

# Fokkerij op ziekteresistentie van Japanse oesters

Pauline Kamermans<sup>1</sup>, Marc Engelsma<sup>2</sup>, Frank Peene<sup>3</sup> en Robbert Blonk<sup>1</sup>

Rapport C025.15



<sup>1</sup> IMARES, <sup>2</sup> CVI, <sup>3</sup> Roem van Yerseke

## IMARES Wageningen UR

(IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies)

Opdrachtgever:

Nederlandse Oestervereniging  
Postbus 124  
4400 Ac Yerseke

Publicatiedatum:

9 februari 2015



**IMARES** is:

- Missie Wageningen UR: *To explore the potential of marine nature to improve the quality of life.*
- IMARES is hét Nederlandse instituut voor toegepast marien ecologisch onderzoek met als doel kennis vergaren van en advies geven over duurzaam beheer en gebruik van zee- en kustgebieden.
- IMARES is onafhankelijk en wetenschappelijk toonaangevend.

Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlandse Operationeel Programma "Perspectief voor een duurzame visserij" dat wordt medegefinancierd uit het Europees Visserijfonds (EVF): investering in duurzame visserij.



Aanbevolen format ten behoeve van citaties: Kamermans, P.; Engelsma, M.; Peene, F.; Blonk, R. (2014) Fokkerij op ziekteresistentie van Japanse oesters. IMARES Rapport C025/15

P.O. Box 68 1970 AB IJmuiden Phone: +31 (0)317 48 09 00 Fax: +31 (0)317 48 73 26 E-Mail: imares@wur.nl www.imares.wur.nl	P.O. Box 77 4400 AB Yerseke Phone: +31 (0)317 48 09 00 Fax: +31 (0)317 48 73 59 E-Mail: imares@wur.nl www.imares.wur.nl	P.O. Box 57 1780 AB Den Helder Phone: +31 (0)317 48 09 00 Fax: +31 (0)223 63 06 87 E-Mail: imares@wur.nl www.imares.wur.nl	P.O. Box 167 1790 AD Den Burg Texel Phone: +31 (0)317 48 09 00 Fax: +31 (0)317 48 73 62 E-Mail: imares@wur.nl www.imares.wur.nl
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

© 2014 IMARES Wageningen UR

IMARES, onderdeel van Stichting DLO.  
KvK nr. 09098104,  
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16.  
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U  
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

De Directie van IMARES is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van IMARES; opdrachtgever vrijwaart IMARES van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.

Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A\_4\_3\_1-V14.1

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave.....	3
Samenvatting.....	4
1. Inleiding.....	5
2. Kennisvragen.....	7
3. Methoden.....	8
3.1 Productie van broed van verschillende families in de hatchery.....	8
3.1.1. Broedstock.....	8
3.1.2. Paaiing.....	8
3.1.3. Larvenkweek.....	9
3.1.4. Micronursery en nursery.....	10
3.2. Opkweek van verschillende families in de hatchery.....	12
3.3. Opvolgen van de families in het veld.....	12
3.3.1. Overleving per familie.....	13
3.3.2. Aanwezigheid van het virus per familie.....	14
3.3.3. Groei en conditie oesters.....	14
3.4. Genetische analyse van de families.....	15
4. Resultaten.....	16
4.1. Overleving per familie.....	16
4.2. Groei en conditie per familie.....	17
4.3. Aanwezigheid van het virus per familie.....	19
4.4. Genetische analyse van de families.....	20
4.5. Vooruitzichten voor genetische selectie.....	22
5. Conclusies.....	24
Dankwoord.....	25
Kwaliteitsborging.....	25
Referenties.....	25
Verantwoording.....	26
Bijlage A. Samenvatting test aanwezigheid CVI.....	27
Bijlage B. Fokwaarden van verschillende families.....	28

## Samenvatting

Het oosterherpesvirus *OshV-1*  $\mu$ var veroorzaakt hoge sterfte onder Japanse oesters in de Nederlandse kweekgebieden. De oestersector ondervindt problemen van deze sterfte. In deze studie is geïnventariseerd of een fokprogramma waarbij oesters geselecteerd worden op resistentie tegen het oosterherpesvirus en vervolgens worden voortgeplant in een hatchery uitkomst kan geven voor deze problematiek. Ook is bekeken of een fokprogramma gebruikt kan worden ter verbetering van groei en conditie van oesters. In dit project zijn verschillende families oesterbroed opgekweekt door de hatchery van Roem van Yerseke. Om de kans aan blootstelling aan het virus te vergroten zijn de families opgekweekt in de Oosterschelde. De verliezen van de families tijdens de testperiode zijn in deze studie gebruikt om overleving van families onder infectiedruk van het oosterherpesvirus te meten. Om de groei van oesterfamilies te karakteriseren zijn de volgende kenmerken gemeten: vers lichaamsgewicht aan het begin en aan het eind van het experiment (LGbegin en LGeind), schelpgewicht (SCHELP), as-vrij drooggewicht (AVDW), en conditie (COND). Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat overleving onder druk van oosterherpesvirus, groei, en conditie van in hatchery geproduceerde Japanse oesters in buitenwater erfelijk zijn bepaald. Genetische selectie middels een fokprogramma op deze kenmerken is daarmee mogelijk. De genetische correlaties tussen diverse groeikenmerken en overleving laten zien dat selectie op overleving automatisch zal leiden tot verbetering van groeikenmerken en andersom. Omdat de correlaties niet zeer hoog zijn zal actieve selectie op beide kenmerken plaats moeten vinden om beide kenmerken te verbeteren. Een genetisch rekenmodel voorspelt dat genetische selectie op groei aan het eind van het traject een verbetering van ca. 12% per generatie kan realiseren. Overleving kan volgens dit model met circa 13% per generatie worden verbeterd. Deze resultaten bieden een goed perspectief voor verbetering van productie van oesters in de Oosterschelde door fokkerij.

## 1. Inleiding

In Nederland worden twee soorten oesters gekweekt: de Japanse oester of creuse (*Crassostrea gigas*) en de platte oester (*Ostrea edulis*). Net als andere organismen zijn beide oestersoorten gevoelig voor ziekten die tot sterfte kunnen leiden. De eencellige parasiet *Bonamia ostreae* is de voornaamste ziekteverwekker verantwoordelijk voor sterfte van platte oesters. De Japanse oester is ongevoelig voor *Bonamia*. Een andere ziekteverwekker, het oesterherpesvirus (Ostreid herpesvirus 1; OshV-1) zorgt voor sterfte van Japanse oesters.

De eerste beschrijving van een herpes-achtig virus in oesters dateert uit 1972 in de Verenigde Staten (Farley et al., 1972). In Europa is oesterherpesvirus voor het eerst waargenomen in hatcheries in Frankrijk in 1992 en op kweeklocaties in 1994. Sinds 2008 is echter een nieuwe variant van oesterherpesvirus aanwezig in Europa: OshV-1  $\mu$ var (Segarra et al., 2010). Deze variant geeft hoge sterfte onder Japanse oesters en heeft zich in korte tijd verspreid naar de belangrijkste kweekgebieden van Europa. Vanaf 2010 is de variant ook aangetroffen in de Nederlandse kweekgebieden (Engelsma et al., 2010). In het voorjaar van 2011 is voor het eerst verhoogde sterfte opgetreden in kweekgebieden in de Oosterschelde en Grevelingen. In beide gebieden werd de sterfte gerelateerd aan de aanwezigheid van het oesterherpesvirus in het vlees van dode Japanse oesters.

