



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Phenotypic responses to lifelong hypoxia in cichlids

Rutjes, Hendrikus Antonius

Citation

Rutjes, H. A. (2006, October 24). *Phenotypic responses to lifelong hypoxia in cichlids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4925>

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/1887/4925>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In het stuk hieronder zijn alleen de belangrijkste referenties gegeven. De rest van de referenties kan worden gevonden in de hoofdstukken 1 en 7.

HET VICTORIAMEER

In oppervlakte is het Victoriameer het grootste tropische meer ter wereld. Met een maximum diepte van 70 meter is het een ondiep meer in vergelijking met de andere grote meren in Afrika (Tanganyika en Malawi). Tot in de jaren 80 van de twintigste eeuw werd de visfauna van het meer gedomineerd door een groep van meer dan 500 soorten nauwverwante haplochromine cichliden (familie Cichlidae). Deze vormen samen een soortenzwerm die, op evolutionaire schaal, pas zeer recentelijk uit een of enkele vooroudersoorten zijn ontstaan. De grote diversiteit en nauwe verwantschap van deze vissen maakt hen tot een populair studieobject. Voor bijna elke beschikbare voedselbron in het meer bestaan er wel soorten haplochromine cichliden die gespecialiseerd zijn in het eten ervan. Het Victoriameer zelf is minder dan een miljoen jaar oud en de laatste gegevens wijzen erop dat aan het eind van het Pleistoceen het meer droog is komen te staan. Ongeveer 14.000 jaar geleden (12.400 ¹⁴C jaren) vulde het meer zich weer met water. Men is het er nog niet over eens of het Victoriameer tijdens deze uitdrogingsperiode geheel droog stond, of dat er nog kleine meertjes zijn blijven bestaan in het Victoriameerbassin. Dit vormt een belangrijk discussiepunt rondom de evolutie van de Victoriacichliden. Er zijn sterke aanwijzingen dat de genetische

diversiteit van deze vissen al 250.000 tot 750.000 jaar geleden is ontstaan. Toen vooroudersoorten het meer bevolkten nadat het weer met water gevuld was, stelde hun genetische diversiteit hen in staat om zeer snel in de verschillende soorten te divergeren die de latere soortenzwerm zou vormen. Een alternatieve theorie stelt dat de meeste soorten al vóór de uitdroging van het Victoriameer zijn ontstaan en dus als gescheiden soorten de uitdrogingsperiode moeten hebben overleefd. Feit blijft dat de vissen die het Victoriameer meer bevolkten nadat het 14.000 jaar geleden weer gevuld was met water, tijdens de uitdrogingsperiode ergens moeten hebben overleefd. Het ene kamp beweert dat deze hebben overleefd in kleine moerasachtige meertjes die in het Victoriameerbassin zouden zijn achtergebleven. Er zijn gegevens die erop wijzen dat soorten die daar oorspronkelijk niet voorkomen zich er toch in stand kunnen houden. Het andere kamp denkt dat juist de stroompjes en rivieren die naar het Victoriameer bassin toe liepen, een toevluchtsoord vormden voor de toekomstige meerbewoners. Ondersteuning hiervoor is gevonden toen zeer recentelijk een grote groep cichlidensoorten is gevonden in een rivier in de Kalahariwoestijn (Joyce *et al.*, 2005). De verscheidenheid aan specialisaties aan verschillende voedselbronnen binnen deze groep doet niet onder voor de verscheidenheid die in het Victoriameer werd aangetroffen. De rivier waar deze nieuw gevonden soorten in leven, voedde een meer dat 2000 jaar geleden uitdroogde tot een zoutwoestijn. Men concludeerde dat de soorten uit de

rivier dus een overblijfsel van de soorten die ooit in het meer leefden.

RECENTE VERANDERINGEN

In de afgelopen eeuw hebben menselijke invloeden voor dramatische veranderingen in de ecologie van het Victoriameer gezorgd. Sinds het begin van de twintigste eeuw is de visserijdruk continu toegenomen, wat leidde tot steeds lagere vangsten van de inheemse tilapiasoorten in het meer. In de jaren '50 en '60 zijn exotische tilapiasoorten, in het bijzonder de Nijltilapia, en de roofzuchtige Nijlbaars (*Lates niloticus*) in het meer uitgezet maar aanvankelijk namen populaties ervan niet in aantal toe. Nijlbaars en Nijltilapia worden veel groter dan de vinger- tot handgrote cichliden en zijn daardoor van veel grotere economische waarde. In de jaren '60 begon men met lichtvisserij specifiek op de talrijk voorkomende *Rastrineobola argentea*, een kleine karperachtige, te bevissen. Bij deze vorm van visserij lokt men de visjes 's nachts met lampen waarna zij met netten worden gevangen. In 1976 is men begonnen om met trailschepen de haplochromine cichliden te bevissen. Hierdoor werden populaties cichliden lokaal overbevist. In de jaren '80 namen nijlbaarspopulaties explosief in aantal toe. Dit ging gepaard met een dramatische afname van de cichlidenpopulaties die tot prooi dienden aan de nijlbaars. Vele soorten zijn sindsdien nooit meer waargenomen en we kunnen aannemen dat de meeste van hen zijn uitgestorven. Tegelijkertijd nam *R. argentea* op veel plaatsen sterk in aantal toe. Een van de getroffen soorten,

waar in dit proefschrift veel experimenten mee zijn gedaan, is *Haplochromis (Yssichromis) pyrrhocephalus*. Vangsten hiervan liepen terug van ongeveer 20.000 per trailvangst van een half uur naar minder dan een. Behalve verschuivingen in de visfauna nam men in de jaren '80 ook belangrijke veranderingen van omgevingsfactoren waar. De troebelheid van het water nam toe, deels veroorzaakt door algenbloei. De hoeveelheid cyanobacteriën (blauwalgen) in het meer nam flink in aantal toe ten koste van diatomeën die eerst de dominante groep vormden. Uit boorproeven in de sedimentlaag van het Victoriameer is gebleken dat eutrofiëring¹ van het meer, als waarschijnlijke oorzaak van deze verschuiving, al rond de jaren '20 of '30 van de vorige eeuw in gang is gezet. De eutrofiëring vertoont een sterke correlatie met de toename van het aantal mensen dat rond het Victoriameer woont. Bronnen van eutrofiëring zijn intensieve landbouw, ontbossing en industrieel en huishoudelijk afvalwater. Door de opkomst van de Nijlbaars nam het aantal vissen dat algen at af en nam de ontbossing verder toe omdat hout nodig was voor het roken en vakken van de gevangen Nijlbaars.

