

Hoogte en lengte van de stressrespons bij karpers erfelijk bepaald

door dr. ir. Michael Tanck (Leerstoelgroep Visteelt en Visserij, Wageningen URI)

Door de intieme relatie van de vis met zijn (waterige) milieu, kunnen kleine veranderingen in dit milieu al leiden tot een verstoring van de homeostase (evenwichtstoestand) in de vis. De combinatie van gedragingen en fysiologische reacties om zich aan deze veranderende omstandigheden aan te passen en het evenwicht weer te herstellen wordt de stressrespons genoemd (Chrousos and Gold, 1992). Wanneer bepaalde veranderingen in houderij-omstandigheden (bijv. waterkwaliteit) het aanpassingsvermogen van de dieren echter te boven gaan, leiden deze veranderingen tot een langdurige stressrespons, die, op zijn beurt, kan leiden tot negatieve 'bijwerkingen' zoals bijv. een vertraging van de groei en vermindering van de ziekte weerstand. Door deze samenhang, wordt selectie op stressrespons gezien als mogelijke methode om met name de (algemene) ziekte weerstand van de populatie te verbeteren. Temeer omdat directe selectie op ziekte weerstand vaak moeilijk te combineren is met andere selectiecriteria in commerciële fokprogramma's.

Ondanks uitgebreid onderzoek naar de stressrespons van vissen en zijn gevolgen met betrekking tot groei, maturatie en ziekteresistentie zijn er nog maar enkele selectie-experimenten uitgevoerd, waarbij de stressrespons gebruikt werd als selectie criterium. Het merendeel van deze experimenten werd uitgevoerd bij zalm-achtigen, zoals de Atlantische zalm (Fevolden et al., 1991) en de regenboogforel (Fevolden et al., 1991, 1999; Pottinger and Carrick, 1999). Omdat de karper, naast een belangrijk vissoort voor de visteelt, ook een belangrijke soort is in experimenteel onderzoek, richtte mijn promotie-onderzoek bij de leerstoelgroep Visteelt en Visserij zich op het beantwoorden van de volgende twee vragen: is de hoogte van de stressrespons erfelijk bepaald in de karper, en is het mogelijk om in teeltlijnen te maken met een hoge dan wel lage stressrespons? Om deze vragen te be-

antwoorden werd een selectie-experiment uitgevoerd met de stressrespons als selectie criterium.

Stressor en cortisolstressrespons

Als stressor binnen het onderzoek werd een snelle daling van de watertemperatuur van 25 naar 16° gebruikt (= koudeschok, Figuur 1).

Ter voorbereiding van het daadwerkelijke selectie-experiment werden een aantal experimenten uitgevoerd met behulp van een bestaande inteeltlijn om: 1) de validiteit van de koudeschok als stressor te onderzoeken en 2) een selectie criterium te definiëren voor het selectie-experiment. De stressrespons van de karper werd onderzocht door concentraties van het stresshormoon cortisol in het bloedplasma te meten tijdens en na de koudeschok. Deze koudeschok veroorzaakte een signifi-

cante stijging van de cortisolconcentratie en de hoogste waarden werden gemeten binnen 20 minuten na aanvang van de koudeschok (Figuur 1). Daarom werd de cortisolconcentratie op 20 minuten gekozen als selectie criterium binnen het selectie-experiment.

