

# Thermische Anpassung durch Selektion bei *Gambusia holbrooki* Girard, 1859

Thermic adaptation by selection in *Gambusia holbrooki* Girard, 1859

Michael Pollirer<sup>1</sup> & Helmut Kratochvil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department für Neurobiologie und Kognitionsforschung, Universität Wien, Althanstr. 14, A-1090 Wien, Österreich; pollilovesarcherfish@live.de

<sup>2</sup>Department für Evolutionsbiologie, Universität Wien, Althanstr. 14, A-1090 Wien, Österreich; helmut.kratochvil@univie.ac.at

**Zusammenfassung:** In den Zwanzigerjahren des 20. Jahrhunderts wurde der Östliche Moskitofisch *Gambusia holbrooki* in vielen europäischen Ländern mit mäßigem Erfolg zur Malariabekämpfung ausgesetzt. Im Zuge der chemischen Bekämpfung wurde das Projekt bald vergessen. In vielen Gewässern überlebte *Gambusia holbrooki* unter den unterschiedlichsten ökologischen Bedingungen. Dies gibt die gute Gelegenheit, allopatrische Selektion bzw. Speziation bei Fischen zu studieren. Exemplare aus zwei unterschiedlichen Habitaten (ein kalter Weiher in Krk, Kroatien, und ein Thermalsee in Heviz, Ungarn) wurden unter identischen Bedingungen gezüchtet und auf ihre Atemfrequenz und ihre Reaktion gegenüber kaltem Wasser untersucht. Es zeigte sich, dass die Fische aus dem Thermalsee ihre Toleranz gegenüber tiefen Temperaturen verloren und eine ausgeprägte Stenothermie entwickelt haben.

**Schlüsselwörter:** *Gambusia*, allopatrische thermische Selektion, Speziation

**Summary:** In the twenties of the 20th century the eastern mosquitofish *Gambusia holbrooki* was exposed in many European countries for malaria control reasons with moderate success. In aid of chemical pest control the project was forgotten shortly after. In many waters *Gambusia holbrooki* survived to date under different ecological conditions. This presents an excellent opportunity to study allopatric selection and speciation in fishes. Individuals of two different habitats (a cold pond in Krk, Croatia, and a thermal lake in Heviz, Hungaria) were bred under identical conditions and tested for their respiratory rate and their reaction to cold temperatures. It was found that the fishes from the thermal lake lost their tolerance to low temperatures and developed a distinctive stenothermia.

**Keywords:** *Gambusia*, allopatric thermal selection, speciation

## 1. Einleitung

Der „Östliche Koboldkärpfling“ *Gambusia holbrooki* nimmt unter den Lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliinae) eine Sonderstellung ein. Der Grund dafür ist, dass er, wie auch der Westliche Koboldkärpfling *Gambusia affinis*, wegen der möglichen Eignung zur Fiebermückenbekämpfung weltweit in durch Malaria gefährdete Gebiete gebracht wurde. So wurde diese Art auch in den Jahren 1921-1930 in Europa in den unterschiedlichsten Gewässern ausgesetzt (ARNOLD 1990, KINZELBACH & KRUPP 1982). Zuerst kam sie 1921 nach Spanien (NAJERA-

ANGULO 1944). Nach dieser Studie waren es lediglich zwölf Individuen. Nachkommen dieser Gruppe wurden über ganz Europa verteilt. Durch diesen genetischen „Flaschenhals“ kam es, wie durch VIDAL et al. (2010) anhand von DNA-Untersuchungen nachgewiesen wurde, zu einer gegenüber der Ursprungspopulation aus den südwestlichen USA starken Einschränkung der genetischen Variabilität (Heterozygotiegrad). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in Europa nur die Art *Gambusia holbrooki* nachweisen. Da die Aussetzungsaktionen nicht den durchschlagenden Erfolg brachten und zunehmend Insektizide eingesetzt wurden, nahm das Interesse an der

Malariabekämpfung durch *Gambusia holbrooki* jedoch bald ab, sodass ab ca. 1940 fast nur mehr Chemikalien zur Stechmückenbekämpfung eingesetzt wurden. Die Gambusenpopulationen verblieben jedoch in den Gewässern und die meisten hielten sich unbeschadet bis in die Gegenwart.