Het klassieke OshV-1 veroorzaakt sterfte onder oesterlarven en broed. De variant, OshV-1  $\mu$ var, lijkt virulenter te zijn voor Japanse oesters dan het oorspronkelijk beschreven OshV-1 en kan sterfte geven oplopend tot 100%. Naast sterfte onder oesterbroed geeft OshV-1  $\mu$ var ook hoge sterfte onder jonge Japanse oester. Resistentie voor OshV-1  $\mu$ var neemt toe met leeftijd en gewicht (Dégremont, 2013). Het virus kan ook worden aangetroffen in volwassen oesters maar over het algemeen zonder sterfte. Mogelijk fungeren deze oesters als reservoir voor het virus.

De oestersterfte als gevolg van het virus gaat altijd gepaard met watertemperaturen boven de 16 °C (Dégremont et al., 2013). De optimale periode voor sterfte door het virus ligt dus in de zomermaanden. Daarnaast is een plotselinge stijging in de watertemperatuur, zoals dat in de zomer kan plaatsvinden, vaak een trigger voor het ontwikkelen van ziekten bij oesters (J. F. Samain & H. McCombie, 2008)

Onderzoeksinstituut IFREMER heeft ontdekt dat oester families blootgesteld aan het virus in het veldverschillen in overleving laten zien (Dégremont et al., 2010a,b). Families met een goede overleving kunnen nakomelingen produceren die ook minder gevoelig zijn voor het virus (Sauvage et al., 2010). Door de dieren gecontroleerd te kruisen kan een fokprogramma worden uitgevoerd. Geselecteerde oesters bevatten minder virus waardoor de kans op besmetting van andere oesters ook afneemt (Dégremont, 2011; Dégremont et al., 2013). Tweede en derde generatie nakomelingen van oesters in Frankrijk geselecteerd op goede en slechte overleving laten verschil in sterfte zien: na drie zomermaanden 6% voor de tolerante families, 12% voor een controle groep en 30% voor de gevoelige families (Dégremont et al., 2010b). Vijfde generatie tolerante en gevoelige families gaf 5% sterfte bij de tolerante, 53% bij de controle en 94% bij de gevoelige groep (Dégremont, 2011). In 2010 is een fokprogramma gestart door twee bedrijven (SFC en Grainocean) en in 2012 is het SCORE project gestart, een publiek private samenwerking gecoördineerd door Le Comité National de la Conchyliculture.

De verhoogde sterfte heeft tot gevolg dat de opbouw van een nieuwe populatie wild oesterbroed minder is. Gecontroleerde productie van oesterbroed in hatcheries is in Nederland reeds enige tijd in ontwikkeling. Echter, het oesterbroed uit de hatcheries is nog steeds vatbaar voor het oesterherpesvirus. Dit is nadelig voor commerciële teelt van oesters en een directe bedreiging voor een gezonde ontwikkeling van schelpdierenkweek in de Zeeuwse wateren.

Een van de mogelijke oplossingen om in de toekomst toch over voldoende oesterbroed te beschikken is het in een hatchery gecontroleerd voortplanten van oesters waarbij ouderdieren middels een fokprogramma geselecteerd worden op resistentie tegen het oesterherpesvirus. Het in de hatchery geproduceerde broed met verhoogde resistentie wordt dan verder opgekweekt in het buitenwater. Het doel van een fokprogramma is het genetisch verbeteren van populaties voor één of meerdere kenmerken die genetisch bepaald zijn. Dit gebeurt door dieren uit een populatie te selecteren op basis van deze kenmerken, voort te planten en de nakomelingen onder gelijke omstandigheden op te kweken. Uit deze populatie nakomelingen worden weer nieuwe ouders geselecteerd, etc. In feite ontstaat met een fokprogramma een aparte populatie, specifiek "verbeterd" voor deze kenmerken.

## **2. Kennisvragen**

Het doel van het project is kennis en methodieken te ontwikkelen om de sterfte van Japanse oesters in buitenwater als gevolg van het oesterherpesvirus terug te dringen.

Hiertoe worden de volgende kennisvragen beantwoord:

- 1 - Is overleving onder infectiedruk van het oesterherpesvirus en conditie van in hatchery geproduceerde Japanse oesters in buitenwater erfelijk bepaald?
- 2 - Is selectie mogelijk op genoemde kenmerken?

### 3. Methoden

#### 3.1 Productie van broed van verschillende families in de hatchery

In dit project zijn voor de testpopulatie verschillende families oesterbroed opgekweekt door de hatchery van Roem van Yerseke. Voor een eerlijke vergelijking van families is gestreefd naar een zo klein mogelijk leeftijdsverschil tussen de families die onder gelijke omstandigheden gehouden zijn.

##### 3.1.1. Broedstock

Half juli 2012 is binnen de hatchery van Roem van Yerseke gestart met de productie van oesterfamilies. Hiervoor zijn paarijpe ouderdieren verkregen van verschillende oesterkwekers die betrokken zijn bij het project. Deze paarijpe ouderdieren kwamen van verschillende oesterpercelen op de Oosterschelde. De ouderdieren zijn bewaard op een lage temperatuur  $< 10^{\circ}\text{C}$  om verdere gonaden ontwikkeling en eventuele paaiing te voorkomen. Toen na een tweetal maanden de kwaliteit terugliep en er geen paarijpe ouderdieren meer aanwezig waren in de Oosterschelde, zijn we oesters uit de Oosterschelde gaan conditioneren alvorens ze te gaan gebruiken voor reproductie.

##### 3.1.2. Paaiing

Voor het paaien is gebruik gemaakt van een zogenaamde 'strip-spawning'. Bij deze manier van paaien worden de ouderdieren één voor één open gestoken en worden de eitjes/sperma uit het weefsel van de oester 'gestript' (Fig. 1a). Deze manier heeft als voordeel boven het paaien d.m.v. een temperatuurschock dat de eitjes/sperma goed gescheiden kunnen worden zodat zuivere families gekweekt kunnen worden. De eitjes en sperma worden in verschillende bekertjes ondergebracht (Fig. 1b) waarna de eitjes van één vrouwtje worden bevrucht met de sperma van één mannetje.



Fig. 1. Strip-spawning van een oester (a) en eitjes en sperma in bekertjes (b).

Een familie is een groep van volle broers en zussen, gevormd door een kruising tussen 1 vader en 1 moeder. Het kruisingsschema uit tabel 1 is gebruikt.



Tabel 1. Kruisingsschema productie oesterfamilies.

Mannetje/vrouwtje	1	2	3	4	5	6	7
1	Fam 1						
2	Fam 2	Fam 3					
3		Fam 4	Fam 5				
4			Fam 6	Fam 7			
5				Fam 8	Fam 9		
6					Fam 10	Fam 11	
7						Fam 12	Fam 13

De bevruchte eitjes zijn onder gebracht in de larventanks met 1 um gefilterd Oosterschelde water van 23 °C, op een dichtheid van maximaal 30 eitjes/ml. Na 24 uur is de temperatuur langzaam verhoogd naar 30 °C. Ervaring in de hatchery heeft laten zien dat met de verhoging van de temperatuur mortaliteit door het oesterherpesvirus gedurende het larvale stadium kan worden voorkomen.