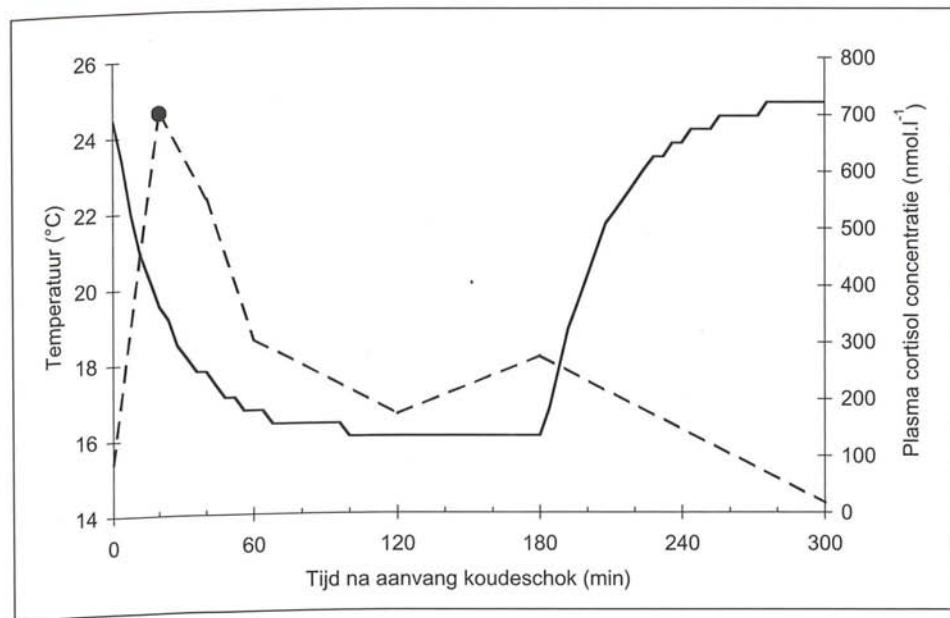
Basispopulatie

Als eerste stap in het selectie-experiment (Figuur 2) werd een basispopulatie geformeerd. Deze basispopulatie (F_1) bestond uit een kruising tussen zes mannetjes van een wilde lijn uit de Anna Paulowna (AP) polder (verkregen via de OVB) en een gedomesticeerd homozygoot vrouwtje van de E4 lijn, dat al in het broedhuis aanwezig was (zie voorkant blad). Om de genetische achtergrond van de AP karpers te onderzoeken, werden de zes mannetjes gekarakteriseerd met behulp van eiwit- (allozym) en DNA-merkers (microsatellieten). Deze analyses toonden aan, dat zes AP mannetjes hoogst

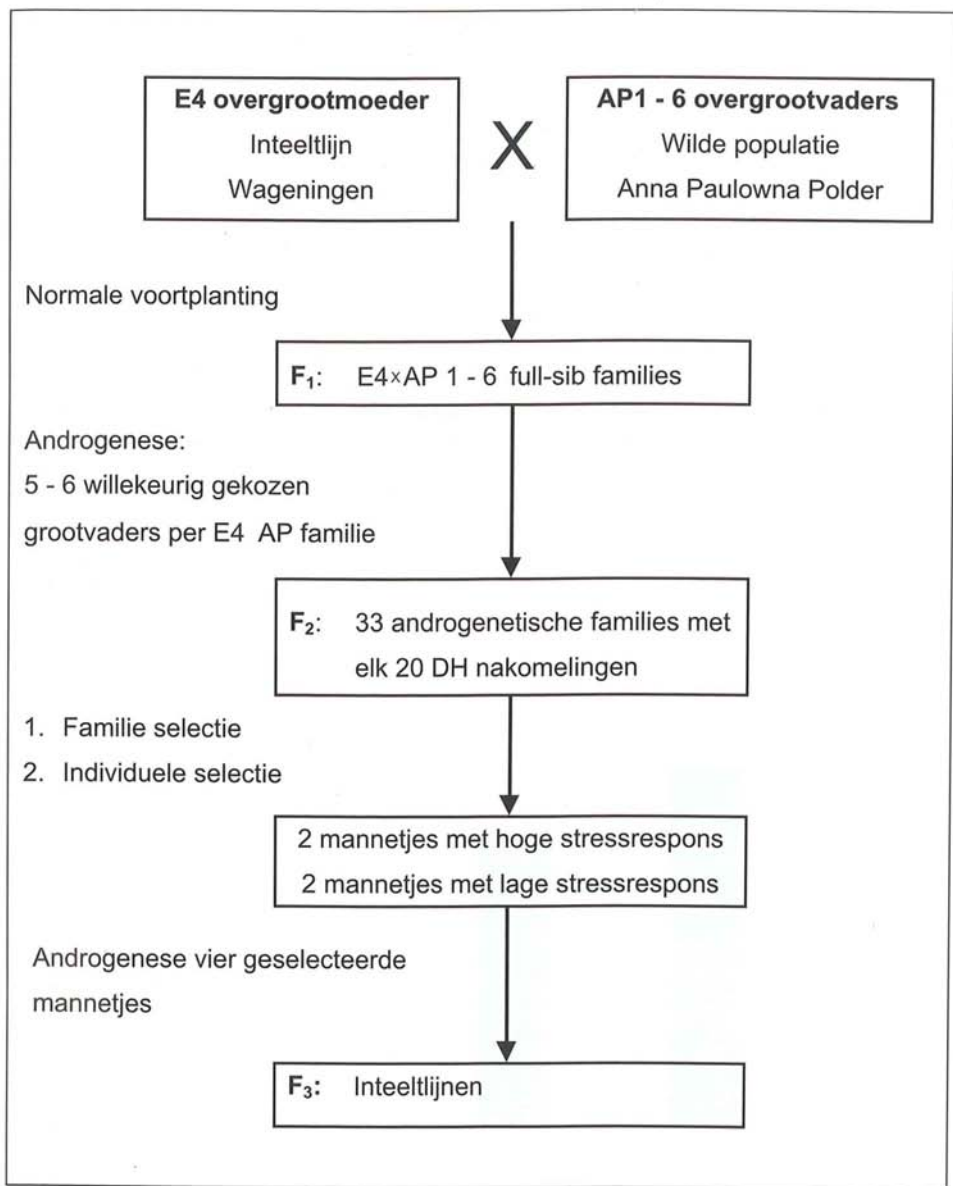
waarschijnlijk afkomstig waren uit een wilde of verwilderde populatie.

