifiziert werden.

Bei einer durchschnittlichen Mutationsrate von 3,6 % pro Millionen Jahre ist die Wahrscheinlichkeit eines Basenaustauschs innerhalb der ersten Filialgeneration relativ gering, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sowohl die Mütter als auch die Nachkommen dieselbe d-loop-Sequenz teilen (Donaldson & Wilson, 1999; Carlsson *et al.*, 2004).

Vibo 2010

Die Hypervariabilität des d-loops konnte durch die Detektion von neun Haplotypengruppen innerhalb der zehn untersuchten Elterntiere bestätigt werden (vgl. Abbildung 4.43). Zudem wurde das vornehmlich intendierte Ziel des Experiments durch den Fund homologer d-loop-Sequenzen zwischen Elterntieren und Nachkommen erreicht. Alignments der Eier 6 und 10 des Laichtags 20.07.2010 und Probe 9 der Jungfische mit Anomalien resultierten in einer 100 %igen Homologie mit den Elterntieren VB2 und VB5, die sich gleichzeitig einen Haplotyp teilten. Da von einem rein maternalen Erbgang ausge-

gangen wird, können die Elterntiere VB2 und VB5 sowie alle weiteren dieser Gruppe anhand ihrer Wahrscheinlichkeiten zugeordneten Tiere als weiblich betrachtet werden.

Begutachtet man vor diesem Hintergrund erneut die Ergebnisse des mitochondrialen Elternschaftstests des Standorts Vibo (vgl. Absatz 3.8) kann festgestellt werden, dass die Geschlechter anhand der Wahrscheinlichkeitsberechnungen exakt zugeordnet wurden. Da beim NBFT bislang keine Möglichkeit zur genetischen Geschlechtsbestimmung besteht, kann der mikrosatellitenbasierte Elternschaftstest mit nachträglicher Überprüfung der d-loop-Vererbung als eine indirekte Methode zum Sexen der Zuchtfische angesehen und eingesetzt werden. Über die nachträglich gewonnene Geschlechtinformation können weibliche und männliche Tiere nun nicht nur anhand bereits implantierter ID-Tags erkannt, sondern auch über erneute Mikrosatelliten-Analysen bzw. dem spezifischen Allelmuster identifiziert werden.

Es bleibt festzuhalten, dass die durchgeführte geschlechtslose Elternschafts- und Verwandtschaftsanalyse des Standorts Vibo (2010) über die Methode des Sequenzvergleichs verifiziert wurde und eine nachträgliche Geschlechtinformation ergänzt werden konnte.

Malta 2011

Da für den Reproduktionsvorgang des Jahres 2011 am Standort Malta keine DNA-Proben der Elterntiere vorhanden waren, wurde versucht die Laichbeteiligung weiblicher Fische über die numerische Anzahl detektierbarer Haplotypengruppen zu bestimmen. Über das Alignment von 47 d-loop-Sequenzen konnten acht Haplotypengruppen identifiziert werden, was zu der Annahme führt, dass sich mindestens acht weibliche Tiere dem Reproduktionsvorgang angeschlossen haben. Demnach kann ebenfalls für das Jahr 2011 ein umfassender Reproduktionsprozess bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den prozentualen Ablauchbeteiligungen weiblicher Fische, die mittels Mikrosatelliten-Analyse ausfindig gemacht wurden und sich als sehr homogen darstellten, konnte über den Sequenzvergleich ein starkes Ungleichgewicht ausfindig gemacht werden. So mussten 76,6 % der untersuchten Eier aufgrund der jeweiligen Sequenzhomologie den Haplotypengruppen A und B zugeordnet werden. Jedoch kann man in diesem Fall davon ausgehen, dass sich – wie im vorherigen Abschnitt gezeigt – mehrere Weibchen einen Haplotyp teilen. Eine erfolgreiche Fortpflanzung dieser Weibchen führt im Folgenden zu einem verstärkten Auftreten der maternalen Haplotypengruppe und dem detektierten Ungleichgewicht.

Der beschriebene Sequenztest ohne Parentalinformation gewährleistete einen deutlich geringen Einblick in den Reproduktionsvorgang als die mikrosatellitenbasierten Elternschaftstests. Dennoch besteht die Möglichkeit einen Ablauchvorgang über die Anzahl vorgefundener Haplotypengruppen zu qualifizieren.

4.8 Zusammenfassende Charakterisierung der untersuchten Reproduktionsvorgänge

In abschließender Zusammenfassung werden mögliche Argumente gesucht und diskutiert, welche die augenscheinlich unzureichenden bzw. ausgebliebenen Reproduktionsvorgänge des Standorts Malta begründen.

Grundsätzlich sprechen die observierten Eizahlen der Projektjahre 2009 bis 2011 (0, 350000 und 780000 Eier) unter der Voraussetzung, dass ein einzelnes Weibchen mehrere Millionen Eier ablegen kann (Medina *et al.*, 2002), dafür, dass eine sehr sporadische Reproduktion weniger Weibchen stattfand. Doch vor allem die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen verdeutlichen die hohe Wahrscheinlichkeit für ein anderes Szenario. Sowohl im Jahr 2010 als auch im Projektjahr 2011 konnte mit acht respektive elf identifizierten Muttertieren eine deutlich höhere maternale Reproduktionsbeteiligung festgestellt werden als über die Eizahlen zu erwarten war.

Diese Feststellung lässt sich mit den Aufzeichnungen der Fisch-Datenlogger in Verbindung bringen. In beiden Versuchsjahren konnte anhand der aufgezeichneten Tauchtiefen bereits vor der registrierten Laichzeit eine signifikante Präferenz für ein oberflächennahes Schwimmen der Versuchstiere registriert werden. Da vor allem das nächtliche Schwimmen nahe der Wasseroberfläche als Indiz für eine Reproduktion angesehen wird (Mather, 1995; Block *et al.*, 2001; Masuma *et al.*, 2008; Mylonas *et al.*, 2010), kann davon ausgegangen werden, dass die Eiablagen der Zuchtfische bereits zu früheren Zeitpunkten – als den jeweils datierten – begannen.

Auch die Temperaturmessungen der stationären HOBO-Datenlogger des Jahres 2011 bestätigen, dass die berechnete fortpflanzungsinduzierende Wassertemperatur von 23,8 °C bereits am 23.06.2011 und damit acht Tage vor der definierten Laichperiode erreicht war. Demzufolge stellte auch die Umgebungstemperatur keinen Negativfaktor für ein vorzeitiges Ablachen des Broodstocks dar. Gleichzeitig ist zu erwähnen, dass schon im Vorfeld der Laichperiode (definiert mit dem Fund von mehr als 10000 Eiern pro Tag) sporadisch einige pelagische Fischeier in einer Größenordnung zwischen 50 und 5000 Eiern pro Tag im Käfig zu finden waren (vgl. Absatz 3.2.2). Eine ähnliche Feststellung konnte aufgrund der durchgängig geringeren Durchschnittstemperaturen (Wasser und Luft) des Jahres 2010 für den Standort Malta nicht gemacht werden. Gegebenenfalls war ein anderer externer Faktor wie die äußerst frühe erste Hormoninduktion oder das Erreichen einer möglichen kritischen Photoperiode für eine verfrühte, aber unbemerkte Reproduktion verantwortlich.

Aus den umfassend beschriebenen Versuchsergebnissen lassen sich zwei Hypothesen für die maltesischen Zuchtversuche aufstellen. Die erste Hypothese geht davon aus, dass die Gonaden der weiblichen Zuchtfische nicht vollständig ausgereift waren, weshalb nur sporadische Reproduktionsprozesse der hormoninduzierten Weibchen festgestellt werden konnten. Diese These deckt sich sowohl mit der registrierten Eizahl als auch mit den molekularbiologischen Ergebnissen. Die zweite Hypothese besagt, dass es bereits vor der definierten Laichperiode zu einem umfassenden Fortpflanzungsprozess kam. Diese These unterliegt allerdings der Bedingung, dass abgelaichte Eier aus dem Käfig ver-

driftet sind und somit nicht nachgewiesen werden konnten. Neben den Temperaturlaufzeichnungen und den molekularbiologischen Erkenntnissen deckt sich diese These zusätzlich mit dem aufgezeichneten Schwimmverhalten der Zuchtfische.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Zuchtversuche am Atlantischen Blauflossen-Thunfisch weiterhin fokussiert, dokumentiert und analysiert werden müssen, um bereits gewonnene Erkenntnisse über dessen Reproduktionsverhalten und -bedürfnisse zu vertiefen. Die Entwicklung einer nachhaltigen Thunfisch-Aquakultur muss als essentielles Instrument zum Schutz der Wildtierbestände angesehen werden. Wenn die Nachzucht dieser bereits bedrohten Spezies in absehbarer Zeit nicht gelingt, ist das Aussterben des Atlantischen Blauflossen-Thunfisches bei gleichbleibender Nachfrage und Fangquote mehr als wahrscheinlich.

5 Zusammenfassung

Mit dem Atlantischen Blauflossen-Thunfisch (*Thunnus thynnus*) stand einer der größten rezenten Knochenfische im Fokus dieser Arbeit. Die zunehmende Globalisierung des Sushi-Markts und die damit einhergehende permanent ansteigende Nachfrage nach Thunfischprodukten führten in den letzten Jahrzehnten zu einer außerordentlichen Wertsteigerung dieser Spezies. Aufgrund der dauerhaften Überfischung bestand die Notwendigkeit zunehmend strenger reglementierte Fangquoten einzuführen. Jedoch sind die Wildbestände des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs gegenwärtig bereits soweit reduziert, dass nur ein komplettes Fangverbot das zukünftige Aussterben dieser Art verhindern kann. Um diesem vorzubeugen, wurden in Europa seit dem Jahrtausendwechsel diverse Forschungsprojekte zur Entwicklung einer nachhaltigen Thunfischzucht ins Leben gerufen.

Die vorliegende Dissertation, welche im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projekts SELFDOTT (From capture based to SELF-sustained aquaculture and Domestication of bluefin tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011) und des durch EU-Strukturfonds finanzierten apulischen Regionalprojekts ALLOTUNA (Organizzazione di un sistema integrale di allevamento del tonno rosso nel golfo di Taranto, 2008-2010) verfasst wurde, verfolgte die Absicht den Umgang, die Haltung und die Zucht des Atlantischen Blauflossen-Thunfischs auf physiologischer, ökologischer und molekularbiologischer Ebene zu optimieren und zu verstehen.

Im Hinblick auf eine realisierbare und wirkungsvolle Anästhesie Atlantischer Blauflossen-Thunfische wurden verschiedene Wirkstoffe auf ihre anästhetische Potenz am Modellorganismus Nil-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) erprobt. Im Vergleich zur intramuskulären stellte sich die intraperitoneale Injektion als geeignete Applikationsmethode bei Teleostern dar. Das dissoziative Narkosemittel Ketamin bewährte sich nach intraperitonealer Gabe sowohl als Monoanästhetikum (40 mg/kg) als auch in Kombination mit den α_2 -Adrenozeptor-Agonisten Xylazin (25 mg/kg : 5 mg/kg) und Detomidin (15 mg/kg : 0,5 mg/kg). Darüber hinaus konnte mit zunehmenden Wirkstoffkonzentrationen nachweislich eine Reduktion der Stresshormone Cortisol und Adrenalin beobachtet werden. Die an Tilapien ermittelten effektiven Wirkstoffdosen induzierten auch beim Goldbrassen (*Sparus aurata*) und beim Atlantischen Blauflossen-Thunfisch erfolgreich ein chirurgisches Narkosestadium. Unvollständige Wirkstoffapplikationen bei den freischwimmenden Tieren stellten sich als Hauptproblem bei der Betäubung von adulten Thunfischen heraus.

Durch die Analyse und Verknüpfung mehrjähriger Temperaturlaufzeichnungen kann die durchschnittliche ablaichinduzierende Wassertemperatur für den Atlantischen Blauflossen-Thunfisch mit 23,8 °C beziffert werden. Gleichzeitig gelang es mit Hilfe von extern an Versuchsfischen angebrachten Datenloggern eine signifikante Präferenz für ein oberflächennahes Schwimmen während der Laichzeit aufzuzeichnen.

Mittels der molekularbiologischen Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus konnte eine Untereinheit des mitochondrial codierten Cytochrom-C-Oxidase Gens als effektive Sequenz zur umfassenden Speziesidentifikation beim Genus *Thunnus* und einer verwandten Art (*Katsuwonus pelamis*) ermittelt werden. Hierbei gewährleistete der Doppelverdau des amplifizierten 1545 bp großen PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzymmix *MnII/XcmI* eine eindeutige und schnelle Identifikationsmöglichkeit. Eine äquivalente RFLP-basierte Möglichkeit zur Individuenidentifikation anhand der mitochondrialen Kontrollregion konnte nicht ermittelt werden.

Die erfolgreich durchgeführten Markierungen und Beprobungen der Zuchtfische ließen umfassende molekularbiologische Elternschafts- und Verwandtschaftsanalysen observierter Reproduktionsereignisse zu. Mikrosatellitenbasierte Parentalstudien offenbarten an allen untersuchten Standorten eine Reproduktionsbeteiligung von über 50 % der Käfigtiere. Nachträglich gelang es durch Sequenzalignments der maternal vererbten d-loop-Region die Geschlechtszugehörigkeit der Elterntiere zu bestimmen und gleichzeitig die Richtigkeit der Elternschaftsanalyse zu verifizieren.

