



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Energetic requirements and environmental constraints of reproductive migration and maturation of European silver eel (*Anguilla anguilla* L.)

Palstra, Arjan Peter

Citation

Palstra, A. P. (2006, October 24). *Energetic requirements and environmental constraints of reproductive migration and maturation of European silver eel (*Anguilla anguilla* L.)*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4926>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4926>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse Samenvatting

Energievereisten en omgevingsbeperkingen van reproductieve migratie en maturatie van de Europese schieraal (*Anguilla anguilla* L.)

In menig deel van de wereld wordt de aal sinds de oudheid beschouwd als culinaire delicatessen. Daardoor dient de aal een commercieel belang en fungeert het als een doel voor visserij en aquacultuur. Aal aquacultuur is nog altijd volledig afhankelijk van het wilde bestand omdat het kweken in gevangenschap nog niet succesvol is. De wilde populatie vertoont echter een sterke afname over de laatste 25 jaar zonder enig teken van herstel. Een brede diversiteit aan factoren wordt verondersteld betrokken te zijn die ofwel de kwantiteit (habitatreductie, heruitzetting, overbevissing en migratie barrières) dan wel de kwaliteit (vervuiling, introductie van ziekten) bepalen van de jaarlijkse hoeveelheid paaiers. Een grote behoefte bestaat aan het nemen van management en beschermingsmaatregelen maar de kennis van de biologie van de aal vertoont hiervoor nog te grote hiaten. Het gebrek aan kennis betreft vooral de mysterieuze oceanische fase in de intrigerende levenscyclus van deze katadrome vissoort.

De Europese aal *Anguilla anguilla* is één van de 15 soorten 'zoetwater' alen die allen een oceanische fase gemeen hebben, gekenmerkt door een lange afstandsmigratie en een eenmalige semelpare paai. Europese alen worden geboren als *Leptocephalus* larven in de Sargasso Zee. Na een reis van 7 tot 9 maanden arriveren ze op het Europees continentaal plat en vertonen een eerste metamorfose naar glasaaltjes. Als onvolwassen rode alen verblijven ze in de estuaria of migreren stroomopwaarts in de Europese zoete binnenwateren waar ze een lang voedingsstadium kennen. Na het bereiken van een bepaalde leeftijd en grootte stoppen de rode alen met eten en ondergaan een tweede metamorfose: het schierwordings of 'silvering' proces dat ze doet veranderen in schieraal.

Het schier worden is een complex fenomeen dat bestaat uit externe en interne modificaties. Pankhurst (1982) ontwikkelde een index op basis van ooggrootte en lichaamslengte om onderscheid te maken tussen rode en schiere alen. Recentelijk heeft Durif (et al., 2005) additioneel onderscheid gemaakt in intermediaire fasen en heeft een 'silver' index voorgesteld op basis van ooggrootte, lengte van de pectorale (borst)vinnen, lichaamslengte en lichaamsgewicht. Nog altijd voltrekt zich een multidisciplinaire wetenschappelijke discussie of schier worden nu een echte metamorfose betreft, ofwel een duidelijke en abrupte verandering in ontwikkeling van vorm of structuur van een dier, of een meer continu proces dat gecorreleerd is aan de mate van maturatie of rijping. We observeerden dat de ogen tijdens kunstmatig geïnduceerde maturatie groter bleven worden op een lineaire manier wat een meer continu proces indiceert.

Pas na het completeren van het proces verlaten de schiere alen het continent vooral tussen september en november en verdwijnen in de oceaan. Ze migreren waarschijnlijk op diepten variërend tussen de 200 en 600 meter gedurende 5 tot 6 maanden naar de paaiplaatsen in de Sargasso (overzicht door Tesch & Rohlf, 2003), waar de paai plaats heeft in maart en april (McCleave et al., 1987; McCleave, 2003). Hoogstwaarschijnlijk worden

de effectief reproducerende alen gekenmerkt door een excellente zwem fitness. Een zeer efficiënte energie huishouding is vereist, niet alleen om te voldoen aan de migratie, maar ook om de eieren te voorzien van voldoende vetvoorraden. Als de schiere alen vertrekken zijn ze nog altijd slechts in prepuberale staat terwijl ze na 6 maanden zwemmen volledig gematureerd en afgerijpt dienen te zijn en klaar zijn om te reproduceren.