Erfelijkheidsgraad schatten m.b.v. androgenetische nakomelingen.

Uit deze zes E4xAP 'full-sib' families (F_1) werden willekeurig 33 mannetjes gekozen, die androgenetisch voortgeplant werden. Bij deze vorm van voortplanten wordt alleen het DNA van de vader doorgegeven aan de nakomelingen, welke daarom ook wel dubbel haploïd (DH) nakomelingen genoemd worden. De F_2 generatie bestond zodoende uit 33 families, elk met twintig DH nakomelingen. Al deze 660 DH nakomelingen werden aan de koudeschok onderworpen en m.b.v. deze gegevens kon een erfelijkheidsgraad (h^2) geschat worden voor de hoogte van de cortisolstressrespons. Deze h^2 geeft aan welk deel (0-1) van de gevonden totale variatie door genen veroorzaakt wordt en welk deel door milieufactoren. In ons experiment werd een h^2 gevonden van 0.60 (90%



■ Figuur 1: Watertemperatuur (—) en plasma cortisolconcentratie (- -) tijdens een 9^e koudeschok.



■ *Figuur 2: Schematische weergave van het selectie-experiment met als doel het creëren van inteeltlijnen met divergente stressresponsen ten gevolge van een koudeschok. Per generatie wordt de gebruikte voortplantingstechniek en/of selectiemethode aan de linkerkant weergegeven.*

betrouwbaarheidsinterval: 0.37 – 0.90), wat aantoonde, dat de hoogte van de cortisolstressrespons in de karpers voor een groot deel erfelijk bepaald wordt.

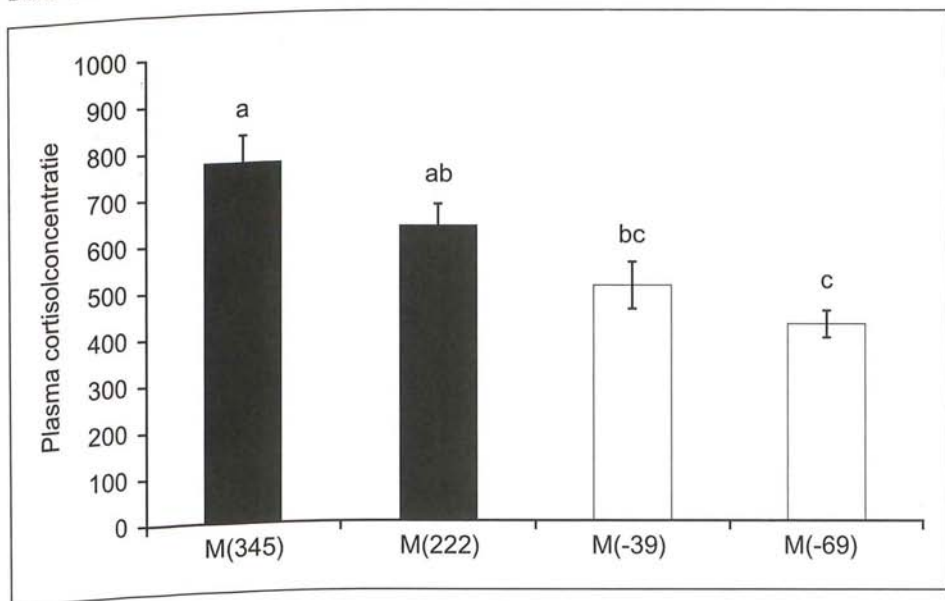
Selectieprocedure $F_2 \rightarrow F_3$

Omdat de 660 DH nakomelingen niet individueel gemerkt waren, was selectie op basis van de individuele cortisolstressrespons onmogelijk. Daarom werden drie families met een hoge en drie families met een lage gemiddelde cortisolstressrespons geselecteerd. De 154 vissen in deze zes families werden individueel gemerkt, gemixt en aan een tweede koudeschok onderworpen. Met deze gegevens werd voor elke individuele vis een fokwaarde voor de cortisolstressrespons geschat. Deze fokwaarden werden gebruikt om vier mannetjes (twee hoge en twee lage) te selecteren. Deze vier homozygote mannetjes werden

androgenetisch voortgeplant om vier inteeltlijnen te krijgen. Deze inteeltlijnen werden aan de koudeschok onderworpen om te testen of nakomelingen van een hoge vader ook een relatief hoge cortisolstressrespons hadden en vice versa. Figuur 3 laat de resultaten van dit experiment zien. De rangorde in cortisolstressrespons van de inteeltlijnen was identiek aan de rangorde in fokwaarden van de vaders. Tevens was het maximale verschil in cortisolconcentraties tussen de lijnen (350 nmol l⁻¹) gelijk aan het verwachte verschil op basis van de geschatte fokwaarden.