Da die Populationen sich in den ökologisch unterschiedlichsten Gewässern befinden, welche aufgrund oft extremer Umweltbedingungen auf die Fische einen starken Selektionsdruck ausüben, ergeben sich hier gute Möglichkeiten, erste Schritte der Speziation aufgrund allopatrischer Bedingungen über einen Zeitraum von ca. 250-300 Generationen (KRUMHOLZ 1948) zu studieren. Als zuverlässigstes Kriterium für umweltbedingte Anpassung bietet sich hierbei die Wassertemperatur an, da sich stabile Populationen einerseits in Gewässern finden, die so kalt sind, dass es zu regelmäßigen Ausdünnungen der Individuendichte im Winter führt, andererseits in Thermalgewässern, bei denen hohe Temperaturen denselben Effekt haben. Die frühesten, umfangreicheren Versuche zur Bestimmung der Wärmeresistenz, allerdings aus angestammten Habitaten, wurden von HAGEN (1964) durchgeführt. Er verglich die Letalität dreier Gambusenarten (*G. affinis*, *G. geiseri*, *G. gaigei*), wobei sich *G. affinis* als die mit Abstand widerstandsfähigste Art gegenüber hohen Temperaturen erwies. Weibchen waren widerstandsfähiger als Männchen. Spätere Autoren wie WINKLER (1975, 1979, 1985), welcher *G. affinis* aus einer warmen Quelle (Austrittstemperatur 41,2 °C) in Arizona untersuchte, sowie JOHNSON (1976) und OTTO (2006) kamen ebenfalls bei *G. affinis* zu ähnlichen Ergebnissen. MEFFE et al. (1995) verglichen die genetischen Differenzen im Zusammenhang mit der Temperaturresistenz (letale Höchsttemperaturen) von *Gambusia holbrooki* an zwei nordamerikanischen Populationen – eine stammte aus einem natürlichen Gewässer in Süd-Carolina und eine aus den warmen Kühlwasserbehältern eines Atomkraftwerkes – und fanden, dass eine höhere genetische Variabilität (Heterozygotiegrad) eine höhere Temperaturtoleranz ermöglicht. FISCHER & SCHUPP (2009) verglichen die Temperatur-

toleranz zweier Poeciliiden (Amazonenmolly, *Poecilia formosa* und Breitflossenkärpfling, *Poecilia latipinna*) und stellten fest, dass es weniger die anhaltend hohen Temperaturen als die Kälteeinbrüche im Winter sind, welche die Populationen von *P. formosa* beeinträchtigen.

Eine wegen des extremen ökologischen Umfeldes herausragende Bedeutung für Studien zur thermischen Anpassung hat hier die Population von *Gambusia holbrooki* im Thermalsee von Heviz (Ungarn). In früheren Untersuchungen wurden die Körpermaße der Heviz-Gambusen mit denen von vier verschiedenen Populationen aus kalten Gewässern mit morphometrischen Methoden verglichen (FÜRNEIN et al. 2006). Dabei konnten signifikante Unterschiede in den Körperproportionen festgestellt werden. Spätere Arbeiten haben die genetischen Eigenschaften (genetische Variabilität) der Exemplare aus Heviz mit solchen aus kalten Gewässern verglichen (GRAPUTTO et al. 2006). Eine jüngere Untersuchung über *G. holbrooki* aus dem Thermalsee von Heviz hat sich mit ökophysiologischen Themen wie Fertilität und Nahrungsaufnahme befasst (SPECZIAR 2004). Es hat sich auch gezeigt, dass Exemplare aus kleinen, nahen Weihern eine wesentlich andere Geschlechterverteilung besitzen als jene im Hauptsee. CECH et al. (1985) wiesen nach, dass die Männchen von *G. holbrooki* aus Heviz gegenüber Sauerstoffmangel viel empfindlicher sind als Weibchen.

Es ist für das Studium über die Entwicklung und Anpassung bei Fischen von großem Interesse, mehr über die Temperaturanpassungen von *Gambusia holbrooki* zu erfahren, da die Art und Weise, wie die Selektion erfolgte (Verschiebung der Temperaturtoleranz nach oben? Einengung des Temperaturbereiches?), gute Beispiele zur Selektion unter diesen Bedingungen liefern könnte.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Herkunft der Versuchstiere

Es wurden zwei Populationen untersucht. Die Versuchstiere stammten aus dem Heviz-See und aus einem Weiher auf der Insel Krk.

