

Geschlechtsausprägung bei temperaturbehandelten genetisch weiblichen und männlichen Tilapien (*Oreochromis niloticus*)

Stephan Wessels¹, Claudia Floren², Thomas Lingner³,
Gabriela Salinas³, Christoph Knorr²



Oreochromis niloticus

Zusammenfassung

Die zu den Cichliden gehörenden Nilbuntbarsche (*Oreochromis niloticus*) sind einerseits eine Modellfischart, andererseits sind sie weltweit die zweitwichtigste Aquakulturspezies. Sie zeigen eine äußerst komplexe Form der Geschlechtsdetermination. Neben genetischen Hauptfaktoren, die Geschlechtschromosomen nur ähneln, können Gene, die nicht auf Geschlechtschromosomen liegen, und temperaturabhängige Faktoren die Geschlechtsausbildung beeinflussen. Bei der Produktion dieser Fischart in Aquakultur werden rein-männliche Bestände bevorzugt, denn das materne Maulbrutverhalten verstärkt den vorhandenen Wachstumsunterschied zwischen Männchen und Weibchen zugunsten der

Männchen. Eingeschlechtliche Bestände werden fast ausschließlich über die Gabe synthetischer männlicher Hormone an die Fischbrut erzeugt. Diese Methode könnte zukünftig von Temperaturprotokollen abgelöst werden, die sowohl aus Gründen des Verbraucherschutzes als auch des Umweltschutzes unbedenklich sind. Die Voraussetzung für die Nutzung der Temperatursensibilität ist jedoch eine einfache und zuverlässige Identifikation temperatursensibler Elterntiere, die bevorzugt die gewünschten Geschlechterverhältnisse der Nachkommen erzielen. Dies könnte durch die Nutzung genetischer Marker erreicht werden. Das Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war somit die Untersuchung und Darstellung der Genexpression, dem Vorgang, bei dem die genetische

Information umgesetzt und für die Zelle nutzbar gemacht wird, während der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung genetisch weiblicher (XX) und männlicher (XY) Tilapien.

Übersicht der geschlechtsdeterminierenden Mechanismen

Das Verständnis der geschlechtsdeterminierenden Mechanismen bei Fischen ist eine große Herausforderung für die Wissenschaft. Je nach Art sind verschiedene geschlechtsdeterminierende Mechanismen verantwortlich für die Ausprägung des Geschlechterverhältnisses innerhalb einer Population, welches wiederum entscheidend für die Überlebensfähigkeit und Stabilität einer Population ist. Bisher wurden bei Wirbeltieren genetische oder umwelt-

¹ Department für Nutztierwissenschaften – Abteilung Aquakultur und Gewässerökologie, Georg-August-Universität Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen

² Department für Nutztierwissenschaften – Abteilung Biotechnologie und Reproduktion landwirtschaftlicher Nutztiere, Georg-August-Universität Göttingen, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen

³ Transkriptomanalyselabor, Institut für Entwicklungsbiologie, Universitätsmedizin Göttingen, Justus-von-Liebig-Weg 11, 37077 Göttingen

abhängige, d.h. vor allem temperaturabhängige Mechanismen der Geschlechtsdetermination beschrieben.

Säuger und Vögel weisen mit dem XX/XY-, bzw. dem WZ/ZZ-System eine stabile chromosomale Geschlechtsdetermination auf. Bei den Säugern wird das Geschlecht, bis auf die Kloakentiere und beutelartigen Säugetiere, bei der Befruchtung durch das Gen Sry, unwiderruflich bestimmt. Das Gen ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert. Spermien, die das Y-Chromosom tragen, bewirken männliche Nachkommen. Spermien, die das X-Chromosom besitzen, führen zu weiblichen Nachkommen. Die genetische Geschlechtsdetermination ist auch bei den Reptilien und Vögeln die häufigste Form der Geschlechtsdetermination und geht dabei mit ausdifferenzierten Geschlechtschromosomen einher. Bei Vögeln scheint die Geschlechtsdetermination in Abhängigkeit der Dosis des Gens *dmrt1*, das auf den Z-Chromosomen liegt, zu erfolgen.

