

Samenvatting proefschrift 'Gesimuleerde migratie van de Europese aal (*Anguilla anguilla* L.)'

Vincent van Ginneken, Biologie, Universiteit Leiden, Promotor: Prof.Dr.Johan Verreth, Visteelt en Visserij, Universteit Wageningen, Co-promotor: Dr. Guido van den Thillart, Biologie, Universiteit Leiden. Promotiedatum: 14 Juni 13.30 Aula Landbouwwuniversiteit Wageningen.

Over de laatste 25 jaar is de populatie van de Europese paling in zo'n sterke mate afgenomen dat er grote zorgen zijn ontstaan om zijn voortbestaan op de lange termijn. Populaties van volwassen dieren begonnen af te nemen vanaf 1940 in grote delen van het Europees continent, terwijl het recruitment (aanwas via golven van glasaal) vanaf de jaren tachtig van de vorige eeuw zijn afgenomen. Tot op heden zijn er geen signalen van herstel en dit fenomeen kan gesignaleerd worden over het hele levensgebied van de Europese paling. Een parallele ontwikkeling kan worden geobserveerd voor de nauw verwante Amerikaanse paling (*A.rostrata*) en de Japanse paling (*A.japonica*).

De Europese paling (*Anguilla anguilla* L.) is een katadrome vissoort met zijn paaigebieden duizenden kilometers ver in de oceaan. Een belangrijk aspect van de reproductie van de Europese paling is de enorme afstand die zij moeten zwemmen om hun paaigebieden te bereiken. Na het verlaten van de Europese kusten moeten ze 5000-6000 km zwemmen om de Sargasso Zee te bereiken. Van deze zee wordt aangenomen dat hier de paaigronden liggen. Om deze enorme afstand af te leggen moeten de alen 6 maanden lang bij een 0,5 lichaamslengte per seconde zwemmen wat een indrukwekkende lange termijn zweminspanning vereist. Daarnaast zijn grote energievoorraden gekoppeld met lage energiekosten voor transport vereist. Hieraan kan de hypothese worden toegevoegd dat lange termijn zwemmen een belangrijke voorwaarde kan zijn voor reproductie. In dit proefschrift hebben we de capaciteit van

Europese paling onderzocht om over deze lange afstand te migreren. De zoetwaterfase van groei, geslachtsdifferentiatie en 'schier' worden, (een preadaptatie aan zijn oceanische fase en terugkeer naar zijn paaigronden) voor de migratie bepaalt uiteindelijk de kwaliteit van de ouderdieren. Deze periode in het zoete water kan een periode van 5-50 jaar beslaan. De kwaliteit van de 'habitat' (woon omgeving) en de kwaliteit van habitatfactoren zoals voedseltekort (wat leidt tot verminderde vetvoorraden), virussen en giftige stoffen (zoals PCB's = polychloorbiphenyls) is belangrijk voor de zwemcapaciteit van de ouderdieren en de kwaliteit van de geslachtsproducten. In dit proefschrift zullen we de factoren die de levenscyclus van de Europese paling beschrijven, dit om meer begrip te krijgen voor de mogelijke factoren die betrokken zijn bij de afname van palingpopulaties en die betrokken zijn bij de reproductie.

De zoetwaterfase: oriëntatie op het aardmagnetisch veld

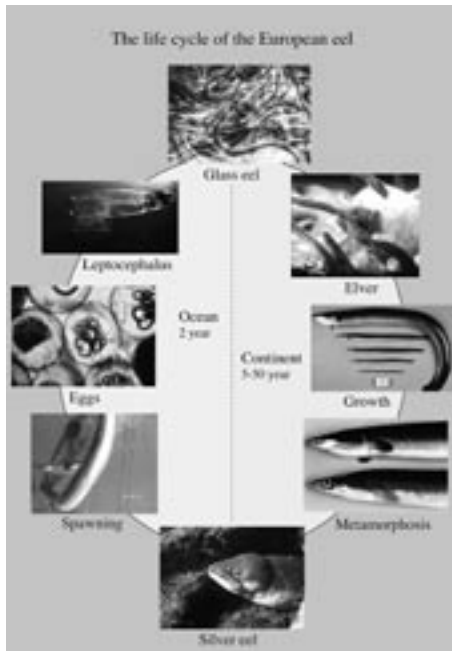
In de literatuur zijn verschillende publicaties te vinden van veldstudies in bassins, telemetrische studies, studies met sterke kunstmatige magnetische velden die de natuurlijke voorkeursrichting van paling overtreffen, die aangeven dat oriëntatie wordt bewerkstelligd door kenmerken van het aardmagnetisch veld. Ook de observatie van magnetische substanties in de schedel en botten van palingen ondersteunt in sterke mate deze zienswijze. Wij bestudeerden de circadiane (24-uurs) en maandelijkse activiteit, het distributiepatroon, en oriëntatie op het aardmagnetisch veld van niet-schiere (niet-migrerende) vrouwelijke paling op een zoetwatervijver door middel van microchips geïmplanteerd in hun spieren. Detectoren voor de microchips werden gemonteerd in buizen en deze worden op de vijver geplaatst om vast te stellen of palingen zich oriënteerden ten opzichte van