Der Thermalsee Heviz (46°47'13,39" N, 17°11'35,19" O) gilt mit einer Fläche 4,4 Hektar und einer maximalen Tiefe von 25 m (beim unterirdischen Zufluss) als einer der weltweit größten Thermalseen. Er liegt einige Kilometer westlich vom Plattensee, in welchen sich auch seine Abflüsse ergießen. Im Sommer hat das Wasser eine Temperatur von 36-38 °C (FÜRNEIN et al. 2004). Im Winter sinkt die Temperatur nie unter 25 °C. Die Fische kommen sowohl im See als auch in seinen Abflüssen sowie einigen kleinen Nebentümpeln in großer Zahl vor.

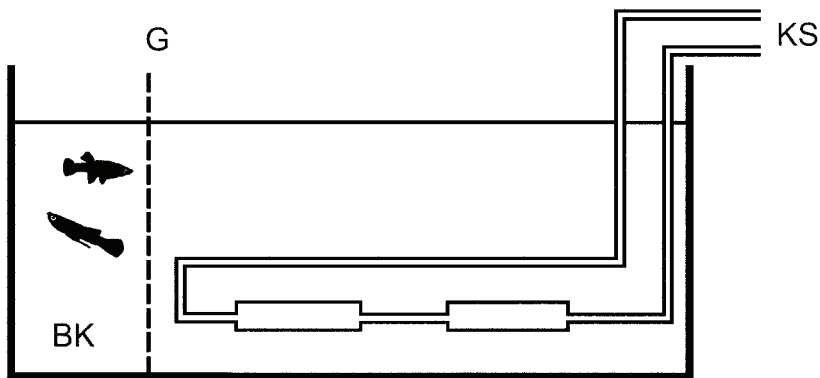
Die Vergleichsgruppe (Population Vrbnik) kam aus einem kleinen Weiher in der Nähe von Vrbnik auf der Insel Krk, Kroatien (45°3'12,31" N, 14°41'6,66" O). Das Gewässer hat einen Durchmesser von ca. 15 m mit einer maximalen Tiefe von 1,5 m. Die durchschnittliche Wassertemperatur beträgt im Juni 24 °C. Im Winter bildet sich häufig eine Eisdecke (H. SCHWAMMER & H. NEMESCHKAL, unpublizierte Beobachtungen).

Erwachsene Tiere wurden im Sommer 2008 beiden Biotopen entnommen und getrennt unter identischen Bedingungen gehalten und gezüchtet (25 °C, Wasserhärte 8 °dGH, pH-Wert 7, Zwölfstundentag), um die unterschiedlichen ökologischen Bedingungen, welche in den beiden Gewässern herrschen, auszuschalten. Sie wurden mit gefrorenen Weißen und Roten Mückenlarven sowie TetraMin gefüttert. Es wurden

nur erwachsene Tiere der F1-Generation (Hevis: neun Männchen, 19 Weibchen, Vrbnik: neun Männchen, zwölf Weibchen) für die Versuche verwendet. Die Standardlänge der Weibchen (Schnauze bis Schwanzwurzel) war 26-32 mm, die der Männchen 19-25 mm. Die Weibchen hatten alle schon einmal geboren. Während der Versuche waren alle in der 2. bis 4. Woche trächtig.

## 2.2. Versuche

In Übereinstimmung mit den Tierschutzbestimmungen wurden die Tiere bei den Versuchen – sie wurden 2009 durchgeführt – nicht geschädigt. Die Tiere wurden in einem Spezialaquarium einer kontinuierlich absinkenden Temperatur ausgesetzt (Abb. 1). Das längliche Aquarium (26 x 26 x 55cm) war durch ein Gitter in zwei Abteilungen getrennt. Im vorderen Teil befanden sich die Versuchstiere. Je Versuch befanden sich fünf Exemplare in der Beobachtungskammer, entweder nur Männchen oder nur Weibchen. Wenn am Ende der Testserien keine fünf Exemplare mehr zur Verfügung standen, wurden vier oder drei Exemplare verwendet. Die gleichzeitige Verwendung von fünf Tieren erfolgte einerseits aus arbeitsökonomischen Gründen, andererseits standen die Fische unter diesen Bedingungen viel weniger unter Stress



