



Voortplanting bij de zoetwaterkabeljauw

Jurgen Adriaen

Odisee
DE CO-HOGESCHOOL



AQUA-ERF

**ASSOCIATIE
KU LEUVEN**

Voorwoord

De zoetwaterkabeljauw of kwabaal (*Lota lota*) is de enige zoetwatervis uit de familie van de kabeljauwen. Door zijn culinair eigenschappen wordt deze vis aanzien als een kandidaat voor de commerciële kweek van consumptievis. Aqua-ERF onderzoekt deze vis al een paar jaar en wilde met het PWO-project LotaPLUS de ontbrekende soortspecifieke kennis en ervaring omtrent voortplanting van de zoetwaterkabeljauw opbouwen en overbrengen naar de commerciële kwekers in België. Deze handleiding is gebaseerd op literatuurstudie en onze ervaringen tijdens de voortplantingsproeven op het Aqua-ERF in kader van het LotaPLUS-project. Hoewel er bevruchte eitjes zijn bekomen, zijn deze niet verder ontwikkeld tot larven. De juiste redenen waarom dit niet gelukt is, zijn nog niet achterhaald daar verschillende factoren een rol kunnen gespeeld hebben: leeftijd van de vis, invloed van manipulaties, waterkwaliteit bij de broedieren en eieren,..... Meer informatie over deze proeven en het project kunt u terugvinden in het eindrapport van LotaPLUS.

Inhoudstafel

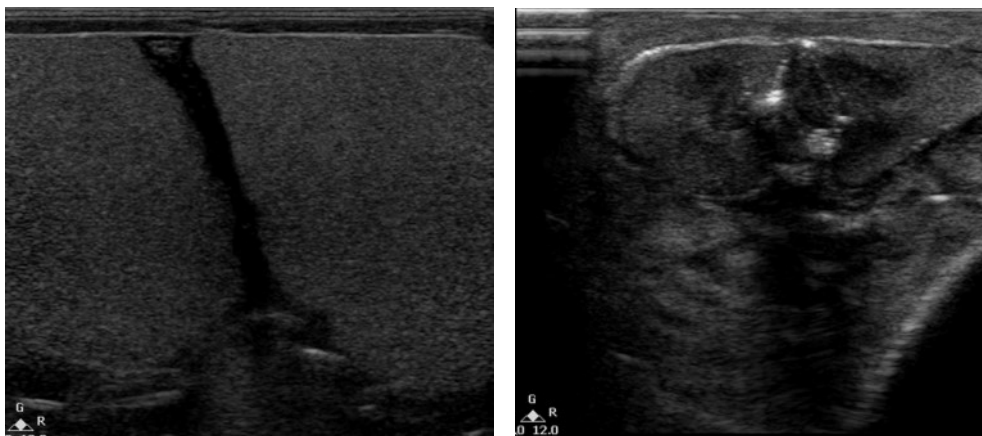
Voortplanting bij de zoetwaterkabeljauw.....	4
1. Broeddieren	4
2. Omgevingsfactoren	5
3. Voeding.....	6
4. Hormonale stimulatie	7
5. De bevruchting.....	7
6. Ei-incubatie.....	10
7. Ontluiking van de eitjes.....	11
Bijlage: Referenties	12