Durch die gewonnenen Ergebnisse besteht zukünftig die Möglichkeit, den Zeitpunkt des Ablachens oder einer notwendigen Hormonbehandlung genauer terminieren zu können. Zusätzlich ermöglichen die etablierten molekularbiologischen Methoden neben einer exakten Veranschaulichung des Reproduktionserfolgs auch eine schnelle und sichere Speziesidentifikation, wodurch in Zukunft Thunfischprodukte aus Arten- und Verbraucherschutzgründen auf ihre richtige Deklaration überprüft werden können.

6 Summary

The main interest of this study was focused on the Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*), one of the largest extant bony fishes. The globalized sushi market and the consequent permanent increase in demand for tuna products in recent decades have led to an extraordinary growth in the value of this species. Due to persistent overfishing, the introduction of increasingly stringent regulated fishing quotas was necessary within the last five years. However, the wild stocks of Atlantic bluefin tuna have been reduced to a point that only a complete ban on fishing may prevent the future extinction of this species. Due to this fact, several European research projects have focused on the development of sustainable tuna aquaculture.

The aim of the present thesis, which was conducted in the framework of the European Union funded project SELFDOTT (From capture based to SELF-sustained aquaculture and Domestication of bluefin tuna *Thunnus thynnus*, 2008-2011) and the Apulian regional EU-structural funds project ALLOTUNA (Organizzazione di un sistema integrale di allevamento del tonno rosso nel golfo di Taranto, 2008-2010), was the optimization of tuna handling, husbandry and breeding using physiological, ecological and molecular biological methods.

To find a viable and effective anesthetic for Atlantic bluefin tunas several compounds were tested for their anesthetic potency in the model organism Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Compared to an intramuscular route, the intraperitoneal injection was shown to be a suitable application method in teleost fish. The dissociative agent ketamine indicated suitable anesthetic effects alone (40 mg/kg) as well as in combination with the α_2 -adrenoceptor agonists xylazine (25 mg/kg : 5 mg/kg) and detomidine (15 mg/kg : 0,5 mg/kg) after intraperitoneal injection. Furthermore, a reduction of the stress hormones cortisol and adrenaline was observed with increasing drug concentrations. The effective drug dosages induced not only a successfully surgical anesthesia stage in tilapia but also in the gilt-head seabream (*Sparus aurata*) and Atlantic bluefin tuna. Incomplete drug applications proved to be the main problem during anesthesia trials on adult free-swimming tuna.

The mean water temperature that facilitates the spawning of bluefin tunas was observed by long-term temperature measurements at different cage locations and was finally ascertained to be around 23,8 °C. With externally attached fish data loggers, a significant preference for a near-surface swimming during the spawning season was also observed.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was used to determine a subunit of the mitochondrial encoded cytochrome c oxidase gene as an effective sequence for species identification within the genus *Thunnus* and a closely related species (*Katsuwonus pelamis*). Double digestion of the amplified 1545 bp PCR product with the restriction enzymes *MnII* and *XcmI* ensured a clear and

quick identification process. An equivalent RFLP-based method for individual identification using the mitochondrial control region was not verified.

Successful tagging and DNA sampling of the broodstock animals enabled comprehensive molecular biological parentage analysis of the observed spawning events. The microsatellite-based parentage tests revealed a > 50 % participation of the caged animals at all studied areas in reproduction. Subsequently performed sequence alignments of the maternally inherited d-loop region were used to verify the accuracy of the parentage analysis and to determine the sex of the broodstock animals.

Based on the obtained results it is possibility to determine the beginning of reproduction or the necessary hormone induction date more accurately. In addition, the molecular biological techniques established will allow an exact illustration of the reproductive success of caged tunas and a rapid and reliable way for species identification, which will help to verify tuna products for their proper declaration for reasons of species conservation and consumer protection.

7 Literaturverzeichnis

- Adams, H. A. und Werner, C.** (1997). (S)-ketamine – renaissance of a substance? *Anaesthetist* **46**, 1026-1042.
- Aguado-Giménez, F. und García-García, B.** (2005). Growth, food intake and feed conversion rates in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758) under fattening conditions. *Aquaculture Research* **36**, 610-614.
- Al Hamdani, A. H.; Ebrahim, S. K. und Mohammad, F. K.** (2010). Experimental Xylazine-Ketamine Anesthesia in the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Wildlife Diseases* **46**, 596-598.
- Alves, H. C.; Valentim, A. M.; Olsson, I. A. S. und Antunes, L. M.** (2007). Intraperitoneal propofol and propofol fentanyl, sufentanil and remifentanil combinations for mouse anaesthesia. *Laboratory Animals* **41**, 329-336.
- Anton, A. H. und Sayre, D. F.** (1962). A Study of the Factors Affecting the Aluminum Oxide-Trihydroxyindole Procedure for the Analysis of Catecholamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **138**, 360-375.
- Avella, M.; Berhaut, J. und Bornancin, M.** (1993). Salinity Tolerance of two Tropical Fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. 1. Biochemical and Morphological Changes in the Gill Epithelium. *Journal of Fish Biology* **42**, 243-254.
- Axelrod, J. und Reisine, T. D.** (1984). Stress Hormones – Their Interaction and Regulation. *Science* **224**, 452-459.
- Barcellos, L. J. G.; Nicolaiewsky, S.; de Souza, S. M. G. und Lulhier, F.** (1999). Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research* **30**, 437-444.
- Barton, B. A.; Rahn, A. B.; Feist, G.; Bollig, H. und Schreck, C. B.** (1998). Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* **120**, 355-363.
- Barton, B. A.** (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 517-525.
- Baumgartner, M. F.; Freitag, L.; Partan, J.; Ball, K. R. und Prada, K. E.** (2008). Tracking Large Marine Predators in Three Dimensions: The Real-Time Acoustic Tracking System. *Journal of Oceanic Engineering* **33**, 146-157.
- Baumgartner, W.** (2006). Untersuchung der Fische. In 'Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere'. 6. Aufl. pp. 361-368. (Blackwell: Berlin).
- Bayer, M.; Hellio, C.; Maréchal, J.; Frank, W.; Lin, W.; Weber, H. und Proksch, P.** (2011). Antifouling Bastadin Congeners Target Mussel Phenoloxidase and Complex Copper(II) Ions. *Marine Biotechnology* **13**, 1148-1158.
- Beebee, T. J. C. und Rowe, G.** (2008). Population Genetics. In 'An introduction to molecular ecology'. 2. Aufl. pp. 136-182. (Oxford University Press: Oxford).

- Beemelmans, A.** (2010). "Fischzucht-Management" – Untersuchung molekularbiologischer Methoden zur Identifizierung von Arten, Individuen und Elternschaften in der Aquakultur. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Belkhir K.; Borsa P.; Chikhi L.; Raufaste N. und Bonhomme F.** (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France)*.
- Berenbrink, M.** (1994). Die Kontrolle des intrazellulären pH in den Erythrozyten von Knochenfischen. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Bierne, N.; Bezuart, I.; Vonau, V.; Bonhomme, F. und Bedier, E.** (2000). Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* **184**, 203-219.
- Block, B. A.; Dewar, H.; Blackwell, S. B.; Williams, T. D.; Prince, E. D.; Farwell, C. J.; Boustany, A.; Teo, S. L. H.; Seitz, A.; Walli, A. und Fudge, D.** (2001). Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. *Science* **293**, 1310-1314.
- Block, B. A.; Teo, S. L. H.; Walli, A.; Boustany, A.; Stokesbury, M. J. W.; Farwell, C. J.; Weng, K. C.; Dewar, H. und Williams, T. D.** (2005). Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. *Nature* **434**, 1121-1127.
- Bonath, K.** (1977). 'Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische'. pp. 1-158. (Parey: Hamburg).
- Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. und Davis, R. W.** (1980). Construction of a Genetic-Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.
- Brasseur, P.; Beckers, J. M.; Brankart, J. M. und Schoenauen, R.** (1996). Seasonal temperature and salinity fields in the Mediterranean Sea: Climatological analyses of a historical data set. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* **43**, 159-192.
- Bregazzi, R. M.** (2011). Mind the Gap: An Analysis of the Mediterranean Bluefin Trade. *Pew Environment Group*.
- Bridges, C. R.; Schröder, P.; Susca, V.; Corriero, A.; Deflorio, M. und De Metrio, G.** (2001). A new muscle biopsy technique for sex and sexual maturity determination in large pelagic fishes. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **52**, 752-758.
- Bridges, C. R.; Krohn, O.; Deflorio, M. und De Metrio, G.** (2009). Possible NAO and SST Influences on the Eastern Bluefin Tuna Stock – The IN-EX-FISH Approach. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **63**, 138-152.
- Bromage, N.; Porter, M. und 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.
- Brown, L. A.** (1993). Anesthesia and Restraint. In 'Fish Medicine'. (Hrsg. M. K. Stoskopf.) pp. 79-90. (Saunders: Philadelphia).

- Bruecker, P. und Graham, M.** (1993). The Effects of the Anesthetic Ketamine Hydrochloride on Oxygen Consumption Rates and Behavior in the Fish *Heros (Cichlasoma) citrinellum* (Günther, 1864). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **104**, 57-59.
- Buentello, J. A.; Pohlenz, C.; Neill, W.; Gatlin III., D. M. und Ascencio, F.** (2008). Physiological indicators for tuna cultured in sea cages: a preliminary approach to prevention of the burnt-flesh syndrome. *Proceedings of the WAS 2008, May 19-23 2008, Busan, Korea*.
- Buentello, J. A.; Anguiano, M.; Pohlenz, C.; Sink, T.; Neill, W. H.; Ascencio, F. und Gatlin III., D. M.** (2010). Physiological indicators for tuna cultured in sea cages: II. Preliminary considerations for prevention of the burnt-flesh syndrome. *Aquaculture 2010, March 02-05 2010, San Diego, California, USA*.
- Buschiazzo, E. und Gemmell, N. J.** (2006). The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays* **28**, 1040-1050.
- Bushnell, P. G. und Jones, D. R.** (1994). Cardiovascular and Respiratory Physiology of Tuna – Adaptations for Support of Exceptionally High Metabolic Rates. *Environmental Biology of Fishes* **40**, 303-318.
- Caprioli, R.** (2007). Ampliamento delle basi conoscitive per la messa a punto di metodologie per il controllo della biologia riproduttiva del tonno rosso in acquacoltura. *Dissertation, Università degli studi di Roma „Tor Vergata“*.
- Carey, F. G. und Gibson, Q. H.** (1983). Heat and Oxygen Exchange in the Rete Mirabile of the Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* **74**, 333-342.
- Carey, F. G.; Kanwisher, J. W. und Stevens, E. D.** (1984). Bluefin Tuna Warm Their Viscera During Digestion. *Journal of Experimental Biology* **109**, 1-20.
- Carlsson, J.; McDowell, J. R.; Diaz-Jaimes, P.; Carlsson, J. E. L.; Boles, S. B.; Gold, J. R. und Graves, J. E.** (2004). Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* **13**, 3345-3356.
- Chart, T. E. und Bergersen, E. P.** (1988). Methods for long-term identification of salmonids: a review. *U.S. Fish and Wildlife Service, Biological Report* **88**, 1-18.
- Chase, B. C.** (2002). Differences in diet of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) at five seasonal feeding grounds on the New England continental shelf. *Fishery Bulletin* **100**, 168-180.
- Chervinski, J.** (1965). Sexual Dimorphism in Tilapia. *Nature* **208**, 703.
- Chow, S. und Inoue, S.** (1993). Intra-and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bulletin National Research Institute Far Seas Fisheries* **30**, 207-225.
- Chow, S. und Ushiyama, H.** (1995). Global Population-Structure of Albacore (*Thunnus alalunga*) Inferred by RFLP Analysis of the Mitochondrial Atpase Gene. *Marine Biology* **123**, 39-45.
- Clark, J. M.** (1988). Novel Non-Templated Nucleotide Addition-Reactions Catalyzed by Procaryotic and Eukaryotic DNA-Polymerases. *Nucleic Acids Research* **16**, 9677-9686.