het aardmagnetisch veld. Gebaseerd op de frequentie van het bezoeken van de buizen (corresponderend met het zoekgedrag naar een schuilplaats), gaven de data aan dat de aanwezigheid van de palingen in de buizen geleidelijk afnam gedurende de duur van de studie. Daarnaast zagen we meer activiteit gedurende de nacht in de eerste paar maanden. Er was een seizoenscomponent in het oriëntatie mechanisme met een significant lagere voorkeurscomponent in de zomer in vergelijking tot de herfstperiode, de periode waarbij de migratie op gang komt. Een voorkeurspositie voor buizen georiënteerd in de Zuidzuidwestelijk richting (de richting van de Sargasso Zee) in de herfst suggereert een oriëntatie gebaseerd op het aardmagnetisch veld.

De zoetwaterfase: het schier worden

De overgang van niet-schiere (niet-migrerende) naar schieraal (migrerende) wordt schier worden ('silvering') genoemd, en dit proces neemt plaats kort voor migratie. De mechanismen betrokken bij het in gang zetten van het schier worden zijn grotendeels onbekend. Ook een duidelijke beschrijving van de verschillende stadia, die de metamorfose karakteriseren ontbreken. Tot zeer recent werd het proces van schier worden voornamelijk gebaseerd op morfologische kenmerken en er werd een opsplitsing gemaakt in twee gescheiden stadia: 'schier' en 'niet-schier'. Deze classificatie nam geen mogelijk voorbereidingsstadium in ogenschouw.

Wij beschrijven hormonale profielen van Europese paling tijdens het proces van 'schier'-worden. Wij hebben ook gebruik gemaakt in de beschrijving van fysiologische kenmerken als lichaamssamenstelling en bloeds substraten. Deze transformatie gebeurt in associatie met hoge hormonale concentraties van testosteron (T), oestradiol (E2), cortisol maar niet met hoge concentraties van schildklierhormonen (TH) en groeihormoon (GH) welke een maximale



activiteit hebben in het voorjaar en een minimale activiteit in de zomer en de herfst. In tegenstelling hiermee worden in de herfst hoge concentraties van cortisol gevonden welke een grote rol spelen in de mobilisatie van metabole energie van lichaamsvoorraden, naar migratie activiteit en de groei van de gonade. Gebaseerd op een statistische methode genaamd 'Principal Component Analysis' met fysiologische morfologische en endocrinologische parameters kan er geconcludeerd worden dat de overgang naar schier worden gradueel is en dat de paling door verschillende stadia gaat.

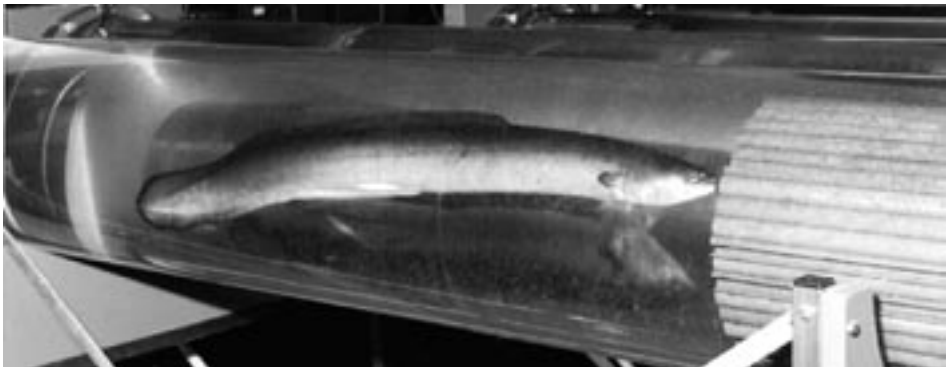
***De zoetwaterfase:
de rol van schildklierhormoon***