Door menselijke activiteiten veroorzaakte eutrofiëring is een wereldwijd probleem. Algenbloei en de daaropvolgende sterfte heeft in veel gevallen hypoxie tot gevolg. Onder hypoxie verstaan we het voorkomen van te lage zuurstofconcentraties. Het voorkomen van hypoxie in wateren waar dit ongewoon is heeft een negatief effect op de soortenrijkdom en dichtheden van

¹ Verrijking van het water met nutriënten.

waterademhalende dieren (zoöplankton, macroëvertebraten, schaaldieren vissen etc.).

Seizoensgebonden terugkeer van hypoxie veroorzaakt grootschalige ontvolking van getroffen regio's door sterfte en migratie. In het Victoriameer zorgt acute opwelling van hypoxische waterlagen voor grootschalige vissterfte (Wanink *et al.*, 2001). Dit fenomeen is in de laatste decennia sterk in frequentie toegenomen. In het Victoriameer komt chronische hypoxie tegenwoordig in veel grotere gebieden en gedurende langere periodes voor dan vroeger. In 1960-61 kwamen zeer lage zuurstofconcentraties ($< 1 \text{ mg l}^{-1}$) alleen voor op plaatsen dieper dan 60 meter. Echter, in 1990-91 werd dit al op dieptes van 45 tot 54 meter (35% van de bodemoppervlakte) waargenomen in een aaneengesloten periode van oktober 1990 tot maart 1991. In de ondiepere Mwanza golf ($< 20\text{m}$), in het zuiden van het Victoriameer, werden tussen 1979 en 1988 de periodes van hypoxie langer en hypoxische waterlagen werden steeds verder van de bodem waargenomen. Hypoxie maakt de waterlaag vlak boven de bodem een minder geschikt habitat voor vissen die ervan afhankelijk zijn. Het is dan ook niet verassend dat een aantal wetenschappers met de hypothese kwam dat, naast predatie door nijlbaars, hypoxie een belangrijke oorzaak was voor het afnemen van cichlidenpopulaties in de jaren '80 van de vorige eeuw.

HOE GAAN VISSSEN OM MET HYPOXIE?

De duur van blootstelling aan hypoxie heeft een belangrijke invloed op de

respons van vissen hierop. Deze kunnen gedragmatig, fysiologisch, biochemisch en anatomisch van aard zijn. Echter, de relatie tussen de blootstellingduur aan hypoxie en het type respons is bijna nooit gespecificeerd. In dit proefschrift is onderscheid gemaakt tussen korte-termijn hypoxie en chronische hypoxie. Korte-termijn hypoxie kan enkele uren tot dagen duren terwijl chronische hypoxie vanaf een week tot permanente blootstelling kan inhouden.

Korte-termijn hypoxie

Tijdens korte-termijn hypoxie kunnen veranderingen van het gedrag en de regulering van de stofwisseling de energieconsumptie verlagen, zuurstofextractie verhogen en het anaëroobe metabolisme² activeren. Vissen die aan korte-termijn hypoxie worden blootgesteld zullen doorgaans reageren met een verhoogde ademhalingsactiviteit, een afname van de bewegingsactiviteit en oppervlakterespiratie. Dit laatste houdt in dat vissen het laagje water direct aan de oppervlakte opzuigen daar dit meer zuurstof bevat dan de rest van de waterkolom. Een plotselinge blootstelling aan hypoxie leidt tot stress-responsen die resulteren in een lage tolerantie voor hypoxie. Als vissen de tijd krijgen om zich aan een nieuwe omgeving aan te passen, het metabolisme te verlagen en andere stressfactoren minimaal blijven, is de tolerantie voor hypoxie veel hoger. De mogelijkheid om korte-termijn hypoxie te overleven is deels afhankelijk van de "coping strategie"³ van het individu. Onderzoek aan tong (*Solea solea*) en regenboogforel

² Stofwisseling in het lichaam.

³ Het type reactie op een verandering in de omgeving, deze zijn vaak een combinatie van gedrag en fysiologische veranderingen

(*Oncorhynchus mykiss*) heeft aangetoond dat zij óf met een onderdrukking van de gedrags- en metabole activiteit reageren, óf proberen weg te komen. Dit laatste gaat gepaard met hoge concentraties van catecholamines en cortisol⁴ en snelle sterfte van de dieren als zij niet kunnen ontsnappen.

Veel vissen reageren op geleidelijke blootstelling aan korte-termijn hypoxie met een reductie van het metabolisme die tot onder het standaardmetabolisme⁵ kan uitkomen. Dit stelt hen in staat om hun stofwisseling aëroob te houden, hetgeen een bepalende factor is voor de tolerantie. Bij steeds lager wordende zuurstofconcentraties zal op een gegeven moment de zuurstofbehoefte groter zijn dan de opname en is activering van het anaërobe metabolisme nodig om aan de energiebehoefte te voldoen. In reactie op steeds lagere zuurstofconcentraties, zal de perfusie van de kieuwen met bloed verhoogd worden. Door de hogere doorbloeding zal het maximale kieuwoppervlak worden gebruikt voor zuurstofopname. Onder normale omstandigheden en routine activiteit is het gebruikte kieuwoppervlak lager omdat niet alle secundaire lamellen doorbloed zijn.