- Clark, T. B.; Ma, L.; Saillant, E. und Gold, J. R.** (2004). Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) and other species of genus *Thunnus*. *Molecular Ecology Notes* **4**, 70-73.
- Cocolin, L.; D'Agaro, E.; Manzano, M.; Lanari, D. und Comi, G.** (2000). Rapid PCR-RFLP method for the identification of marine fish fillets (Seabass, Seabream, Umbrine, and Dentex). *Journal of Food Science* **65**, 1315-1317.
- Collette, B. B.; Reeb, C. und Block, B. A.** (2001). Systematics of the Tunas and Mackerels (Scombridae). In 'Tuna: Physiology, Ecology, and Evolution'. (Hrsg. B. A. Block und E. D. Stevens) pp. 5-30. (Academic Press Inc: San Diego).
- Cornide, J.** (1788). 'Historia de los peces y otras producciones marinas de la costa de Galicia'. pp. 1-308. (Cano, Benito: Madrid).
- Correa-Sales, C.; Rabin, B. C. und Maze, M.** (1992). A Hypnotic Response to Dexmedetomidine, an α -2 Agonist, Is Mediated in the Locus Ceruleus in Rats. *Anesthesiology* **76**, 948-952.
- Crowther J.R.** (2000). 'The ELISA Guidebook'. pp. 1-436. (Humana Press: Totowa).
- Cuisset, B.; Pradelles, P.; Kime, D. E.; Kuhn, E. R.; Babin, P.; Davail, S. und Lemenn, F.** (1994). Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **108**, 229-241.
- Daniels, J.; Holmans, P.; Williams, N.; Turic, D.; McGuffin, P.; Plomin, R. und Owen, M. J.** (1998). A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *American Journal of Human Genetics* **62**, 1189-1197.
- Das Mahapatra, K.; Gjerde, B.; Reddy, P. V. G. K.; Sahoo, M.; Jana, R. K.; Saha, J. N. und Rye, M.** (2001). Tagging: on the use of passive integrated transponder (PIT) tags for the identification of fish. *Aquaculture Research* **32**, 47-50.
- Day, J. W.; Pont, D.; Hensel, P. F. und Ibanez, C.** (1995). Impacts of Sea-Level Rise on Deltas in the Gulf of Mexico and the Mediterranean: The Importance of Pulsing Events to Sustainability. *Estuaries* **18**, 636-647.
- De La Gandara, F.; Mylonas, C. C.; Coves, D.; Ortega, A.; Bridges, C. R.; Belmonte Rios, A.; Vassallo-Agius, R.; Papandroulakis, N.; Rosenfeld, H.; Tandler, A.; Medina, A.; De Metrio, G.; Corriero, A.; Fauvel, C.; Falcon, J.; Sveinsvoll, K.; Ghysen, A.; Deguara, S. und Gordin, H.** (2010). Seedling production of Atlantic bluefin tuna (ABFT) *Thunnus thynnus*. The selfdott project. *Joint International symposium of Kinki University and Setouchi town on the 40th anniversary of Pacific bluefin tuna aquaculture, Towards the sustainable aquaculture of bluefin tuna, October 15-16 2010, Amami, Japan*.
- De Lean, A.; Munson, P. J. und Rodbard, D.** (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *American Journal of Physiology* **235**, E97-E102.
- De Metrio, G.; Bridges, C. R.; Mylonas, C. C.; Caggiano, M.; Deflorio, M.; Santamaria, N.; Zupa, R.; Pousis, C.; Vassallo-Agius, R.; Gordin, H. und Corriero, A.** (2010a). Spawning induction and large-scale collection of fertilized eggs in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) and the first larval rearing efforts. *Journal of Applied Ichthyology* **26**, 596-599.

- De Metro, G.; Caggiano, M.; Deflorio, M.; Mylonas, C. C.; Bridges, C. R.; Santamaria, N.; Caprioli, R.; Zupa, R.; Pousis, C.; Vassallo-Agius, R.; Gordin, H. und Corriero, A.** (2010b). Reproducing the Atlantic Bluefin Tuna in Captivity: The Italian Experience. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **63**, 864-867.
- De Stefano, V. und van der Heijden, P. G. M.** (2007). Bluefin tuna fishing and ranching: a difficult management problem. *NEW MEDIT* **2**, 59-64.
- Dicken, M. L.; Nance, S. P. und Smale, M. J.** (2011). Sessile biofouling on tags from recaptured raggedtooth sharks (*Carcharias taurus*) and their effects on tagging studies. *Marine and Freshwater Research* **62**, 359-364.
- Donaldson, K. A. und Wilson, R. R.** (1999). Amphi-panamic geminates of snook (Percoidae: *Centropomidae*) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA central region of fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **13**, 208-213.
- Doumenge, F.** (1998). L'Histoire des pêches thonières. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **50**, 753-803.
- Doze, V. A.; Chen, B. X. und Maze, M.** (1989). Dexmedetomidine Produces A Hypnotic Anesthetic Action in Rats Via Activation of Central α -2 Adrenoceptors. *Anesthesiology* **71**, 75-79.
- Dunham, R. A.** (2011). 'Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches'. 2. Aufl. pp 1-495. (CAB International: Wallingford).
- Dunn, O. J.** (1961). Multiple Comparisons Among Means. *Journal of the American Statistical Association* **56**, 52-64.
- Ellis, R.** (2008). The bluefin in peril. *Scientific American* **298**, 70-77.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V. und Featherstone, R. M.** (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88-95.
- EMA** (1996) Detomidine: Summary report – Committee for Veterinary Medicinal Products. European Medicines Agency.
- EMA** (1997) Ketamine: Summary report – Committee for Veterinary Medicinal Products. European Medicines Agency.
- EMA** (1999) Xylazine hydrochloride: Summary Report (1) – Committee for Veterinary Medicinal Products. European Medicines Agency.
- Epple, A.; Hathaway, C. B. und Nibbio, B.** (1989). Circulatory Catecholamines in the Eel – Origins and Functions. *Fish Physiology and Biochemistry* **7**, 273-278.
- Kölle, P. und Henke, J.** (2004). Fische. In 'Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: Sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen'. (Hrsg. W. Erhardt, J. Henke und J. Haberstroh) 1. Aufl. pp. 814-841. (Schattauer: Stuttgart).
- Esser, P.** (2010). Principles in Adsorption to Polystyrene. *Technical Bulletin, Thermo Fisher Scientific* **06a**.

- European Commission** (2011). Regulation of the European Parliament and of the Council amending Regulation (EC) No 302/2009 concerning a multiannual recovery plan for bluefin tuna in the eastern Atlantic and Mediterranean. *European Commission, COM(2011) 330 final, 2011/0144 (COD)*.
- FAO** (2003). © 2004-2012. Fishing Techniques. Tuna purse seining. Technology Fact Sheets. Text by J. Majkowski. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 19 September 2003. [Cited 21 January 2012]. <http://www.fao.org/fishery/fishtech/40/en>.
- Fleming, G. J.; Heard, D. J.; Floyd, R. F. und Riggs, A.** (2003). Evaluation of propofol and medetomidine-ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus de soti*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **34**, 153-158.
- Frederick, J. L.** (1997). Evaluation of fluorescent elastomer injection as a method for marking small fish. *Bulletin of Marine Science* **61**, 399-408.
- Fromentin, J. M.** (2003). The East Atlantic and Mediterranean bluefin tuna stock management: uncertainties and alternatives. *Scientia Marina* **67**, 51-62.
- Fromentin, J. M. und Powers, J. E.** (2005). Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish and Fisheries* **6**, 281-306.
- Frøystad, M. K.; Volden, V.; Berg, T. und Gjoen, T.** (2002). Metabolism of oxidized and chemically modified low density lipoproteins in rainbow trout – clearance via scavenger receptors. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 723-733.
- Gamperl, A. K.; Vijayan, M. M. und Boutilier, R. G.** (1994). Epinephrine, norepinephrine, and cortisol concentrations in cannulated seawater-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following black-box confinement and epinephrine injection. *Journal of Fish Biology* **45**, 313-324.
- Ganzedo, U.; Zorita, E.; Solari, A. P.; Chust, G.; del Pino, A. S.; Polanco, J. und Castro, J. J.** (2009). What drove tuna catches between 1525 and 1756 in southern Europe? *Ices Journal of Marine Science* **66**, 1595-1604.
- Garrison, T.** (2011). Water. In 'Essentials of Oceanography'. 6. Aufl. pp. 124-49. (Brooks Cole: Belmont).
- Geiger, C.** (2007). Die „Hellabrunner Mischung“ im Vergleich mit MS 222 als Tauchbadnarkose bei verschiedenen Fischen. *Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Giegerich, R.; Meyer, F. und Schleiermacher, C.** (1996). GeneFisher – software support for the detection of postulated genes. *Proceedings of the International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* **4**.
- Giles, R. E.; Blanc, H.; Cann, H. M. und Wallace, D. C.** (1980). Maternal Inheritance of Human Mitochondrial-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **77**, 6715-6719.
- Glantz, S. A.** (1998). 'Biostatistik'. (Hrsg. A. Heinecke und W. Köpcke) 4. Aufl. pp. 224-231. (McGraw-Hill Professional: New York).
- Graham, M. S. und Iwama, G. K.** (1990). The physiologic effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on two salmonid species. *Aquaculture* **90**, 323-331.

- Green, C. J.; Knight, J.; Precious, S. und Simpkin, S.** (1981). Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Laboratory Animals* **15**, 163-170.
- Hales, T. G. und Lambert, J. J.** (1991). The Actions of Propofol on Inhibitory Amino-Acid Receptors of Bovine Adrenomedullary Chromaffin Cells and Rodent Central Neurons. *British Journal of Pharmacology* **104**, 619-628.
- Hall, L. W.; Clarke, K. W. und Trim, C. M.** (2001). 'Veterinary Anesthesia'. 10. Aufl. pp. 1-561 (Saunders: Philadelphia).
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**.
- Halwart, Soto, und Arthur** (2007). 'Cage aquaculture. Regional reviews and global overview.' *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 498. pp. 1-241. (Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rom).
- Hara, M.; Kai, Y. und Ikemoto, Y.** (1993). Propofol Activates GABA_A Receptor-Chloride Ionophore Complex in Dissociated Hippocampal Pyramidal Neurons of the Rat. *Anesthesiology* **79**, 781-788.
- Hartmann, N.; Reichwald, K.; Wittig, I.; Drose, S.; Schmeisser, S.; Luck, C.; Hahn, C.; Graf, M.; Gausmann, U.; Terzibasi, E.; Cellerino, A.; Ristow, M.; Brandt, U.; Platzer, M. und Englert, C.** (2011). Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* **10**, 824-831.
- Harvey, B.; Denny, C.; Kaiser, S. und Young, J.** (1988). Remote Intramuscular Injection of Immobilizing Drugs Into Fish Using a Laser-Aimed Underwater Dart Gun. *Veterinary Record* **122**, 174-177.
- Hattingh, J.** (1975). Heparin and Ethylenediamine Tetraacetate as Anticoagulants for Fish Blood. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **355**, 347-352.
- Hawkes, J. W.** (1974). The Structure of Fish Skin 2. The Chromatophore Unit. *Cell and Tissue Research* **149**, 159-172.
- Hayton, W. L.; Szoke, A.; Kemmenoe, B. H. und Vick, A. M.** (1996). Disposition of benzocaine in channel catfish. *Aquatic Toxicology* **36**, 99-113.
- Hazel, J.; Lawler, I. R. und Hamann, M.** (2009). Diving at the shallow end: Green turtle behaviour in near-shore foraging habitat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **371**, 84-92.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L. und deWaard, J. R.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**, 313-321.
- Hoeder, U.** (2010). Anwendung und Verbesserung von Schnelltests zur Geschlechtsbestimmung bei Knochenfischen. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Hoffman, B. B. und Taylor, P.** (2001). Neurotransmission: The Autonomic and Somatic Motor Nervous System. In 'Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics'. (Hrsg. J. G. Hardman, L. E. Limbird und A. Goodman Gilman) 10. Aufl. pp. 115-53. (McGraw-Hill: New York).

- Holland, K. N.; Brill, R. W.; Chang, R. K. C.; Sibert, J. R. und Fournier, D. A.** (1992). Physiological and Behavioral Thermoregulation in Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*). *Nature* **358**, 410-412.
- Holm, S.** (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6**, 65-70.
- Holm, S.; Brungot, J.; Rønnekleiv, A.; Hoff, L.; Jahr, V. und Kjølnerbakken, K. M.** (2007). Acoustic passive integrated transponders for fish tagging and identification. *Aquacultural Engineering* **36**, 122-126.
- Horreo, J. L.; Machado-Schiaffino, G.; Griffiths, A.; Bright, D.; Stevens, J. und Garcia-Vazquez, E.** (2008). Identification of differential broodstock contribution affecting genetic variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **280**, 89-93.
- Horsberg, T. E.; Burka, J. F. und Tasker, R. A. R.** (1996). Sedative effects and pharmacokinetics of medetomidine and atipamezole in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *British Journal of Pharmacology* **119**, 94.
- Hu, G. X.** (1993). DNA Polymerase-Catalyzed Addition of Nontemplated Extra Nucleotides to the 3' End of a DNA Fragment. *Dna and Cell Biology* **12**, 763-770.
- ICCAT** (2009a). ICCAT. 2006-2009. **ICCAT Manual. International Commission for the Conservation of Atlantic Tuna. In: ICCAT Publications** [on-line]. Updated 2009. [Cited 01/27/]. ISBN (Electronic Edition): 978-92- 990055-0-7 <http://www.iccat.int/en/ICCATManual.htm>.
- ICCAT** (2009b). Report of the Standing Committee on Research and Statistics (SCRS). *ICCAT Report 2008-2009 (II)*.
- ICCAT** (2011). Report of the 2010 Bluefin Data Preparatory Meeting. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **66**, 1-65.
- IUCN** (2011). Collette, B.; Amorim, A.F.; Boustany, A.; Carpenter, K.E.; de Oliveira Leite Jr., N.; Di Natale, A.; Die, D.; Fox, W.; Fredou, F.L.; Graves, J.; Viera Hazin, F.H.; Hinton, M.; Juan Jorda, M.; Kada, O.; Minte Vera, C.; Miyabe, N.; Nelson, R.; Oxenford, H.; Pollard, D.; Restrepo, V.; Schratwieser, J.; Teixeira Lessa, R.P.; Pires Ferreira Travassos, P.E. und Uozumi, Y. 2011. *Thunnus thynnus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. www.iucnredlist.org. Downloaded on 09 December 2011.
- Jones, O. R. und Wang, J. L.** (2010). COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources* **10**, 551-555.
- Karlsson, J. O. G.; Andersson, R. G. G. und Grundstrom, N.** (1989). Characterization of pigment aggregating α_2 -adrenoceptors of fish melanophores by use of different agonists after partial irreversible receptor inactivation. *British Journal of Pharmacology* **97**, 222-228.
- Kawakami, T.; Aoyama, J. und Tsukamoto, K.** (2010). Morphology of pelagic fish eggs identified using mitochondrial DNA and their distribution in waters west of the Mariana Islands. *Environmental Biology of Fishes* **87**, 221-235.
- Kiessling, A.; Johansson, D.; Zahl, I. H. und Samuelsen, O. B.** (2009). Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture* **286**, 301-308.