Voortplanting bij de zoetwaterkabeljauw

In de natuur zal de zoetwaterkabeljauw zich voortplanten bij koudere temperaturen. In de maanden voor de paaiperiode ontwikkelen de gameten (geslachtcellen) naargelang de omstandigheden (temperatuur, voeding, ...). De ontwikkeling van de gameten en de uiteindelijke zaadlozing bij het mannetje en ovulatie bij het vrouwtje wordt gereguleerd door de "hypothalamus-hypofyse-gonaden-as". Over deze as gebeuren veel interacties die beïnvloedt worden door verschillende factoren (temperatuur, licht, voeding, ...). Een plotse daling in de watertemperatuur zou een trigger kunnen zijn om de oöcyten in hun laatste ontwikkelingsfase te brengen waarna de eieren door het vrouwtje gelost worden (ovulatie) en in het water bevrucht worden door mannetjes. Dit spontaan paaien kan ook toegepast worden bij broeddieren in de kweektanks indien de omstandigheden optimaal worden nagebootst. Maar voor een kweker betekent dat hij minder controle heeft over de voortplanting. Indien er meerdere vrouwtjes op hetzelfde moment paaien, zal de kweker niet altijd weten van welk vrouwtje de afgelegde eitjes zijn. Er is ook de kans dat de mannetjes de eitjes niet bevruchten en zal de kweker een extra aanpassing moeten doen aan de tank om de afgegeven eitjes te beschermen tegen kannibalisme. De kweker zal ook een paar keer per dag de tanken moeten controleren om de eitjes op tijd eruit te halen en te verhuizen naar de incubatoren. Verder in deze handleiding wordt het bevruchtingsproces door middel van artificiële voortplanting beschreven.

1. Broeddieren

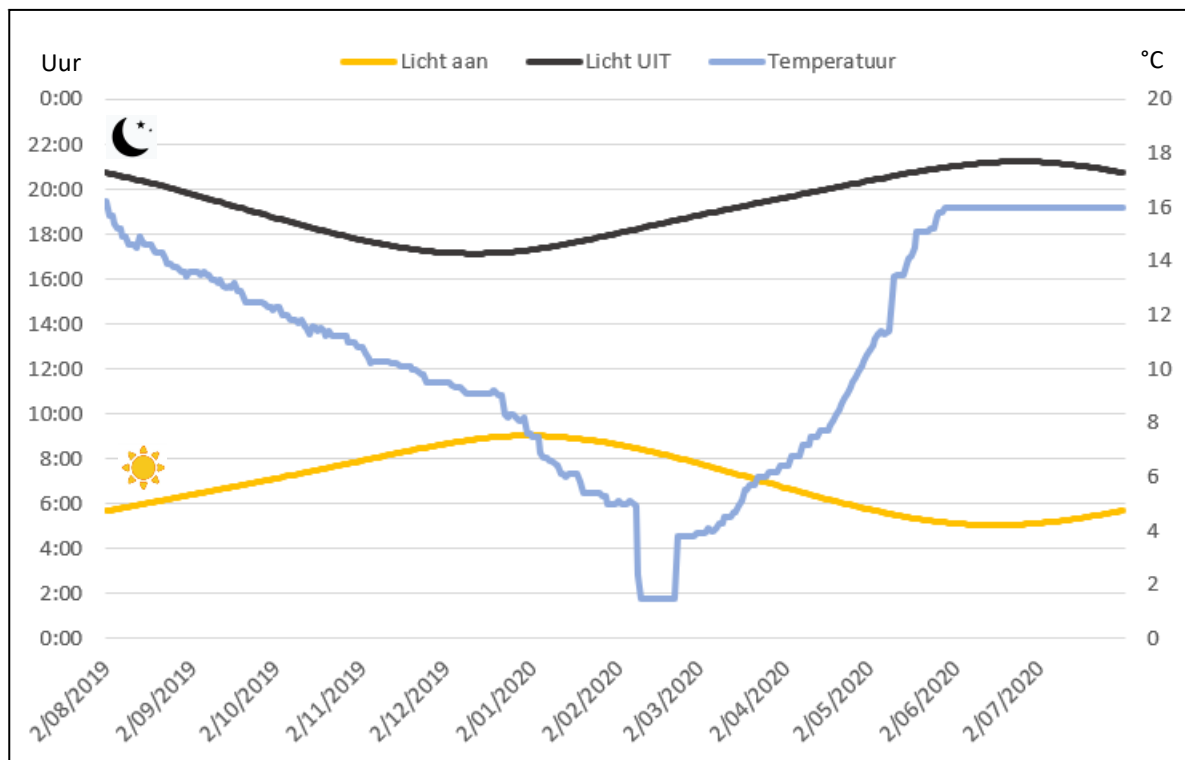
De ouderdieren waarmee op het Aqua-ERF gekweekt wordt zijn afkomstig van de Beierse regio. Er zijn nog andere genetische lijnen verbonden aan andere regio's waardoor er afwijkingen kunnen zijn tussen deze populaties onderling met betrekking tot de optimale voortplanting. In de literatuur (Schaefer et al. 2016) vinden we dat de geslachtsrijpheid voor vrouwtjes vanaf drie jaar kan zijn en dat dit bij mannelijke zoetwaterkabeljauwen al een jaar vroeger kan. In deze studie geven ze ook aan dat sommige vrouwtjes een paai-jaar kunnen overslaan. Bij de eerste voortplantingspoging op het Aqua-ERF hebben 67% van de 3-jarige vrouwtjes geovuleerd. De vrouwtjes en den mannetjes werden bij elkaar gehouden in tanken in een ratio van 1:1. Er zijn bij de zoetwaterkabeljauw geen uiterlijke geslachtskenmerken, maar via echografie (Figuur 1) kunnen ze van elkaar onderscheiden worden. Bij het vrouwtjes zien we twee grote grijze zones die de ovariën zijn. Bij het mannetje zien we twee irreguliere grijze zones die de testis weergeven. Er kan ook gewacht worden op de paaiperiode en zien welke gameten ze afgeven. Voor een betere opvolging van prestaties van de ouderdieren en voor verdere selectie kunnen de vissen gechipt worden.