Im Gegensatz dazu gibt es bei wechselwarmen Tieren, Amphibien, Reptilien und vor allem bei Fischen, eine beeindruckende Bandbreite geschlechtsdeterminierender Systeme. Bei männlichen Schildkröten werden zwei unterschiedliche Geschlechtschromosomen

(XY, XXY) vorgefunden. Weibliche Tiere mit unterschiedlichen Geschlechtschromosomen (WZ, WZZ oder WWZ) findet man z. B. bei Schlangen. Bei Eidechsen und Fischen können sowohl bei Männchen als auch Weibchen unterschiedliche Geschlechtschromosomen beobachtet werden. Bei Fischen können komplexere Systeme mit mehreren Geschlechtschromosomen (X, W und Z) innerhalb einer Art (z.B. *Xiphophorus maculatus*) existieren. Nur bei wenigen Fischarten konnte jedoch bisher ein alleinig geschlechtsbestimmendes Gen gefunden werden, wie z.B. *dmy* beim Medakafisch (*Oryzias latipes*), *amhY* beim patagonischen Ährenfisch (*Odontesthes hatcheri*), *gsdf* beim Reisfisch (*Oryzias luzonensis*), *amhr2* beim Kugelfisch und *sdY* bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). In kürzlich veröffentlichten Arbeiten von Li et al. (2015) wurde in zwei *Tilapia*-Populationen die Entdeckung zweier populationsabhängiger Hauptgeschlechtsfaktoren beschrieben.

Bei vielen Fischarten wurden zudem temperaturabhängige Mechanismen der Geschlechtsausprägung beschrieben, seit diese beim neuweltlichen Ährenfisch 1981 in Feld- und Laborversuchen festgestellt wurde. Nachgewiesen ist diese Form der Geschlechtsdetermination seither bei mehr als 60 Fischar-

ten. Genetische Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren mit temperaturabhängiger Geschlechtsausprägung sind bisher kaum beschrieben. Die Geschlechtsdifferenzierung erfolgt oft in einer thermolabilen Phase. Obwohl die Geschlechtsdetermination zum Zeitpunkt der Befruchtung der Eizelle beginnt, kann das genetische Programm durch umweltabhängige Faktoren beeinflusst oder sogar außer Kraft gesetzt werden.

Temperaturabhängige Geschlechtsdetermination bei Tilapien der Art *Oreochromis niloticus*

Das phänotypische Geschlecht von Tilapien wird primär über Geschlechtschromosomen ähnelnde genetische Hauptfaktoren bestimmt. Deren Wirkung kann jedoch durch Nebenfaktoren in bestimmten Konstellationen überlagert werden. Des Weiteren hat die Wassertemperatur einen starken Einfluss auf die phänotypische Geschlechtsausprägung (Abbildung 1). Ab einer Wassertemperatur von 32 °C kann eine funktionelle Vermännlichung genetisch weiblicher (XX) Nachkommenschaften erfolgen.

Temperaturbehandlungen bei 36 °C sind effektiv, wenn sie beginnend am 10. Tag nach der Befruchtung für 10

