

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20977> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Burgerhout, Erik

**Title:** Tools and triggers for eel reproduction

**Issue Date:** 2013-06-18

# **Samenvatting**



Al eeuwen hebben ‘zoetwater’ palingen of alen (*Anguilla* spp.) vele wetenschappers gefascineerd. Hun intrigerende levenscyclus bestaat onder andere uit een tweetal verschillende larvale stadia en een lange afstandsmigratie welke soms wel duizenden van kilometers beslaat (zelfs meer dan 6000 km voor de Europese paling, *A. anguilla*). De kweek van palingen is nog steeds afhankelijk van de invoer van glasaal, omdat palingen in gevangenschap niet op natuurlijke wijze matureren (afrijpen/volwassen worden). Sinds de jaren '80 van de vorige eeuw is de instroom van glasaal van een aantal palingsoorten sterk achteruit gegaan (Dekker et al., 2003) door onder andere overexploitatie, migratie barrières, parasieten en vervuiling (zie overzicht in van den Thillart & Dufour, 2009). Recentelijk is de Europese paling als bedreigde diersoort op de IUCN rode lijst geplaatst (Freyhoff & Kottelat, 2008). Daarom is er een urgente noodzaak tot kunstmatige reproductie. Kunstmatige reproductie zou namelijk een bijdrage kunnen leveren aan het herstel van de palingpopulatie door de visserijdruk op de wilde populatie te verminderen en daarmee een toekomstige duurzame paling aquacultuur mogelijk maken.

Aan het begin van de reproductieve migratie zijn palingen nog in een prematuur stadium. Voor de start van de migratie worden palingen ‘schier’ (schieraal); een proces dat waarschijnlijk is te vergelijken met puberteit (Aroua et al., 2005; Rousseau et al., 2009). Seksuele maturatie is geïnhibeerd doordat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) onvoldoende wordt afgegeven en doordat dopamine het synthetiseren en afgeven van luteïniserend hormoon (LH) blokkeert (Dufour et al., 1993, 2003, 2005; Vidal et al., 2004). Seksuele maturatie moet daarom plaatsvinden tijdens of na de reproductieve migratie. Op dit moment is de kunstmatige voortplanting van palingen alleen mogelijk door middel van wekelijkse hormoonbehandelingen waarbij de endogene inhibitie wordt omzeild.

In eerdere studies was gesuggereerd dat langeafstandzwemmen de dopaminerge inhibitie zou opheffen en daarbij maturatie zou induceren. Het lijkt erop dat langdurig zwemmen de eerste stadia van ei-ontwikkeling in vrouwtjes stimuleert (Palstra et al., 2007; van Ginneken et al., 2007), maar dat verdere ontwikkeling zoals vitellogenese blijft geblokkeerd (Palstra et al., 2008b; Palstra et al., 2010). In wilde schiere mannetjes palingen bleek de spermatogenese

gestimuleerd na het zwemmen van ca. 900 km (Palstra et al., 2008b). Op basis hiervan werd verondersteld dat het zwemmen van de complete afstand tot de Sargassozee (circa 6000 km) zou resulteren in volledige maturatie in mannetjes palingen. Om deze veronderstelling te testen hebben we eerst de zwemcapaciteit (i.e. optimale zwemsnelheid, kosten van transport) van gemeste schiere mannetjespalingen bepaald (**Hoofdstuk 2**). Tevens hebben we het groepsgewijs zwemmen van palingen bestudeerd. Voorgaande studies betreffende de zwemcapaciteit van palingen waren voornamelijk gericht op vrouwtjes (van Ginneken & van den Thillart, 2000; van Ginneken et al., 2005; Palstra et al., 2008a). Deze studies toonden aan dat vrouwtjes zeer efficiënte zwemmers zijn, zelfs 4-6 keer efficiënter dan regenboogforel. Gebaseerd op onze resultaten met betrekking tot de kosten van transport van schiere mannetjespalingen kunnen we concluderen dat mannetjes zelfs nog efficiënter kunnen zwemmen dan vrouwtjes (Tudorache, Burgerhout & van den Thillart, ongepubliceerde data). Dit is in tegenstelling tot de eerdere verwachting dat de veel kleinere mannetjes meer energie zouden verbruiken dan vrouwtjes. Daarnaast hebben we gevonden dat bij mannetjes die groepsgewijs zwommen de kosten van transport met nog eens 30% werden gereduceerd bij ieder geteste snelheid. We hebben tevens geobserveerd dat mannetjes tijdens groepsgewijs zwemmen een in-fase gesynchroniseerde zwemmodus prefereren, welke mogelijk een manier is om de energiekosten van het zwemmen te reduceren.