Figuur 1: Ultrasoon beelden van vrouwelijke (links) en mannelijke (rechts) zoetwaterkabeljauw

2. De omgevingsfactoren

De geslachtsklieren of gonaden van de zoetwaterkabeljauw, testis bij de mannen en ovariën bij de vrouwtjes, beginnen in de herfst aan hun ontwikkeling voor de voortplanting. In artificiële omstandigheden moet er dan ook geprobeerd worden de optimale natuurlijke omstandigheden na te bootsen om de vissen succesvol te laten paaien. In de natuur zakt de watertemperatuur langzaam naar de winter toe, waarbij de zoetwaterkabeljauw pas zou paaien aan watertemperaturen onder de 4°C. Een plotse daling van de temperatuur in het winterseizoen zou de trigger zijn om de laatste fase van het ontwikkelingsproces van de oöcyten en het ovuleren in te leiden. Op basis van literatuur (Zarski et al. 2010, 2014, Kucharczyk et al. 2018) hebben we een temperatuursverloop uitgestippeld die we gebruiken als basisverloop, met de temperatuursdrop onder de 4°C in de begindagen van februari. Figuur 2 toont het basisverloop van de temperatuur en het licht gebruikt op het Aqua-ERF.



De ouderdieren worden op het Aqua-ERF om de twee dagen gevoederd aan een voedingsratio van 0.8% van hun lichaamsgewicht. Er wordt gestopt met voederen twee weken voor de geplande temperatuursdaling naar 1.5°C. Er wordt niet gevoederd tijdens de paaiingsmaand.