**Abb. 1:** Versuchsaufbau. BK, Beobachtungskammer mit Fischen. G, Gitter zwischen BK und Kühlbereich. KS, Kühlsystem.

**Fig. 1:** Experimental set-up. BK, observation compartment with the experimental specimens. G, grid separating BK from the cold area. KS, cooling system.

als bei Einzelbeobachtungen. Im hinteren Teil befand sich die Kühleinrichtung, welche aus zwei Kühlkörpern bestand, durch die Leitungswasser (13-15 °C) geleitet wurde. Ein Teil der Versuche wurde direkt in einer Kühlkammer durchgeführt. Es wurde mit dieser Einrichtung, bei 30 °C beginnend, die Temperatur über einen Zeitraum von 3-3,5 h kontinuierlich bis auf 12 °C abgesenkt. Um einen linearen Temperaturverlauf zu erzielen und um das Ziel von 12 °C zu erreichen, wurden etwa ab Mitte des Vorganges in den Kühlbereich Kühlkörper mit Eis eingelegt (Abb. 2)

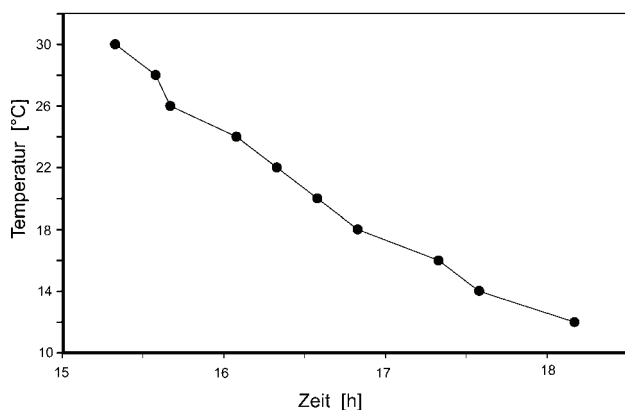
Im Abstand von 2 °C wurde die Atemfrequenz anhand der Maulbewegungen (ein Bewegungszyklus bestand aus der Folge: Maul geschlossen – offen – geschlossen) bestimmt. Tiere, bei denen die Bewegungsfolge nicht eindeutig zu sehen war, wurden nicht für die Auswertung verwendet. Es wurde hintereinander bei jedem Tier einmal gezählt und der Durchgang zweimal wiederholt, also jede Beobachtungsgruppe dreimal gezählt. Da die Absenkung der Temperatur kontinuierlich erfolgte, sich also die Temperatur während des Zählens weiter verminderte, wurden vor und nach dem Zählvorgang die Temperaturen gemessen und der Mittelwert eingetragen, d.h. es wurde etwas vor Erreichen der Zieltemperatur mit dem Zählen begonnen und etwas danach damit aufgehört. Die Unterschiede zwischen den Testgruppen wurden, da es um den möglichen Nachweis von Unterschieden in den Atemfrequenzen ging, mittels Binomialtest überprüft.

Als zweites Kriterium wurde die Temperatur festgestellt, bei der das „Schaukeln“ auftrat, ein Verhalten, das mangelndes Wohlbefinden (niedrige Temperatur, mangelnde Wasserqualität, Krankheit etc.) anzeigt. Das „Schaukeln“ besteht aus einem horizontalen Pendeln der Körpers, bei dem mehrmals pro Sekunde der Körper abwechselnd nach rechts und links gekrümmt wird. Es dient in der Fischheilkunde als sicheres Symptom für mangelndes Wohlbefinden wie Hitze oder Kälte, zu hoher oder niedriger pH-Wert, Schwäche etc. (u.a. UNTERGASSER 1989).

Weibchen und Männchen beider Biotope wurden jeweils getrennt untersucht und sämtliche zu Verfügung stehenden Exemplare der F1-Generation verwendet. Die relativ kleinen Stichproben ergeben sich aus den Schwierigkeiten, Tiere unter identischen Bedingungen zu züchten.