### 3.1.3. Larvenkweek

In eerste instantie is gekozen om de larven op te kweken in een zogenaamd 'zugerflessensysteem'. Dit zijn glazen flessen van 8 liter waarin na de paaiing ca. 240.000 eitjes in onder kunnen worden gebracht in een dichtheid van 30 eitjes/ml (Fig. 2). Het voordeel van dit systeem is dat er 16 families tegelijkertijd opgekweekt konden worden, zodat in 4 productierondes 50 families geproduceerd konden worden. Na de tweede productieronde kwamen we er achter dat dit systeem niet aan de verwachtingen voldeed. Het systeem was moeilijk te reinigen waardoor bacteriële infecties zorgden voor onnodig veel mortaliteit gedurende het larvale stadium. Ook zorgde het kleine volume (slechts 8 liter) ervoor dat slechts een kleine groep larven per fles kon worden opgekweekt (ca. 10.000) zonder dat er mortaliteit optrad. Deze kleine hoeveelheden aan larven in het flessensysteem met daarbij de nodige uitval door bacteriële infecties zorgden ervoor dat er van de eerste twee productierondes te weinig broedjes over zijn gebleven.



Fig. 2. 8-liter flessensysteem.

Om dit probleem te voorkomen en families van voldoende grootte (minimaal 1000 broedjes) te kweken, is besloten gebruik te gaan maken van de standaard larventanks zoals die normaal gesproken gebruikt worden in de hatchery. Dit zijn conische tanks van 100L waarin na de paaiing 3 miljoen eitjes (dichtheid van 30 eitjes/ml) in onder gebracht kunnen worden (Fig. 3). Nadeel van dit systeem was dat er maar 10 tanks beschikbaar waren waardoor er minimaal 5 productierondes nodig waren om 50 families te kunnen maken. Met een gemiddeld larvaal stadium van ca 4 weken, komt dit neer op een productieperiode van ca 4,5 maand.



Fig. 3. 100-l larventanks.

Nadat de bevruchte eitjes ondergebracht waren in de larventanks (op 23 °C) is de temperatuur langzaam verhoogd naar 30 °C om eventuele mortaliteit door het oosterherpesvirus gedurende het larvale stadium te voorkomen. Na 24 uur zijn de larven voor het eerst gevoerd met in de hatchery gekweekt microalgen. Hiervoor is gebruik gemaakt van een combinatie van algensoorten die garant staat voor een goede groei en overleving gedurende het larvale stadium en daarna.

De larventanks zijn 3x per week geledigd en schoongemaakt waarbij de larven zijn gecheckt op groei en overleving. Bij deze schoonmaak beurten is bovendien het water verversed en zijn verse algen toegediend. Na een periode van ca. 14 dagen gaan de eerste larven settelen. Dit houdt in dat ze op zoek gaan naar een geschikt substraat op zich aan vast te hechten. Om te voorkomen dat er larven verloren gaan doordat ze aan de wand van de tank settelen, zijn vanaf dit moment de larventanks dagelijks schoongemaakt en verversed. Bovendien zijn de competente larven vanaf dit moment dagelijks uitgesorteerd en overgebracht naar de micronursery.

#### 3.1.4. *Micronursery en nursery*

Voor het laten settelen van de larven is gebruik gemaakt van een systeem met ondiepe ringen met een bodem van 200 µm gaas (Fig. 4). Hierop is een dun laagje fijngemalen oestergruis aangebracht (micro-cultch). Dit kalkrijke materiaal vormt een prima substraat waarop de oesterlarven kunnen vasthechten. Door toedienen van voldoende micro-algen zijn de oesterbroedjes in dit systeem opgekweekt tot ca. 2mm groot waarna ze d.m.v. een 500 µm zeef uit het cultch zijn gezeefd. Vervolgens zijn ze teruggeplaatst in dezelfde ringen om door te groeien tot het formaat van minimaal 10 mm (Fig. 4). Omdat de productieperiode uit is gelopen tot ca. 7 maanden, is besloten om de eerste batches (van juli en augustus) eind oktober 2012 langzaam af te koelen. Het formaat van 10 mm was bereikt en hierdoor

kon worden voorkomen dat er teveel verschil in grootte zou ontstaan op moment van uitzetten. Hetzelfde is eind december gedaan voor de batches van september. Eind april 2013 zijn deze batches weer langzaam (max 5 °C per week) opgewarmd totdat de zeewatertemperatuur (ca. 13 °C) was bereikt. De families die nog op een hoge temperatuur zaten, zijn juist langzaam afgekoeld naar deze temperatuur. Helaas is er in maart 2013 plotseling behoorlijke mortaliteit opgetreden onder een aantal batches (in één bak) waardoor 12 families als verloren moesten worden beschouwd.



*Fig. 4. Micro-nursery systeem met ondiepe ringen voor settlement en doorkweek tot 10mm.*

Omdat er in sommige batches nogal wat verschil in grootte is opgetreden gedurende de nursery fase, is besloten het broed voor uitzetten in het veld op 22 mei 2013 te sorteren in twee klassen: een klasse T6 (gesorteerd op een zeef van 6x6 mm) en een klasse T3 (gesorteerd op een zeef van 3x3 mm) (Fig. 5a). Het totaal versgewicht en aantal dieren per familie is bepaald. De T6 klasse is geplaatst in 4 mm BST mandjes, de T3 klasse is geplaatst in 2 mm gaas in 16 mm BST mandjes (Fig. 5b). Er zijn steeds 1000 dieren (of minder als er niet meer waren) per familie en per klasse apart in een mandje geplaatst.



Fig. 5. Tellen en wegen van de families voor het uitzetten (a) en de BST oestermanpjes waarin de families zijn uitgezet (b).

### 3.2. Opkweek van verschillende families in de hatchery

Om de verschillende families voor het experiment te produceren was veel meer tijd nodig dan voorzien en gewenst. Hierdoor liep de leeftijd van de verschillende oesterfamilies aanzienlijk uiteen (1ste familie geproduceerd in juli 2012, laatste in april 2013). Om verschillen in startgewicht te minimaliseren zijn de families die tot oktober 2012 geproduceerd zijn tot januari 2013 opgekweekt onder 28 °C. Vanaf januari 2013 tot vlak voor uitzetten in de Oosterschelde zijn deze groepen onder lage temperatuur (6 °C) opgekweekt, i.e. in rust gehouden. Vanaf oktober 2012 geproduceerde families zijn onder 28 °C opgekweekt tot vlak voor uitzetten in de Oosterschelde in juni 2013. Enkele weken voor uitzetten in de Oosterschelde zijn alle families langzaam gewend aan een watertemperatuur van 13 °C . Als gevolg van deze temperatuursbehandelingen en de verschillende data waarop families zijn geproduceerd hebben de verschillende families hebben de verschillende families op het moment van uitzetten in de Oosterschelde ook een verschillend aantal daggraden ondervonden. "Daggraden" is het cumulatieve aantal temperatuursgraden in Celsius dat een organisme ondervindt gedurende een bepaalde periode. Het aantal daggraden voor een bepaalde periode wordt berekend door de som van de gemiddelde dagtemperatuur over alle dagen. Omdat de ontwikkeling van veel (aquatische) organismen vaak sterk temperatuurafhankelijk verloopt, is het de verwachting dat de verschillende families zich dus ook in verschillende ontwikkelingsstadia bevonden op het moment van uitzetten in de Oosterschelde.