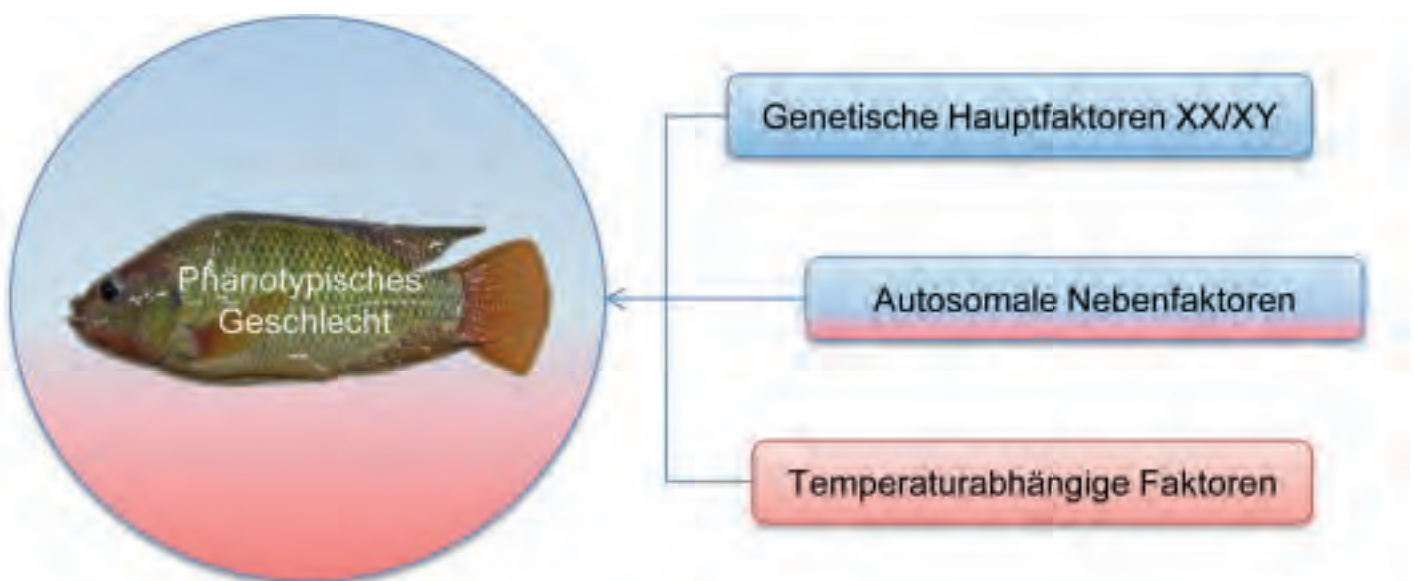


Abbildung 1. Geschlechtsdetermination bei Tilapien der Art *Oreochromis niloticus*.

Tage oder länger appliziert werden. In diesem Zeitfenster können auch andere externe Faktoren, d. h. Hormone und Aromataseinhibitoren, zu einer funktionellen Geschlechtsumkehr führen. Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei *O. niloticus* temperaturabhängige Geschlechterverhältnisse stark zwischen und innerhalb von Populationen variierten. Weiterhin zeigten diese Untersuchungen dennoch eine hohe Reproduzierbarkeit der temperaturabhängigen Geschlechterverhältnisse und wiesen auf die Erbllichkeit dieses Merkmals hin. Diese Annahme konnte anhand eines Selektionsexperiments bestätigt werden. Nach Selektion über drei Generationen erhöhte sich der Männchenanteil in den Temperaturbehandlungsgruppen (36 °C für 10 Tage) auf 93 %, ausgehend von 66 %. Gleichermäßen konnte durch entgegengerichtete Selektion eine Verringerung des Männchenanteils auf 51,5 % erreicht werden.

Die vorliegende Arbeit zielte nun darauf ab, das Transkriptom (Gesamtheit

der Ausprägung der genetischen Information aller Gene) in genetisch reinweiblichen (XX) und genetisch reinmännlichen (XY) Populationen während der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung zu charakterisieren.

Material & Methoden

Zur Untersuchung der Genexpression an definierten Zeitpunkten der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung wurden jeweils drei genetisch reinweibliche und drei genetisch reinmännliche Familien mittels künstlicher Befruchtung erstellt (Abbildung 2). Diese genetisch reinweiblichen und reinmännlichen Populationen wurden bei 28 °C erbrütet und anschließend während der kritischen Phase der Geschlechtsdifferenzierung vom 10. bis zum 20. Lebensstag als Kontrollen bei 28 °C und als Behandlungsgruppen bei 36 °C gehalten.

Die Probenahmen aus Kontrollen und Behandlungen fanden während der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung am 10., 14., 17. und 19. Tag nach der Befruchtung statt (Abbildung 3). Dazu wurden aus allen Versuchsgruppen stichprobenartig an jedem Zeitpunkt 20 Tiere beprobt. Danach wurde per Sektion der Torso der Larven ohne Kopf, Schwanzflosse und Eingeweide gewonnen und in einer Stabilisationslösung für die Nukleinsäure RNA aufbewahrt, die für die Analyse des Transkriptoms isoliert wird. Sämtliche Proben wurden bis zur Gewinnung der Gesamt-RNA bei -20 °C gelagert.

Die in den Gruppen verbleibenden Tiere wurden bis zu einem Alter von mindestens 120 Tagen aufgezogen (Abbildung 4). Im Anschluss wurden morphometrische Daten, wie u. a. das Gewicht und das Gonadengewicht, erfasst. Das phänotypische Geschlecht wurde anhand der gequetschten Gonaden mikroskopisch festgestellt. Des Weiteren wurde der Gonadosomale Index (GSI) berechnet.