Bij amfibieën zoals kikkers wordt de metamorfose van larve naar volwassen dier gereguleerd door schildklierhormoon. Voor andere koudbloedigen zoals vissen, wordt ook een rol voor schildklierhormoon aangenomen zoals bij zalmen gedurende de 'parr-smolt' transformatie. In onze studie van de jaarcyclus hebben we echter waargenomen dat de concentratie van schildklierhormonen erg hoog is in het voorjaar maar niet in de herfst tijdens het proces van 'schier' worden (silvering). Gebaseerd op dit gegeven kunnen we mogelijk concluderen dat de schildklierhormonen mogelijk niet betrokken zijn bij het schier worden. Een andere mogelijkheid is dat hun actie calorigeen is

en betrokken bij de controle van de stofwisselingsnelheid zoals bij vogels en zoogdieren het geval is. Wij hebben met directe calorimetrie de totale warmte productie gemeten in vrij bewegende palingen met verschillende thyroid status met een nauwkeurigheid van 0,1 mW. Hyperthyroidisme werd geïnitieerd door injectie van T3 en T4 hormonen terwijl het effect van hypothyroidisme bestudeerd werd door de dieren bloot te stellen aan phenylthiourem. De resultaten laten voor het eerst op het niveau van het organisme zien, gebruik makend van de techniek van directe calorimetrie, dat nog de totale warmte productie nog de totale zuurstofconsumptie in palingen beïnvloed wordt door hyperthyroidisme. Hieruit kunnen we concluderen dat een stimulerend effect van thyroid hormonen op de thermogene stofwisselingsnelheid niet optreedt bij een koudbloedige soort als de Europese paling.

Het nieuwe type Blazka zwemtunnel

Wij hebben een Blazka zwemtunnel van 127 liter ontwikkeld met een totale lengte van 2,0 meter en een lengte van het zwemcompartiment van 1,15 meter om de lange duur zwemcapaciteit van schieralen met een lengte van 80-90 centimeter te testen. Wij hebben met een zeer nauwkeurig Laser-Doppler systeem de homogeniteit van de stroming in de zwemtunnels aangetoond.



De eigenlijke doorstroming werd gemeten op verschillende dwarsdoorsneden van de tunnel en op verschillende plaatsen van de wand. Een lineaire verband werd gevonden tussen het aantal omwentelingen per minuut van de motor en gemeten water snelheid. Deze lineariteit bleef bestaan tot 0,9 meter per seconde. De waterdoorstroming vanaf 40 mm van de wand tot het midden van de tunnel bleef binnen een paar procent van de ingestelde waarde. Hieruit kunnen we concluderen dat vissen met een dwarsdoorsnede van > 40 mm niet in de grensvlaklaag kunnen zwemmen. De palingen gebruikt in de verschillende zwemstudies hadden nog meer ruimte nodig vanwege de amplitude van hun staartslag. Daarnaast observeerden wij dat de kop van de palingen tussen de 50 en 100 mm van de wand af bleef.

Migratie

Lange termijn zwemexperimenten over 5.500 km met virusnegatieve Europese paling tonen aan dat palingen erg efficiënte zwemmers zijn. Palingen hebben een vetpercentage van 10-28%, met een gemiddelde van 20% en dit is overduidelijk hun belangrijkste energievoorraad. 60% van de totale vetreserve van schieraal wordt gebruikt om te zwemmen. Dieren met een vetpercentage lager dan 13% vet zijn niet in staat om 6000 km te zwemmen. In vergelijking tot andere vissoorten zoals de zalm zijn palingen erg efficiënte zwemmers met energie kosten voor migratie die 4-6 keer lager liggen dan die voor salmoniden. De 'Kosten voor Transport' (Cost of Transportation, COT) voor een paling zijn $0,68 \text{ kJ.kg}^{-1}.\text{km}^{-1}$ terwijl de COT voor forel $2,73 \text{ kJ.kg}^{-1}.\text{km}^{-1}$ is. Het geschatte vetverbruik van een volwassen paling om de Atlantische Oceaan over te steken (6000 km) bedraagt 29% van zijn vetvoorraden. Dit correspondeert met 58 gram vet per kg paling terwijl dit voor zalm 300 gram per kg zou bedragen. Op dit moment wordt niet begrepen

waarom palingen zulke efficiënte zwemmers zijn. In toekomstige studies moet de hydrodynamica verklaren hoe 'undulatory' zwemmen (karakteristiek voor anguilliform = palingachtige beweging) werkt. Hiervoor moeten twee vragen worden beantwoord: a) het spierontwerp: welke spierrangschikking is het meest geschikt om het lichaam te buigen?, b) hoe zet de vis spiervermogen om in zwemvermogen?