### 3.3. Opvolgen van de families in het veld

De families zijn opgekweekt in de Oosterschelde waar blootstelling aan het virus plaatsvond . Voor een eerlijke vergelijking van families is het belangrijk dat ze evenveel worden geïnfecteerd. In maart en april zijn de nodige werkzaamheden uitgevoerd in het veld m.b.t. het klaar maken van het systeem voor het ophangen van de BST oestermanpjes. Hiervoor zijn in samenwerking met derden palen gezet en lijnen bevestigd en opgespannen. Op 22 mei 2013 zijn alle families uitgezet. In totaal zijn 60 mandjes uitgezet met een T6 klasse voor alle 37 families en daarnaast nog een T3 klasse voor 22 van de 37 families (Fig. 6). De families zijn willekeurig, maar wel op gelijke ophanghoogte, over het kweekstelsel verdeeld. De families zijn gescheiden gehouden gedurende de opkweek.





Fig. 6. BST oestermandjes met verschillende families in het kweekstelsel bij Kattendijke in de Oosterschelde.

In totaal waren 37 families beschikbaar voor analyse met fractie T6 (Tabel 2).

Tabel 2. Productiedatum van de oesterfamilies die zijn uitgezet in het veld.

Productiedatum	Aantal families
11 juli 2012	1
16 juli 2012	2
14 augustus 2012	9
25 september 2012	6
2 oktober 2012	1
29 oktober 2012	6
14 januari 2013	5 (+ 1 fam alleen in T3 fractie)
21 januari 2013	4
2 februari 2013	3
<b>Totaal</b>	<b>37</b>

### 3.3.1. Overleving per familie

De verliezen van de families in de Oosterschelde in de periode van 27 juni 2013 tot de oogst op 22 oktober 2013 zijn in deze studie een maat voor overleving van families onder infectiedruk van het oosterherpesvirus. Bij temperaturen boven 16 °C wordt sterfte als gevolg van het oosterherpesvirus verwacht. Daarom is op 27 juni 2013, toen de watertemperatuur richting 16 °C steeg ) en op 22 oktober 2013 het aantal oesters per mandje geteld (Fig. 7). Het verschil in het aantal dieren per familie op deze tijdstippen is gebruikt als de overleving van de families (OVERL). Het kenmerk overleving van de families (OVERL) is weergegeven als familiegemiddelde.

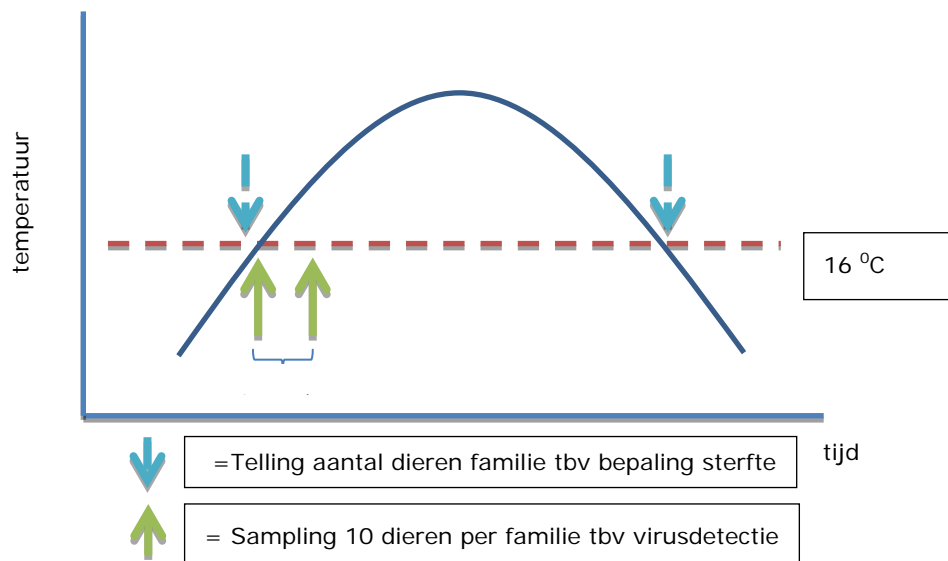


Fig. 7. Schema voor telling en bemonstering van families. Telling vond plaats in 2013 op 22 mei, 27 juni (t.b.v. correctie, zie verderop voor verklaring) en 22 oktober (eind). Sampling t.b.v. virus detectie vond plaats op 27 juni en 24 juli.

### 3.3.2. Aanwezigheid van het virus per familie

Monsternamen voor detectie van het herpes virus is op twee tijdstippen uitgevoerd: op 27 juni 2013, toen de temperatuur net  $>16\text{ }^{\circ}\text{C}$  was en een maand later op 24 juli, toen de temperatuur rond de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lag (Fig. 7). Deze informatie is gebruikt om te valideren of de families daadwerkelijk bloot gesteld zijn aan het virus en of het aannemelijk was dat de sterfte te wijten was aan het virus.

Tien oesters per familie zijn gemonsterd en apart per familie gekoeld geleverd aan het CVI. Ten behoeve van de virusdetectie zijn alleen families gesampled waar in de startfase meer dan 250 dieren in de families aanwezig waren. Dit om te voorkomen dat te veel dieren door sampling verloren zouden gaan en er aan het eind van het experiment te weinig dieren over zouden zijn om uit te kunnen selecteren. Een zogenaamde Polymerase Chain Reaction (PCR) test is gebruikt om OsHV-1  $\mu\text{var}$  aan te tonen. Deze zeer gevoelige testmethode toont de aan- of afwezigheid van genetisch materiaal van het virus aan.

### 3.3.3. Groei en conditie oesters

Om groei van oesterfamilies te karakteriseren zijn de volgende kenmerken gemeten: vers lichaamsgewicht aan het begin en aan het eind van het experiment (LG<sub>begin</sub> en LG<sub>eind</sub>), schelpgewicht (SCHELP), as-vrij drooggewicht (AVDW), en conditie (COND). De kenmerken schelpgewicht (SCHELP), asvrijdrooggewicht (AVDW), en conditie (COND) zijn voor elke familie aan individuen aan het eind van het experiment gemeten. Voor de kenmerken lichaamsgewicht aan het begin en het eind van het experiment (LG<sub>begin</sub> en LG<sub>eind</sub>) zijn familiegemiddelden genomen. De toename in gemiddeld versgewicht in de uitgroei periode is de groei. Data analyse is uitgevoerd in R software (R Development Core Team 2008).

Ten behoeve van het meten van SCHELP, AVDW en COND zijn op 22 oktober 10 levende dieren per familie bemonsterd en bij  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ingevroren voor analyse van conditie door IMARES. COND is bepaald uit het as-vrij drooggewicht en het schelpgewicht SCHELP aan het einde van de testperiode. Hiertoe is het vlees van de oesters gescheiden van de schelp en per individu gedroogd bij  $70\text{-}100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vervolgens is het gewicht van beide fracties bepaald. Daarna is het vlees verast bij  $540\text{ }^{\circ}\text{C}$  en het gewicht van de as bepaald. Het as-vrij drooggewicht is berekend door het as-gewicht van het drooggewicht af te trekken.