In de nijltilapia (*Oreochromis niloticus*) ligt de P_{50} ⁶ van het volbloed bij ongeveer 20 mm Hg. Dus bij blootstelling aan zulke lage zuurstofconcentraties kunnen we aannemen dat het bloed maar gedeeltelijk

met zuurstof beladen wordt als het de kieuwen passeert. Veel vertebraten kunnen de zuurstofaffiniteit van het hemoglobine (Hb) veranderen door allosterische⁷ interacties met verschillende verbindingen in de rode bloedcellen. In vissen zijn de organische fosfaten ATP (adenosine trifosfaat) en GTP (guanosine trifosfaat) de belangrijkste verbindingen om de Hb-O₂⁸ affiniteit te reguleren. Tijdens hypoxie kan binnen een a twee dagen de concentratie ATP en GTP verlaagd worden waardoor de Hb-O₂ affiniteit stijgt (Weber, 1996, 2000; Val, 2000).

Fysiologie tijdens chronische hypoxie

Tijdens blootstelling aan chronische hypoxie resulteert de activering en deactivering van genen in de productie van andere proteïnen en weefsels. Dit kan leiden tot verhoging van de zuurstofextractiecapaciteit, aërobe capaciteit en veranderingen op weefselniveau zoals erythropoïese⁹ en angiogenese¹⁰. Er zijn totnogtoe maar enkele studies gepubliceerd over blootstelling van vissen aan chronische hypoxie. Experimenten met zowel juveniele als volwassen vissen lieten zien dat het overleven ervan voornamelijk gebaseerd was op het reduceren van energieverbruik. In zeelten (*Tinca tinca*) die 6 weken geacclimatiseerd werden aan 8% luchtverzadiging werd een afname van de routine zuurstofconsumptie van

⁴ Hormonen die vrijkomen bij acute en chronische stress

⁵ Minimum aan stofwisselingsactiviteit om in leven te blijven onder normale omstandigheden

⁶ De zuurstofconcentratie waarbij 50% van de maximale verzadiging van het bloed bereikt is

⁷ Een interactie door binding van een stof op een andere plaats. In dit geval: door binding van een stof op een andere plaats dan waar zuurstof bindt op het Hb molecuul, verandert de bindingsaffiniteit met zuurstof.

⁸ O₂ is de chemische notatie voor zuurstof.

⁹ Aanmaak van rode bloedcellen.

¹⁰ Aanmaak en onderhoud van bloedvaten.

gemiddeld 48% waargenomen (Johnston en Bernard, 1982a). Bovendien werd gevonden dat de totale oppervlakte van de bloedcapillairen in doorsnedes van spieren met 43-76% was afgenomen en de volumedichtheid van de mitochondriën¹¹ met 60%. Glycogeenvoorraden in de witte spieren en de activiteit van het enzym lactaatdehydrogenase¹², beide indicatoren voor de anaërobe capaciteit, waren verhoogd maar niet significant. Van karpers (*Cyprinus carpio*) die 6 weken aan hypoxie werden geacclimatiseerd (20% luchtverzadiging ofwel 30 mm Hg), was de gemiddelde zuurstofconsumptie 50% lager dan in karpers die aan normale zuurstofconcentraties waren geacclimatiseerd (>80% luchtverzadiging ofwel 120 mm Hg; Lomholt en Johansen, 1979). In de goudvis (*Carassius auratus*) die erg tolerant is voor hypoxie, leidde chronische hypoxie tot afname van de proteïnesynthese in de lever en een toename in activiteit van enzymen die een conservatief verbruik van glycogeenvoorraden in de spieren bevorderen. Glycogeen is een van de belangrijkste substraten die onder anaërobe omstandigheden gebruikt kan worden voor de energieproductie. In een andere studie leidde chronische hypoxie bij juveniele karpers (35 g) tot lagere in het bloed van testosteron, oestradiol en triiodothyronine. Deze hormonale veranderingen werden geassocieerd met een vertraagde gonadengroei, een afname van het paaisucces, spermamotiliteit, bevruchting van de eieren, aantal uitgekomen eieren en overleving van de larven (Wu, 2003). In de bovengenoemde studies aan

zeelt, karper en goudvis, duurde de blootstelling aan hypoxie 6-8 weken en is het vrij duidelijk dat de dieren hiervan negatieve gevolgen ondervonden in hun fysiologie. Men kan zich afvragen of deze vissen erg veel langer of zelfs levenslang onder hypoxie zouden kunnen overleven. In het wild zouden zij dan ook nog in staat moeten zijn om voldoende te foerageren, territoria te verdedigen tegen indringers, vluchten voor predatoren etc. Theoretisch zou de beste hypoxieadaptatie vissen in staat moeten stellen om hun energieverbruik te kunnen handhaven. Dat impliceert dat aanpassingen nodig zijn om onder hypoxie niet beperkt te zijn in zuurstof opname.

Functionaliteit van de kieuwen

Een van de belangrijkste functies van de kieuwen is het realiseren van optimale gasuitwisseling tussen het water en bloed dat door de kieuwen stroomt. Bij maximale efficiëntie is al het zuurstof uit het water in het bloed opgenomen als het de kieuwen verlaat. De wet van Fick kan gebruikt worden voor berekeningen aan gasuitwisselingsprocessen:

$$J_{\text{net}} = D A \Delta PO_2 / \Delta \chi$$

Hierin is J_{net} de netto gasuitwisseling tussen water en bloed, A de oppervlakte, ΔPO_2 het verschil in partiële zuurstofdruk en $\Delta \chi$ de diffusieafstand.