Effecten van omgevingsfactoren op de migratie

Wereldwijd zijn palingpopulaties in sterke mate afgenomen over de laatste twee decennia van de vorige eeuw. De exacte oorzaak voor dit fenomeen is onbekend maar mogelijke oorzaken zijn: PCB's, virussen en verminderde vetvoorraden. Om te onderzoeken of deze factoren een effect hebben op de zwemprestatie en -capaciteit van Europese paling werden zwemexperimenten uitgevoerd in 22 grote 127 liter zwemtunnels in het laboratorium.

PCB's

De resultaten van onze studie gaven 5 belangrijke observaties. Ten eerste verliezen aan PCB blootgestelde dieren minder gewicht en bezitten ze een lagere glucose- en cortisolspiegel (alleen zwemmende dieren) in vergelijking tot de niet blootgestelde Controle dieren. Ten tweede, zijn PCB concentraties op een vetbasis 2,7 keer zo hoog in zwemmende dieren in vergelijking tot rustende dieren. Ten derde heeft PCB-blootstelling het effect dat het zuurstofverbruik van de zwemmende, aan PCB blootgestelde dieren vanaf 400 km (18 dagen) significant verlaagd is en dit effect neemt in de tijd toe. De Kosten van Transport (COT, $[\text{mg O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{km}^{-1}]$) zijn significant lager in PCB-blootgestelde dieren vanaf 100 km tot en met 800 km. Daarnaast was de standaard metabole snelheid (basaalstofwisseling) twee dagen gemeten na de laatste zwemactiviteit significant verlaagd in PCB-blootgestelde

dieren. Ten vierde is de milt vergroot in de PCB-blootgestelde zwemdieren maar niet in de PCB-blootgestelde controle dieren. Ten vijfde kunnen schieralen makkelijk rusten in zeewater en zwemactiviteit volbrengen in zoetwater maar niet bij een combinatie van deze twee stressfactoren. Plasma-pH, ionen niveau's (natrium en kalium), plasma melkzuur, hemoglobine en hematocriet waren niet beïnvloed door PCB- blootstelling. We concluderen dat PCB-blootstelling interfereert met de energiestofwisseling van schieralen in zeewater waarbij deze schijnt te interfereren met de cortisolcontrole over de koolhydraat stofwisseling. Dit effect was groter in zwemmende dan in rustende dieren.

Virussen

EVEX ('Eel-Virus-European-X'), HVA (Herpesvirus anguillae) and EVE (Eel Virus European) werden waargenomen in wilde en gekweekte Europese palingen (*Anguilla anguilla*) uit Nederland, EVEX en EVE in gekweekte paling uit Italië, en EVEX in wilde paling uit Marokko. EVEX werd ook geïsoleerd uit wilde paling uit Nieuw Zeeland (*A. dieffenbachii*). Jonge aal (*A. anguilla*) verzameld uit palingkwekerijen in Nederland was voornamelijk geïnfecteerd met HVA. Wijd verspreide infectie van de palingpopulatie met bijvoorbeeld EVEX virus kan het gevolg zijn van ongelimiteerd palingtransport tussen de verschillende continenten. Daarnaast toonden wij in grote zwemtunnels gedurende een gesimuleerde migratie aan dat paling geïnfecteerd met EVEX bloedingen op het lichaam en bloedarmoede kreeg, en stierf na 1000-1500 km. In tegenstelling tot dit gegeven zwommen virus-negatieve dieren 5.500 km, de geschatte afstand van de Europese kust tot de Sargasso Zee. De virus-positieve dieren vertoonden een daling in hematocriet gerelateerd tot de zwem afstand. De virus-negatieve dieren vertoonden een iets verhoogd hematocrietgehalte.

De geobserveerde veranderingen in plasma lactaatdehydrogenase (LDH), Totaal Eiwit en Aspartaat aminotransferase (AST) zijn indicatief voor een ernstige virusinfectie. Het is dus mogelijk dat virusinfecties en verontreiniging met PCB's kunnen bijdragen aan een afname van de palingpopulaties.