Informatie over migratie, maturatie en de interactie tussen beiden ontbreekt. Het begrijpen van de natuurlijke impulsen tot maturatie zou kunnen leiden tot meer succesvolle reproductieprotocollen. Het voornaamste doel van dit proefschrift is om de energievereisten voor reproductieve migratie en maturatie vast te stellen en om de rol te bepalen van omgevingsfactoren zoals de invloed van de zwemblaasparasiet *Anguillicola crassus* op de zwemprestatie en de invloed van dioxineachtige contaminanten op embryonale ontwikkeling.

Biomechanische efficiëntie van anguilliform zwemmen wordt als laag beschouwd. Experimentele studies van de zwemefficiëntie van grote migratoire schieralen zijn zeer beperkt. Zeer recentelijk vond onze groep dat alen 4 tot 6 keer zo efficiënt zwemmen als niet-aalachtige vissen en ongeveer 60 gram vet per kilogram aal gebruiken voor migratie (van Ginneken et al., 2005b). Prestaties worden verondersteld te variëren tussen individuele schieralen, binnen en tussen locaties, voornamelijk bepaald door de trofische kwaliteit van het habitat. Om de zwemprestatie te vergelijken tussen kweekalen en wilde alen van diverse locaties en onder verschillende condities hebben we in **hoofdstuk 2** een zwemfitness test ontwikkeld. Zwemtesten met 101 vrouwelijke alen met een gewicht van 400 – 1500 gram werden uitgevoerd in 22 zwemtunnels van het Blazka-type, geplaatst in een geklimatiseerde cel, in zoet of zout water bij een temperatuur van 18°C. Zwemsnelheid en uithoudingsvermogen werden getest bij snelheden van 0.5 tot 1 meter per seconde (m/s) met stappen van 0.1 m/s verhoging. Omdat beide testen soortgelijke resultaten hadden kon de zwemsnelheidstest, die slechts een dag in beslag neemt, worden gebruikt om uithoudingsvermogen te voorspellen. Alen vertoonden het vermogen om de metabolische balans te stabiliseren en te handhaven. Hoewel ze niet snel zwommen, zwommen ze erg efficiënt. Alen bereikten maximale aerobe zwemsnelheden van 0.81 tot 1.24 lichaamslengten per seconde (body-lengths per second, BL/s). Bij optimale zwemsnelheden van 0.58-0.68 m/s, of 0.74-1.02 BL/s, werden erg lage transportkosten (cost of transport, COT) gevonden van 37-50 mg O₂/kg/km. Energiekosten tijdens zwemmen waren 20% hoger in zout water dan in zoet water. Wilde alen presteerden slechter dan kweekalen. Over het algemeen kunnen we concluderen dat schieralen kunnen worden beschouwd als steêrs of 'cruisers'; specialisten op de lange afstand. Als vrouwelijke schieralen continu zouden 'cruisen' bij optimale zwemsnelheden, dan zouden ze minder dan 3.5 maanden onderweg zijn naar de Sargasso in plaats van de algemeen aangenomen 6 maanden zwemmen.

Er is gesuggereerd dat infectie met de zwemblaasparasiet *Anguillicola crassus* een van de oorzaken zou zijn van het wereldwijde instorten van de aal populaties. Deze nematode werd 20 tot 30 jaar geleden geïntroduceerd vanuit Azië en parasiteerde binnen korte tijd diverse aalsoorten in verschillende geografische gebieden van de wereld. Effecten zijn energieverlies vanwege de sanguivore activiteiten van de parasiet en mechanische schade van de zwemblaaswand door de migratoire activiteiten van de parasiet. Deze effecten worden verondersteld de paaimigratie van de Europese aal te beletten. In **hoofdstuk 3** hebben we de effecten van de infectie op de zwemprestatie onderzocht. We hypotheseerden dat de parasitaire sanguivore activiteiten het uithoudingsvermogen zouden