Abbildung 2: Abstreifen weiblicher (links) und männlicher (rechts) Niltilapien

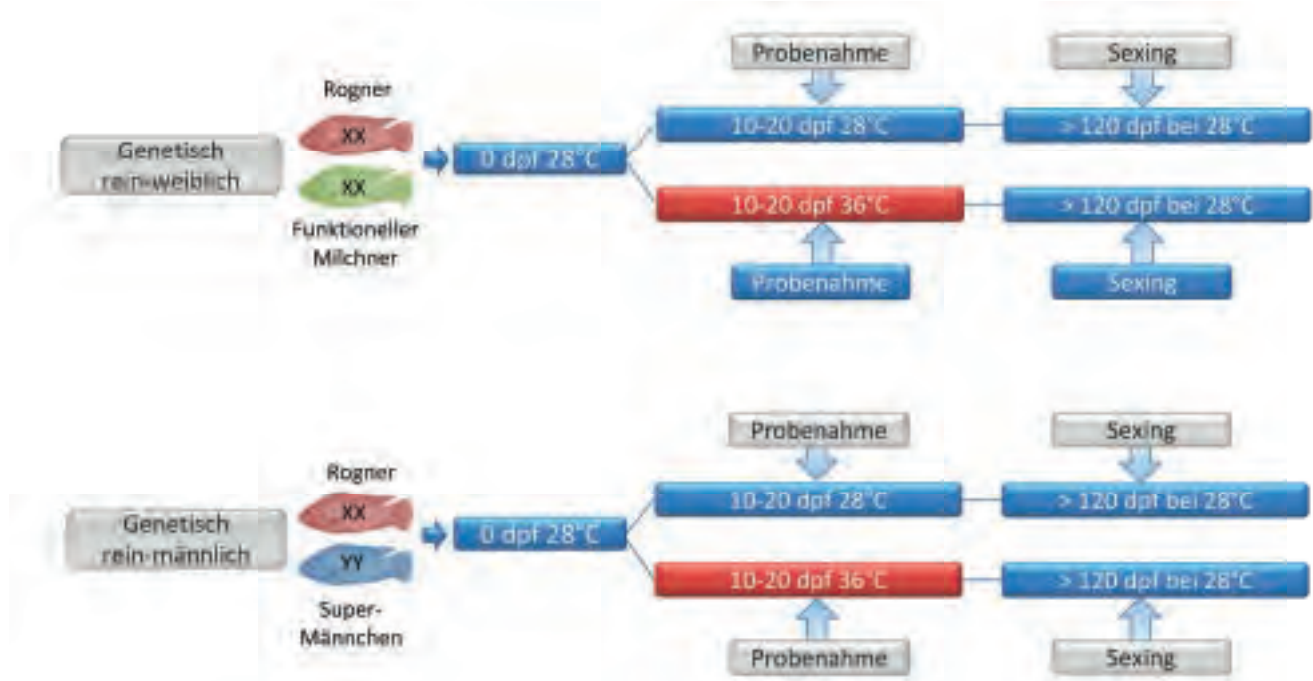


Abbildung 3: Experimentelles Design zur Untersuchung der Genexpression während der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung von Tilapien.

Ergebnisse und Diskussion

Die Männchenanteile in den genetisch rein-weiblichen Kontrollgruppen variierten zwischen 4,7 und 13,5 % mit einem Mittelwert von 7,4 % (Abbildung 5). Männliche Tiere treten in genetisch rein-weiblichen Populationen, begründet durch genetische Nebenfaktoren, relativ häufig auf. Des Weiteren könnten in diesen speziellen Anpaarungen, ähnlich wie beim Wolfsbarsch, auch epigenetische Faktoren (v.a. Umwelteffekte, die auf die Erbsubstanz einwirken, sie aber nicht verändern) für eine Vermännlichung verantwortlich sein, da beide Elterntiere temperaturbe-

handelt waren. Diese Hypothese gilt es jedoch bei Tilapien noch zu überprüfen.

In den temperaturbehandelten Vollgeschwistergruppen wurden Männchenanteile von 48,6 bis 69,1 % festgestellt. Im Mittel aller genetisch rein-weiblichen Behandlungsgruppen wurden 59 % Milchner beobachtet. Demnach konnten zwischen den erstellten Familien große Unterschiede in der Temperatursensibilität beobachtet werden. Eine solche Variation wurde bereits im Rahmen eines Selektionsexperiments anhand genetisch gemischtgeschlechtlicher (XX/XY) Familien berichtet und genauer untersucht.