Reproductie

Wij observeerden dat in hormoon-behandelde Europese paling afpaaigedrag kon worden geïnduceerd Dit gedrag van de alen was collectief en vond simultaan plaats corresponderend met afpaaigedrag in een groep. Dit is de eerste keer dat afpaaigedrag is geobserveerd en geregistreerd voor palingen en het opent nieuwe perspectieven voor onderzoek in de nabije toekomst. Een ander belangrijk onderzoeksresultaat met betrekking tot de reproductie van deze soort was de observatie dat in drie jaar oude (juvenile) Europese palingen welke 173 dagen zwommen in Blazka zwemtunnels, waarbij ze een afstand van 5500 km overbrugden, aan het eind van de rit de maturatieparameters 11-ketotestosteron, hypofyseeniveaus van lutheïnizing hormoon (LH) en plasmaniveaus van oestradiol hoger waren in de zwemgroep (zij het niet significant) in vergelijking tot de restgroep. Daarentegen was de eidiameter significant groter in de zwemgroep in vergelijking tot de restgroep. Gebaseerd op deze observaties concluderen wij dat een periode van langdurig zwemmen een fysiologische stimulus kan zijn voor het in gang zetten van de maturatie. Experimenten in toekomstige studies met volwassen virusvrije dieren moeten in de toekomst definitief aangeven of langdurig zwemmen een natuurlijke prikkel is voor de gonadenmaturatie van de Europese paling.

Panmixia, moleculair werk

De hypothese dat alle Europese palingen naar de Sargasso Zee zwemmen voor reproductie en bestaan uit één enkele

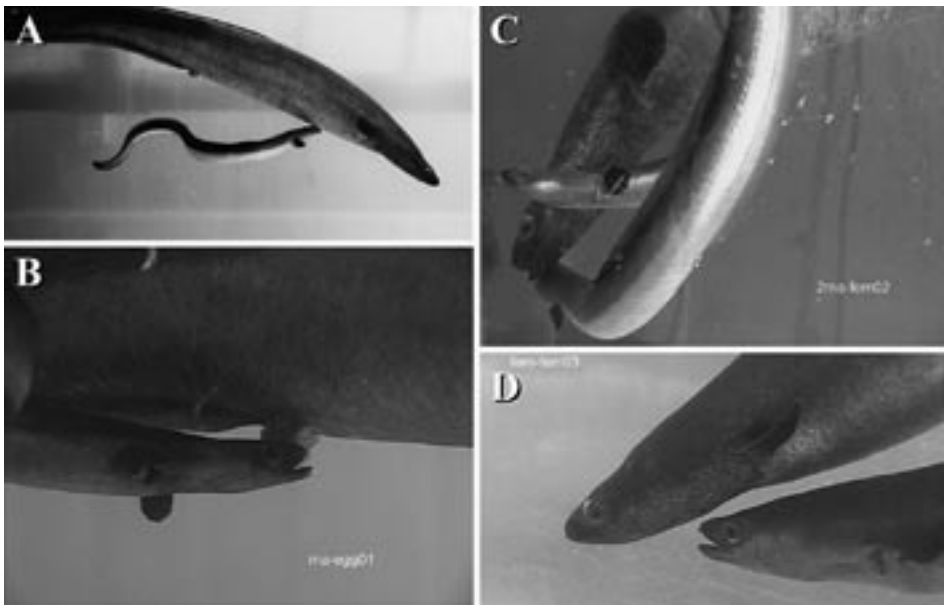
random afpaaiende populatie, de zogenaamde 'panmixia' theorie, was tot voor kort wijd geaccepteerd. Echter, gebaseerd op observaties uit het veld, morfologische parameters en moleculaire studies zijn er indicaties dat de claim van de Deense Bioloog Johannes Schmidt uit 1923 van een unieke afpaaiplaats in de Sargasso Zee voor de Europese palingpopulatie een te sterke bewering kan zijn. Recente moleculaire studies aan de Europese paling (een overzicht van het werk van de verschillende auteurs is gegeven in dit overzichtsartikel) zijn indicatief voor een genetisch mozaïek bestaande uit verschillende geïsoleerde groepen. Dit gegeven leidt tot een verwerping van de panmixia theorie. Echter, de laatste uitgebreide genetische studie van onze Belgische collega's van de Universiteit van Leuven laat zien dat de geografische component van de genetische structuur gebrek vertoont aan temporele (in de tijd bezien) stabiliteit hetgeen benadrukt dat er temporele replicatie (herhaling) moet

plaatsvinden bij het bestuderen van deze zich ver verspreidende mariene soort. Panmixia kan in de toekomst toch nog tot de mogelijkheden behoren.