4. Hormonale stimulatie

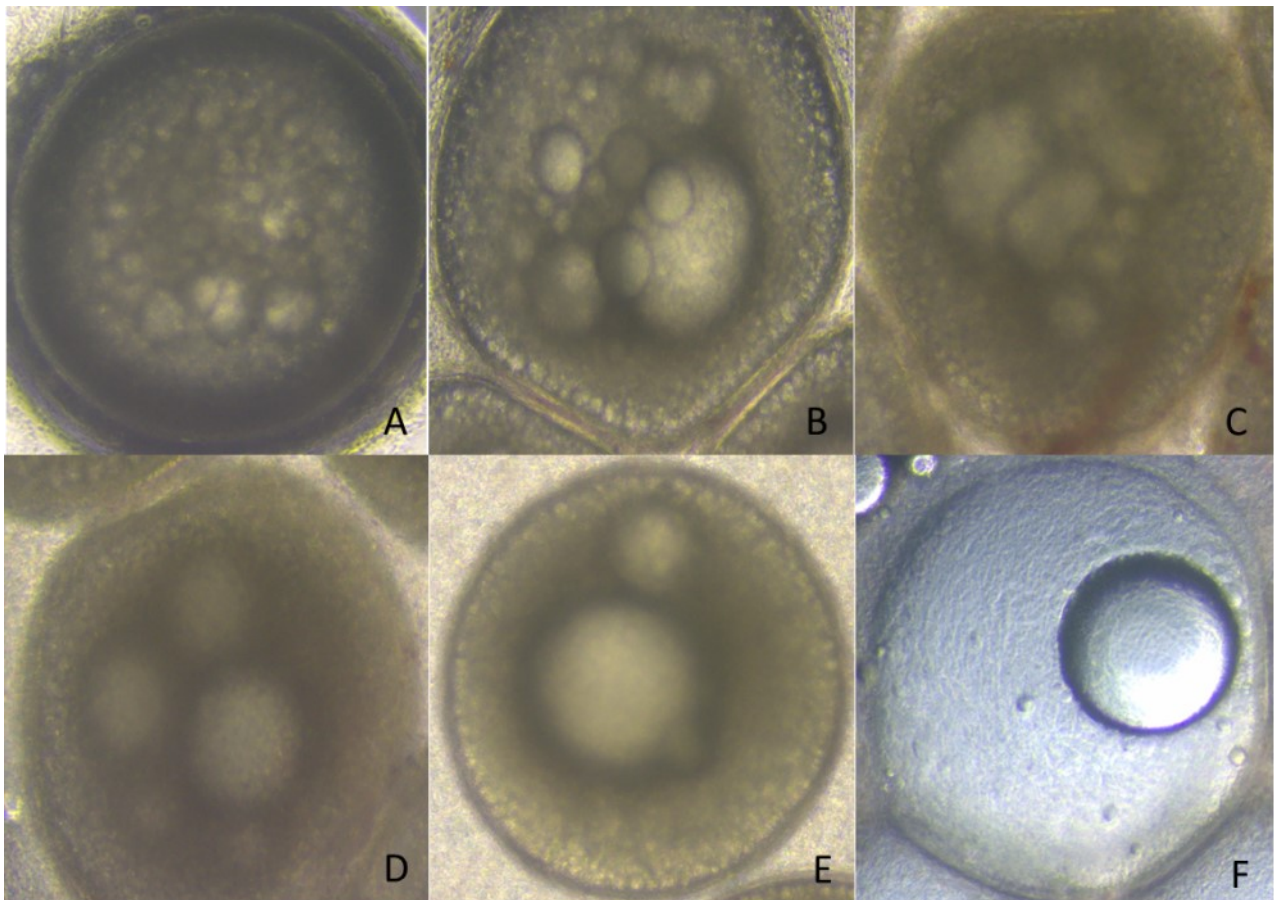
Bij vele gekweekte vissoorten wordt er gebruikt gemaakt van hormonale stimulaties om meer controle te krijgen over het paaien. Het gebruik van hormonen zou de ovulatie kunnen versnellen en eventueel meer voorspelbaar maken, waardoor de kweker zijn activiteiten beter kan organiseren. Hormonen zouden ook zorgen voor een betere synchronisatie van het paaien, waardoor de verschillende vissen hun eieren vooral op één moment afleggen. Dit vergemakkelijkt niet alleen het arbeidsbeheer tijdens de paaiperiodes, maar brengt ook een voordeel op ten opzichte van de latere larvale kweek, waar er minder grootte-verschillen aanwezig zullen zijn tussen de larven en daardoor de kans op kannibalisme vermindert (Palinska-zarska et al. 2013). Literatuur (Kucharczyk et al. 2018) en de onderzoeken van het LotaPLUS-project (zie eindrapport LotaPLUS) doen vermoeden dat dit ook bij de zoetwaterkabeljauw het geval is. Maar het gebruik van hormonen en de manipulaties voor het toedienen zouden eventueel een negatieve invloed kunnen hebben op de bevruchte eitjes en de verdere embryonale ontwikkeling. In onze proeven hebben we geen vergelijking kunnen maken door de snelle mortaliteit bij de bevruchte eitjes. Indien er over zou gegaan worden tot hormonale stimulatie, dan is het gebruik van sGnRHa (Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone analogue) aangeraden aan een dosis van 10µg per kilogram lichaamsgewicht van de vis. Het hormoon kan me vinden in poedervorm die dan wordt opgelost in een fysiologische zoutoplossing (0.9%NaCl) zodat het ingespoten kan worden bij de vis onder de buikvinnen. Voor deze manipulatie moet de vis verdoofd worden.