De conditie is berekend door het as-vrij drooggewicht te delen door het schelpgewicht (Filgueira et al., 2013).

Verder zijn 20 levende dieren per familie levend apart aangehouden in de hatchery tot het moment van selectie.

### 3.4. Genetische analyse van de families

De erfelijkheid en genetische correlaties tussen kenmerken zijn geschat voor de kenmerken lichaamsgewicht aan het begin en aan het eind van het experiment (LGbegin en LGeind), schelpgewicht (SCHELP), as-vrij drooggewicht (AVDW), conditie (COND), en overleving van de families (OVERL). Deze parameters zijn nodig voor het opstellen van een fokprogramma. De erfelijkheid en genetische correlaties zijn berekend uit een genetische statistisch model waar informatie over kenmerken gekoppeld is aan stamboom-informatie (welke vaders en moeders). Het gaat in dit rapport te ver om diep in te gaan op de statistische achtergrond en werking van deze methode zelf.

Voor genetische analyses van de kenmerken SCHELP, AVDW en COND is een statistisch lineair model met een random kenmerk voor individu gebruikt. Dit model ziet er als volgt uit:  $Y_{ij} = \mu + dgr_i + id_j + \epsilon_{ij}$ . Hierbij staat  $Y$  voor het kenmerk,  $\mu$  voor het gemiddelde in de populatie,  $dgr$  voor het fixed effect voor het aantal daggraden,  $id$  voor het random effect voor het individu, en  $\epsilon$  voor de residuele fout.  $Dgr$  was alleen voor het kenmerk SCHELP significant en is dus alleen voor dit kenmerk meegenomen in de statistische analyse. De genetische relaties tussen individuen worden berekend met behulp van de stamboom-informatie en geven in de analyse gewicht aan het random effect  $id$ . Voor genetische analyses van de kenmerken LGbegin, LGeind en OVERL is een statistisch lineair model met een random kenmerk voor familie geanalyseerd. Dit model ziet er als volgt uit:  $Y_{ij} = \mu + dgr_i + familie_j + \epsilon_{ij}$ . Hierbij is  $dgr$  een fixed effect voor daggraden, alleen meegenomen voor het kenmerk LGeind, en  $familie$  is het random effect voor de familie (ook hier wordt het effect bepaald door de stamboom).

De erfelijkheid ( $h^2$ ) geeft weer hoe sterk een kenmerk erfelijk is bepaald en dus hoe op een kenmerk kan worden geselecteerd. De erfelijkheid wordt berekend uit de ratio van de genetische en de fenotypische variatie zoals bepaald uit het genetisch model, respectievelijk aangeduid als  $\sigma^2_A$  en  $\sigma^2_P$  van een kenmerk in de populatie als:  $h^2 = \sigma^2_A / \sigma^2_P$ . Fenotypische correlaties geven aan in hoeverre twee kenmerken met elkaar samenhangen. In deze samenhang zijn genetische factoren meegenomen. Fenotypische correlaties worden berekend volgens  $\sigma_{(P1,P2)} / \sigma_{(P1)}\sigma_{(P2)}$  waarbij  $\sigma_{(P1,P2)}$  de covariantie tussen fenotypes is en  $\sigma_{(P1)}$  en  $\sigma_{(P2)}$  de fenotypische standaarddeviaties van kenmerken 1 en 2. Genetische correlaties geven aan in hoeverre twee kenmerken genetisch samenhangen. Bijvoorbeeld: een hoge positieve correlatie duidt aan dat selectie op het ene kenmerk een positief effect heeft op het andere kenmerk, óók wanneer hier niet op wordt geselecteerd. Genetische correlaties worden berekend volgens  $\sigma_{(A1,A2)} / \sigma_{(A1)}\sigma_{(A2)}$  waarbij  $\sigma_{(A1,A2)}$  de covariantie tussen genotypes is en  $\sigma_{(A1)}$  en  $\sigma_{(A2)}$  de genetische standaarddeviaties van kenmerken 1 en 2.

Alle genetische analyses zijn uitgevoerd in ASREML software (Gilmour et al. 2006), gebruik makend van stamboom-informatie.





#### 4.2. Groei en conditie per familie

Het gemiddelde gewicht per individu vertoont verschillen per familie op 27 juni 2013 (Fig. 10). De relatief kleinere oesters bleken vlak na uitzetten onverwacht door de mazen van de 4 mm BST mandjes heen te kunnen vallen. Er is echter geen relatie gevonden tussen sterfte en gewicht (Fig. 11, correlatie =  $-0.01$ ,  $p=0.9364$ ). Dit maakt het aannemelijk dat de opgetreden verliezen in de periode tot 27 juni niet alleen te wijten zijn aan verlies door "ontsnapping" van kleine oesters. Voor verdere analyses is voor de zekerheid alsnog alleen met data uit de periode 27 juni tot 22 oktober 2013 gewerkt.

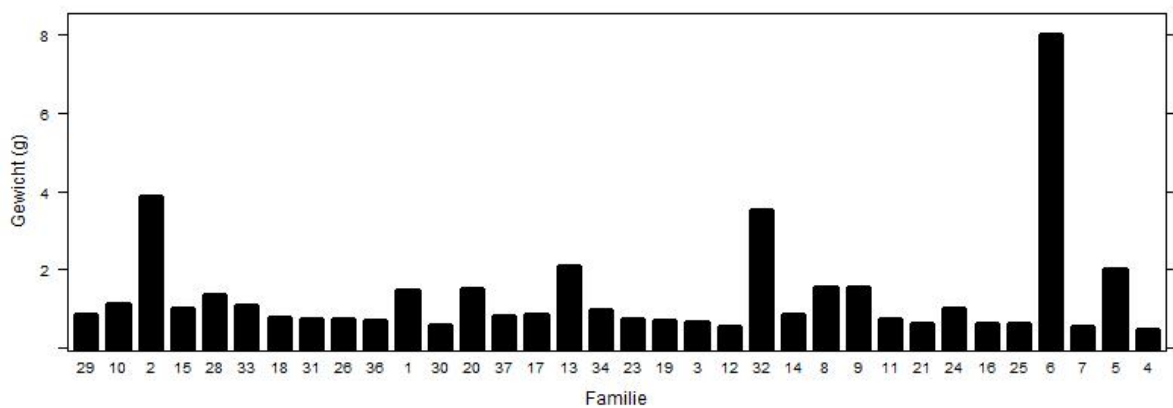


Fig. 10. Gemiddeld individueel gewicht per familie op 27 juni 2013 (alleen in T6 klasse).

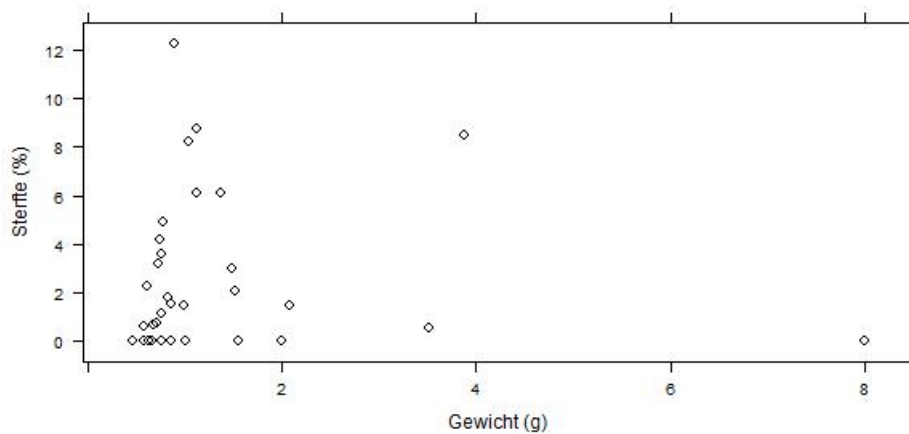


Fig. 11. Relatie tussen startgewicht bij uitzetten in het veld 22 mei en verlies (in de grafiek aangegeven als "sterfte") per familie tussen 22 mei en 27 juni 2013 (alleen in T6 klasse).

