

Succesvolle bevruchting en embryonale ontwikkeling van de Europese paling (*Anguilla anguilla* L.)

Een nieuwe aanpak om de bevruchtingkansen te vergroten.

Arjan Palstra, Edwin Cohen, Vincent van Ginneken en Guido van den Thillart:

Instituut Biologie Leiden, Sectie Integratieve Zoology, Kaiserstraat 63, Leiden Correspondentie: Thillart@ruisfb.leidenuniv.nl

Door de geslachtsrijping en ovulatie van schieraal hormonaal te stimuleren, zijn we in staat geweest goede kwaliteit eieren te produceren en bevruchting te bewerkstelligen voor 6 ouderparen (10% van het aantal experimentele vrouwtjes). Eitjes van twee ouderparen ontwikkelden zich tot embryo's die in leven werden gehouden tot 4 dagen na de bevruchting. De embryo's vertoonden heftige staartbewegingen vanaf 60 uur na bevruchting. Tevens kon in het laatste stadium een hartslag van ca 180 slagen per minuut worden waargenomen. Daar de maturatie per individu sterk varieert is gezocht naar een manier om deze te karakteriseren. Ontwikkelingsstadia van maturerende oocyten werden voor het eerst bij de paling beschreven. Door individuele tijdsreeksen van oocyten te koppelen aan de mate van het bevruchtingssucces is een fertiliteitsindex opgesteld. Met behulp van deze index kan nu voor elk experimenteel dier een geoptimaliseerd maturatie-protocol worden opgesteld. Met de zgn fertiliteits-index hebben we voor het eerst een handvat waarmee we in de toekomst de bevruchtingkansen voor ieder individu aanzienlijk kunnen vergroten.

De aquacultuur van paling is geheel afhankelijk van de schrikbarend afnemende jaarlijkse instroom van glasaal. Succesvolle kunstmatige reproductie van paling zou daarom een stimulans zijn voor de aquacultuur en de druk op de glasaalvisserij verminderen. Tientallen jaren van onderzoek op dit gebied heeft slechts beperkt succes opgeleverd. Japanse onderzoekers zijn inmiddels in staat de Japanse paling te kweken tot glasaal maar slechts in minimale hoeveelheden. Zeer recent is Pedersen (2003) in staat geweest enkele larven te verkrijgen van de Europese paling die echter slechts enkele dagen in leven bleven. Wij hebben in dezelfde periode soortgelijke resultaten behaald in een verkennende stu-

die. Grote individuele verschillen bleken op te treden bij gestimuleerde maturatie met betrekking tot groei, maar ook met betrekking tot hormoon niveaus. Dat is zeer waarschijnlijk de oorzaak van het geringe succes tot nu toe. Om de individuele verschillen te kunnen volgen is in Leiden gekeken naar de ontwikkeling van de oocyten. Op deze wijze kan informatie worden verkregen die noodzakelijk is voor het bepalen van de juiste momenten van de laatste maturatiestap, de inductie van ovulatie, het afstrijken en de bevruchting van de eieren. Tot nu toe krijgt de studie van oocyt-maturatie en (kunstmatige) bevruchting in de aquacultuur niet de aandacht die ze verdienen. Zo is er tot nu toe nog steeds geen goede be-

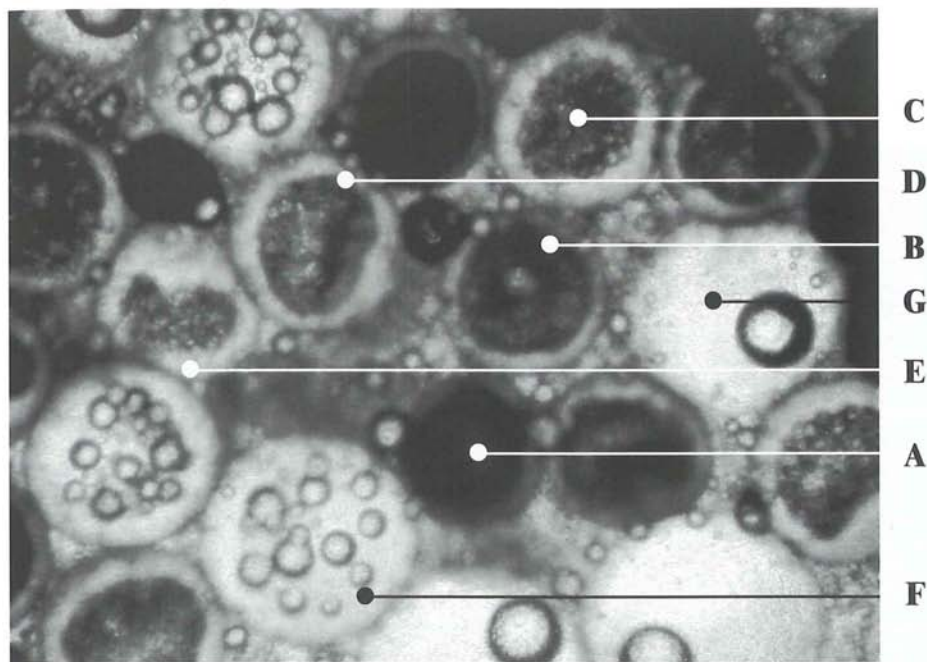
schrijving van de oocyt-ontwikkeling in de laatste fase van de maturatie.