Weiterhin wurden in allen genetisch rein-männlichen Kontrollgruppen ausschließlich Männchen festgestellt. Nur in einer der entsprechenden drei Behandlungsgruppen konnte ein geringer Anteil (5 %) weiblicher Tiere beobachtet werden. Eine solche „paradoxe Verweiblichung“ wurde bereits in genetisch rein-männlichen Populationen beschrieben. Dabei wird angenommen, dass durch eine veränderte Ausprägung der genetischen Information (Expression) des Aromatase-Gens, welches männliche in weibliche Geschlechtshormone überführt, es zu einem veränderten Gehalt weiblicher Geschlechtshormone kommt, welcher

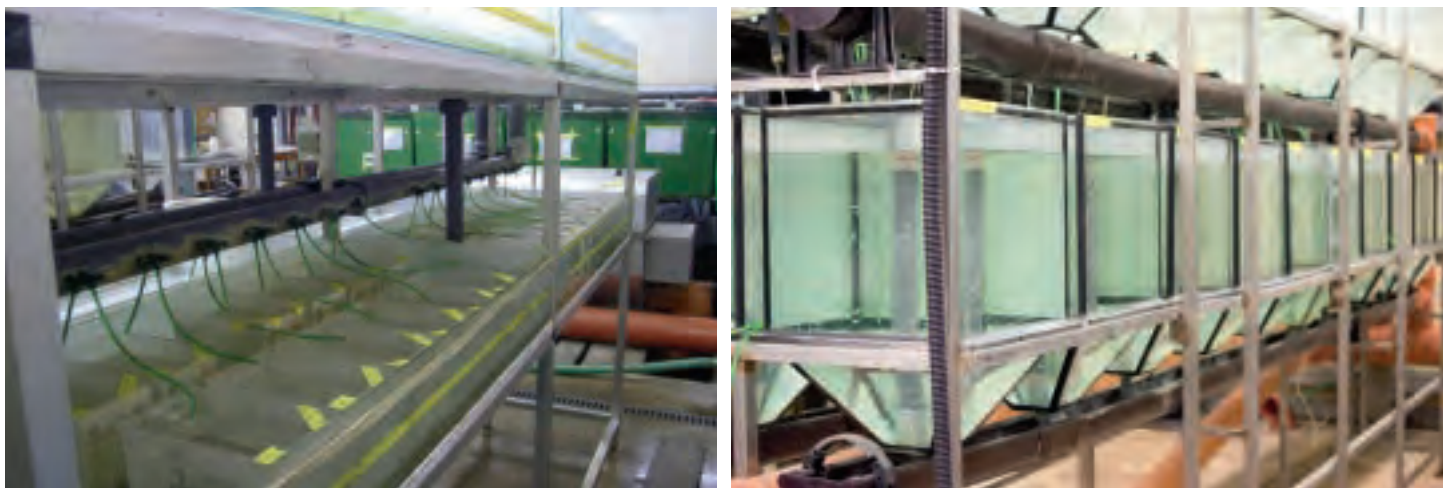


Abbildung 4: Anfütterungseinheit mit Temperaturbehandlung (links) und 80-Liter Aufzuchtbecken (rechts)

