

# Kunstmatige Reproductie van Europese Schieraal: Oocyt ontwikkeling tijdens finale maturatie

Arian Palstra, Edwin Cohen, Eugenia Clavero, Vincent van Ginneken, Guido van den Thillart

Integrative Zoology, Institute of Biology Leiden, the Netherlands

E-mail: [palstra@rulsfb.leidenuniv.nl](mailto:palstra@rulsfb.leidenuniv.nl)

<http://www.fishbiology.net/silvereel.html>

## INTRODUCTIE

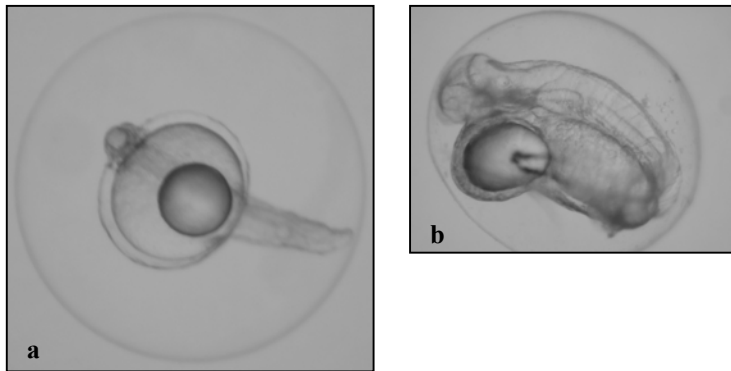
Kunstmatige reproductie van de Japanse aal (*Anguilla japonica*) werd succesvol met toepassing van 17, 20  $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) voor het induceren van finale maturatie en ovulatie, resulterend in aanzienlijke bevruchtings- en hatchingpercentages (1). Pogingen om Europese aal (*Anguilla anguilla*) tot matureren aan te zetten zijn tot dusver niet succesvol geweest (2,3,4,5,6). We verwachten dat inductie van finale maturatie en ovulatie op een bepaald moment van oocyt maturatie cruciaal is voor hoge bevruchtings- en hatchingpercentages. Daarom hebben we de diverse oocyt stadia tijdens finale maturatie bepaald.

## MATERIAAL & METHODEN

Maturatie werd geïnduceerd van 151 mannelijke en 62 vrouwelijke Europese schieralen afkomstig uit het Grevelingen meer door wekelijks inspuiting van resp. Human Chorionic Gonadotropin (HCG, 125 IU) en Carp Pituitary Extract (CPE, 20 mg kg<sup>-1</sup>). Ovulatie werd geïnduceerd door injectie van DHP (2 mg kg<sup>-1</sup>). Tijdens finale maturatie werd geregeld ovarium biopsie gepleegd om cytologische oocyte veranderingen te bestuderen.

## RESULTATEN

Mannetjes begonnen met sperma afgifte na 7-9 injecties. Sperma van hoge motiliteit (80-90%) werd alleen verkregen na een booster dosis HCG van 1000 IU. 23 Vrouwjes matureerden na 12-25 injecties resulterend in gonadosomatische indices van 28-60. 14 Vrouwjes werden geïnduceerd te ovuleren waarvan 10 vrouwjes succesvol ovuleerden 13-14.5 uur na DHP injectie. Deze vrouwjes werden afgestreken en batches van 9 vrouwjes vertoonden vroege ontwikkelingsstadia. Batches van 2 vrouwjes resulteerden in ontwikkeling van resp. 1500 en 100 embryos (Fig 1). 58-60 uur na bevruchting vertoonden embryo's heftige staartbewegingen ten teken van hatching. 100 uur na bevruchting werden grotere, verder ontwikkelde embryo's geobserveerd die sterk leken op vroege larvae stadia. Hatching is niet geobserveerd.



**Figuur 1** a) Ontwikkelende embryo met hartslag 32 uur na bevruchting bij 20°C, en b) Late embryo die niet uit het ei kwam en stierf 100 uur na bevruchting.