- Kime, D. E.** (1993). 'Classical' and 'non-classical' Reproductive Steroids in Fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **3**, 160-180.
- Kitagawa, T.; Nakata, H.; Kimura, S.; Itoh, T.; Tsuji, S. und Nitta, A.** (2000). Effect of ambient temperature on the vertical distribution and movement of Pacific bluefin tuna *Thunnus thynnus orientalis*. *Marine Ecology-Progress Series* **206**, 251-260.
- Kress, H. G.** (1997). Neuropharmacological mechanisms of ketamine. *Anaesthetist* **46**, S8-S19.
- Kruskal, W. H. und Wallis, W. A.** (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**, 583-621.
- Lamare, M. D.; Channon, T.; Cornelisen, C. und Clarke, M.** (2009). Archival electronic tagging of a predatory sea star – Testing a new technique to study movement at the individual level. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **373**, 1-10.
- Lee, W. J.; Conroy, J.; Howell, W. H. und Kocher, T. D.** (1995). Structure and Evolution of Teleost Mitochondrial Control Regions. *Journal of Molecular Evolution* **41**, 54-66.
- Lilliefors, H. W.** (1967). On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *Journal of the American Statistical Association* **62**, 399-402.
- Lin, W. F.; Shiau, C. Y. und Hwang, D. F.** (2005). Identification of four *Thunnus* tuna species using mitochondrial cytochrome b gene sequence and PCR-RFLP analysis. *Journal of Food and Drug Analysis* **13**, 382-387.
- Lin, W. F. und Hwang, D. F.** (2007). Application of PCR-RFLP analysis on species identification of canned tuna. *Food Control* **18**, 1050-1057.
- Liu, Z. J. und Cordes, J. F.** (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**, 1-37.
- Lo Presti, R.; Lisa, C. und Di Stasio, L.** (2009). Molecular genetics in aquaculture. *Italian Journal of Animal Science* **8**, 299-313.
- Lodge, D. und Johnson, K. M.** (1990). Noncompetitive Excitatory Amino-Acid Receptor Antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences* **11**, 81-86.
- Longdill, P. C.; Healy, T. R. und Black, K. P.** (2008). An integrated GIS approach for sustainable aquaculture management area site selection. *Ocean & Coastal Management* **51**, 612-624.
- Longo, S. B.** (2011). Global Sushi: A Political Economic Analysis of the Mediterranean Bluefin Tuna Fishery in the Modern Era. *Journal of World-Systems Research* **17**, 403-427.
- Lowenstein, J. H.; Amato, G. und Kolokotronis, S. O.** (2009). The Real *maccoyii*: Identifying Tuna Sushi with DNA Barcodes – Contrasting Characteristic Attributes and Genetic Distances. *PLoS one* **4**, e7866.
- MacKenzie, B. R. und Myers, R. A.** (2007). The development of the northern European fishery for north Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* during 1900-1950. *Fisheries Research* **87**, 229-239.

- Mair, G. C.; Abucay, J. S.; Beardmore, J. A. und Skibinski, D. O. F.** (1995). Growth performance trials of genetically male tilapia (GMT) derived from YY-males in *Oreochromis niloticus* L.: On station comparisons with mixed sex and sex reversed male populations. *Aquaculture* **137**, 313-323.
- Mair, G. C.; Abucay, J. S.; Skibinski, D. O. F.; Abella, T. A. und Beardmore, J. A.** (1997). Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 396-404.
- Manchado, M.; Catanese, G. und Infante, C.** (2004). Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Fisheries Science* **70**, 68-73.
- Mann, H. B. und Whitney, D. R.** (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* **18**, 50-60.
- Massoulie, J. und Bon, S.** (1982). The Molecular-Forms of Cholinesterase and Acetylcholinesterase in Vertebrates. *Annual Review of Neuroscience* **5**, 57-106.
- Masuma, S.; Miyashita, S.; Yamamoto, H. und Kumai H.** (2008). Status of Bluefin Tuna Farming, Broodstock Management, Breeding and Fingerling Production in Japan. *Reviews in Fisheries Science* **16**, 385-390.
- Mather, F. J.; Mason, J. M. und Jones, A. C.** (1995). 'Historical Document: Life History and Fisheries of Atlantic Bluefin Tuna'. pp. 1-165. (NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-370).
- Mathews, E. A.; Keller, S. und Weiner, D. B.** (1988). A Method to Collect and Process Skin Biopsies for Cell-Culture from Free-Ranging Gray Whales (*Eschrichtius robustus*). *Marine Mammal Science* **4**, 1-12.
- McCormick, M. I. und Smith, S.** (2004). Efficacy of passive integrated transponder tags to determine spawning-site visitations by a tropical fish. *Coral Reefs* **23**, 570-577.
- McEwan, A. J. und Joy, M. K.** (2011). Monitoring a New Zealand freshwater fish community using passive integrated transponder (PIT) technology; lessons learned and recommendations for future use. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **45**, 121-133.
- Mean, R. J.; Pierides, A.; Deltas, C. C. und Koptides, M.** (2004). Modification of the enzyme mismatch cleavage method using T7 endonuclease I and silver staining. *Biotechniques* **36**, 758-760.
- Medina, A.; Abascal, F. J.; Megina, C. und Garcia, A.** (2002). Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. *Journal of Fish Biology* **60**, 203-217.
- Micera, E.; Zupa, R.; Zarrilli, A.; Camarda, A.; Moramarco, A. M.; Acone, F.; De Metrio, G. und Corriero, A.** (2010). A rapid latex agglutination test for gender identification in the Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus). *Aquaculture Research* **41**, 1396-1401.
- Miller, S. M.; Mitchell, A.; Heatley, J. J.; Wolf, T.; Lapuz, F.; Lafortune, M. und Smith, J. A.** (2005). Clinical and cardiorespiratory effects of propofol in the spotted bamboo shark (*Chyllloscyllium plagiosum*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **36**, 673-676.
- Mintz, G. R.** (1993). An irreversible serine protease inhibitor. *BioPharm* **6**, 34-38.

- Miyake, P. M.; De la Serna, J. M.; Di Natale, A.; Farrugia, A.; Katavic, I.; Miyabe, N. und Tičina, V.** (2003). General review of bluefin tuna farming in the Mediterranean area. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **55**, 114-124.
- Morier, E. und Rips, R.** (1982). A New Technique for Simultaneous Assay of Biogenic-Amines and Their Metabolites in Unpurified Mouse-Brain. *Journal of Liquid Chromatography* **5**, 151-164.
- Mosse, P. R. L.** (1978). The Distribution of Capillaries in the Somatic Musculature of Two Vertebrate Types with Particular Reference to Teleost Fish. *Cell and Tissue Research* **187**, 281-303.
- Mourente, G. und Tocher, D. R.** (2009). Tuna Nutrition and Feeds: Current Status and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science* **17**, 373-390.
- Muir, B. S. und Kendall, J. I.** (1968). Structural Modifications in Gills of Tunas and Some Other Oceanic Fishes. *Copeia* 388-398.
- Munday, P. L. und Wilson, S. K.** (1997). Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *Journal of Fish Biology* **51**, 931-938.
- Musyl, M. K.; Brill, R. W.; Boggs, C. H.; Curran, D. S.; Kazama, T. K. und Seki, M. P.** (2003). Vertical movements of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) associated with islands, buoys, and seamounts near the main Hawaiian Islands from archival tagging data. *Fisheries Oceanography* **12**, 152-169.
- Mylonas, C. C. und Zohar, Y.** (2001). Use of GnRH α -delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 463-491.
- Mylonas, C. C.; Bridges, C.; Gordin, H.; Rios, A. B.; Garcia, A.; De La Gandara, F.; Fauvel, C.; Suquet, M.; Medina, A.; Papadaki, M.; Heinisch, G.; De Metrio, G.; Corriero, A.; Vassallo-Agius, R.; Guzman, J. M.; Mananos, E. und Zohar, Y.** (2007). Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH α) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Reviews in Fisheries Science* **15**, 183-210.
- Mylonas, C. C.; De La Gandara, F.; Corriero, A. und Rios, A. B.** (2010). Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) Farming and Fattening in the Mediterranean Sea. *Reviews in Fisheries Science* **18**, 266-280.
- Nadeson, R. und Goodchild, C. S.** (2000). Antinociceptive properties of neurosteroids II. Experiments with Saffan[®] and its components alphaxalone and alphadolone to reveal separation of anaesthetic and antinociceptive effects and the involvement of spinal cord GABA_A receptors. *Pain* **88**, 31-39.
- Nagahama, Y. und Yamashita, M.** (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth & Differentiation* **50**, S195-S219.
- NASA** (2001). World Wind Java SDK Software, © 2001 United States Government as represented by the Administrator of the National Aeronautics and Space Administration. All Rights Reserved.

- Nash, J. P.; Cuisset, B. D.; Bhattacharyya, S.; Suter, H. C.; Le Menn, F. und Kime, D. E.** (2000). An enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for testosterone, estradiol, and 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one using acetylcholinesterase as tracer: application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* **22**, 355-363.
- Nathans, D. und Smith, H. O.** (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *The Annual Review of Biochemistry* **44**, 273-293.
- Neiffer, D. L. und Stamper, M. A.** (2009). Fish Sedation, Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia: Considerations, Methods, and Types of Drugs. *Ilar Journal* **50**, 343-360.
- Neilson, J. D. und Campana, S. E.** (2008). A validated description of age and growth of western Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **65**, 1523-1527.
- Nelson, J. S.** (1994). 'Fishes of the world'. 3 Aufl. pp. 1-624. (Wiley: New York).
- Norris, A. T.; Bradley, D. G. und Cunningham, E. P.** (2000). Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* **182**, 73-83.
- Novel, P.; Porta, J. M.; Porta, J.; Bejar, J. und Alvarez, M. C.** (2010). PCR multiplex tool with 10 microsatellites for the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) – Applications in genetic differentiation of populations and parental assignment. *Aquaculture* **308**, S34-S38.
- O'Brien, S. J.** (1991). Mammalian genome mapping: lessons and prospects. *Current Opinion in Genetics & Development* **1**, 105-111.
- O'Connell, M. und Wright, J. M.** (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 331-363.
- Olsen, R. W. und Li, G. D.** (2011). GABA_A receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Canadian Journal of Anesthesia-Journal Canadian Journal of Anesthesia* **58**, 206-215.
- Oswald, R. L.** (1978). Injection Anaesthesia for Experimental Studies in Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **60**, 19-26.
- Ottolenghi, F.** (2008). Capture-based aquaculture of bluefin tuna. In 'Capture-based aquaculture. Global overview. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 508.'. (Hrsg. Lovatelli.A. und P. F. Holthus.) pp. 169-182. (Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rom).
- Pampoulie, C.; Jakobsdottir, K. B.; Marteinsdottir, G. und Thorsteinsson, V.** (2008). Are vertical behaviour patterns related to the pantophysin locus in the atlantic cod (*Gadus morhua* L.)? *Behavior Genetics* **38**, 76-81.
- Papa, L.** (2009). Genetic Analysis of a Population of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) in the Rhine System, *Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*.
- Park, M. O. und Park, I. S.** (2009). Long-term effects of passive integrated transponder (PIT) tagging on the kelp grouper *Epinephelus bruneus*. *Journal of Fish Biology* **74**, 285-288.
- Peel, M. C.; Finlayson, B. L. und McMahon, T. A.** (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* **11**, 1633-1644.