Zestig vrouwelijke en 200 mannelijke schieralen afkomstig uit het Grevelingen meer (van de gebroeders Bout) werden middels hormoon-injecties tot maturatie gebracht volgens het protocol dat Ohta (et al., 1996) succesvol toepaste op de Japanse paling. In de laatste fase van de maturatie werd de toename van het lichaamsgewicht van ieder van de vrouwelijke dieren

wekelijks gevolgd als ruwe indicatie van afrijping. Hierbij werd een biopsiemonster genomen van de gonaden. Bij het bereiken van volledige rijpheid werd de laatste fase van maturatie gestimuleerd en ovulatie geïnduceerd. Ook bij deze handelingen werden oocytten onttrokken.

Oocytontwikkeling en fertiliteitsindex

Bestudering van oocytten uit individuele tijdsreeksen heeft een beschrijving opgeleverd van zeven opvolgende stadia van oo-

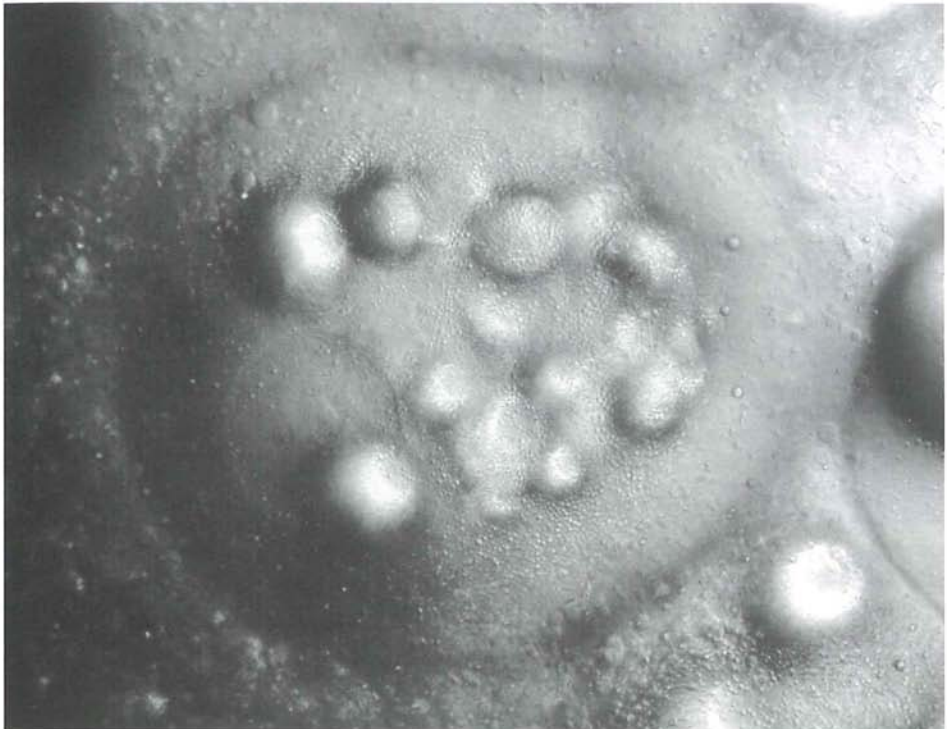


Een oocyt sample via biopsie verkregen uit het ovarium van een afgerijpte vrouwelijke paling, waarin diverse ontwikkelingsstadia zijn vertegenwoordigd. De opnamen zijn gemaakt aan vers materiaal mbv fase-contrast microscopie. a) niet transparante oocyt, b) stadium I: half transparant, volledig gevuld met vetdruppels en een centraal gelegen nucleus, c) stadium II: volledig transparant met gecentreerde vetdruppels, d) stadium III: oocyt met migrerende nucleus, e) stadium IV: kern gelegen aan de periferie, halfcirkelvormige rangschikking van vetdruppels, f) stadium VI: minder dan 20 vetdruppels resteren nog door vetfusie en meiose 2 is voltooid en g) stadium VII: nog slechts een enkele vetdruppel, de oocyt is overrijp.

cyt-maturatie. In foto 1 worden de belangrijkste stadia getoond. Deze worden gekenmerkt door: het transparant worden, toename van de eidiameter, fusie van vetdruppeltjes, migratie van de kern naar de periferie (Foto 2), en het verdwijnen van de kern. Aan de hand van deze stadia is een fertiliteitsindex vastgesteld. Door het percentage transparantie van de samples te vermenigvuldigen met het gemiddeld voorkomende stadium.