Volgens deze wet is de gasuitwisseling per tijdseenheid onder andere afhankelijk van het kieuwoppervlak. Dus zijn vissen die leven onder lage zuurstofconcentraties gebaat bij een groter kieuwoppervlak om

¹¹ Energie producerende onderdelen in de cel. Hier vinden de verbrandingsprocessen plaats.

¹² Een enzym dat een belangrijke stap in de citroenzuurcyclus vormt. De citroenzuurcyclus is een belangrijk proces in de aerobe omzetting van voedsel.

een hoge zuurstofopname te kunnen handhaven. Bij een geringe verlaging van de zuurstofconcentratie is een vergroting van het aantal doorbloede kieuwlamellen en een verhoging van de ventilatiefrequentie voldoende om dezelfde zuurstofopname te realiseren. Bij een steeds lager zuurstofniveau zal op een gegeven moment de snelheid van de waterstroom langs de kieuwlamellen zo hoog zijn dat de gasuitwisseling efficiëntie sterk daalt. In de Nijltilapia gaat de zuurstofopname efficiëntie al achteruit als de luchtverzadiging van het water 50% is.

Om de gasuitwisseling van een complex ademhalingsorgaan als de kieuwen beter te kunnen begrijpen kunnen ze vereenvoudigd worden tot een serie van rechthoekige kanaaltjes waardoor het water stroomt en terwijl in de schotten het bloed stroomt; vergelijkbaar met een radiator. Gebaseerd hierop kan men beredeneren wat het effect zal zijn van een groter kieuwoppervlak op de waterstroom en de weerstand van de kieuwen op het doorstromende water. Een groter kieuwoppervlak heeft onder hypoxie niet alleen maar voordelen. Als bijvoorbeeld de oppervlakte wordt vergroot door de dichtheid van de secundaire lamellen te vergroten, zullen de kanaaltjes kleiner worden hetgeen een verhoging van de weerstand oplevert. Door de secundaire lamellen langer te maken, zal de weglengte voor het doorstromende water toenemen wat ook voor meer weerstand zorgt. Om de stroomsnelheid van het water bij zulke veranderingen toch even hoog te houden zal meer energie

voor de ademhaling gebruikt moeten worden. Deze energie gaat dan verloren voor andere investeringen als voedsel zoeken of voor nageslacht zorgen. Een mogelijke vergroting van de totale oppervlakte van de secundaire lamellen zonder de weerstand per kanaaltje te verhogen wordt gerealiseerd door langere filamenten (dus meer kanaaltjes) en door hogere secundaire lamellen (dus grotere kanaaltjes).

Er is veel gelijkenis tussen de vorm en grootte van kieuwen van vissen die in een vergelijkbaar habitat leven en tussen vissen die een vergelijkbare levensstijl en zuurstofbehoefte hebben. In een studie waarin kieuwdimensies van cichliden uit verschillende Afrikaanse meren werden vergeleken, zag men dat de soorten die gespecialiseerd zijn in het kraken van slakken met hun keelkaken, een hogere dichtheid van secundaire lamellen hadden (dus een grotere oppervlakte maar kleinere kanaaltjes voor waterdoorstroming) naarmate zij in dieper water leefden. Dit werd gerelateerd aan de lagere zuurstofconcentratie op grotere diepte. In een andere studie werden *Haplochromis hiatus* en *H. iris* vergeleken. Morfologisch en ecologisch lijken deze twee Victoriacichliden sterk op elkaar maar er zijn belangrijke verschillen. *H. hiatus* komt voor op dieptes tussen 3 en 9 meter terwijl *H. iris* tussen de 8 en 15 meter voorkomt. Tijdens het regenseizoen komt stratificatie van het water voor en komen zuurstofconcentraties van 2-3 mg L⁻¹ voor in het habitat van *H. iris*. Het totale kieuwoppervlak van deze soort is 1.6 maal groter dan dat van *H. hiatus*

(Hoogerhoud, 1983). Contrasterend met de vele studies die de verschillen in kieuwen tussen soorten beschrijven in relatie tot de habitat en levensstijl, is de fenotypische plasticiteit van de kieuwen in relatie tot omgevingsfactoren nauwelijks onderzocht. Of er een plastische respons bestaat van de kieuwen in reactie op veranderingen in de zuurstofconcentratie, is dus niet bekend.

Anatomische veranderingen tijdens korte-termijn hypoxie

Sommige gespecialiseerde vissoorten kunnen hun anatomie veranderen in reactie op korte-termijn hypoxie. De kroeskarper (*Carassius carassius*) bijvoorbeeld, is in staat om zijn kieuwoppervlak in enkele dagen tijd te vergroten. Onder normale omstandigheden zijn op de kieuwfilamenten slechts rudimentaire secundaire lamellen te zien. Deze zijn ingebed in een sponsachtig weefsel dat, na enkele dagen van blootstelling aan hypoxie, door apoptose¹³, verdwijnt (Sollid *et al.*, 2003). Hierdoor neemt het functionele kieuwoppervlak sterk in grootte toe. In een latere studie bleek ook dat dit verschijnsel bij zowel de kroeskarper als de goudvis (*Carassius auratus*) optreedt als zij aan warm water worden blootgesteld (Sollid *et al.*, 2005). Dit kan verklaard worden door het feit dat de maximale hoeveelheid opgeloste zuurstof in het water afneemt bij hogere temperaturen. Een totaal andere soort fenotypische respons wordt gevonden bij de Zuid-Amerikaanse Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Onder

hypoxie groeit bij deze vis binnen een uur de onderlip sterk uit waardoor deze geschikt wordt om de altijd goed beluchte bovenste millimeters van de waterkolom te benutten voor de respiratie. De hypoxieresponsen in de kroeskarper, goudvis en tambaqui zijn volledig reversibel en bij uitstek geschikt om onder wisselende zuurstofconcentraties te leven.