- Perez, J.; Álvarez, P.; Martínez, J. L. und García-Vázquez, E.** (2005). Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples. *Ices Journal of Marine Science* **62**, 908-914.
- Peter, R. E. und Yu, K. L.** (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**, 173-197.
- Pérez, O. M.; Ross, L. G.; Telfer, T. C. und Barquin, L. M. D.** (2003a). Water quality requirements for marine fish cage site selection in Tenerife (Canary Islands): predictive modelling and analysis using GIS. *Aquaculture* **224**, 51-68.
- Pérez, O. M., Telfer, T. C., und Ross, L. G.** (2003b). On the calculation of wave climate for offshore cage culture site selection: a case study in Tenerife (Canary Islands). *Aquacultural Engineering* **29**, 1-21.
- Pérez, O. M.; Telfer, T. C. und Ross, L. G.** (2005). Geographical information systems-based models for offshore floating marine fish cage aquaculture site selection in Tenerife, Canary Islands. *Aquaculture Research* **36**, 946-961.
- Phelps, R. P. und Rodriguez, D.** (2011). Effects of tag type on red snapper *Lutjanus campechanus* tag retention, growth and survival under hatchery conditions. *Journal of Applied Ichthyology* **27**, 1169-1172.
- Philipps, K.; McCallum, N. und Welch, L.** (2011). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics In Press*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.018>.
- Pinardi, N. und Masetti, E.** (2000). Variability of the large scale general circulation of the Mediterranean Sea from observations and modelling: a review. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **158**, 153-174.
- Plumb, D. C.** (2008). 'Veterinary Drug Handbook, CD-Rom Version'. 6. Aufl. (PharmaVet Inc.: Stockholm, Wisconsin).
- Quinteiro, J.; Sotelo, C. G.; Rehbein, H.; Pryde, S. E.; Medina, I.; Perez-Martin, R. I.; Rey-Mendez, M. und Mackie, I. M.** (1998). Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1662-1669.
- Quinteiro, J.; Vidal, R.; Izquierdo, V.; Sotelo, C. G.; Chapela, M. J.; Perez-Martin, R. I.; Rehbein, H.; Hold, G. L.; Russell, V. J.; Pryde, S. E.; Rosa, P.; Santos, A. T. und Rey-Mendez, M.** (2001). Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5108-5114.
- Radiarta, I. N.; Saitoh, S. I. und Miyazono, A.** (2008). GIS-based multi-criteria evaluation models for identifying suitable sites for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) aquaculture in Funka Bay, southwestern Hokkaido, Japan. *Aquaculture* **284**, 127-135.
- Reid, S. G.; Bernier, N. J. und Perry, S. F.** (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **120**, 1-27.

- Reinhold, P.; Kraus, G. und Schluter, E.** (1998). Desirability of using propofol as a narcotic and as a short term hypnotic in children younger than three years. *Anaesthesist* **47**, 229-237.
- REPRODOTT** (2006). Final Report. *Fifth Framework Programme of the European Commission, REPRO-duction of the bluefin tuna in captivity – feasibility study for the Domestication Of Thunnus Thynnus*.
- Roberts, R. J.; Belfort, M.; Bestor, T.; Bhagwat, A. S.; Bickle, T. A.; Bitinaite, J.; Blumenthal, R. M.; Degtyarev, S. K.; Dryden, D. T. F.; Dybvig, K.; Firman, K.; Gromova, E. S.; Gumpert, R. I.; Halford, S. E.; Hattman, S.; Heitman, J.; Hornby, D. P.; Janulaitis, A.; Jeltsch, A.; Josephsen, J.; Kiss, A.; Klaenhammer, T. R.; Kobayashi, I.; Kong, H. M.; Kruger, D. H.; Lacks, S.; Marinus, M. G.; Miyahara, M.; Morgan, R. D.; Murray, N. E.; Nagaraja, V.; Piekarowicz, A.; Pingoud, A.; Raleigh, E.; Rao, D. N.; Reich, N.; Repin, V. E.; Selker, E. U.; Shaw, P. C.; Stein, D. C.; Stoddard, B. L.; Szybalski, W.; Trautner, T. A.; Van Etten, J. L.; Vitor, J. M. B.; Wilson, G. G. und Xu, S. Y.** (2003). A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* **31**, 1805-1812.
- Rooker, J. R.; Secor, D. H.; Zdanowicz, V. S.; De Metrio, G. und Relini, L. O.** (2003). Identification of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) stocks from putative nurseries using otolith chemistry. *Fisheries Oceanography* **12**, 75-84.
- Rosenfeld, H.; Mylonas, C. C.; Bridges, C. R.; Heinisch, G.; Corriero, A.; Vassallo-Agius, R.; Medina, A.; Belmonte, A.; Garcia, A.; De La Gandara, F.; Fauvel, C.; De Metrio, G.; Meiri-Ashkenazi, I.; Gordin, H. und Zohar, Y.** (2012). GnRH α -mediated stimulation of the reproductive endocrine axis in captive Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *General and Comparative Endocrinology* **175**, 55-64.
- Rubinsztein, D. C.; Amos, W.; Leggo, J.; Goodburn, S.; Jain, S.; Li, S. H.; Margolis, R. L.; Ross, C. A. und Fergusonsmith, M. A.** (1995). Microsatellite Evolution – Evidence for Directionality and Variation in Rate Between Species. *Nature Genetics* **10**, 337-343.
- Saccone, C.; Attimonelli, M. und Sbisà, E.** (1987). Structural Elements Highly Preserved During the Evolution of the D-Loop-Containing Region in Vertebrate Mitochondrial-Dna. *Journal of Molecular Evolution* **26**, 205-211.
- Sachs, L. und Hedderich, J.** (2006). Hypothesentest. In 'Angewandte Statistik' 12. Aufl. pp. 305-559. (Springer: Berlin).
- Sakamoto, R. und Allen, M.** (2011). There's something fishy about that sushi: how Japan interprets the global sushi boom. *Japan Forum* **23**, 99-121.
- Santamaria, N.; Bello, G.; Corriero, A.; Deflorio, M.; Vassallo-Agius, R.; Bok, T.; und De Metrio, G.** (2009). Age and growth of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: *Thunnidae*), in the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Ichthyology* **25**, 38-45.
- Sáñez Reguart, S.** (1795). 'Diccionario histórico de los artes de la pesca nacional.' pp. 1-630 (Impr. de la viuda de Don J. Ibarra: Madrid).
- Sawada, Y.; Okada, T.; Miyashita, S.; Murata, O. und Kumai, H.** (2005). Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquaculture Research* **36**, 413-421.
- Schaefer, K. M.** (2001). Reproductive Biology of Tunas. In 'Tuna: Physiology, Ecology, and Evolution'. (Hrsg. B. A. Block und E. D. Stevens) pp. 225-262. (Academic Press Inc: San Diego).

- Schaffrath, E.; Kuhlen, R. und Tonner, P. H.** (2004). Analgesia and sedation in intensive care medicine. *Anaesthesist* **53**, 1111-1132.
- Schulz, R. W. und Miura, T.** (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 43-56.
- Schulz, S. K.** (2006). Bestimmung der geschlechtsspezifischen Proteine Vitellogenin und Zona radiata im Roten Thun *Thunnus thynnus* mittels immunologischer Nachweisverfahren. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Schwartz, D. D. und Clark, T. P.** (1998). Affinity of detomidine, medetomidine and xylazine for alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **21**, 107-111.
- SELFDOTT** (2010). Project Periodic Report, 3rd. *Seventh Framework Programme of the European Commission, From capture based to SELF-sustained aquaculture and DOmestication of bluefin tuna, *Thunnus Thynnus**.
- Šidák, Z.** (1967). Rectangular Confidence Regions for Means of Multivariate Normal Distributions. *Journal of the American Statistical Association* **62**, 626-633.
- Sinclair, M. D.** (2003). A review of the physiological effects of α_2 -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* **44**, 885-897.
- Smith, D. J.; Azzaro, A. J.; Turndorf, H. und Abbott, S. B.** (1975). Effect of Ketamine HCl on *in vitro* Metabolism of Norepinephrine in Rat Cerebral Cortex Tissue. *Neuropharmacology* **14**, 473-481.
- Sommer, R. und Tautz, D.** (1989). Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6749.
- Spiegel online** (2011). Japaner ersteigern Riesenthunfisch für 300.000 Euro. yes/dpa-AFX. *Spiegel online* vom 05.01.2011. <http://www.spiegel.de/wirtschaft/0,1518,737829,00.html>.
- Starke, K.** (2005). Pharmakologie noradrenerger and adrenerger Systeme. In 'Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie'. (Hrsg. K. Aktories, F. B. Hofmann, U. Förstermann und K. Starke.) pp. 173-211. (Elsevier Urban & Fischer Verlag: München, Jena).
- Stevens, E. D. und Neill, W. H.** (1978). Body temperature relations of tunas, especially skipjack. In 'Fish Physiology, Volume VII, Locomotion'. (Hrsg. W. S. Hoar und D. J. Randall.) pp. 315-356. (Academic Press Inc: New York).
- Susca, V.** (2001). Untersuchung zur Reproduktionsbiologie des Roten Thuns (*Thunnus thynnus* L.) im Mittelmeer. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Susca, V.; Corriero, A.; Deflorio, M.; Bridges, C. R. und De Metrio, G.** (2001). New results on the reproductive biology of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **52**, 745-751.
- Sutovsky, P.; Moreno, R. D.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Simerly, C. und Schatten, G.** (1999). Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**, 371-372.

- Sutovsky, P.; Moreno, R. D.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Simerly, C. und Schatten, G.** (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biology of Reproduction* **63**, 582-590.
- Takeyama, H.; Chow, S.; Tsuzuki, H. und Matsunaga, T.** (2001). Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *Journal of Fish Biology* **58**, 1646-1657.
- Tautz, D.** (1989). Hypervariability of Simple Sequences as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Taylor, N. G.; McAllister, M. K.; Lawson, G. L.; Carruthers, T. und Block, B. A.** (2011). Atlantic Bluefin Tuna: A Novel Multistock Spatial Model for Assessing Population Biomass. *PloS one* **6**, e27693.
- Teo, S. L. H.; Boustany, A.; Dewar, H.; Stokesbury, M. J. W.; Weng, K. C.; Beemer, S.; Seitz, A. C.; Farwell, C. J.; Prince, E. D. und Block, B. A.** (2007). Annual migrations, diving behavior, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, on their Gulf of Mexico breeding grounds. *Marine Biology* **151**, 1-18.
- Thorstad, E. B.; Økland, F. und Heggberget, T. G.** (2001). Are long term negative effects from external tags underestimated? Fouling of an externally attached telemetry transmitter. *Journal of Fish Biology* **59**, 1092-1094.
- Tičina, V.; Grubisic, L.; Katavic, I.; Franicevic, V. und Emric Tičina, V.** (2006). Report on research activities on bluefin tuna tagging within growth-out farming cages. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **59**, 877-881.
- Tičina, V.; Katavic, I. und Grubisic, L.** (2007). Growth indices of small northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.) in growth-out rearing cages. *Aquaculture* **269**, 538-543.
- Tičina, V.** (2007). Tagging of the northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the East Atlantic and Mediterranean Sea in 2005. *Collective Volume of Scientific Papers of the International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)* **60**, 1416-1420.
- Vargas, E. G. und Del Coral, D. F.** (2007). The Origin and Development of Tuna Fishing Nets (*Almadrabas*). *Proceedings of the International Workshop on "Ancient Nets and Fishing Gear in Classical Antiquity. A First Approach"*, November 15-17, 2007, Cádiz, Spain, T. Bekker-Nielsen und D. Bernal Casasola (Hrsg.). Monographs of the Sagena Project 2, Cádiz-Aarhus, 2010.
- Virtanen, R. und Nyman, L.** (1985). Evaluation of the α_1 -Adrenoceptor and α_2 -Adrenoceptor Effects of Detomidine, A Novel Veterinary Sedative Analgesic. *European Journal of Pharmacology* **108**, 163-169.
- Virtanen, R.; Savola, J. M.; Saano, V. und Nyman, L.** (1988). Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an α_2 -adrenoceptor agonist. *European Journal of Pharmacology* **150**, 9-14.
- Volpe, J. P.** (2005). Dollars without sense: The bait for big-money tuna ranching around the world. *Bioscience* **55**, 301-302.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Vandeleer, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. und Zabeau, M.** (1995). AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.

- Walsh, C. T. und Pease, B. C.** (2002). The use of clove oil as an anaesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). *Aquaculture Research* **33**, 627-635.
- Walsh, P. S.; Metzger, D. A. und Higuchi, R.** (1991). Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Walsh, P. S.; Fildes, N. J. und Reynolds, R.** (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* **24**, 2807-2812.
- Wang, J.** (2004). Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* **166**, 1963-1979.
- Wang, J. und Santure, A. W.** (2009). Parentage and Sibship Inference from Multilocus Genotype Data under Polygamy. *Genetics* **181**, 1579-1594.
- Wang, X. W.; Rinehart, T. A.; Wadl, P. A.; Spiers, J. M.; Hadziabdic, D.; Windham, M. T. und Trigiano, R. N.** (2009). A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. *African Journal of Biotechnology* **8**, 2432-2436.
- Ward, D. S.; Norton, J. R.; Guivarc'h, P. H.; Litman, R. S. und Bailey, P. L.** (2002). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of propofol in a medium-chain triglyceride emulsion. *Anesthesiology* **97**, 1401-1408.
- Ward, R. D.; Zemplak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R. und Hebert, P. D. N.** (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **360**, 1847-1857.
- Wardle, C. S.; Videler, J. J.; Arimoto, T.; Franco, J. M. und He, P.** (1989). The Muscle Twitch and the Maximum Swimming Speed of Giant Bluefin Tuna, *Thunnus thynnus* L. *Journal of Fish Biology* **35**, 129-137.
- WBGU** (2006). Die Zukunft der Meere – zu warm, zu hoch, zu sauer. *Sondergutachten, Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen*.
- Weller, D. W.; Cockcroft, V. G.; Würsig, B.; Lynn, S. K. und Fertl, D.** (1997). Behavioral responses of bottlenose dolphins to remote biopsy sampling and observations of surgical biopsy wound healing. *Aquatic Mammals* **23**, 49-58.
- Werner, C. D.** (2005). Detomidin / Ketamin-Anästhesie beim Hausschaf (*Ovis aries*) und Wildschaf (*Ovis ammon musimon*). *Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Wesendonk, J. H.** (2006). Untersuchung zur Hormonphysiologie des Roten Thuns *Thunnus thynnus* mittels immunologischer Nachweisverfahren. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Wexler, J. B.; Scholey, V. P.; Olson, R. J.; Margulies, D.; Nakazawa, A. und Suter, J. M.** (2003). Tank culture of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*: developing a spawning population for research purposes. *Aquaculture* **220**, 327-353.
- White, P. F.; Way, W. L. und Trevor, A. J.** (1982). Ketamine – Its Pharmacology and Therapeutic Uses. *Anesthesiology* **56**, 119-136.
- Wilcoxon, F.** (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin* **1**, 80-83.

- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. und Tingey, S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Williams, N.** (2011). Profit of gloom. *Current Biology* **21**, R97-R98.
- Williams, R.; Kline, M. und Smith, R.** (1996). BSA and Restriction Enzyme Digestions. *Promega Notes Magazine* **59**, 46.
- Williams, T. D.; Rollins, M. und Block, B. A.** (2004). Intramuscular anesthesia of bonito and Pacific mackerel with ketamine and medetomidine and reversal of anesthesia with atipamezole. *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association* **225**, 417-421.
- Wilson, A. C.; Cann, R. L.; Carr, S. M.; George, M.; Gyllensten, U. B.; Helmbychowski, K. M.; Higuchi, R. G.; Palumbi, S. R.; Prager, E. M.; Sage, R. D. und Stoneking, M.** (1985). Mitochondrial DNA and two Perspectives on Evolutionary Genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**, 375-400.
- Zohar, Y.; Goren, A.; Fridkin, M.; Elhanati, E. und Koch, Y.** (1990). Degradation of Gonadotropin-Releasing Hormones in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata*. 2. Cleavage of Native Salmon GnRH, Mammalian LhRH, and Their Analogs in the Pituitary, Kidney, and Liver. *General and Comparative Endocrinology* **79**, 306-319.
- Zohar, Y. und Mylonas, C. C.** (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* **197**, 99-136.
- Zydlowski, G. B.; Haro, A.; Whalen, K. G. und McCormick, S. D.** (2001). Performance of stationary and portable passive transponder detection systems for monitoring of fish movements. *Journal of Fish Biology* **58**, 1471-1475.

8 Anhang

Tabelle 8.1: Versuchstierübersicht

Aufgelistet sind die im Rahmen der Projekte SELFDOTT und ALLOTUNA zu Versuchszwecken getöteten Atlantischen Blauflossen-Thunfische. Nicht angegebene Geschlechts-, Längen- und Gewichtsangaben wurden nicht ermittelt.

Probenkürzel		Geschlecht	Länge [cm]	Gewicht [kg]	Verwuchsbezeichnung / Probenherkunft
CG	201	männlich	132	38	Gametogenese 1
CG	202	männlich	139	50	
CG	203	weiblich	130	40	
CG	204	weiblich	140	55	
CG	205	weiblich	146	55	
CG	206	weiblich	150	54	
CG	207	weiblich	145	56	
CG	208	weiblich	141	51	
CG	209	weiblich	134	42	
CG	210	weiblich	133	40	
CG	211	männlich	134	41	
CG	212	weiblich	142	60	
CG	213	männlich	149	61	
CG	214	männlich	147	57	
CG	215	männlich	149	60	
CG	216	männlich	146	53	Gametogenese 2
CG	217	männlich	135	48	
CG	218	weiblich	145	55	
CG	219	männlich	145	63	
CG	220	männlich	138	62	
CG	221	männlich	128	46	
CG	222	weiblich	133	52	
CG	223	weiblich	136	53	
CG	224	männlich	139	57	
CG	225	männlich	134	51	
CG	226	männlich	132	51	
CG	227	weiblich	141	60	Gametogenese 3
CG	228	weiblich	150	64,5	
CG	229	weiblich	145	62,5	
CG	230	männlich	150	60,5	
CG	231	weiblich	135	48	
CG	232	weiblich	140	57	
CG	233	weiblich	150	61	
CG	234	männlich	146	60	
CG	235	weiblich	145	58	
CG	236	männlich	142	54	
CG	237	männlich	153	68	
CG	238	weiblich	132	44	
CG	239	weiblich	141	60	

Probenkürzel		Geschlecht	Länge [cm]	Gewicht [kg]	Verwuchsbezeichnung / Probenherkunft
1VV	V501	Female	120	28	Vibo 2008
2VV	V502	Female	107	18	
3VV	V503	Male	147	50	
4VV	V504	Male	218	161	
5VV	V505	Female	178	102	
6VV	V506	Male	172	93	
7VV	V507	Female	170	95	
8VV	V508		203	143	
9VV	V509	Male	224	190	
10VV	V510	Female	120		
11VV	V511	Female	135		
12VV	V512	Female	135		
13VV	V513	Male	140		
14VV	V514	Female	140		
15VV	V515	Female	150		
16VV	V516	Male	135		
17VV	V517	Female	115		
18VV	V518	Male	155		
19VV	V519		150		
20VV	V520		140		
21VV	V521		130		
23VV	V523	Male	134	56,4	
24VV	V524	Female	137	51	
25VV	V525	Male	135	44	
26VV	V526	Male	136	45,2	
27VV	V527	Male	140	55	
28VV	V528	Female	135	49	
29VV	V529	Female	130	43,4	
30VV	V530	Female	143	64	
31VV	V531	Female	131	43	
32VV	V532	Male	151	60	
33VV	V533	Male	143	51	
34VV	V534	Female	127	43	
35VV	V535	Male	144	54	
36VV	V536	Female	123	38	
37VV	V537	Female	129	43	
38VV	V538	Female	133	51	
MC	1	Male	160,5	69	
MC	2	Male	157,1	73,5	
MC	3	Female	161,4	80	
MC	4	Female	201,8	139	
MC	5	Female	147,2	54	
MC	6	Male	157,2	70,5	
MC	7	Male	152	67,5	
MC	8	Male	155	63,5	

Probenkürzel		Geschlecht	Länge [cm]	Gewicht [kg]	Verwuchsbezeichnung /Probenherkunft
MN	1	Male	166	63	Malta Nutrition Control
MN	2	Male	177	82	
MN	3	Male	157	64	
MN	4	Male	154	68	
MN	5	Female	170	100	
MN	6	Male	156	70	
MN	7	Male	151	69	
MN	8	Male	145	65	
MN	9	Male	163	72	
MN	10	Male	160	69	
MN	11	Female	166	84	
MN	12	Female	146	50	
MN	13	Female	152	57	
MN	14	Male	158	57	
MN	15	Male	149	50	
MN	16	Male	160	57	
MN	17	Female	156	63	
MN	18	Female	131	35	
MN	19	Female	158	61	
MN	20	Male	166	76	
MN	21	Male	161	78	Malta Nutrition Treatment
MN	22	Female	152	72	
MN	23	Male	167	84	
MN	24	Female	167	94	
MN	25	Male	154	74	
MN	26	Male	158	72	
MN	27	Male	170	87	
MN	28	Male	179	108	
MN	29	Female	150	67	
MN	30	Female	170	86	
MN	31	Female	191	120	
MN	32	Male	173	100	
MN	33	Male	152	69	
MN	34	Male	149	65	
MN	35	Female	164	90	
VI	A	Male	134	56,4	Allotuna 2008
VI	B	Female	137	51	
VI	C	Male	135	44	
VI	D	Male	136	45,2	
VI	E	Male	140	54,8	
VI	F	Female	135	49	
VI	G	Female	130	43,4	

Probenkürzel		Geschlecht	Länge [cm]	Gewicht [kg]	Verwuchsbezeichnung /Probenherkunft
MPi	1				Malta Green Cage 2009
MPi	2				
MPi	3				
MPi	4				
MPi	5				
MPi	6				
MPi	7				
MPi	8				
MPi	9				
MPi	10				
MPi	11				
Mittelwert			151	67,3	
Standardabweichung			20,4	27,3	
Σ	weiblich	63			
Σ	männlich	65			

Tabelle 8.2 Implantierte ID-Tags, Malta 2008

Code	Reporter	Farbcode je 4 cm			PIT-Nummer
M#1	2,5 cm	weiß	weiß	weiß	941000002849825
M#2	2,5 cm	weiß	weiß	rot	941000002849070
M#3	2,5 cm	weiß	rot	rot	941000002845117
M#4	2,5 cm	weiß	rot	weiß	941000002800108
M#5	2,5 cm	rot	weiß	weiß	941000002855149
M#6	2,5 cm	rot	rot	weiß	941000002819112
M#7	2,5 cm	rot	rot	rot	941000002810683
M#8	2,5 cm	rot	weiß	rot	941000002800360
M#9	2,5 cm	weiß	weiß	violett	941000002858332
M#10	2,5 cm	weiß	violett	violett	941000002827048
M#11	2,5 cm	weiß	violett	weiß	941000002802802
M#12	2,5 cm	violett	weiß	weiß	941000002808372
M#13	2,5 cm	violett	violett	weiß	941000002816294
M#14	2,5 cm	violett	violett	violett	941000002818613
M#17	2,5 cm	weiß	grün	grün	941000002835728
M#18	2,5 cm	weiß	grün	weiß	941000002824005
M#20	2,5 cm	grün	grün	weiß	941000002848616
M#21	2,5 cm	grün	grün	grün	941000002827906
M#22	2,5 cm	grün	weiß	grün	941000002827931
M#23	2,5 cm	rot	rot	grün	941000002834429
M#24	2,5 cm	rot	grün	rot	941000002810841
M#25	2,5 cm	grün	grün	rot	941000002849300
M#26	2,5 cm	grün	rot	grün	941000002849495
M#27	2,5 cm	grün	rot	rot	941000002814578
M#28	2,5 cm	rot	grün	grün	941000002822234
M#29	2,5 cm	gelb	gelb	rot	941000002833309
M#30	2,5 cm	gelb	gelb	gelb	941000002854087
M#31	2,5 cm	gelb	rot	rot	941000002861065

Tabelle 8.3 Implantierte ID-Tags, Malta 2009

Code	Reporter	Farbcode je 4 cm			PIT-Nummer
M#32	2,5 cm	grün	grün	weiß	941000002855921
M#33	2,5 cm	grün	weiß	weiß	941000002838998
M#34	2,5 cm	grün	violett	violett	941000002836558
M#35	2,5 cm	grün	gelb	gelb	941000002828431
M#36	2,5 cm	weiß	grün	grün	941000002836471
M#37	2,5 cm	violett	grün	grün	941000002827803
M#38	2,5 cm	gelb	grün	grün	941000002855841
M#39	2,5 cm	weiß	weiß	weiß	941000002860462
M#40	2,5 cm	weiß	weiß	grün	941000002804238
M#41	2,5 cm	weiß	weiß	violett	941000002811738
M#42	2,5 cm	weiß	weiß	gelb	941000002856555
M#43	2,5 cm	weiß	violett	violett	941000002821234
M#44	2,5 cm	weiß	gelb	gelb	941000002862141
M#45	2,5 cm	violett	weiß	weiß	941000002838554
M#46	2,5 cm	gelb	weiß	weiß	941000002835015
M#47	2,5 cm	orange	orange	orange	941000002832142
M#48	2,5 cm	rot	rot	rot	941000002848588
M#49	2,5 cm	violett	violett	violett	941000002827333
M#50	2,5 cm	violett	violett	grün	941000002856581
M#51	2,5 cm	violett	violett	weiß	941000002832084
M#52	2,5 cm	violett	violett	gelb	941000002848409
M#53	2,5 cm	violett	gelb	gelb	941000002839114
M#54	2,5 cm	gelb	violett	violett	941000002824810
M#55	2,5 cm	gelb	gelb	gelb	941000002800137
M#56	2,5 cm	gelb	gelb	grün	941000002864916
M#57	2,5 cm	gelb	gelb	weiß	941000002832191
M#58	2,5 cm	gelb	gelb	violett	941000002865008
M#59	2,5 cm	grün	weiß	violett	941000002846843
M#60	2,5 cm	violett	weiß	grün	941000002864276
M#61	2,5 cm	gelb	grün	violett	941000002811447
M#62	2,5 cm	violett	grün	gelb	941000002807894
M#63	2,5 cm	weiß	violett	weiß	941000002858233
M#64	2,5 cm	violett	weiß	violett	941000002804929
M#65	2,5 cm	gelb	rot	gelb	941000002804938
M#66	2,5 cm	gelb	grün	weiß	941000002834685
M#67	2,5 cm	rot	violett	violett	941000002865746
M#68	2,5 cm	violett	violett	rot	941000002837765
M#69	2,5 cm	rot	violett	rot	941000002845659
M#70	2,5 cm	violett	rot	violett	941000002836243
M#71	2,5 cm	rot	rot	violett	941000002818347
M#72	2,5 cm	violett	rot	rot	941000002848354
M#73	2,5 cm	orange	grün	grün	941000002832743
M#74	2,5 cm	grün	grün	orange	941000002859142
M#75	2,5 cm	orange	grün	orange	941000002813031
M#76	2,5 cm	grün	orange	grün	/
M#77	2,5 cm	orange	orange	grün	/
M#78	2,5 cm	grün	orange	orange	/
M#79	2,5 cm	gelb	violett	weiß	941000002831268