**Figuur 2** Fusie van vetdruppels.

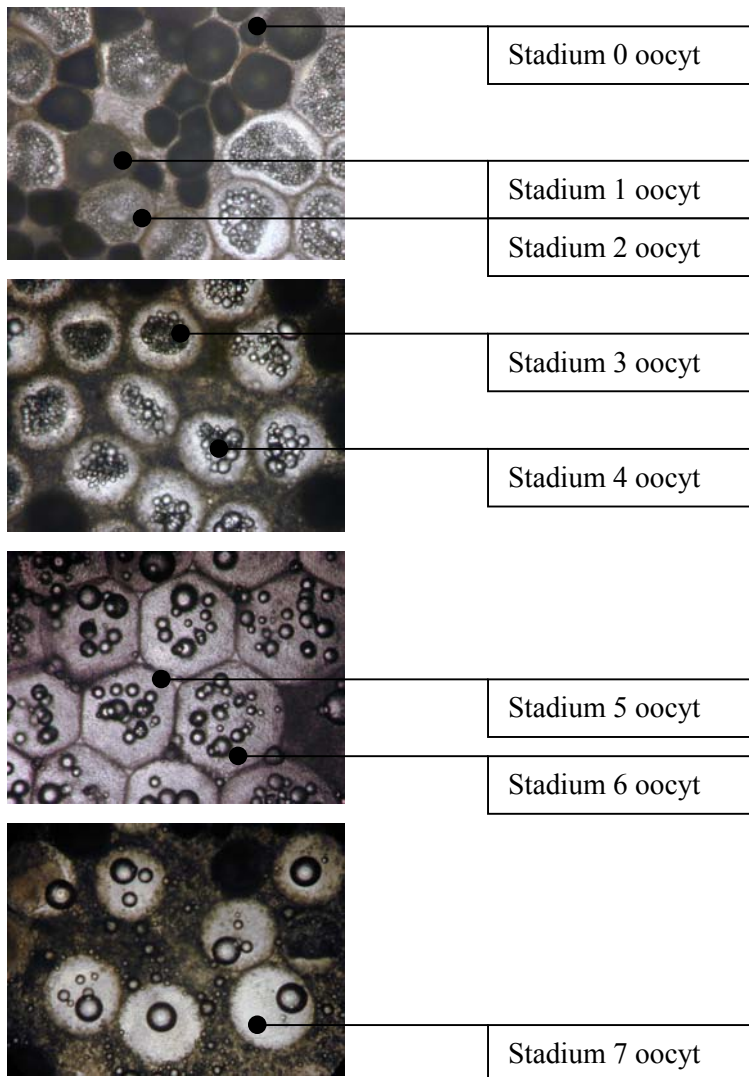
8 Typen oocyten, gevonden in elkaar opvolgende biopsies, zijn gekarakteriseerd op basis van 6 parameters: transparantie, diameter en het aantal vetdruppels (Figuur 2), positie en visibiliteit van de nucleus (Figuur 3), en diameter van de oocyte. Aangezien ontwikkeling werd getoond door opvolging van typen is er sprake van ontwikkelingsstadia (Figuur 4).

#### **Ontwikkelingsindex van aal oocyten na finale maturatie**

<b>Stadium 0</b>	niet transparante oocyten
<b>Stadium 1</b>	transparante oocyten met een centrale nucleus die juist zichtbaar wordt
<b>Stadium 2</b>	volledig transparante oocyt; vetdruppels liggen in klusters
<b>Stadium 3</b>	volledig transparante oocyt met een migrerende nucleus
<b>Stadium 4</b>	volledig transparante oocyt met perifere nucleus
<b>Stadium 5</b>	volledig transparante oocyt met perifere nucleus en slechts enkele grote vetdruppels
<b>Stadium 6</b>	volledig transparante oocyt, nucleus niet zichtbaar (Germinal Vescicle Breakdown GVBD); enkele vetdruppels
<b>Stadium 7</b>	volledig transparante oocyt, nucleus niet zichtbaar (Germinal Vescicle Breakdown GVBD); enkele vetdruppel



**Figuur 3** Migratie van de nucleus naar de periferie.



**Figuur 4** Oocyt ontwikkelingsstadia in opvolgende biopsies.

## DISCUSSIE & CONCLUSIES

- In tegenstelling tot Japanse aal vertoont de Europese aal grote individuele variabiliteit en een veel langzamere reactie op hormonale stimulatie (5). Het moment van stimulatie van finale maturatie en ovulatie bij Japanse aal dat gebaseerd is op gewichtstoename gerelateerd aan de hydratatie respons van oocyten is in de Europese aal niet betrouwbaar.
- Oocyten matureren asynchroon met opvolgende grotere generaties die oocyten grotere oocyten bevatten. Dit lijkt een artefact aangezien de fertiliteit daalt met elke nieuwe generatie (5). Aangezien timing van ovulatie cruciaal is voor de fertiliteit kan de ontwikkelde oocyt ontwikkelingsindex leiden tot succesvollere maturatie protocollen.
- In toekomstig onderzoek zullen we trachten kunstmatige stappen te vervangen door natuurlijke. Twee belangrijke veranderingen zijn in overweging. Ten eerste weten we dat zwemmen de maturatie induceert (7). Langdurige gesimuleerde migratie zou mogelijk dus hormonale behandeling ten dele kunnen vervangen. Ten tweede zou het bij elkaar voegen van mannetjes en vrouwtjes gedurende finale maturatie de ovulatie kunnen induceren. Chemische (feromonen) en tactiele stimulatie zou dus mogelijk DHP behandeling kunnen vervangen.

## ACKNOWLEDGEMENTS:

Dit onderzoek is gefinancierd middels EU contract EELREP no Q5RS-2001-01836.

## REFERENCES

- 1 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 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 139, 291-301.
- 2 Bezdenezhnykh, V.A., Prokhorcik, G.A., Petrikov, A.M., Petukov, V.B., Plyuta, M.V., 1983. Obtaining the larvae of European eel *Anguilla anguilla* L. (Pisces, Anguillidae), under experimental conditions. Dokl. Akad. Nauk SSSR 268 (5), 1264-1266 (In Russian).
- 3 Pedersen, B.H., 2003. Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. Aquaculture 224, 323-338.
- 4 Pedersen, B.H., 2004. Fertilisation of the eggs, rate of embryonic development and hatching followed induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. Aquaculture 237, 461-473.
- 5 Palstra, A.P., Cohen, E.G.H., Niemantsverdriet, P.R.W., van Ginneken, V.J.T., van den Thillart, G.E.E.J.M. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. Aquaculture, submitted.
- 6 Palstra, A., van Ginneken, V., van den Thillart, G., 2004. Artificial reproduction of European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). EAS Special Publication No 34.
- 7 Palstra, A.P., van Ginneken, V., van den Thillart, G. Swimming exercise induces maturation of European eel (*Anguilla anguilla* L.). to be submitted