In **Hoofdstuk 3** werd de hypothese getest dat spermiatie zou optreden bij schiere mannetjespalingen na langdurig zwemmen. Gemeste schiere Europese mannetjespalingen werden blootgesteld aan zwemmen voor een maximum van 6 maanden, waarbij een totale afstand van 6670 km werd afgelegd. We hebben aangetoond dat er geen effect was van langeafstandswemmen op maturatie in mannetjes, wat in contrast is met een voorgaande studie (Palstra et al., 2008b). De laatste toonde een stimulerend effect van zwemmen aan in wilde schiere mannetjes, welke waren gevangen in brakwater tijdens de migratie. Data van de initiële controle van deze wilde mannetjes lieten een progressie in spermatogenese zien, wat aangeeft dat de maturatie al was geïnduceerd en dat de dopaminerge inhibitie al was opgeheven. Dit is nogal verschillend ten opzichte van de gemeste palingen die in onze studie zijn gebruikt. We hebben daarom

geconcludeerd dat zwemmen alleen niet voldoende is om maturatie te induceren in gemeste schiere mannetjespalingen.

Het gebruik van genomics is het afgelopen decennium sterk toegenomen. Fysiologische studies betreffende maturatie en reproductie van palingen zouden profijt kunnen hebben van genexpressie 'profiling'. Daarom hebben we een eerste versie van de DNA-volgorde van het palinggenoom samengesteld (**Hoofdstuk 4**). In dit hoofdstuk hebben we ons gericht op de Hox genen; genen welke coderen voor transcriptiefactoren die van belang zijn in het ontwikkelingspatroon van het bouwplan. We hebben laten zien dat, verschillend van andere teleost vissen, de paling volledig gedupliceerde Hox clusters heeft behouden. Deze gedupliceerde Hox clusters zijn voortgekomen uit de teleost-specifieke genoom duplicatie. We vonden door middel van RNA-seq transcriptoom analyse en *in situ* hybridisaties dat alle kopieën van de Hox genen tot expressie komen in embryo's (27 uur na fertilisatie). Deze schets van het genoom zal een perfecte referentie zijn voor toekomstige transcriptoom analyses binnen alle velden van de biologie.

Tijdens het maturatietraject van Europese vrouwtjespalingen reageert vaak meer dan 50% van de dieren niet op de hormonale behandeling (non-responders) welke ca. 3-6 maanden duurt (Pedersen, 2003, 2004; Palstra et al., 2005). Selectie van vrouwelijke broodstock voorafgaand aan of vroeg tijdens het maturatietraject zal de efficiëntie van kunstmatige reproductie verhogen. Omdat de respons gerelateerd is aan de initiële staat van het vrouwtje is het van belang om non-invasieve biomerkers te verkrijgen. Op basis van een eerdere studie (Minegishi et al., ongepubliceerde data) was de verwachting dat genen in de steroidogenese cascade en de seks-steroiden zelf mogelijke kandidaat merkers zijn. In **Hoofdstuk 5** hebben we een reproductie experiment uitgevoerd om specifieke biomerkers te identificeren, welke een indicatie van de respons van vrouwtjes geven. We hebben invasieve met minder-invasieve merkers gecorreleerd door gebruik van, respectievelijk, ovariumweefsel en bloedplasma. Voor het eerst is er gebruik gemaakt van een palingspecifieke microarray analyse, gebaseerd op het Europese palinggenoom (Henkel et al., 2012), om verschillen te analyseren in transcriptomen van ovariumweefsel tussen responders en non-responders na 4 wekelijkse injecties. Analyse van bloed toonde aan dat een verandering in bloedplasma niveaus van  $17\beta$ -oestradiol (E2) na 4 wekelijkse

injecties significant gecorreleerd was met de gonadosomatic index (GSI). We concludeerden dat de relatieve verandering in E2 plasma niveaus na 4 weken ten opzichte van de initiële waarden gebruikt kan worden als biomerker om met circa 80% zekerheid onderscheid te maken tussen responders en non-responders.