reduceren terwijl de mechanische schade het drijfvermogen zou inperken. Tachtig alen die leidden aan variërende maten van infectie werden geïntroduceerd in de zwemtunnels en onderworpen aan de zwemfitnesstest zoals beschreven in hoofdstuk 2. De zuurstofconsumptie werd gemeten van deze grote geïnfecteerde schieralen bij diverse zwemsnelheden en stelde ons in staat de zwemefficiënties te bepalen. We vonden dat vooral schieralen doel van infectie zijn. Geïnfecteerde alen hadden lagere 'cruise' snelheden en hogere transportkosten. Alen die niet waren geïnfecteerd maar wel zwemblaasschade vertoonden door voormalige infectie, vertoonden gelijke effecten en zelfs hogere transportkosten. Effecten lijken dus vooral geassocieerd te zijn met het niet functioneren van de zwemblaas en het resulterende verlies van drijfvermogen. Dit leidt tot de conclusie dat geïnfecteerde alen met beschadigde zwemblazen een verminderd succes hebben om de paigronden te bereiken. Gesimuleerde migratie testen hebben een snelle migratiemislukking bevestigd (<1,000-km). Deze studie heeft laten zien dat *A. crassus*-infectie het reproductieve potentieel van de aal zeer nadelig beïnvloed. Recente studies hebben een soortgelijke rol voor PCB verontreiniging (van Ginneken et al., submitted) en virus infectie (van Ginneken et al., 2004, 2005a) geïndiceerd. Daarom kunnen we concluderen dat het verlies van kwaliteit (zwemblaasparasiet, EVEX virus, PCBs ed) van toekomstige paaiers wel eens de belangrijkste factor achter het instorten van de wereldwijde aalpopulaties zou kunnen betekenen.

Omdat de Europese aal een van de meest extreme voorbeelden is van reproductieve 'homing', het terugkeren naar de geboortegronden om daar te reproduceren, is het een perfect model om de nauwelijks begrepen relatie tussen migratie en maturatie te onderzoeken. In **hoofdstuk 4** hebben we deze relatie onderzocht. We hypotheeserden dat zwemmen betrokken is in metamorfose (schierwording) en ontheffing van reproductieve onderdrukking en onderdrukte vetmobilisatie. In deze studie hebben we 55 oude (>13 jaar) alen van het Balaton meer (Hongarije) laten zwemmen voor een duur van 1, 2 en 6 weken. Veranderingen in morfometrie en eicelontwikkeling werden bepaald om de schierheids- en maturatie status vast te stellen. We vonden dat zwemmen schierwording stimuleert, aangegeven door het vergroten van de ogen reeds binnen 2 weken zwemmen. Bovendien vonden we dat zwemmen de maturatie stimuleert. Al binnen een week zwemmen was de gonadenmassa toegenomen, eicellen veranderden naar een verder ontwikkelingsstadium, ze werden groter en grote hoeveelheden vet werden geïncorporeerd tijdens een uitgebreide 'lipid droplet stage'; het eicelontwikkelingsstadium gedurende welke vetinbouw plaats heeft. Synchronisatie van eicelontwikkeling had plaats in en tussen alen. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor 'vitellogenese'; het eicelontwikkelingsstadium gedurende welke proteïne-inbouw plaats heeft en welke volgt op de 'lipid droplet stage'. We kunnen concluderen dat zwemmen een belangrijke rol speelt in ontheffing van reproductieve onderdrukking en mobilisatie van vet naar de eicellen. Vitellogenese en finale maturatie waren niet geïnduceerd en zouden in het veld alleen kunnen plaats hebben in de buurt of op de paigronden zelf. Voorbehandeling door zwemmen in protocollen die ervoor dienen de aal of andere migratoire soorten in gevangenschap te kweken zouden de sensitiviteit voor hormonale behandeling, de fertiliteit en het reproductieve succes kunnen doen toenemen.

In **hoofdstuk 5** hebben we de Europese aal artificieel gematureerd met de bestaande protocollen voor de Japanse aal. In de Japanse aal is het moment van stimulatie van finale maturatie en ovulatie voornamelijk gebaseerd op een gewichtstoename die is gerelateerd aan de hydratatierepons van de eicellen die, in de Europese aal, onregelmatig