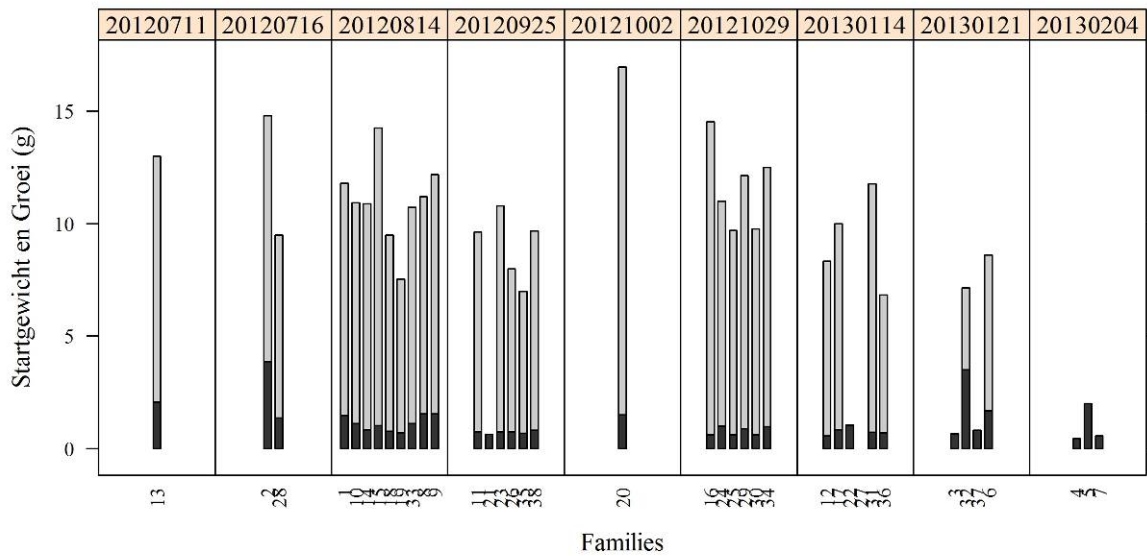


Fig. 12. Gemiddeld startgewicht op 27 juni 2013 en eindgewicht op 22 oktober 2013 van de oesterfamilies (alleen in de T6 klasse). Productiedatum is per groep aangegeven.

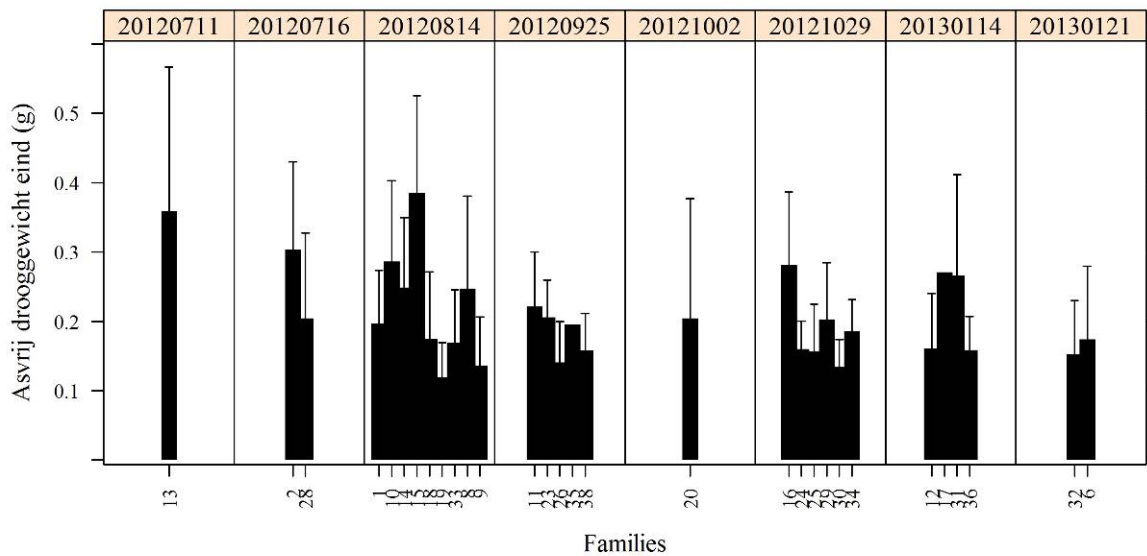


Fig. 13. As-vrij drooggewicht van de oesterfamilies op 22 oktober 2013 (alleen in de T6 klasse). Productiedatum is per groep aangegeven.

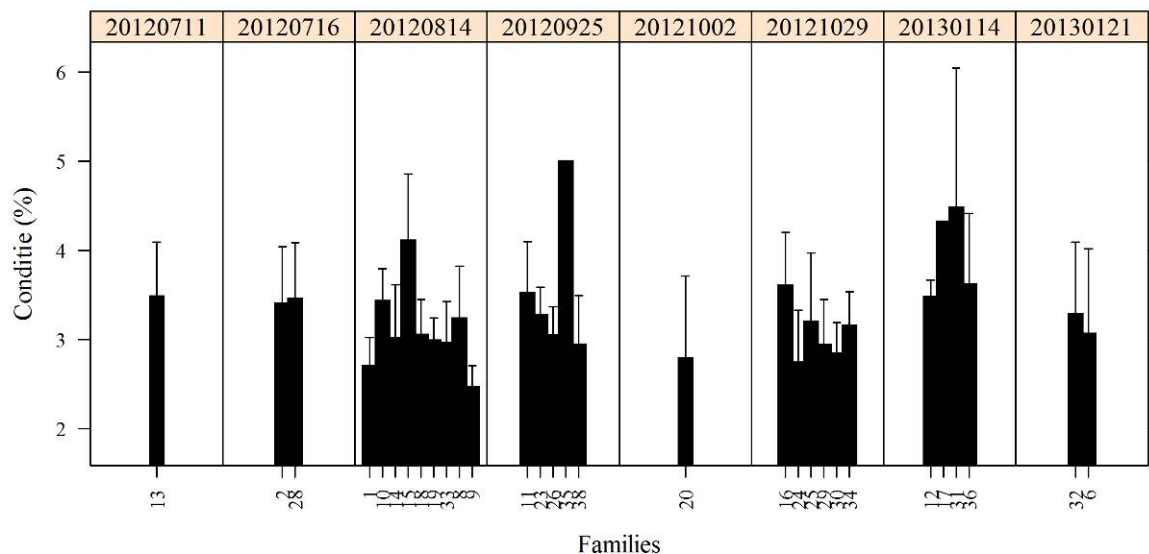


Fig. 14. Conditie van de oesterfamilies op 22 oktober 2013 (alleen in de T6 klasse). Productiedatum is per groep aangegeven.