### 3. Ergebnisse

Bei der kontinuierlichen Temperaturabsenkung zeigten die Tiere einen charakteristischen Verlauf in der Atemfrequenz. Von 30 °C bis ca. 22 °C verringerte sich die Atemfrequenz relativ langsam um etwa 10 %. Ab dieser Temperatur machte die Kurve einen Knick und wurde deutlich bis zum Endpunkt von 12 °C steiler. Die Atemfrequenz der Männchen war signifikant höher (< 0,1 % Irrtumswahrscheinlichkeit laut Binomialtest für den gesamten Temperaturbereich) als die der Weibchen. Der Unterschied war in den oberen Temperaturen – im flachen Verlauf zwischen 22 °C und 30 °C – am stärksten.

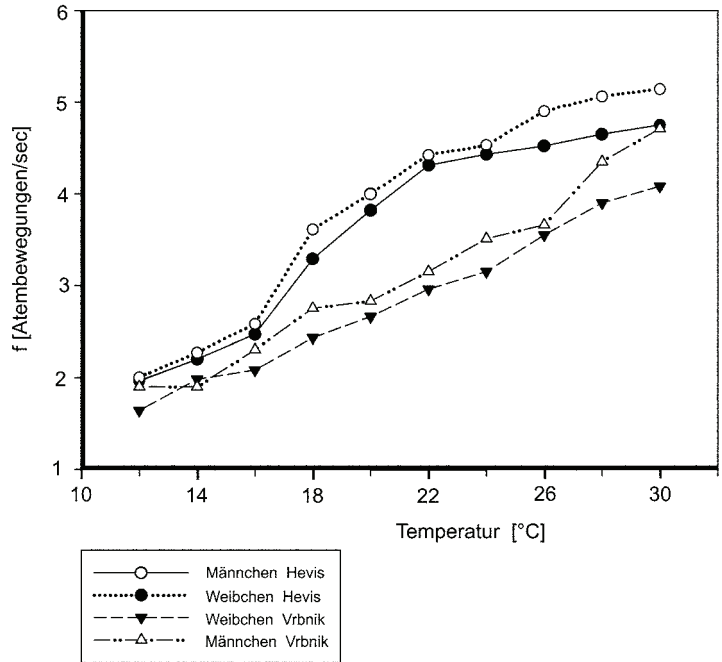


**Abb. 2:** Temperatur-Zeitverlauf während der Experimente.

**Fig. 2:** Temperature-time sequence during experiments.

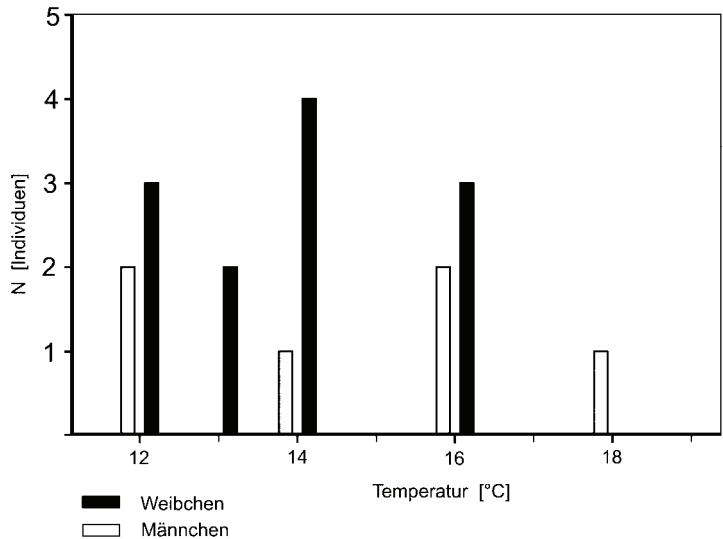
**Abb. 3:** Atemfrequenz der Männchen und Weibchen von *Gambusia holbrooki* aus Heviz und Vrbnik während der Temperaturabsenkung. Weitere Erklärungen s. Text.

**Fig. 3:** Respiratory rate of males and females of *Gambusia holbrooki* from Heviz and Vrbnik during decrease of the temperature.