Stressresponsprofielen

Afgezien van de inteeltlijn, die gebruikt werd om de werking van de koudeschok als stressor te testen, waren er verder geen volledige profielen van de cortisolstressrespons tijdens een koudeschok beschikbaar. Daarom werden in een extra experiment de 'complete'



■ Figuur 3: Plasma cortisolconcentraties (in nmol.l⁻¹) in de inteeltlijnen van de geselecteerde hoge en lage mannetjes (M) op 20 minuten na aanvang van de koudeschok. De fokwaarde van de verschillende mannetjes (in nmol.l⁻¹) staat tussen haakjes. De letters geven significante ($P < 0.05$) verschillen weer in cortisolconcentraties tussen de vier lijnen.

stressresponsprofielen van verschillende reeds voorhanden zijnde inteeltlijnen bestudeerd. Uit dat experiment bleek, dat de profielen van de cortisolstressrespons systematisch kunnen verschillen tussen karperlijnen (Type I en II; Figuur 4). Type I laat een relatief korte respons zien met een hoge dan wel lage piekwaarde op 20 minuten na aanvang van de koude schok, terwijl Type II een langdurige (hoge) cortisolstressrespons laat zien.

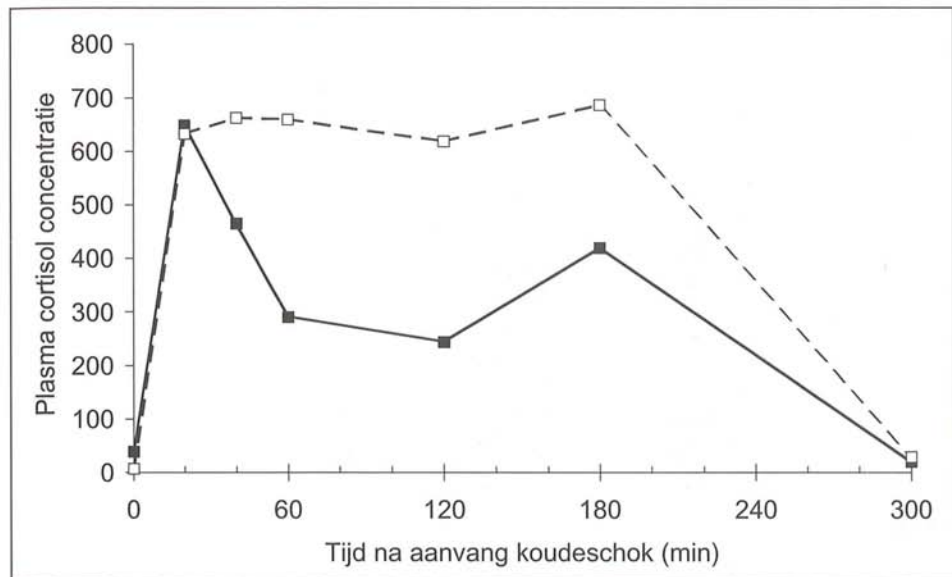
Conclusies

De hoogte en lengte van de cortisolstressrespons zijn erfelijk bepaald in de karper en de verschillende experimenten resulteerden in inteeltlijnen met tenminste twee cortisolresponsprofielen. Deze inteeltlijnen vormen een waardevol gereedschap voor toekomstig onderzoek naar de stressrespons zelf en zijn effecten op andere eigenschappen zoals groei, reproductie en gezondheid. Door dit vervolgonderzoek zou het mogelijk moeten zijn om in de nabije toe-

komst enkele problemen met betrekking tot het gebruik van de stressrespons als selectie criterium in commerciële fokprogramma's op te lossen.

Referenties

- Chrousos, G.P., and Gold, P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* 267, 1244-1252.
- Fevolden, S.E., Roed, K.H., Fjalestad, K.T., and Stien, J. (1999). Poststress levels of lysozyme and cortisol in adult rainbow trout: heritabilities and genetic correlations. *Journal of Fish Biology* 54, 900-910.
- Fevolden, S.E., Refstie, T., and Roed, K.H. (1991). Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 95, 53-66.
- Pottinger, T.G., and Carrick, T.R. (1999). Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *General and Comparative Endocrinology* 116, 122-132



■ Figuur 4: Cortisolresponsprofielen van twee verschillende inteeltlijnen tijdens een koudeschok. Type I: -■-, Type II (-□-).