5. De bevruchting

Bij artificiële voortplanting gaan we proberen het vrouwtje af te strijken wanneer we denken dat het vrouwtje klaar is en deze eitjes bevruchten met afgestreken zaad. Op deze manier kunnen we ook bepaalde parameters en de verdere ontwikkeling van de eitjes terugkoppelen naar de vader- en moedervis en de eventuele behandelingen die ze hebben gekregen. Om te weten wanneer het vrouwtje klaar is om de eieren af te strijken kunnen de vissen elke dag vast genomen worden en op basis van het buikgevoel, en door eventueel druk uit te voeren op de buik, zien of er gameten vrijkomen. Dit kan tijdrovend zijn en stresserend voor de vissen als dit dagelijks over een langere periode moet uitgevoerd worden. Een andere methode is om de vrouwtjes te katheteren (Figuur 3). Hierbij wordt een katheter via de genitale opening binnen het vrouwtje gebracht tot in de ovariën, waar er een staal van de oöcyten wordt afgezogen. Onder een microscoop wordt het maturiteitsstadium van de bekomen oöcyten bepaald met behulp van ontwikkelingsschema gepubliceerd door Foltz et al. (2012). Moesten de oöcyten bijna volledig rijp zijn, dan kan er besloten worden om deze vis in de volgende dagen manueel te checken of een paar dagen later opnieuw te katheteren indien de oöcyten niet ver genoeg gevorderd zijn in de maturatie-stadia. Figuur 4 de toont evolutie van een paar oöcyten.



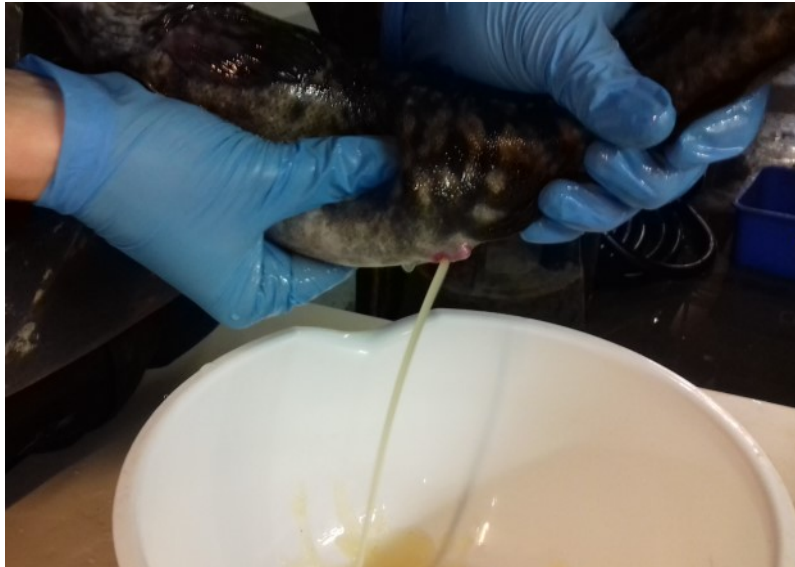
Figuur 3: Katheteren van een vrouwelijke zoetwaterkabeljauw