**Abb. 4:** „Schaukeln“ von *Gambusia holbrooki* aus dem Thermalsee in Heviz.

**Fig. 4:** „Swaying“ of *Gambusia holbrooki* from the thermal lake in Heviz.



ten ausgeprägt (Abb. 3). Zweiundzwanzig von 28 (sechs von neun Männchen, zwölf von 19 Weibchen) untersuchten Tieren zeigten zwischen 12 °C und 18 °C Schaukelreaktionen. Ein Temperaturunterschied in den Reaktionen zwischen Männchen und Weibchen war nicht festzustellen (vgl. Abb. 4.)

Der Unterschied zu den Fischen der Heviz-Population war, dass der Verlauf der Atemfrequenz bei den „Vrbnik-Fischen“ weitgehend linear war. Die Atemfrequenz der Männchen war ebenfalls höher als bei den Weibchen.

Als zweites auffallendes Ergebnis ist zu vermerken, dass die Atemfrequenz der Heviz-

Population insgesamt deutlich höher war als die der Vrbnik-Population, und zwar um ca. 20 % (Abb. 3).

Von den Gambusen aus Vrbnik zeigte kein einziges Exemplar eine Reaktion in Form des Schaukelns.

Die Unterschiede zwischen allen Kurven (zwischen Männchen und Weibchen Heviz, zwischen Männchen und Weibchen Vrbnik, Zwischen Heviz und Vrbnik) waren laut Binomialtest deutlich  $< 0,1$  % Irrtumswahrscheinlichkeit.

#### 4. Diskussion

Der Versuch in den Zwanzigerjahren des 20. Jahrhunderts, die Malaria durch Einsetzen von Gambusen zu bekämpfen, stellt insofern einen wissenschaftlichen Glücksfall dar, als er die Möglichkeit bietet, die Wirkung allopatrischer Selektion während eines relativ gut bekannten Zeitraumes unter überschaubaren Bedingungen zu studieren. Eine die Artbildung fördernde Radiation (SEEHAUSEN 2007, 2008, SCHLUTER 2009) scheint wegen der Kleinheit der gewählten Biotope weniger wahrscheinlich. Es zeigt sich, dass dieser nach phylogenetischen Vorstellungen äußerst kurze Zeitraum von ca. 80 Jahren bei zwei bis drei Generationen pro Jahr genügt hat, unter natürlichem, starkem Selektionsdruck nachweisbare Veränderungen der Atmungsphysiologie wie auch in morphologischen (FÜRNEIN et al. 2004) Merkmalen zu schaffen. Es ist offensichtlich, dass es bei der Population von *Gambusia holbrooki* im Thermalsee von Heviz zu einer Entwicklung in Richtung Stenothermie im hohen Temperaturbereich gekommen ist. Das wird dadurch belegt, dass Reaktionen, die Unwohlsein anzeigten, bereits unterhalb von 18 °C auftraten und dass die Atemfrequenzkurve zwischen 22 °C und 30 °C sehr flach verläuft. Das lässt unabhängig von möglichen Veränderungen der Kiemen vermuten, dass Sauerstofftransport und Stoffwechsel im hohen Temperaturbereich (ab ca. 23 °C bis über 30 °C) einen höheren Grundumsatz erlauben als bei den Fischen aus der Vrbnik-Population. Bei der Heviz-

Population ist offensichtlich der funktionale Temperaturbereich nachhaltig eingengt und nach oben verschoben. Dass die Männchen bei beiden Populationen eine höhere Atemfrequenz aufwiesen, lässt sich durch ihr geringeres Körpergewicht erklären. Auf höhere Temperaturbereiche wurde bei den Experimenten verzichtet, weil eine mögliche Schädigung der Tiere vermieden werden sollte. Als Hauptgrund für die schnelle selektive Anpassung von *Gambusia holbrooki* kann angenommen werden, dass es sich bei ihr, ähnlich wie bei *Gambusia affinis*, um eine extrem euryöke und anpassungsfähige Art handelt, was ihre weltweite Verbreitung belegt.

Eine weitere interessante Frage zur thermischen Anpassung von *Gambusia holbrooki* ist die nach dem Einfluss der Anpassungsprozesse auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tiere. Eine diesbezügliche Studie ist in Vorbereitung.