is. In tegenstelling tot de Japanse aal laat de Europese aal een veel bredere individuele variabiliteit zien en een veel langzamere respons op hormonale stimulatie. We vonden geen verschil in responstijd tussen vrouwtjes van het Grevelingen meer en de Loire wat suggereert dat deze respons typisch is voor de Europese aal. In deze studie is de eicelontwikkeling bij wilde Europese schieralen gevolgd tijdens de finale maturatie. We beschrijven 7 ontwikkelingsstadia die gebaseerd zijn op 6 parameters: transparantie, eiceldiameter, positie en zichtbaarheid van de kern, en diameter en aantal vet druppels. Gezamenlijk geven deze parameters een unidirectionele verandering weer van onvolwassen tot overrijpe eieren. Het ontwikkelingsstadium van de gonaden werd bepaald in biopsies van 23 vrouwelijke aalen, waarvan er 14 ovuleerden en werden afgestreken en waarvan 9 aalen eieren gaven die bevrucht konden worden. Eicellen matureerden asynchroon, maar dit lijkt een artefact aangezien de fertiliteit kelderde met elke nieuwe generatie eicellen. Omdat de timing van ovulatie cruciaal is voor de fertiliteit van de eieren, zou onze eicelontwikkelingsindex kunnen resulteren in succesvollere maturatie protocollen.

Tijdens de eerste 3 uur na bevruchting (hours post fertilisation h.p.f.) lieten de meeste eieren in alle 'batches' (legsels) meroblastische klieving zien tot het 8 cellen stadium. Eibatches van 2 vrouwtjes resulteerden in de ontwikkeling van ongeveer 1600 embryo's na 31-32 h.p.f. Embryo's van één vrouwtje (n=100) bleven ontwikkelen en bewogen energie met de gepigmenteerde staart 58-60 h.p.f. ter indicatie van het moment van uitkomen. Op dit moment vertoonden ze een dooierzak waarin het proteïne-deel was verdwenen en alleen de vetdruppel bleef over. Embryonale ontwikkeling continueerde tot 100 h.p.f. toen de laatste embryo's stierven. Uitkomen is niet waargenomen.

Embryo's van een tweede succesvol vrouwtje (n=1500) lieten ernstige oedeemvorming zien van de dooierzak, een gedeformeerde kopregio en afwezigheid van de hartslag. Zulke embryonale afwijkingen zijn typisch voor PCB-blootgestelde eieren en indiceren een negatieve interferentie met dioxineachtige contaminanten. Daarom meetten we in **hoofdstuk 6** de niveaus van dioxineachtige contaminanten in de ouders en correleerden deze aan overleving en ontwikkeling van embryo's. De totale dioxineachtige toxische potentie van de individuele gonaden batches werd bepaald als TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine) – equivalenten (TEQs) met behulp van een in vitro reporter gen assay. De waargenomen verschillen in ontwikkeling en overleving lieten een significant negatieve correlatie zien met TEQ niveaus in de gonaden, zelfs bij niveaus die ver onder het maximaal toelaatbare niveau voor visconsumptie liggen van 4 ng TEQ/kg vis. De duidelijk inverse relatie tussen TEQ niveau en overlevingsperiode van de bevruchte eieren suggereert sterk dat de huidige niveaus van dioxineachtige stoffen de reproductie van de Europese aal ernstig bedreigen. De piek van dioxineachtige PCB's in het milieu en de afname van aal vallen wereldwijd samen dat verder suggereert dat, naast andere bedreigingen, deze contaminanten significant hebben bijgedragen aan het huidige instorten van de aalpopulaties.

Enkele pogingen werden gedaan om de energiekosten voor migratie en maturatie van de Europese aal te schatten. Opgeslagen energievoorraden van schiere aalen, vooral als vet in de spieren en onder de huid zouden moeten voldoen voor succesvolle reproductie. In **hoofdstuk 7** hebben we daarom grote schiere kweekalen en wilde aalen onderworpen aan gesimuleerde migratie bij verschillende snelheden en we hebben de transportkosten (cost of transport COT) berekend uit zuurstofconsumptiewaarden. We vonden dat kweekalen zwommen bij COT waarden van 34 ± 5 mg O₂/kg/km gedurende $2,173 \pm 305$ km migratie.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Wilde schieralen zwommen bij hogere COT waarden van 52 ± 12 mg O₂/kg/km gedurende $1,232 \pm 172$ km migratie. COT waarden waren vrij constant en gelijk aan waarden die tijdens korte 2 uur zwemtesten werden gevonden. Wilde schieralen spenderen 78 ± 4 g fat /kg, of 39% van de vetvoorraden bij gemiddelde vetpercentages van 20%, aan complete 5500 km migratie. Deze relatieve lage waarden bevestigen de hoge zwemefficiëntie. Bovendien hebben we wilde schieralen van dezelfde lichting kunstmatig tot maturatie gebracht door hormonale injecties om zo de hoeveelheid vet te bepalen die werd ingebouwd in de eicellen. We vonden dat alen 57 ± 22 g fat /kg, of 28% van de vetvoorraden, in de eicellen inbouwen wat positief is gerelateerd aan leeftijd. Dus totaal wordt 67% van de vetvoorraden gespendeerd aan aalpaai. Vetvereisten van gemiddelde schieralen van habitats met hoge trofische kwaliteit limiteren dus niet de reproductie.