Anatomische veranderingen bij chronische hypoxie

Relaties tussen kieuwgrootte en chronische hypoxie zijn enkele malen eerder gevonden. In het begin van de jaren '80, de periode dat chronische hypoxie zich manifesteerde in het Victoriameer, groeiden de populaties van *R. argentea*. Het totale aantal kieuwfilamenten op de eerste kieuwboog van *R. argentea* die in 1988 gevangen werden was 3.6% groter dan van vissen die in 1983 gevangen werden. Het is niet bekend of deze verandering een resultaat was van fenotypische plasticiteit of dat ook natuurlijke selectie een rol hierin heeft gespeeld. Er is een studie bekend waarin juist de fenotypisch geïnduceerde veranderingen van de kieuwen zijn onderzocht (Chapman *et al.*, 2000). In deze studie zijn gesplitste nesten van de niet endemische¹⁴ *Pseudocrenilabrus multicolor victoriae* (in Nederland bekend als de kleine muilbroeder, een aquariumvis) bij normoxie (<7.5 mg L⁻¹) en hypoxie (1 mg L⁻¹) opgegroeid. Toen zij 6 maanden oud waren had de hypoxiegroep een 22% groter kieuwoppervlak, voornamelijk veroorzaakt door een

¹³ Gereguleerde celdood.

¹⁴ Soorten zijn endemisch als zij maar op een locatie voorkomen, bijvoorbeeld een meer of rivier.

groter filamentaantal en –lengte. Wilde exemplaren uit een normoxisch habitat hadden een 41% groter kieuwoppervlak dan vissen uit een hypoxisch habitat. De vissen uit het hypoxische habitat vertoonden naast een verandering in de filamenten ook grotere secundaire lamellen.

Consequenties en beperkingen van grotere kieuwen

In de kop van een vis liggen spieren, botten en andere weefsels, die betrokken zijn bij respiratie, visie, eten etc. tegen elkaar aan. Als door blootstelling aan chronische hypoxie de kieuwen en het ademvolume groter zouden worden, zou er extra ruimte ingenomen worden door de kieuwen en spieren van het ademhalingsapparaat. In andere studies is al gesuggereerd dat een dergelijke vergroting zulke grote effecten heeft op omliggende structuren dat deze zelfs de vorm van de kop zullen veranderen om genoeg ruimte te creëren. Theoretisch zou extra ruimte in de kop op verschillende manieren verkregen kunnen worden (Witte *et al.*, 1990): (1) het gebruik van de vrije beschikbare ruimte; (2) verkleining van omliggende structuren; (3) toename van het kopvolume; (4) een combinatie van de voorgaande mogelijkheden. Oplossingen 2-4 zouden een negatieve invloed kunnen hebben op de functies van omliggende structuren en de stroomlijn van de vis nadelig kunnen beïnvloeden.

Bewijs dat structuren die de kieuwfilamenten omringen plastisch zijn is al eerder geleverd (Smits *et al.*, 1996a,b). Van twee populaties van *A.*

alluaudi is bekend dat de een vooral van slakken leeft en vergrote keelkaken heeft. De andere populatie leeft van zachtere prooien zoals insecten en heeft kleinere, minder robuuste keelkaken. De kieuwen, die tegen de keelkaken aan liggen, hebben bij de slakkenetende *A. alluaudi* een andere vorm, waardoor er meer ruimte beschikbaar is voor de vergrote keelkaken. Bij de *A. alluaudi* met grote keelkaken was ook de kop breder op de plaats waar de keelkaken en kieuwen zitten. In die studie kon niet vastgesteld worden of de gevonden verschillen een resultaat waren van fenotypische plasticiteit of dat genetische verschillen ook een rol speelden.

CENTRAAL IN DIT PROEFSCHRIFT

Gegeven de wereldwijde trend van een toenemend aantal locaties waar chronische hypoxie voorkomt, en het feit dat tot nu toe geen voorbeeld bekend is van herstel, is er behoefte aan meer begrip van de effecten van hypoxie op vissen. De huidige kennis hiervan is voornamelijk gebaseerd op korte-termijn hypoxie. In de weinige studies die bekend zijn over chronische hypoxie, was de duur van de blootstelling maar enkele weken en de vissen die gebruikt werden groeiden niet veel. Deze studies, waarin parameters voor bewegingsactiviteit, zuurstofconsumptie, enzymactiviteit, reproductie, groei en voedselopname zijn meegenomen, laten zonder uitzondering zien dat vissen beperkt worden door blootstelling aan hypoxie en overleven door hun energieverbruik zo veel mogelijk te beperken. Ook uit eerdere studies met Victoriacichliden in

ons laboratorium, bleek dat exemplaren die bij normale zuurstofconcentraties ($\geq 80\%$ luchtverzadiging) zijn opgegroeid en geleidelijk in enkele uren tijd aan 10% luchtverzadiging (LVZ) worden blootgesteld, niet langer dan een dag kunnen overleven. Echter, als twee weken oude visjes van dezelfde soorten aan in een periode van vier weken geleidelijk aan 10% LVZ werden blootgesteld, overleefden zij dit en trad er geen sterfte op. De vissen groeiden net zo snel als nestgenoten die bij normale zuurstofconcentraties (80% LVZ) opgroeiden en volgroeide individuen produceerden regelmatig nesten met levensvatbare jongen. Dit zijn sterke aanwijzingen dat cichliden die bij 10% LVZ opgroeien hun energieverbruik (lees zuurstofconsumptie) kunnen handhaven en dus weinig fysieke hinder ondervinden van de lage zuurstofconcentratie. Dit in tegenstelling met de studies die hierboven zijn beschreven.