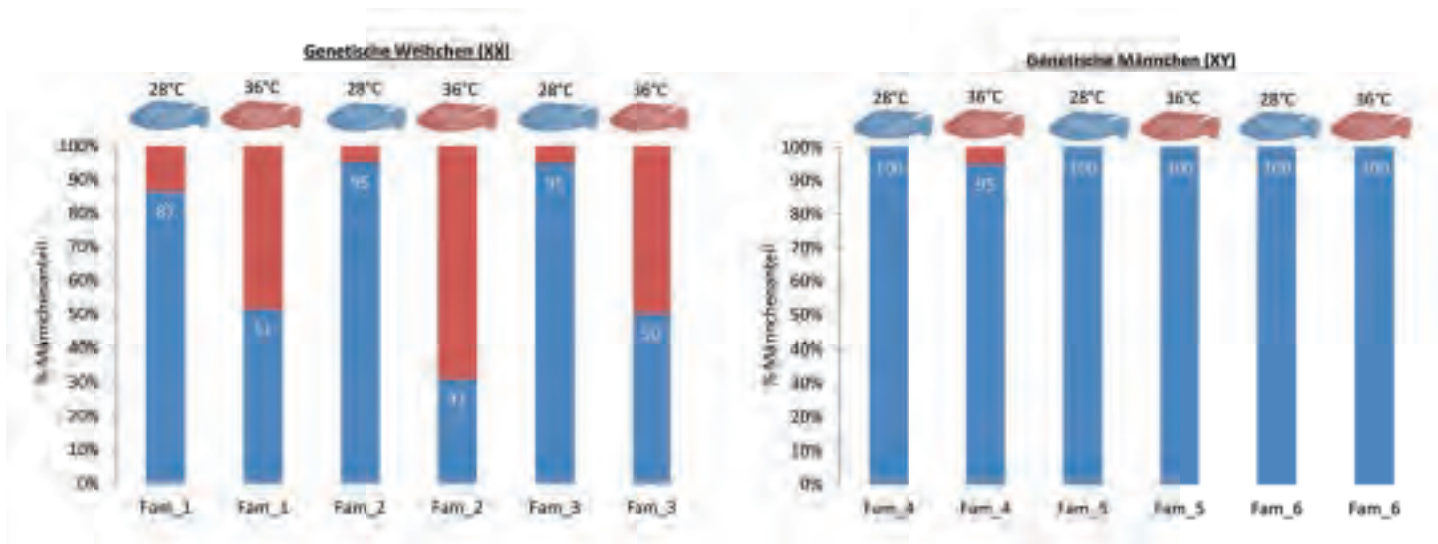


Abbildung 5: Geschlechterverhältnisse in genetisch rein-weiblichen und rein-männlichen Kontroll- und Behandlungsgruppen (blau = Anteil der Männchen; rot = Anteil der Weibchen).

in der Folge zu einer Verweiblichung führen kann.

Der gonadosomale Index unterschied sich erwartungsgemäß deutlich zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Abbildung 6). Unterschiede hinsichtlich des GSI zwischen genetisch rein-weiblichen, funktionellen Milchneben aus Behandlungs- oder Kontrollgruppen bestanden hingegen nicht. Im Vergleich zu den genetischen Männ-

chen wiesen die funktionellen Milchneben unabhängig von der Behandlung einen leicht erhöhten GSI auf. Eine ähnliche Beobachtung wurde auf Seiten der Weibchen gemacht. Genetisch weibliche Tiere wiesen mit und ohne Temperaturexposition immer einen leicht erhöhten GSI auf. Dabei muss jedoch deutlich auf die geringe Anzahl von Beobachtungen ($n = 2$) bei den temperaturinduzierten XY-Roggnern hingewiesen werden.

Die Genexpression betreffend konnten deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen sowohl bei genetisch rein-weiblichen als auch bei genetisch rein-männlichen Tieren gefunden werden. Interessanterweise befindet sich unter den stark differenziell exprimierten Genen ein kürzlich bei einer Kreuzung von Roten- und Mozambique-Tilapien als womöglich geschlechtsdeterminierend charakterisiertes Gen (*zfand3*). Dieses Gen wird