Tabelle 8.4: Implantierte ID-Tags, Malta 2010

Code	Reporter	Farbcode je 4 cm			PIT-Nummer
M#80	grün	rot	rot	weiß	/
M#81	grün	weiß	rot	grün	/
M#82	grün	rot	weiß	weiß	/
M#83	grün	rot	weiß	rot	/
M#84	grün	weiß	rot	rot	/
M#85	grün	weiß	weiß	rot	/
M#86	grün	weiß	rot	weiß	/
M#87	grün	rot	grün	grün	/
M#88	grün	rot	weiß	grün	/
M#89	grün	weiß	grün	rot	/
M#90	grün	rot	grün	weiß	/
M#91	grün	violett	rot	weiß	/
M#92	grün	violett	weiß	rot	/
M#93	grün	violett	rot	gelb	/
M#94	grün	rot	grün	rot	/
M#95	grün	rot	rot	grün	/
M#96	grün	violett	grün	rot	/
M#97	grün	violett	rot	grün	/
M#98	grün	weiß	grün	grün	/
M#99	grün	gelb	gelb	rot	/
M#100	grün	rot	gelb	gelb	/
M#101	grün	gelb	rot	rot	/
M#102	grün	rot	rot	gelb	/
M#103	grün	rot	gelb	rot	/
M#104	grün	rot	gelb	grün	/
M#105	grün	weiß	rot	gelb	/
M#106	grün	gelb	grün	rot	/
M#107	grün	rot	grün	gelb	/
M#108	grün	gelb	rot	grün	/
M#109	grün	weiß	gelb	rot	/
M#110	grün	rot	violett	violett	/
M#111	grün	violett	violett	rot	/
M#112	grün	rot	violett	rot	/
M#113	grün	violett	rot	violett	/
M#114	grün	rot	rot	violett	/
M#115	grün	violett	rot	rot	/
M#116	grün	violett	gelb	gelb	/
M#117	grün	gelb	violett	violett	/
M#118	grün	violett	violett	violett	/
M#119	grün	violett	violett	grün	/
M#120	grün	violett	violett	violett	/
M#121	grün	weiß	weiß	weiß	/
M#122	grün	rot	rot	rot	/
M#123	grün	gelb	gelb	gelb	/
M#124	grün	grün	grün	grün	/
M#125	grün	orange	orange	orange	/

Tabelle 8.5: Implantierte ID-Tags, Vibo 2008 und 2009

Code	Reporter	Farbcode je 4 cm			PIT-Nummer
2008					
V#1	gelb	rot	rot	rot	/
V#2	gelb	rot	rot	weiß	/
V#3	gelb	weiß	rot	grün	/
V#4	gelb	rot	weiß	weiß	/
V#5	gelb	rot	weiß	rot	/
V#6	gelb	weiß	rot	rot	/
V#7	gelb	weiß	weiß	rot	/
V#8	gelb	weiß	weiß	weiß	/
V#9	gelb	weiß	rot	weiß	/
V#10	gelb	rot	grün	grün	/
V#11	gelb	rot	weiß	grün	/
V#12	gelb	weiß	grün	rot	/
V#13	gelb	rot	grün	weiß	/
V#14	gelb	grün	rot	weiß	/
V#15	gelb	grün	weiß	rot	/
V#16	gelb	grün	rot	rot	/
V#17	gelb	rot	grün	rot	/
V#18	gelb	rot	rot	grün	/
V#19	gelb	grün	grün	rot	/
2009					
V#20	grün	grün	grün	grün	/
V#21	grün	grün	grün	violett	/
V#22	grün	grün	grün	gelb	/

Tabelle 8.6: Untersuchte DNA Proben

Aufgelistet sind die für den Speziestest herangezogenen Gewebeproben mit ihrer jeweiligen Herkunft.

Spezies	Anzahl	Probenmaterial	Herkunft
<i>T. thynnus</i>	53	Muskel	Kroatien 2009/10
<i>T. thynnus</i>	4	Muskel	Marpesca 2010
<i>T. thynnus</i>	20	Muskel	Malta 2009
<i>T. thynnus</i>	20	Muskel	Vibo Jungtiere 2010
<i>T. thynnus</i>	10	Eier	Vibo 2010
<i>T. thynnus</i>	10	Eier	Malta 2010
<i>T. maccoyii</i>	24	Muskel	Bali 2009
<i>T. alalunga</i>	5	Flosse	Hawaii 2010
<i>T. alalunga</i>	7	Muskel	Marpesca 2010
<i>T. albacares</i>	5	Flosse	Hawaii 2010
<i>T. albacares</i>	14	Muskel	Marpesca 2010
<i>T. obesus</i>	5	Flosse	Hawaii 2010
<i>K. pelamis</i>	5	Flosse	Hawaii 2010
Σ	182		

Tabelle 8.7: Messdaten der HOBO-Datenlogger

Aufgelistet sind wesentliche Messdaten der HOBO-Datenlogger der Standorte Malta (2009-2011), Vibo (2009-2010) und Cartagena (2009-2011). Äquivalent zu den Abbildungen 3.6, 3.7 und 3.8 ist die nachfolgende Tabelle in Langzeit- und Kurzzeitmessungen unterteilt. Neben den jeweiligen Maximal- und Minimaltemperaturen sowie der Messperiode sind auch die detektierten Langzeit- und Kurzzeittemperaturanstiege (p.d. = pro Tag) angegeben.

Langzeitmessungen											
Abbildungsteil	Standort	Messperiode	Messtiefe								
			-1 m			-8 m					
			max. Temp.	min. Temp.	Temperaturanstieg p.d.	max. Temp.	min. Temp.	Temperaturanstieg p.d.			
3.6A	Malta	01.04.-14.07.2009	28,3 °C	14,9 °C	0,116 °C	25,7 °C	15,1 °C	0,097 °C			
3.7A	Malta	01.04.-20.07.2010	28,9 °C	15,9 °C	0,091 °C	27,8 °C	15,4 °C	0,084 °C			
3.8A	Malta	08.04.-20.07.2011	28,8 °C	16,2 °C	0,109 °C	28,0 °C	16,1 °C	0,101 °C			
Abbildungsteil	Standort	Messperiode	-1 m			-10 m			-16 m		
			max. Temp.	min. Temp.	Temperaturanstieg p.d.	max. Temp.	min. Temp.	Temperaturanstieg p.d.	max. Temp.	min. Temp.	Temperaturanstieg p.d.
			3.6C	Vibo	01.04.-11.07.2009	28,7 °C	14,1 °C	0,128 °C	27,4 °C	14,0 °C	0,119 °C
3.7C	Vibo	22.05.-08.09.2010	29,6 °C	18,2 °C	0,07 °C	28,8 °C	18,0 °C	0,063 °C	28,7 °C	18,0 °C	0,049 °C
3.6E	Cartagena	01.04.-28.07.2009	28,1 °C	13,8 °C	0,116 °C	27,6 °C	13,8 °C	0,109 °C	27,6 °C	13,8 °C	0,095 °C
3.7E	Cartagena	15.05.-22.07.2010	28,4 °C	16,3 °C	0,132 °C	27,7 °C	16,0 °C	0,128 °C	27,3 °C	15,5 °C	0,119 °C
3.8C	Cartagena	16.05.-15.07.-2011	26,7 °C	19,5 °C	0,115 °C	26,6 °C	19,5 °C	0,111 °C	26,0 °C	17,1 °C	0,079 °C

Kurzzeitmessungen							
Abbildungsteil	Standort	Messperiode	1. Hormoninduktion		2. Hormoninduktion		Laichzeit
			Datum	14-tägiger Temperaturanstieg	Datum	14-tägiger Temperaturanstieg	
3.6B	Malta	12.06.-13.07.2009	27.06.2009	0,95 °C (= 0,068 °C p.d.)	03.07.2009	0,48 °C (= 0,032 °C p.d.)	nicht beobachtet
3.7B	Malta	21.05.-11.07.2010	05.06.2010	0,77 °C (= 0,051 °C p.d.)	25.06.2010	0,37 °C (= 0,032 °C p.d.)	20.06.-07.07.2010
3.8B	Malta	30.05.-11.07.2011	14.06.2011	1,33 °C (= 0,098 °C p.d.)	/	/	01.07.-08.07.2011
3.6D	Vibo	12.06.-11.07.2009	27.06.2009	0,71 °C (= 0,051 °C p.d.)	03.07.2009	0,65 °C (= 0,046 °C p.d.)	30.06.-10.07.2010
3.7D	Vibo	29.05.-24.07.2010	13.06.2010	2,21 °C (= 0,158 °C p.d.)	06.07.2010	1,9 °C (= 0,136 °C p.d.)	16.06.-19.06. sowie 08.07.-22.07.2010
3.6F	Cartagena	12.06.-16.07.2009	26.06.2009	1,82 °C (= 0,16 °C p.d.)	/	/	29.06.-15.07.2009
3.7F	Cartagena	05.06.-22.07.2010	/	± 0 °C vor spontanem Abbläichen	/	/	19.06.-17.07.2010
3.8D	Cartagena	28.05.-15.07.2011	/	0,4 °C (= 0,03 °C p.d.) vor spontanem Abbläichen	/	/	11.06.-11.07.2011

Tabelle 8.8: Detektierte Allele und zugehörige Allelfrequenzen (Malta)

Aufgelistet sind die via QIExcel System detektierten und gerundeten Allele sowie deren zugehörige Allelfrequenz des Standorts Malta (2010).

Allele Locus <i>Tth-62</i>	Allel- frequenz	Allele Locus <i>Tth-208</i>	Allel- frequenz	Allele Locus <i>Tth-152</i>	Allel- frequenz	Allele Locus <i>Tth-004</i>	Allel- frequenz
100	0,0877	162	0,0515	174	0,8409	220	0,0476
109	0,5614	177	0,2574	178	0,1591	224	0,181
102	0,2675	183	0,0147			230	0,0286
118	0,0833	190	0,2794			235	0,2429
		196	0,1912			240	0,1476
		200	0,0515			245	0,2524
		205	0,1544			251	0,1
Allele Locus <i>Tth-217</i>	Allel- frequenz	Allele Locus <i>Tth-1-31</i>	Allel- frequenz	Allele Locus <i>Tth-265</i>	Allel- frequenz	Allele Locus <i>Tth-254</i>	Allel- frequenz
219	0,0189	90	0,1475	205	0,0354	82	0,0652
235	0,0094	100	0,0246	210	0,4242	96	0,0145
245	0,2075	108	0,0656	220	0,5202	102	0,2391
250	0,3396	112	0,1148	226	0,0202	108	0,0145
255	0,2736	117	0,1557			112	0,2101
260	0,1132	124	0,3033			116	0,0725
266	0,0377	133	0,0902			125	0,1159
		137	0,0738			130	0,1449
		146	0,0246			135	0,0145
						140	0,0435
						146	0,0507
						150	0,0145

Abbildung 8.1: Einmonatige Aufzeichnung eines Star-Oddi-Datenloggers

Der Datenlogger (Nr. 0973) wurde am 26.03.2008 an einem maltesischen Zuchtfisch befestigt, von welchem er sich am 17.04.2008 löste und zur Oberfläche aufstieg.