Hiermee komen we bij de centrale vraag in dit proefschrift:

Welke fenotypische responsen zijn verantwoordelijk voor het feit dat cichliden die vanaf de vrijzwemmende fase aan chronische hypoxie worden blootgesteld zich veel beter kunnen handhaven onder hypoxie dan nestgenoten die niet onder hypoxie opgroeien?

Experimenten waarin nesten worden gesplitst zijn erg nuttig voor het beantwoorden van deze vraag. In het onderzoek dat voor dit proefschrift werd uitgevoerd zijn nesten cichliden gesplitst waarna een helft is opgegroeid onder hypoxie (10% LVZ) en de andere helft onder normoxie (80%

LVZ). Van de volgroeide individuen zijn parameters van het gedrag, de fysiologie en de anatomie gemeten. Hiermee is geprobeerd te achterhalen of onder hypoxie opgegroeide (OHO) vissen juist hun energieconsumptie beperken of zuurstofextractie vergroten om onder hypoxie te overleven.

LIMITATIES IN ZUURSTOFOPNAME ONDER HYPOXIE

Uit respirometrie-experimenten is gebleken dat de zuurstofconsumptie van OHO cichliden bij 10% LVZ en onder normoxie opgegroeide (ONO) nestgenoten bij 80% LVZ niet wezenlijk van elkaar verschilt. Als de ONO cichliden onder hypoxie gezet worden dan is hun zuurstofconsumptie lager dan die van OHO nestgenoten (Hoofdstuk 2,3 en 4). Echter, er waren verschillende aanwijzingen dat cichliden die onder hypoxie opgroeiden toch beperkt waren in hun zuurstofopnamecapaciteit. Ten eerste, tijdens het voeren was het gedrag van ONO en OHO vissen duidelijk verschillend (Hoofdstuk 2 en 3). De ONO vissen waren altijd erg actief tijdens het eten en aten al het voer zo snel mogelijk op. OHO nestgenoten wachtten juist tot de verzorger ze met rust liet en begonnen daarna rustig met eten, wat dan ook langer duurde. Dit impliceert dat OHO vissen minder energie spenderen aan eten en concurrentie om voer. Ten tweede, aan een gesplitst nest van *H. piceatus* is een voorstudie uitgevoerd waarin verschillende gedragsparameters zijn gemeten die representatief zijn voor paaigedrag en agressief gedrag. Al deze gedragingen werden minder

vaak waargenomen in de OHO groep dan in de ONO groep. Paaigedrag en agressief gedrag kosten erg veel energie en het gevonden verschil duidt erop dat OHO vissen minder energie spenderen aan deze gedragspatronen en dat het totale energieverbruik dus lager ligt. Ten derde, de activiteit van het mitochondriale enzym citraatsynthase in de witte spieren van OHO *A. alluaudi* en *H. ishmaeli* was 25% lager dan in dat van ONO nestgenoten (Hoofdstuk 6). In tilapia was het verschil kleiner en niet significant. De citraatsynthase activiteit is een beperkende stap in de citroenzuurcyclus. Dus kan gezegd worden dat de maximale aerobe activiteit van de witte spieren lager was in OHO dan in ONO exemplaren van *A. alluaudi* en *H. ishmaeli*. Verder werd in de witte spieren van OHO tilapia een verhoogde concentratie glycogeen aangetroffen ten opzichte van ONO nestgenoten (Hoofdstuk 6). Dus kan er meer energie door anaërobe energie omzetting worden geproduceerd. In *A. alluaudi* en *H. ishmaeli* waren de verschillen in glycogeen voorraad kleiner en niet significant. Andere onderzoeken lieten zien dat ook in de karpers en zeelt geen verhoging van glycogeen voorraden optraden na langdurige blootstelling aan hypoxie. Echter, OHO *A. alluaudi* en *H. ishmaeli* konden zuurstofloze condities veel langer tolereren dan ONO nestgenoten (Hoofdstuk 3). Wellicht wordt de hogere tolerantie van *H. ishmaeli* en *A. alluaudi* verklaard door gedragsverschillen of verhoogde glycogeen voorraden in de lever. De

lever is naast de spieren de belangrijkste opslagplaats voor glycogeen.

De observaties hierboven zijn aanwijzingen voor een verlaagd energieverbruik in OHO vissen. Dit zou moeten resulteren in een verlaagd zuurstofverbruik maar experimenten met respirometers hebben juist aangetoond dat de zuurstofconsumptie van ONO vissen bij 80% LVZ niet verschilde van de zuurstofconsumptie van OHO nestgenoten bij 10% LVZ (Hoofdstuk 2, 3). Echter, zuurstofconsumptie is een weergave van het totale energie budget van een vis terwijl gedragsactiviteit, glycogeen voorraden en citraatsynthase activiteit iets zeggen over de verdeling van het energie budget. Onder hypoxie is dus de verdeling van het energie budget anders dan onder normoxie. Behalve afname van energiebudget in sommige fysiologische processen onder hypoxie, zal er ook een toename van het budget zijn in andere. Bijvoorbeeld in de kosten voor ademhaling; OHO vissen moeten, om bij 10% LVZ dezelfde hoeveelheid zuurstof te kunnen opnemen als ONO nestgenoten bij 80% LVZ, ongeveer acht keer meer water over hun kieuwen pompen. Logischerwijs kost dit veel extra energie.