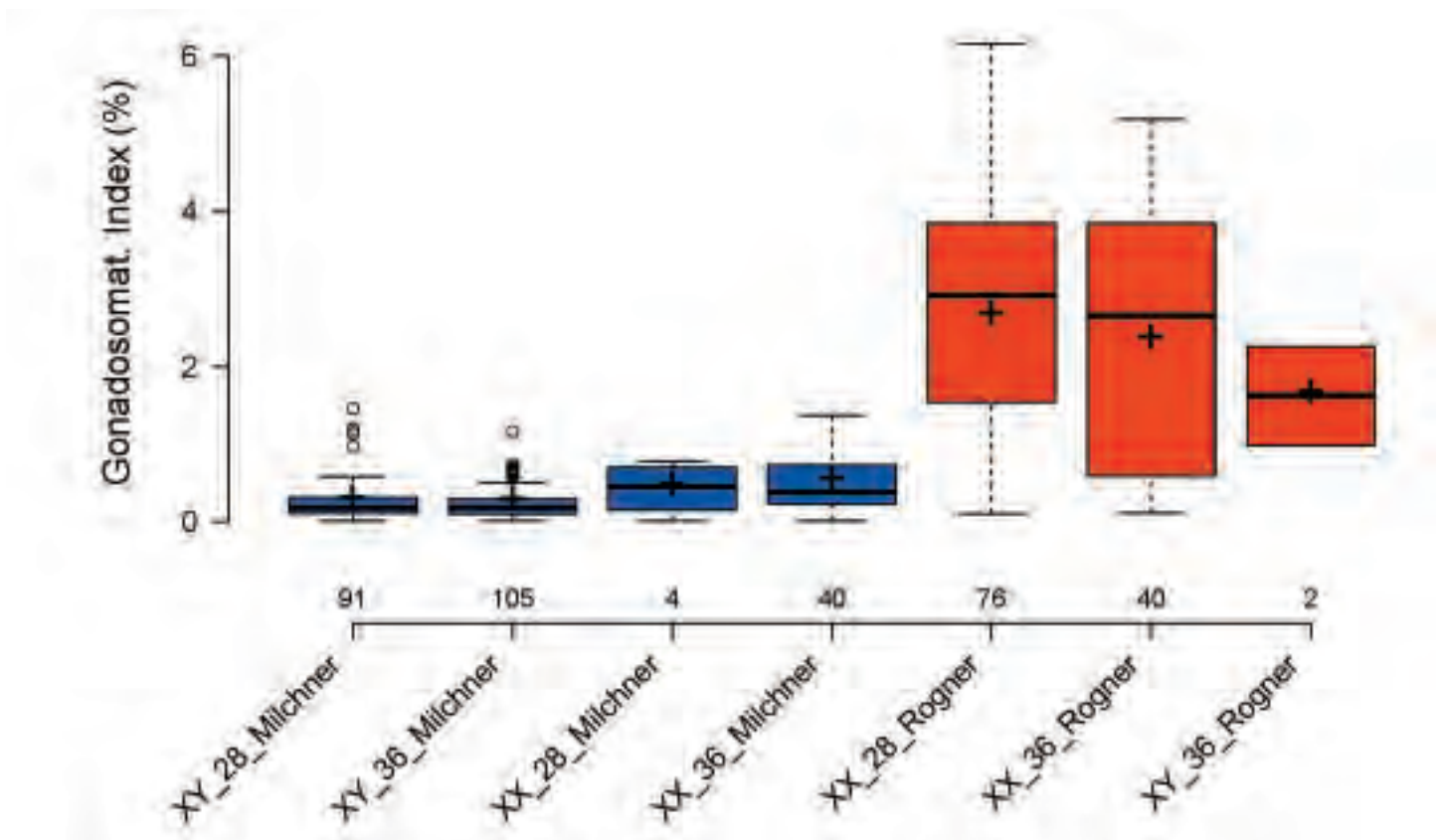


Abbildung 6: Gonadosomaler Index (%) bei genetisch weiblichen und männlichen Tieren mit determiniertem oder funktionellem Geschlecht.



Oreochromis niloticus (Foto: Wolfgang Staeck)

bei Tilapien ausschließlich in den Hoden und Ovarien exprimiert, wobei die Expression in den Hoden bei 140 Tage alten Fischen bis zu 90-mal höher war als in den Ovarien. In der vorliegenden Studie führte die Temperaturbehandlung jedoch zu einer verminderten Expression dieses Gens. Auch wenn eine verminderte Expression einer erhöhten Vermännlichungsrate in den Behandlungsgruppen zunächst zu widersprechen scheint, spielt dieses Gen,

zfand3, offensichtlich eine bedeutende Rolle während der temperaturabhängigen Geschlechtsausprägung bei Tilapien.

Ausblick

Die Ergebnisse der Studie weisen auf die Beteiligung einiger Gene an der temperaturbedingten Geschlechtsdetermination bei Tilapien hin. Die in der vorliegenden Studie identifizierten unterschiedlich exprimierten Gene werden in weiteren Po-

pulationen auf Zusammenhänge mit der Ausprägung des phänotypischen Geschlechts bei gleichzeitig erhöhten Aufzuchttemperaturen geprüft. Dabei werden neben familienspezifischen auch populationsweite Ansätze mit Daten aus dem gesamten Erbgut verfolgt.

Literatur

Das ausführliche Literaturverzeichnis kann beim ersten Autor oder bei der Redaktion angefordert werden.



Porträt eines *Oreochromis-niloticus*-Weibchens (links) und ein Schwarm 25 Tage alter Jungfische (rechts).