Van zes vrouwelijke palingen konden de eieren worden bevrucht. Dit blijkt uit het ontstaan van een beschermende eischaal, en door het ontstaan van celdelingen. Eitjes van twee vrouwtjes ontwikkelden zich verder tot embryo's. Twee-en-dertig uur na de

bevruchting werden goed ontwikkelde embryo's geobserveerd (Foto3). Van 1 reeks werd het aantal embryo's geschat op 100 en van de tweede reeks op 1500. Deze embryo's bezaten een dooierzak met een centraal gelegen vetdruppel omgeven door eiwitmateriaal. Somieten waren goed waar te nemen door toepassing van fasecontrastmicroscopie. Een hartslag met een frequentie van 180 slagen per minuut werd geobserveerd. Zestig uur na bevruchting waren embryo's flink in grootte toegenomen en lagen gedraaid. Kopstructuren en een gepigmenteerde staart waren goed waar te nemen. In die fase vertoonden de embryo's heftige staartbewegingen, de eischaal was reeds gescheurd en aangenomen mag worden dat de larven in dat stadium uitko-



Een oocyte via biopsie verkregen uit het ovarium van een afgerijpte vrouwelijke paling. Stadium III: Kernmigratie ofwel Germinal Vesicle Migration. (fase contrast microscopie).

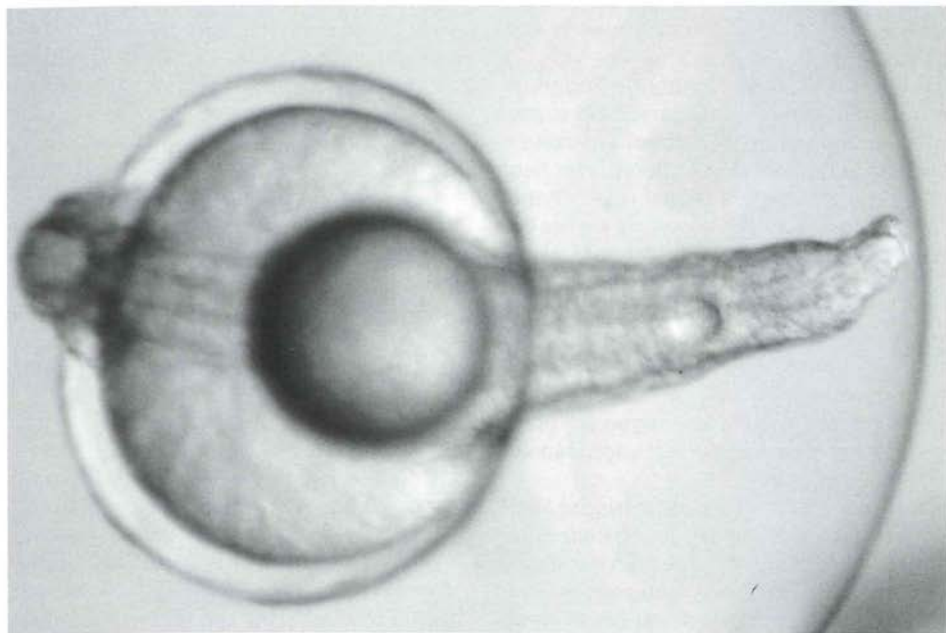
men. Eiwitmateriaal in de dooierzak was in deze laatste fase volledig geconsumeerd en alleen de vetdruppel restte. In de grote groep van enkele honderdduizenden eieren kunnen wellicht enkele uitgekomen larven over het hoofd zijn gezien. Echter duidelijk is dat het succes-percentages nog laag is.

Bij de bovenbeschreven reproductie-experimenten hebben wij het Ohta-protocol gevolgd. Het blijkt echter dat er grote verschillen zijn in de reactie van de dieren op de hormoonbehandeling. Dit laatste is recentelijk ook vastgesteld door S.Dufour ten aanzien van het vitellogeen gehalte in het bloed van behandelde vrouwtjes paling. Het is dus waarschijnlijk dat de 'timing' van de laatste stap in de maturatie en de ovulatie voor alle dieren verschillend moet zijn. Tot nu zijn alle gepubliceerde maturatie-

protocollen gebaseerd op 'trial and error'. De nieuwe methode om aan de hand van de oocyt-ontwikkeling het juiste moment van afrijping en ovulatie te bepalen biedt een nieuw perspectief. Wij denken dat wij door de dieren individueel te volgen we voor elk dier het juiste moment kunnen vinden aan de hand van de fertiliteits-index.

Referenties

- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K. (1996). Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20_-dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139: 291-301.
- Pedersen, B.H. (2003). Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224: 323-338.



Embryo, 32 uur na bevruchting