VERHOOGDE ZUURSTOFEXTRACTIE DOOR VERANDERINGEN IN DE KIEUWEN

Normaliter kunnen vissen die onder normoxie opgroeien hun normale zuurstofconsumptiepatroon niet handhaven bij hypoxie omdat dan hun zuurstofextractie efficiëntie verlaagd is. Uitgaande van de wet van Fick, is de zuurstofflux direct

afhankelijk van het verschil in partiële druk tussen water en bloed. Verder is de zuurstofopname per tijdseenheid direct afhankelijk van het totale oppervlak en omgekeerd evenredig met de diffusieafstand. Terwijl de meeste vissen tijdens korte-termijn hypoxie maar beperkte middelen hebben om hun zuurstofopname capaciteit te verhogen, was de verwachting dat blootstelling van jonge vissen aan chronische hypoxie zou leiden tot een vergroot kieuwoppervlak en een kleinere diffusieafstand (Hoofdstuk 4). Metingen aan de derde kieuwboog van *H. pyrrhocephalus* wezen uit dat het kieuwoppervlak van OHO vissen maar liefst 80% groter was dan dat van ONO nestgenoten. Kieuwen zijn dus erg plastische organen. Deze vergroting van het kieuwoppervlak werd veroorzaakt door 26.9% grotere primaire filamenten, 9.2% hogere en 37.7% langere secundaire lamellen.

De verschillen in kieuwgrootte die we hebben waargenomen tussen ONO en OHO *H. pyrrhocephalus* vertoonden grote overeenkomsten met de verschillen tussen vissen die leven in habitats met veel of weinig zuurstof. Omdat uit onze studie duidelijk blijkt dat kieuwen erg plastische organen zijn, kan men zich afvragen in hoeverre de verschillen in de kieuwen van deze vissen een fenotypische respons zijn op het leven in een verschillende omgeving. In ieder geval moeten we voorzichtig zijn met de interpretatie van morfologische verschillen tussen vissen die in verschillende habitats leven. Behalve de acht maal lagere zuurstofconcentratie bij 10% LVZ, zorgt de relatief grote

toename in de hoeveelheid water die over de kieuwen gepompt moet worden voor voldoende zuurstofaanvoer in OHO vissen, voor sterk verschillende condities waaronder gasuitwisseling moet plaatsvinden. Bij een verlaging van het verschil in zuurstofconcentratie tussen water en bloed gaat de gasuitwisseling in theorie evenredig veel trager. Dus zou het water juist langer in de kieuwen moeten blijven om nagenoeg al het zuurstof uit het water op te kunnen nemen. Dit lijkt op het eerste gezicht niet te kunnen vanwege de grote toename in hoeveelheid water die door de kieuwen stroomt. Echter, als het totaal van de oppervlaktes van de dwarsdoorsneden van de respiratiekanalen groter wordt, verlaagt dit de stroomsnelheid van het water. Ook langere secundaire lamellen zorgen voor een langer verblijf van water in de kieuwen. Metingen toonden aan dat, bij OHO vissen zowel de dwarsdoorsnede per kanaal als het aantal kanalen groter was dan bij ONO nestgenoten (Hoofdstuk 4). Bovendien waren de secundaire lamellen en dus de respiratiekanalen langer. Echter, een ~26.9% toename van het aantal kanalen, een 9.2% toename van de hoogte en een 37.7% toename van de lengte van de kanalen, verhoogt de verblijftijd van het water in de kieuwen met minder dan een factor twee. Dus bij een acht maal lagere zuurstofconcentratie, lees acht maal langzamere gasuitwisseling snelheid, is de efficiëntie nog steeds erg verlaagd. Samen met de waargenomen vergroting van het kieuwoppervlak van 80%, kan dus niet verklaard worden dat OHO vissen toch in staat zijn tot even

grote zuurstofopname als ONO vissen. Het vermoeden bestaat dan ook dat er nog meer veranderingen in de kieuwen hebben plaatsgevonden. Bijvoorbeeld een afname van de dikte van de waterbloedbarrière. De hieruit volgende verlaging van de diffusieafstand zorgt voor een rechtevenredige vergroting van de diffusiesnelheid.

ANATOMISCHE EFFECTEN VAN GROTERE KIEUWEN

Omdat er maar weinig vrije ruimte beschikbaar is in de kop van een vis, was de hypothese dat een mogelijke vergroting van de kieuwen zulke veranderingen met zich meebrengt dat dit de kopvorm beïnvloedt. In hoofdstuk 5 zijn experimenten met gesplitste nesten van tilapia, *A. alluaudi*, *H. ishmaeli* en *H. pyrrhocephalus* beschreven. Met een behulp van driedimensionaal model is de vorm van de kop en de volumes van de orale, suspensoriale en operculaire¹⁵ compartimenten gemeten. Ondanks het feit dat de gebruikte soorten een verschillende fylogenetische achtergrond hebben en verschillen in hun leefwijze en morfologie, waren de gevonden toenames van dezelfde aard en omvang. De sterkste vergroting van het kopvolume vond plaats in het suspensoriale compartiment, waarin het grootste gedeelte van de kieuwen zich bevindt. Gebaseerd op de studies die hierboven zijn beschreven is het waarschijnlijk dat andere structuren die tegen de kieuwen aanliggen, zoals de keelkaken en spieren die de keelkaken bedienen, ook van vorm zijn veranderd. Een dergelijke correlatie tussen fenotypische vergroting

van de kieuwen en verandering van omliggende structuren is recentelijk gevonden (Chapman *et al.*, 2000). In een experiment met een gesplitst nest van *P. multicolor*, vond men dat de OHO groep een langere kop had dan de ONO groep en een afgenomen diepte van de *m. sternohyoideus*, de *m. retractor dorsalis* en onderste keelkaak. Deze structuren liggen dicht tegen de kieuwen.

Als we alle andere publicaties raadplegen waar een zelfde of een vergelijkbare meetmethode is gebruikt, zien we steeds een terugkerend fenomeen: een grote variatie in de ventrale¹⁶ breedte van de kop (stang [5_L-5_R], zie Hoofdstuk 4). Deze studies gaan over bijtkracht van de orale kaken, grootte van de keelkaken in relatie tot voedseltypen, fylogenetische verschillen en verschillen in leefomgeving tussen soorten. Dit suggereert dat de ventrale breedte in zowel genotypisch als fenotypisch opzicht veel plasticiteit vertoont. De huidige studie toont aan dat een dergelijke variatie ook door fenotypische plasticiteit alleen gerealiseerd kan worden.