Aangezien het maturatietraject van vrouwtjes van de 'New Zealand short-finned eel' (*A. australis*) veel korter is dan dat van de Europese paling (respectievelijk 2-4 maanden (Lokman & Young, 2000) vs 3-6 maanden (Pedersen, 2003, 2004; Palstra et al., 2005)), zou hybridisatie tussen *A. anguilla* en een soort als *A. australis* een mogelijke optie zijn voor paling aquacultuur. In **Hoofdstuk 6** hebben we levensvatbare larven van *A. australis* geproduceerd tot 8 dagen post fertilisatie (dpf) en larven van een hybride soort tussen vrouwelijke *A. australis* en mannelijke *A. anguilla* tot 7 dpf. We hebben de eerste ontogenie beschreven van de 'short-finned eel' en de hybride soort. De productie van de hybride soort werd gevalideerd door middel van een specifiek verschil in de 18S rDNA genen tussen de twee soorten. Het bestuderen van de reproductie van nauw verwante soorten en de eerste ontogenie van de hybride soort zal verder inzicht geven in het mechanisme van de reproductie en daarbij mogelijk een hulpmiddel zijn voor het kweken van de Europese paling.

Vooralsnog zijn de standaardprotocollen voor maturatie en reproductie van palingen gebaseerd op wekelijkse injecties met hypofyse extracten of gezuiverde gonadotropines. Deze wekelijkse behandelingen resulteren in hanteerstress en tijdelijke hormoonpieken in het bloedplasma (Sato et al., 2000), welke negatieve effecten hebben op gametogenese en daarbij de kwaliteit van eieren en larven. Naar verwachting zullen zogenaamde 'slow-release' systemen bovengenoemde problemen oplossen door het reduceren van de hanteerstress en fysiologische stress. Echter de huidig verkrijgbare 'slow-release' systemen vereisen chirurgische ingrepen en grote hoeveelheden gezuiverde hormonen (Kagawa et al., 2009). We hebben een 'slow-release' systeem ontwikkeld op basis van hormoon producerende viscellen. **Hoofdstuk 7** laat een 'proof-of-principle' experiment zien waarin mannetjespalingen werden behandeld via een enkele injectie met humaan choriongonadotropine (hCG) producerende implantaten. hCG plasma niveaus waren detecteerbaar tot 14 dagen na de injectie. Het implantaat resulteerde in een significante toename van bloedplasma testosteron

niveaus en een verhoging van de oogindex. Deze resultaten toonden aan dat het cellulaire implantaat seksuele maturatie induceert in mannetjes palingen. Echter, de hormoonproductie van de implantaten moet worden geoptimaliseerd aangezien de behandeling niet resulteerde in volledige spermiatie.

Tot slot, **Hoofdstuk 8** biedt, naast de samenvatting van dit proefschrift, handvatten voor toekomstig onderzoek ter verbetering van de huidige protocollen voor kunstmatige reproductie van palingen. Essentieel is het verminderen dan wel volledig vervangen van de onnatuurlijke hormoonbehandelingen. Dit zou bewerkstelligd kunnen worden door het gebruik van 'slow release' systemen, zoals de celimplantaten, of door middel van het gebruik van natuurlijke prikkels. Kennis met betrekking tot de (neuro)-endocrinologische cascades tijdens de natuurlijke maturatie is van vitaal belang om inzicht te verkrijgen in het mechanisme betreffende de dopaminerge inhibitie, evenals het opheffen hiervan.