Uit de resultaten blijkt dat er een flinke variatie is in startgewicht, groei, overleving en conditie van verschillende oesterfamilies. In figuur 12 lijkt de groei van oesters afhankelijk van het moment van productie. Daarbij zijn twee perioden te onderscheiden: de families geproduceerd in de periode van 11 juli 2012 tot 2 oktober 2012 laten een aflopende groei over het gehele traject zien, waarbij de laatst geproduceerde families minder gegroeid zijn dan de eerste geproduceerde families. Families geproduceerd in de periode van 2 oktober juli 2012 tot 4 februari 2013 laten ook een aflopende groei over het gehele traject zien, waarbij de eerste geproduceerde families (2 oktober 2012 en vlak daarna) meer groeiden dan de daarvoor geproduceerde families (periode 11 juli 2012 tot 2 oktober 2012). Er lijkt dus een effect van periode van productie op groei. De meest waarschijnlijke verklaring hiervoor is het aantal daggraden van kweek in de hatchery, zoals verder beschreven onder de resultaten van de genetische analyse. Of deze verschillen erfelijk zijn, en de correlaties tussen de verschillende kenmerken is ook in de resultaten van de genetische analyse beschreven.

#### 4.3. Aanwezigheid van het virus per familie

Op 27 juni en 24 juli 2013 zijn vijftientig families met T6 klasse getest op aanwezigheid van het oosterherpesvirus: 1, 3, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 38. Resultaten zijn weergegeven in bijlage A. Deze families hadden op 27 juni meer dan 250 individuen en konden daarom veilig bemonsterd worden zonder dat er naar verwachting te veel verlies op zou treden om selectie onmogelijk te maken.

Op 27 juni 2013 is OsHV-1 slechts in 1 familie (nr 18) aangetroffen. Op 24 juli is OsHV-1 is aangetroffen in de meeste families. Uitzonderingen zijn families 17 (maar n=1) en 20. Het lijkt redelijk om aan te nemen dat alle families onder infectiedruk van het virus hebben gestaan. Verder zijn er een aantal families (21, 26, 35 en 38) waarin geen enkele oester meer vlees had (100% sterfte) en welke we dus niet hebben kunnen testen, maar waar gezien de resultaten de kans zeer groot was dat deze dieren geïnfecteerd zijn geraakt door het virus.

#### 4.4. Genetische analyse van de families

De gemiddelde resultaten voor erfelijkheden van verschillende modellen worden hieronder gepresenteerd in tabel 3. Uit de analyses bleek een redelijke tot zeer hoge erfelijkheid voor de groei gerelateerde kenmerken LGbegin, LGeind, SCHELP, AVDW en COND. Dit betekent dat selectie op deze kenmerken zeer effectief kan zijn. "Normaliter" hebben groeikenmerken in aquatische dieren een erfelijkheid van ca. 0.30.

Tabel 3. Erfelijkheden, fenotypische correlaties en genetische correlaties voor de kenmerken lichaamsgewicht begin en het eind van het experiment (LGbegin en LGeind), schelpgewicht (SCHELP), asvrijdrooggewicht (AVDW), conditie (COND), en overleving van de families (OVERL) voor oesterfamilies in de Oosterschelde. SCHELP, AVDW, COND en OVERL zijn aan het eind van het experiment gemeten. Diagonaal (geel cursief): gemiddelde erfelijkheid per kenmerk; boven de diagonaal: fenotypische correlaties; onder de diagonaal: genetische correlaties.

	LGbegin	LGeind	SCHELP	AVDW	COND	OVERL
LGbegin	<i>0.68</i>	0.23	0.31	0.23	-0.04	0.10
LGeind	0.80	<i>0.32</i>	0.59	0.57	0.10	-0.10
SCHELP	0.62	0.31	<i>0.54</i>	0.89	0.22	-0.16
AVDW	0.54	0.11	0.89	<i>0.41</i>	0.61	-0.21
COND	-0.06	-0.57	-0.14	0.34	<i>0.58</i>	-0.17
OVERL	0.73	0.54	0.48	0.72	0.67	<i>0.10</i>

Voor de kenmerken SCHELP en LGeind bleek het effect van het aantal daggraden (zie uitleg in paragraaf 2.2) een significant effect. Daggraden (dgr) is daarom opgenomen in de statistisch genetische analyses voor deze kenmerken. Het kan echter niet worden uitgesloten dat de lange benodigde periode voor productie van families tot meer tijdseffecten en mogelijke niet opgemerkte verschillen in opkweek hebben geleid. Door deze effecten ontstaan er zeer waarschijnlijk verschillen tussen families die niet perse genetisch van aard zijn. In de statistische analyse zijn deze effecten moeilijk tot niet te onderscheiden van de genetische

Naast de mogelijke tijdseffecten heeft het experiment ook hinder ondervonden van verlies van kleinere fracties oesters uit families. In sommige gevallen zijn families zelfs geheel verdwenen tijdens het experiment. Het gevolg hiervan is dat de testpopulatie, met name voor kenmerken LGbegin, LGeind, SCHELP, AVDW en COND, niet meer normaal verdeeld raakt waardoor de schatting van genetische parameters "biased" raakt. Hierdoor worden de uiteindelijke resultaten mogelijk vervormd.

Helaas verzwakt dit de huidige analyse en de resultaten. Mogelijk zijn de gemeten erfelijkheden overschat ten opzichte van de daadwerkelijke waarde. Hierdoor wordt de daadwerkelijke variatie tussen families opgerekt. Omdat de verdelingen van de kenmerken niet extra afwijken van normaliteit is het de verwachting dat het effect van bias beperkt is en dat de daadwerkelijk erfelijkheden juist zeer laag zijn.

Correlaties geven een richting aan voor de relatie tussen twee kenmerken. Door de wat tegenvallende hatcheryproductie van families en het grote tijdsverschil tussen productie van de eerste en de laatste families zijn correlaties vaak niet significant, waardoor resultaten lastiger te interpreteren zijn. Hieronder worden de conclusies weergegeven.

##### 1. Relaties tussen groei gerelateerde kenmerken zoals verwacht

De correlaties tussen groei gerelateerde kenmerken (LGbegin, LGeind, SCHELP, AVDW en COND) zijn naar verwachting allen positief, hoewel niet zeer hoog. Een hogere correlatie was verwacht. Mogelijk zijn de matig duidelijke uitkomsten te wijten aan de problematiek (verschillende leeftijden, temperatuursbehandelingen in de hatchery en selectieve uitval) rondom productie van families.

Opvallend is de redelijk hoge genetische correlatie tussen LGBegin en LGeind: deze is 0.80 wat aangeeft dat, in het geteste traject, jonge grote oesterfamilies zeer waarschijnlijk ook op latere leeftijd relatief groter zijn (Tabel 3). Een duidelijke verwachte fenotypische correlatie tussen SCHELP en AVDW van 0.89 (Tabel 3) is ook goed zichtbaar in figuur 15. Dit betekent dat dieren met grotere schelpen ook relatief veel droge stof, dus vlees bevatten, en niet meer water.