Figuur 4: Overzicht van de oocyte in verschillende stadium gaande van "nog geen finale maturatie stadium" (A) naar "afstrijkrijp stadium" (F)

Als er bij het manueel checken van het vrouwtje aantekeningen zijn dat ze klaar is om te paaien, dan wordt het vrouwtje in een aparte waterkuip gelegd met verdoving (15ml opgeloste benzocaine (20gr/500ml ethanol). Eens de vis goed verdoofd is wordt ze gewogen en op een natte doek gelegd waar haar buik afgekuist en de urineblaas eventueel geledigd worden. Urine of andere vuiligheden kunnen de afgestreeken eitjes verontreinigen en de bevruchting negatief beïnvloeden. De eitjes worden zo droog mogelijk gehouden daar contact met bepaalde vloeistoffen een reactie in het eitje al kan opstarten waardoor het in een latere fase niet meer bevrucht kan worden.

Om het vrouwtje af te strijken wordt de vis in een positie gehouden (Figuur 5) dat de genitale opening op het laagste punt staat en wordt met lichte druk aan de zijkanten van de buik een beweging richting de genitale opening uitgevoerd. Hierna zullen de rijpe eitjes uit het vrouwtje afgestreken en opgevangen worden in een gedesinfecteerde, droge kom. Deze beweging wordt rustig meermaals herhaald tot we zien dat er weinig of geen eitjes meer bekomen worden. Het vrouwtje wordt ter recuperatie in een kuip gestoken waar het water is aangerijkt met pure zuurstof. De kom met eitjes wordt afgewogen en daarna afgedekt in een koelkast bewaard terwijl we zaad van de mannetjes bekomen.



Figuur 5: Afstrijken van een vrouwelijke zoetwaterkabeljauw

Als er bij het manueel checken van het mannetje aantekeningen zijn dat hij klaar is om te paaien, dan wordt het mannetje in een aparte waterkuip gelegd met verdoving. Eens het mannetje verdoofd is, wordt hij op een natte doek gelegd waar zijn buik wordt afgekuist en de urineblaas eventueel geledigd wordt. Urine of andere vuiligheden kunnen het afgestreeken zaad verontreinigen en kunnen de zaadcellen al activeren en zo de bevruchting negatief beïnvloeden. De vis ligt op zijn rug en met lichte druk aan de zijkanten van de buik wordt een beweging richting de genitale opening uitgevoerd. Hierna zal het zaad uit de genitale opening komen, waar we het kunnen opzuigen met een spuit (Figuur 6). Deze beweging wordt rustig meermaals herhaald tot we genoeg zaad hebben voor de bevruchting van de eitjes, namelijk 10µl zaad per gram eitjes.



Figuur 6: Afstrijken van een mannelijke zoetwaterkabeljauw

Indien er niet genoeg zaad van één mannetje bekomen is, kan er zaad "gepooled" worden door van andere mannetjes ook zaad te bekomen en het dan samen te mengen. Dit betekent wel dat bepaalde paairesultaten en verdere productieparameters niet kunnen teruggekoppeld worden aan één mannetje. Na het afstrijken wordt het mannetje in een kuip gestoken waar het water is aangerijkt met pure zuurstof. De spuiten met zaadstalen worden op ijs gelegd en onder een microscoop geëvalueerd op percentage van bewegende zaadcellen en bewegingstijd. Zaad waarvan geschat wordt dat meer dan 80% van de zaadcellen bewegen en deze bewegingen pas stilvallen na 40 seconden worden weerhouden voor de verdere bevruchting.