Bedreigde diersoort

Gedurende de laatste twee decennia van de vorige eeuw zijn palingpopulaties afgenomen met 90-99%, mogelijk ten gevolge van een synergie tussen menselijke activiteiten en oceaan fluctuaties, en deze afname heeft ertoe geleid dat het een bedreigde diersoort is. Drie miljoen jaren slaagde de katadrome Europese paling erin om te overleven en zijn karakteristieke levensstijl te handhaven. Deze levensstijl kan worden gekarakteriseerd door afpaaigebieden in de oceaan, (mogelijk de Sargasso Zee) en zijn juveniele levensfase van groei en sekse differentiatie in het zoete water van het Europese continent. De volgende aanbevelingen kunnen worden gedaan om een totaal uitsterven van deze soort te voorkomen:

a) Het verminderen van de visserijdruk



- door in de binnenlandse wateren natuurreservaten in te stellen om deze territorium-gebonden vissoort te beschermen.
- b) Het ontwikkelen van vroege waarschuwingssystemen bij waterkrachtcentrales om een groot deel van de migrerende schieraal tijdens het migratieseizoen in de herfst te beschermen.
 - c) PCB verontreiniging moet in alle grote watersystemen bemeaten worden en gebieden met lage PCB niveaus moeten worden beschermd.
 - d) Om het verspreiden van parasieten en virussen te voorkomen moeten internationale wereldwijde instructies voor sanitaire standaardisering voor het transport van aquatische organismen geïntroduceerd worden.
 - e) Onderzoek naar kunstmatige voortplanting van de paling moet uitgebreid worden door zich te concentreren op toedieningstechnieken van hormonen. Er moet meer onderzoek worden gedaan naar het natuurlijk afpaaigedrag van paling en de rol van feromonen. En verder moet het onderzoek zich concentreren op het begrijpen van de natuurlijke stimulus voor reproductie.
 - f) Moleculaire technieken om cellen in te bouwen met genen (gentherapie) die maturatiehormonen produceren zijn een uitdaging.

Gezien de recente catastrofale afname van palingpopulaties over heel Europa, is er niet veel tijd gegeven om deze vragen te beantwoorden en om het onvermijdelijk verlies van deze mysterieuze soort te voorkomen.

Conclusies: We kunnen concluderen dat Europese palingen erg efficiënte zwemmers zijn en dat gezonde, goed gevoede palingen in staat zijn de Sargasso Zee te bereiken waarbij ze genoeg energiereserves behouden voor reproductie. Lange afstand zwemmen van palingen en de mogelijkheid

te migreren worden negatief beïnvloed door infecties met virussen zoals EVEX. Ook PCB's, welke uitgescheiden worden uit de gebruikte vetvoorraden na migratie, kunnen het energieverbruik en de stofwisseling negatief beïnvloeden. Dit kan resulteren in een verlaagd zuurstofverbruik, lagere glucose- en cortisolniveaus, een verminderde omzetting van aminozuren in de gluconeogenese en een verlaagde Basaal Stofwisselingssnelheid (SMR). Ofschoon we verschillende woonomgeving (habitat) factoren gevonden hebben die kunnen interfereren met de fitness en lange afstand zwemmen zoals virussen en PCB's en die ten grondslag kunnen liggen aan de sterke afname van de palingpopulaties hebben we toch twee positieve resultaten gevonden die in de toekomst belangrijk kunnen zijn voor de reproductie van de paling onder kunstmatige condities. Allereerst hebben we gevonden dat zwemmen het proces van schier worden en een vroege maturatie in gang zet, Ten tweede hebben we voor de eerste keer bij hormoon-behandelde paling geobserveerd dat er afpaaigedrag in een groep optrad wat collectief en simultaan optredend was.

Dankbetuiging:

“Dit proefschrift werd gesponsord door STW project No. LBI66.4199 (Ir. J. van Rijsingen, Royaal BV, was sponsor in de gebruikerscommissie), de Europese Commissie (EELREP project QLRT-2000-01836), het PCB experiment door EUROCHLOR (project officer drs. C. de Rooij), het vijverexperiment in Beesd door het Leids Universitair Fonds (LUF, 312/15-6-98/X,vT) en de GRATAMA-stichting (Harlingen, grant no. 9815). De vijver in Beesd werd ter beschikking gesteld door de Organisatie ter Verbetering van de Binnenvisserij (Nieuwegein, Directeur Dr. Lex Raat), de maturatie-experimenten door een subsidie van de OVB en LNV.