TOEGENOMEN ZUURSTOFEXTRACTIE DOOR VERANDERINGEN IN HET BLOED

Naast de gasuitwisseling in de kieuwen is de zuurstofbelading van het bloed en het transport naar de weefsels een essentieel proces dat beïnvloed wordt door hypoxie. De P₅₀ van het bloed van tilapia is 20 mmHg (vergelijkbaar met 13% LVZ in onze experimenten), dus kan aangenomen worden dat bij 10% LVZ de relatieve zuurstofbelading van het bloed in de kieuwen erg laag

¹⁵ Holtes ter hoogte van opeenvolgend: de bek, het oog en de kieuwdeksels, zie hfst. 5 fig 1.

¹⁶ De kant waar de buik zit.

is. Bij alle drie soorten die onderzocht zijn, was de haemoglobineconcentratie (Hb-concentratie) in het bloed van de OHO groep significant hoger dan van de ONO groep. Daarnaast was de GTP-concentratie in de rode bloedcellen van de OHO tilapia 55% verlaagd (Hoofdstuk 6). Een verlaging van de GTP-concentratie in de rode bloedcellen verlaagt in vissen de P_{50} van het Hb. Hierdoor wordt dus meer zuurstof in het bloed opgenomen onder hypoxie. In rode bloedcellen van *H. ishmaeli* werd geen verschil in GTP-concentratie gevonden. Dit suggereert dat rode bloedcellen van *H. ishmaeli* niet gevoelig zijn voor veranderingen in de GTP-concentratie. Echter, ook in *H. ishmaeli* werd geen verschil in zuurstofconsumptie gevonden tussen OHO vissen bij 10% LVZ en ONO vissen bij 80% LVZ. Het is dus waarschijnlijk dat in *H. ishmaeli* op een andere manier voor voldoende Hb-O₂ binding wordt gezorgd. Terwijl in tilapia en *A. alluaudi* geen verschillen gevonden werden in de types Hb van ONO en OHO dieren, hadden alle ONO *H. ishmaeli* duidelijk andere Hbs in hun bloed dan OHO nestgenoten. OHO *H. ishmaeli* misten vier isoHbs¹⁷ die wel aanwezig waren in ONO vissen terwijl in rode bloedcellen van OHO vissen vijf isoHbs aanwezig waren die niet gevonden werden in die van ONO nestgenoten. Het is waarschijnlijk dat het verdwijnen van vier isoHbs en het verschijnen van vijf nieuwe isoHbs een verlaging van de P_{50} van het bloed met zich meebrengt. Hierdoor neemt de zuurstofopnamecapaciteit in de kieuwen dus toe bij 10% LVZ. Zo een eenduidig

verschil in hemoglobines is totnogtoe nooit gevonden in vissen. Een dergelijke fenotypische respons is extra uniek als men bedenkt dat de productie van verschillende Hbs onder verschillende omstandigheden alleen bekend was bij dieren die drastische ontogenetische veranderingen doormaken zoals de na de geboorte bij mensen, bij levendbarende vissen of de overgang van water naar lucht bij amfibieën.

CONCLUSIES

Van vier verschillende soorten cichliden zijn broedsels enkele weken na de bevruchting, in een postlarvaal stadium, gesplitst en permanent bij 10% en 80% luchtverzadiging gehouden. In de groepen bij 10% LVZ trad geen mortaliteit op en de vissen groeiden net zo snel als OHO nestgenoten. Hoewel er duidelijke aanwijzingen waren voor een enigszins verlaagde maximum aërobe capaciteit, resulteerde hun fenotypische respons voornamelijk in een toename van de zuurstofopnamecapaciteit onder hypoxie. Deze toename werd deels gerealiseerd door een 80% vergroting van het kieuwoppervlak. Hiermee samenhangend nam ook het kopvolume toe. De sterkste volumevergroting vond plaats op de locatie waar de kieuwen zitten. De fenotypische veranderingen in de kieuwen en kop waren van vergelijkbare aard en omvang als verschillen tussen soorten uit verschillende habitats of met verschillende levensstijlen (lees zuurstofbehoefte). In OHO vissen verschilde het transport van zuurstof naar de weefsels op twee manieren van dat van ONO dieren: ten eerste was de

¹⁷ Haemoglobines die verschillen in structuur en daardoor vaak ook in functie.

Hb-concentratie verhoogd en ten tweede was de Hb-O₂ affiniteit verhoogd. Dit laatste werd op verschillende manieren gerealiseerd. Terwijl in tilapia lagere GTP-concentraties in de rode bloedcellen een hogere Hb-O₂ affiniteit tot gevolg hadden, had in *H. ishmaeli* het produceren van andere Hbs dan onder normoxie waarschijnlijk hetzelfde resultaat.

Het effect van hypoxie op belangrijke aspecten als het gedrag, voortplanting en embryoontwikkeling zijn in dit proefschrift amper belicht maar de resultaten van dit proefschrift laten zien dat cichliden over buitengewoon plastische eigenschappen beschikken die hen in staat stellen om onder zeer zuurstofarme omstandigheden te leven. Daarom moet de algemene gedachte dat chronische hypoxie desastreuze gevolgen heeft op vissen, meer worden genuanceerd. Dit proefschrift helpt ons om de effecten van zuurstoffluctuaties, een belangrijke menselijke invloed op waterademhalende organismen, beter te begrijpen. Terwijl acute en korte-termijn hypoxie resulteert in beperking van de zuurstofopname in cichliden, stelt chronische hypoxie jonge cichliden in staat om zich aan te passen aan het leven onder deze omstandigheden.