De bevruchting kunnen we doen gebaseerd op de methode beschreven door Kucharczyk et al. (2016), waarbij het zaad wordt toegevoegd aan de eitjes in 3 beurten. Bij de start van de bevruchting wordt $\frac{1}{3}$ van het zaad over de eitjes verdeelt en wordt het zaad met een zachte, trillende bewegend verdiept tussen de eitjes. Er wordt water van de incubatoren bij eitjes toegevoegd totdat er boven de eitjes een halve centimeter water staat. Daarna beginnen we langzaam te roeren met een plastieken lepeltje of ganzenveer (Figuur 7). 30 seconden na het toevoegen van het water, spuiten we opnieuw $\frac{1}{3}$ van het zaad over de eitjes en blijven we langzaam roeren, 30 seconden later voegen we het laatste $\frac{1}{3}$ van het zaad en blijven we langzaam roeren. Een halve minuut later voegen we een hoeveelheid water, qua volume evenveel als het volume eitjes, bij en blijven we langzaam roeren. Met een pipet kunnen al aan elkaar gestrengelde eitjes, bloedklonters en vuiligheid uit het water gehaald worden. Twee minuten na het toevoegen van water, laten we de eitjes even sedimenteren in de kom. Het overtollig water wordt langzaam afgegoten en opnieuw kunnen vuiligheden eruit gepipetteerd worden. We vullen opnieuw aan met water, roeren en na drie minuten herhalen we het proces opnieuw van sedimenteren, afgieten en opnieuw bijvullen. Na twee minuten roeren laten we de eitjes sedimenteren, gieten het merendeel van het water af en stockeren we de eitjes in de incubator (Figuur 8).



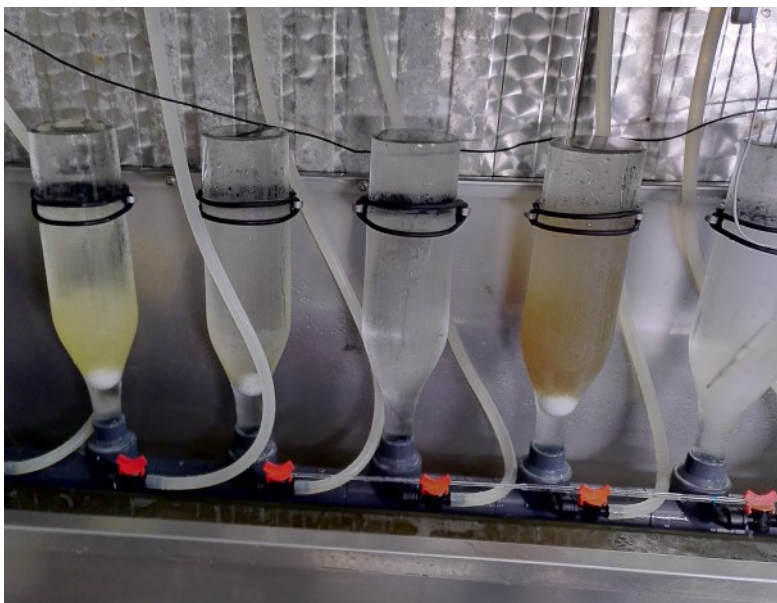
Figuur 7: Toevoeging zaad bij de eitjes; Water toevoegen, Menging van het zaad en de eitjes