#### Danksagung

Wir danken Herrn Dr. H. SCHWAMMER, Tiergarten Schönbrunn, Wien, für die Beschaffung der Fische aus Vrbnik sowie Herrn Prof. Dr. H. NEMESCHKAL, Universität Wien, für die Beratung in statistischen Fragen.

#### Literatur

- ARNOLD, A. 1990. Eingebürgerte Fischarten. Neue Brehm-Bücherei Nr. 602. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- CECH, J.J., M.J. MASSINGILLI, B. VONDRACEKI, & A.L. LINDEN. 1985. Respiratory metabolism of mosquitofish, *Gambusia affinis*: effects of temperature, dissolved oxygen and sex difference. *Environmental Biology of Fishes* 23, 297-307.
- FISCHER, C., & I. SCHLUPP. 2009. Differences in thermal tolerance in coexisting sexual and asexual mollies (*Poecilia*, Poeciliidae, Teleostei). *Journal of Fish Biology* 74, 1662-1668.
- FÜRNEIN, H., H. NEMESCHKAL, & H. KRATOCHVIL. 2004. Ecological differentiation in *Gambusia holbrooki*, a morphometric analysis of isolated populations influenced by habitat and climate. *Zeitschrift für Fischkunde* 7, 43-53.
- GRAPUTTO, A., A. BISAZZA, & A. PILASTRO. 2006. Invasion success despite reduction of genetic

- diversity in the European populations of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). Italian Journal of Zoology 73, 67-73.
- HAGEN, D.W. 1964. Evidence of adaptation to environmental temperatures in three species of *Gambusia*. The Southwestern Naturalist 9, 6-19.
- JOHNSON, C.R. 1976. Variation in the thermal tolerance of *Gambusia affinis affinis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Physiology 55, 337-340.
- KINZELBACH, R., & F. KRUPP. 1982. Zur Einbürgerung des Moskitofisches (*Gambusia affinis*) in Mitteleuropa. Mainzer Naturwissenschaftliches Archiv 20, 67-77.
- KRUMHOLZ, L.A. 1948. Reproduction in the western mosquitofish *Gambusia affinis affinis* and its use in mosquito control. Ecological Monographs 18, 1-43.
- MEFFE, G.C., S.C. WEEKS, M. MULVEY, & K.L. KANDL. 1995. Genetic differences in thermal tolerance of eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from ambient thermal ponds. Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences 52, 2704-2711.
- NAJERA-ANGULO, L. 1944. Sobre la identificación de la *Gambusia holbrooki*. Boletín Real Sociedad Española de Historia Natural, Sección Biología 42, 51-55.
- OTTO, R.G. 2006. Temperature tolerance of the mosquitofish *Gambusia affinis*. Journal of Fish Biology 5, 575-585.
- SEEHAUSEN, O. 2007. Evolution and ecological theory – chance, historical contingency and ecological determinism jointly determine the rate of adaptive radiation. Heredity 99, 361-363.
- SEEHAUSEN, O. 2009. Ecology: Speciation affects ecosystems. Nature 458, 1122-1123.
- SPECZIAR, A. 2004. The life history pattern and feeding ecology of the introduced eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in a thermal spa under temperate climate, of Lake Heviz, Hungary. Hydrobiologia 522, 249-260.
- SCHLUTER, D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. Science 323, 737-741.
- UNTERGASSER, D. 1989. Krankheiten der Aquarienfische. Diagnose und Behandlung. Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart.
- VIDAL, O., E. GARCIA-BERTOU, P.O. TEDESCO, & J.L. GARCIA-MARIN. 2010. Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. Biological Invasions 12, 841-851.
- WINKLER, J. 1975. Thermal tolerance of *Gambusia affinis* from a warm spring. Physiological Zoology 48, 367-377.
- WINKLER, J. 1979. Thermal preference of *Gambusia affinis* as determined under field and laboratory conditions. Copeia 1979, 60-64.
- WINKLER, J. 1985. Persistent difference in thermal tolerance among acclimation groups of a warm spring population of *Gambusia affinis* determined under field and laboratory conditions. Copeia 1985, 456-461.

Eingegangen: 25. 10. 2010

Angenommen: 15. 12. 2010