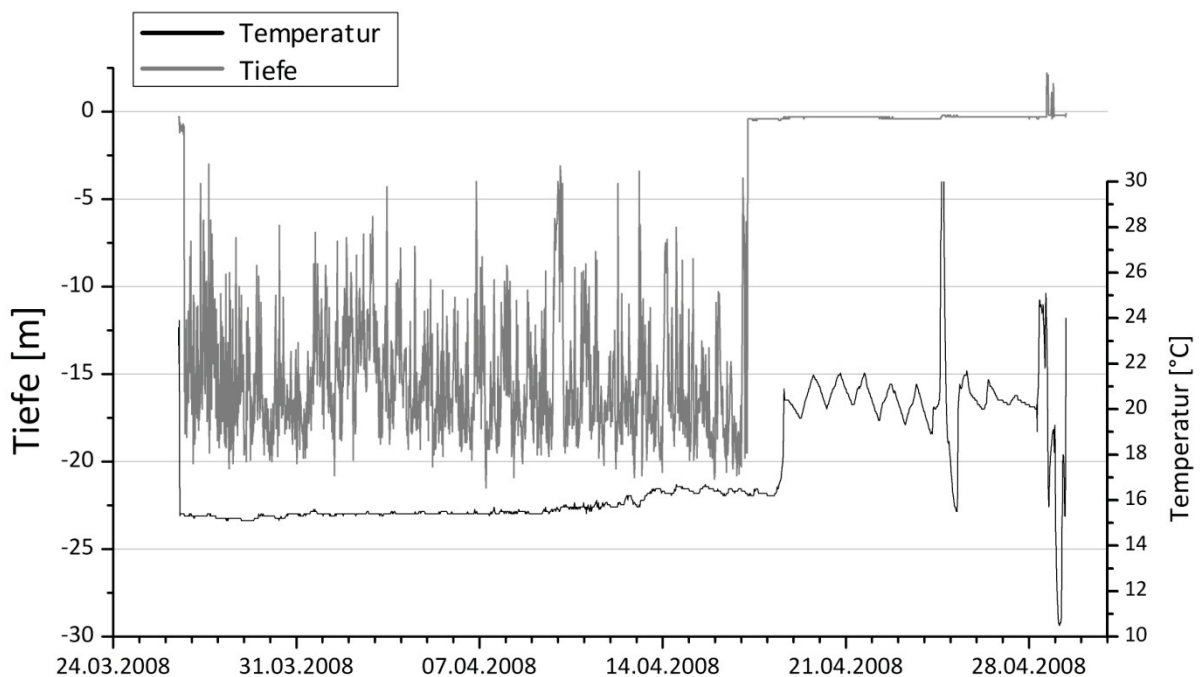
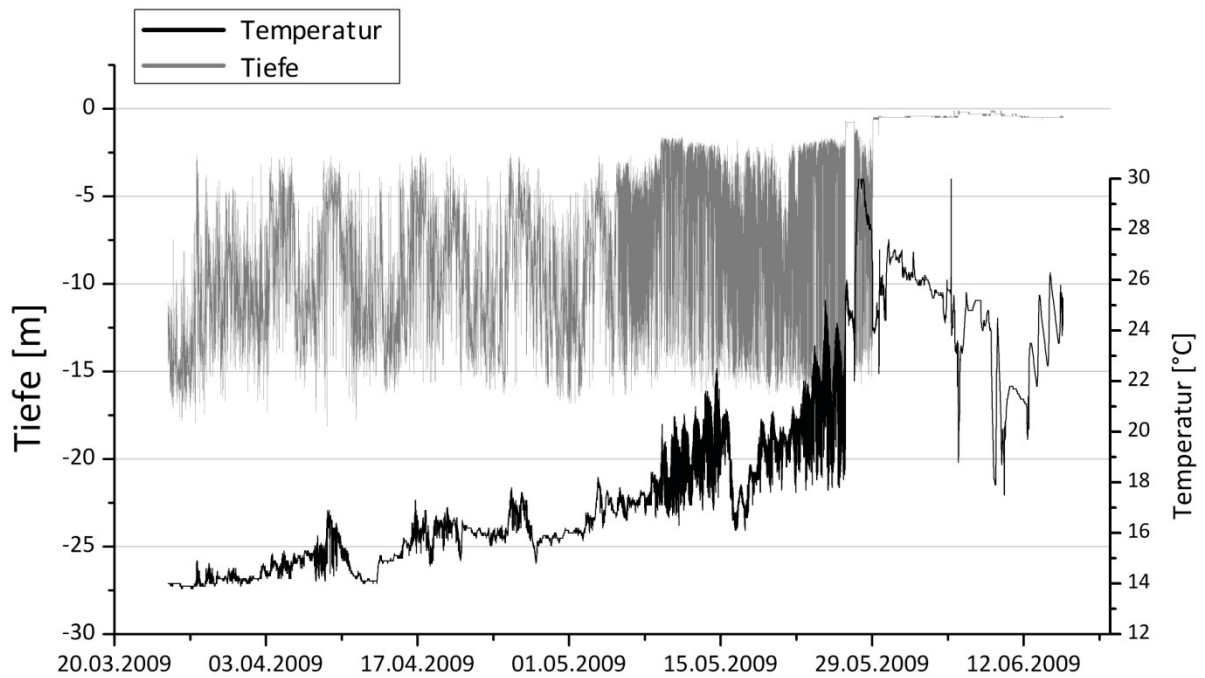


Abbildung 8.2: Dreimonatige Aufzeichnung eines Star-Oddi-Datenloggers

Der Datenlogger (Nr. 0029) wurde am 24.03.2009 an einem maltesischen Zuchtfisch befestigt, von welchem er sich am 29.05.2009 löste und zur Oberfläche aufstieg.

**Abbildung 8.3: Neuntägige Aufzeichnung eines Star-Oddi-Datenloggers**

Der Datenlogger (Nr. 0030) wurde am 26.03.2009 an einem maltesischen Zuchtfisch befestigt, von welchem er sich bereits am 03.04.2009 löste und zur Oberfläche aufstieg.

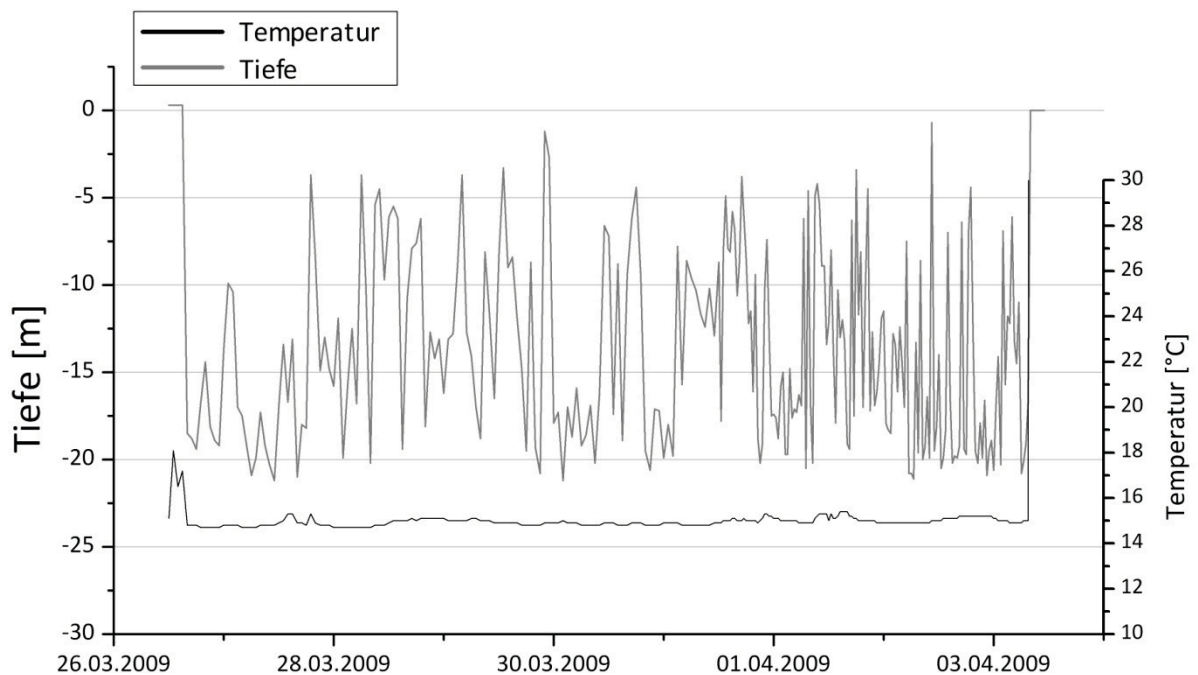
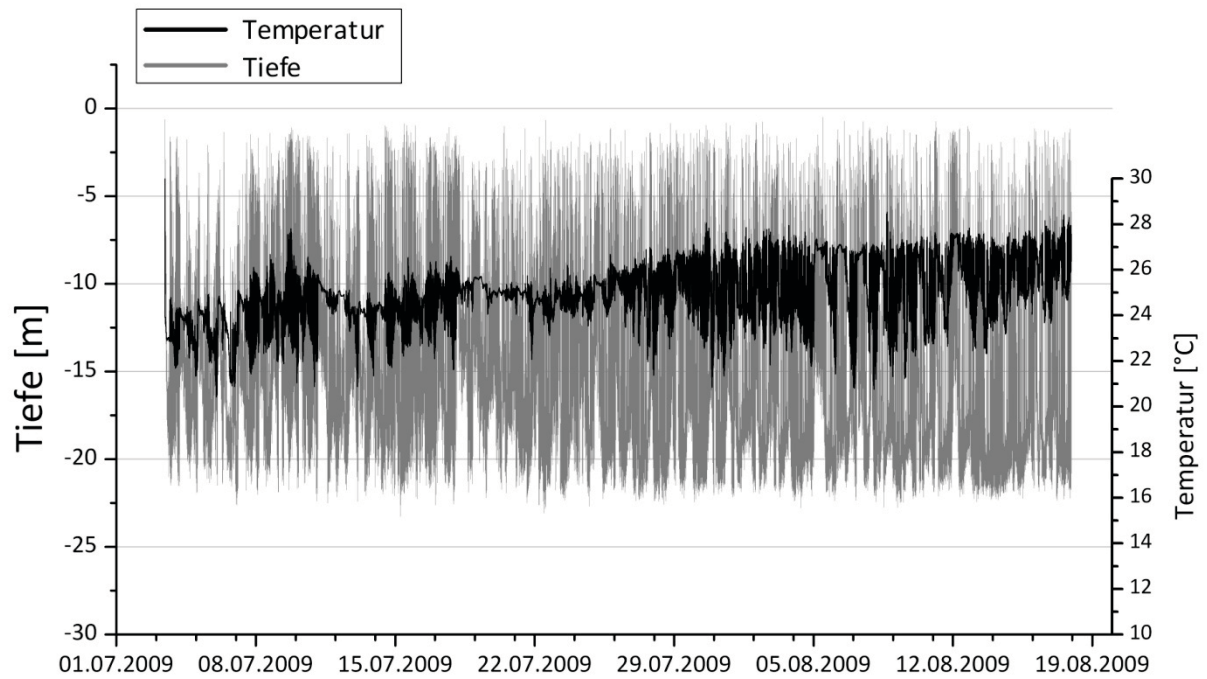


Abbildung 8.4: Eineinhalbmonatige Aufzeichnung eines Star-Oddi-Datenloggers

Der Datenlogger (Nr. 0091) wurde am 03.07.2009 an einem maltesischen Zuchtfisch befestigt, von welchem er sich am 17.08.2009 löste und zur Oberfläche aufstieg.



Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich im Laufe meiner Dissertation im wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Rahmen unterstützt haben und mir zur Seite standen.

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christopher R. Bridges, der meine Forschungsarbeit von Anfang an begleitet und gefördert hat und mir ermöglichte an zahlreichen Forschungsreisen teilzunehmen. Seine Hilfe und sein Rat trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Lammert für die Übernahme des Korreferats, die herzliche Aufnahme in das Institut für Stoffwechselphysiologie und sein mir gegebenes Vertrauen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich stellvertretend für alle Kooperationspartner und Mitglieder der Projekte SELFDOTT und ALLOTUNA bei Prof. Dr. Gregorio De Metrio, Dr. Robert Vassallo-Agius, Dr. Fernando De La Gandara, Dr. Constantinos C. Mylonas, Dr. Aldo Corriero, Dr. Riccardo Caprioli und Hillel Gordin für ihre Hilfe bedanken. Gleichzeitig wäre diese Arbeit ohne die Zusammenarbeit mit Salvu Ellul, Vincenzo Ceravolo und Syd Kraul sowie den beteiligten Tauchern nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Sander Smits und Dr. Diana Clausnitzer, die mir ermöglichten, das QIAxcel-System im Institut für Biochemie zu benutzen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der Besatzung der *Giovanni Padre* und Angelo Disabato für einige schöne und aufregende Tage vor der Libyischen Küste.

Ein ausgesprochenes Dankeschön geht an die Mitarbeiter der Zentralwerkstatt und der Elektronik Werkstatt Biologie der Heinrich-Heine-Universität. Vor allem Waldemar Seidel war maßgeblich an der Realisierung und Entwicklung der verwendeten Materialien involviert.

Mein besonderer Dank gilt neben meinen Doktorandenkollegen/-innen Stephan Schulz, Eva Klumpen und Janina Kraft natürlich auch Andrea Köster, Silke Jakob, Barbara Bartosinska, Ramona Beckmann, Anne Beemelmans, Oliver Krohn und Ulf-Simon Trabitczsch, die mir eine ständige Hilfe waren und meine Laborarbeit unterstützen.

Große Unterstützung habe ich auch von allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Stoffwechselphysiologie und der Arbeitsgruppe Ökophysiologie erhalten. Die stets freundschaftliche Arbeitsatmosphäre hat mich zusätzlich motiviert und trug dazu bei, dass ich die Tage im Institut gern verbrachte.

Für die finanzielle Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit danke ich der Europäischen Kommission.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Jenny Offermanns. Ihre Unterstützung und ihre wertvollen Kommentare haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Gleichzeitig danke ich für zehn wunderbare Jahre und für all die, die noch kommen werden.

Bedanken muss ich mich auch bei all meinen Freunden und Bekannten.

Hier vor allem bei Dr. Daniel Ziggel, für seinen kognitiven Seiltanz zwischen exorbitanter Weisheit und völliger Naivität sowie für die Zeit, die er sich nahm.

Bei Philipp und Niklas Krull, die mich stets dazu angetrieben haben, dass mir auch während meiner Freizeit das Thema *Fisch* nie aus dem Sinn ging und die selbst mir noch so manches über die Flossenträger beibrachten.

Bei Dr. Jens Jany, Gört Hülsermann und Thomas Pochwyt für ihre langjährige Freundschaft und viele nette Tage und Abende.

Sowie zu guter Letzt bei Matthias, Daniel, Marco, Marc, Maik, Andreas, Dominik, Christopher und Ralf, die damit den Club komplettieren.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen danken.