Figuur 8: Toevoeging van zaad, Water verversen en incubatie van de eitjes

6. Ei-incubatie

De bevruchte eitjes kunnen dan overgebracht worden naar de incubator. Op het Aqua-ERF gebruiken we Zuger-flessen van 3liter waar het water langs onder in de flessen binnenstroomt om dan aan de bovenkant uit te lopen (Figuur 9). De stroming van het water moet juist genoeg zijn dat er een vloeiende trage golfbeweging is bij de bevruchte eitjes zodat ze niet aan elkaar klitten, niet sedimenteren, maar bij wijze van spreken over elkaar rollen. De stroming mag ook niet zo sterk staan dat de "wolk" aan eitjes uit elkaar wordt verspreid en ze te hoog in het waterkolom komen te staan. Juist boven de hals waar het water binnenstroomt kan een golfbal gestoken worden die voor wat meer stroomverdeling zorgt, maar het zou ook zonder kunnen. Voordeel aan de golfbal is dat deze bal de eitjes blokkeren zodat ze niet uit de fles zakken bij een stroomonderbreking.



Figuur 9: Incubatoren met eitjes

7. Ontluiking van de eitjes

Op het Aqua-ERF is het niet gelukt om de bevruchte eitjes te laten ontluiken. Binnen de week na stoc-king waren de bevruchte eitjes dood. De oorzaak hiervan is nog niet duidelijk. Verschillende hypothesen die in een verder onderzoek kunnen nagegaan worden zijn: negatieve invloed van de manipulaties, niet-optimale voeders, waterkwaliteit in de viskweektanken en/of de eierincubator, ... Een overzicht van de verschillende embryonale stadias kunt u terugvinden in de publicatie van Egan et al. (2012). Uit litera-tuur vinden we een incubatieperiode van 30-40 dagen onder de 4°C, waarbij er soms manipulaties nodig zijn om dode eitjes weg te halen en eventuele ontsmettingsbaden om schimmelinfecties te vermijden of te bestrijden.

Bijlage Referenties

- *Egan J.P., Johnson R.D., Anders P.J., Cain K.D. (2015) "Initial Characterization of Embryonic Development in North American Burbot", *North American Journal of Aquaculture*, 77:1, 37-42
- *Foltz J.R., Jensen N.R., Polinski M.P., Ireland S.C., Cain K.D. (2012) "Characterization of Oocyte Development in Hatchery-Reared Burbot", *North American Journal of Aquaculture*, 74:3, 408-412
- *Kucharczyk, D., Nowosad, J., Łuczyński, M.J., Targońska, K., (2016) "New technique for fertilizing eggs of burbot, asp and ide under hatchery conditions" *Anim. Reprod. Sci.* 172, 143-147.
- *Kucharczyk D., Nowosad J., Kujawa R., Dietrich G., Biegaj M., Sikora M., Luczynski M.J. (2018) "Comparison of spontaneous and hormone-induced reproduction of burbot *Lota lota* (L.) under hatchery conditions", *Aquaculture* 485: 25-29
- *Izquierdo M.S., Fernandez-Palcios H., Tacon A.G.J. (2001) "Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish", *Aquaculture* 197: 24-42
- *Palinska-zarska K., Zarski D., Krejszeff S., Nowosad J., Bias M., Trejchel K., Brylewski A., Targonska K., Kucharczyk D. (2014) "The effect of age, size and digestive tract development on burbot, *Lota lota* (L.), larvae weaning effectiveness", *Aquaculture Nutrition* 20: 281-290
- *Schaeffer F.J., Hermelink P., Husmann P., Meeus W., Adriaen J., Wuertz S. (2016). "Induction of gonadal maturation at different temperatures in burbot *Lota lota*", *J. Fish Biol.* Vol 89(5), 2268-2281
- *Zarski D., Kucharczyk D., Sasiowski W., Targonska K., Mamcarz A. (2010). "The influence of temperature on successful reproduction of burbot, *Lota lota* (L.) under hatchery conditions", *Pol. J. Natur. Sc.* Vol 25(1): 93-105
- *Zarski D., Palinska-Zarska K., Krejszeff S., Kucharczyk D. (2014). "A first successful induction of spawning of the hatchery reared burbot, *Lota lota* L.", Poster session at Aquaculture Europe, San Sebastian, 14-17/10/2014