Op basis hiervan kunnen we concluderen dat:

- 1) Schieralen zwemmen niet snel maar hoogst efficiënt bij alle snelheden zoals we vonden met een ontwikkelde zwemfitness test. Transportkosten zijn erg laag en blijven constant gedurende gesimuleerde migratie. Schieralen zijn daardoor lange afstandspecialisten of 'cruisers'. Vooral schieralen zijn het doel van *A. crassus* infectie en geïnfecteerde alen hebben een lagere cruise snelheid en hogere transportkosten. De parasieten veroorzaken schade aan de zwemblaaswand die resulteert in het verlies van drijfvermogen en waarschijnlijk migratiemislukking. Zwemmen onthefte de aal van onderdrukte reproductie en stimuleert mobilisatie van vet naar de eicellen.
- 2) Vetten worden gemobiliseerd voor 39% als brandstof en voor 28% ingebouwd in de eicellen. Leeftijd is een determinant voor succesvolle reproductie aangezien oudere alen a) gevoeliger zijn voor zwemmen geïnduceerde eicelontwikkeling, b) een toegenomen capaciteit vertonen om vet van de spieren in de eicellen in te bouwen wat een hogere eicel kwaliteit bepaalt en c) gevoeliger zijn voor hormonale stimulatie.
- 3) De timing van ovulatie kan worden verbeterd en de fertiliteit worden verhoogd door de ontwikkelde eicelontwikkelingsindex toe te passen. We zijn in staat geweest vele keren eibatches te bevruchten en hebben embryo's gekweekt tot 4 dagen na bevruchting. Verschillen in embryonale ontwikkeling en overleving vertoonden een negatieve correlatie met niveaus van dioxineachtige contaminanten, reeds bij lage niveaus.

In het afsluitende **hoofdstuk 8** worden, volgend op de samenvatting, aanbevelingen ter bescherming en restauratie van aalpopulaties gesuggereerd op basis van het onderzoek zoals gepresenteerd in dit proefschrift en in breder EU verband. Deze betreffen met name waarborging van de kwaliteit van de schieraal: 1) Het monitoren van de productie aan hoog kwalitatieve migratoire schieraal in elke EU lidstaat met als doel het reproductieve potentieel van de Europese aal vast te stellen, 2) Het beschermen van hydrosystemen die aanzienlijke proporties van deze hoog kwalitatieve migratoire schieralen produceren, 3) Het monitoren van dioxineachtige contaminatie in migratoire schieralen van alle belangrijke hydrosystemen en het beschermen van migratoire schieralen van gebieden met lage niveaus. Actie moet worden ondernomen om maatregelen ter reductie van deze niveaus te ondersteunen, 4) Het monitoren van virussen en zwemblaasparasieten in migratoire schieralen van alle belangrijke hydrosystemen en het beschermen van migratoire schieralen met lage parasiet niveaus van virus vrije gebieden, 5) Het verlenen van doorgang aan migratoire schieralen, vrij van visserij en barrières.

Mogelijk is het echter laat of zelfs te laat voor dit soort maatregelen. Daarom dient onderzoek naar de kweek van aal in gevangenschap op korte termijn sterk gestimuleerd te worden. Het onderzoek zoals gepresenteerd in dit proefschrift en in breder EU verband biedt hiervoor diverse handvaten om tot succesvolle kunstmatige reproductie te komen. Deze betreffen selectiecriteria (leeftijd, lengte, gewicht, conditie factor, silver index, vetpercentage, PCB-niveau), het verhogen van gevoeligheid (zwemmen), het verbeteren van timing van ovulatie (eicelontwikkelingsindex, feromonen) en het ontwikkelen van nieuwe stressvrije technieken (hormoon producerende cellen, GnRH implantaten, gentransplantatie).