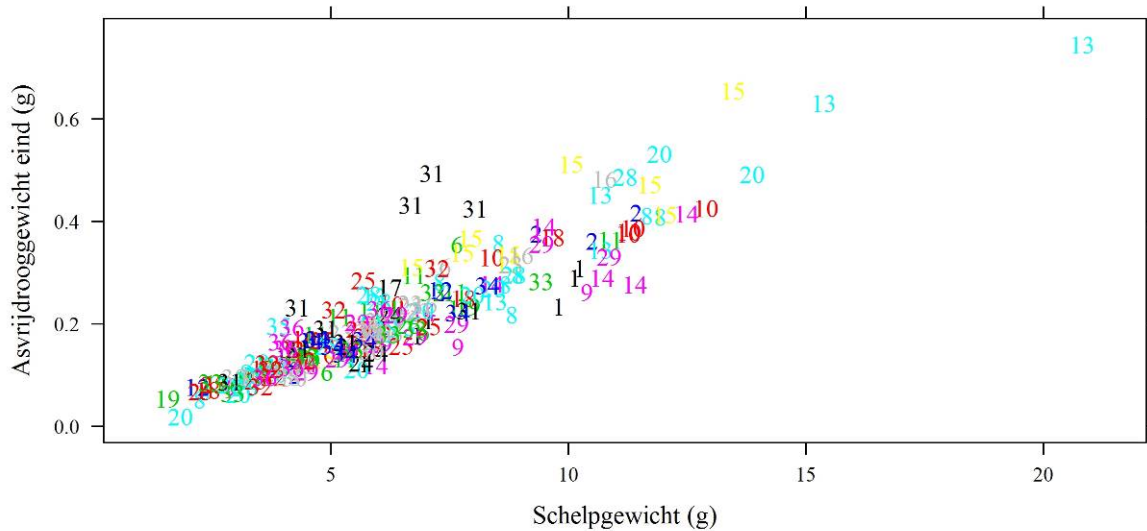


Fig. 15. Relatie tussen AVDW (Asvrijdrooggewicht) en SCHELP (Schelpgewicht) op 22 oktober 2013 (alleen in de T6 klasse). De verschillende kleuren en nummers geven de individuen per familie weer.

## 2. Relatie eind-lichaamsgewicht en conditie genetisch negatief

De resultaten laten zien dat de meeste kenmerken genetisch zwak en negatieve correlatie hebben met conditie. Met name LGeind heeft een sterkere negatieve genetische correlatie met conditie (-0.57, tabel 3). Kennelijk neemt conditie, genetisch gezien, af bij hoger eind-gewicht. Dit kan te maken hebben met een relatief hoger gewicht van de schelp, maar het is niet helemaal duidelijk hoe dit komt.

Opvallend is het gebrek aan fenotypische correlatie tussen LGeind en COND (0.1, tabel 3). Het ontbreken van een correlatie is te zien in figuur 16.



huidig geteste groeitraject te boeken. De per kenmerk te behalen responsen zijn weergegeven in tabel 4. De berekende responsen zijn bepaald met een selectiepercentage van 5%. Dit percentage geeft een in aquacultuur fokprogramma's gangbare intensiteit (i).

Uit dit model blijkt dat dat genetische selectie het kenmerk lichaamsgewicht aan het eind van het traject een verbetering van ca 12% per generatie kan realiseren. Overleving kan volgens dit model met circa 13% per generatie worden verbeterd (Tabel 4).

## 5. Conclusies

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat overleving onder druk van oosterherpesvirus en andere invloeden in het buitenwater, groei, en conditie van in hatchery geproduceerde Japanse oesters in buitenwater erfelijk zijn bepaald. Genetische selectie en verbetering middels een fokprogramma op deze kenmerken is daarmee mogelijk. Deze positieve resultaten voor selectie bieden de Nederlandse oestersector de kans om genetische lijnen, speciaal voor Nederlands buitenwater te ontwikkelen, en om de sector een impuls te geven in haar productiviteit.

Resultaten van selectie zijn te allen tijde afhankelijk van de omgeving. Wanneer de omgevingsfactoren van selectiepopulaties en volgende generaties verschillen (hoge vs lage temperaturen/aanwezigheid voedsel etc) kan het resultaat van selectie afwijken van de verwachting. Zoals eerder opgemerkt kan het niet worden uitgesloten dat er door de uitgestrekte periode van productie van families omgevingseffecten verstrengeld zijn geraakt met familie-effecten. Helaas verzwakt dit de huidige analyse en de resultaten.

Bij eventueel verdere acties op het vlak van fokkerij van oesters moet extra aandacht worden geschonken aan de periode van productie van de verschillende families, om een betere genetische evaluatie mogelijk te maken. Ook het (letterlijk) uitvallen van kleinere fracties oesters geeft problemen bij een nauwkeurige analyse. Ook de opkweek van oesterfamilies in het buitenwater moet dus verbeterd worden.

Indien selectie wordt uitgevoerd, levert dit geen volledige basis voor een ouderpopulatie Japanse oesters in een fokprogramma met behoud van genetische diversiteit. Verder kweken met de geselecteerde ouders, zonder voldoende aanvulling met dieren die de genetische diversiteit verbreden, zal zeer snel tot inteelt en inteeltdepressie van de oesterpopulaties leiden. Om wel een volledige basis te creëren moet het aantal families en de grootte van de testpopulatie uitgebreid worden.



## Dankwoord

Graag bedanken wij Emiel Brummelhuis, Mehdi Ghourabi, Kasper Brandt, Nienke ten Brinke en Johan de Bat voor hun bijdrage aan het veld en lab werk.

## Kwaliteitsborging

IMARES beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 124296-2012-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 december 2015. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V. Daarnaast beschikt het chemisch laboratorium van de afdeling Vis over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 1 april 2017 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie.

## Referenties

- Dégremont L, P Soletchnik, P Boudry (2010a) Summer mortality of selected juvenile Pacific oyster *Crassostrea gigas* under laboratory conditions in comparison with field performance. *Journal of Shellfish Research* 29: 847–856
- Dégremont L, E Bédier, P Boudry (2010b) Summer mortality of hatchery-produced Pacific oyster spat (*Crassostrea gigas*) II. Response to selection for survival and its influence on growth and yield. *Aquaculture* 299: 21–29
- Dégremont L (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317: 94–98
- Dégremont L (2013) Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 416–417: 129–134
- Engelsma MY, Roozenburg I, Voorbergen-Laarman M, et al. (2010) Eerste detectie van oesterherpesvirus OsHV-1 in Nederland. *Aquacultuur* 25:36-39
- Farley CA, Banfield WG, Kasnic GJ, et al. (1972) Oyster herpes-type virus. *Science* 178: 759-760
- Filgueira R., L.A. Comeau, T. Landry, J. Grant, T. Guyondet, A. Mallet. 2013. Bivalve condition index as an indicator of aquaculture intensity: A meta-analysis. *Ecological Indicators* 25:215-229.
- Gilmour, A. R., Gogel, B. J., Cullis, B. R. and Thompson, R., 2006. ASReml User Guide Release 2.0. VSN International Ltd. Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.R-project.org>.
- Samain J. F. & H. McCombie, 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. Versailles: Quae Editions
- Sauvage C, Boudry P, de Koning DJ, et al. (2010) QTL for resistance to summer mortality and OsHV-1 load in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Anim Genet* 41:390-399
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, et al. (2010) Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res* 153:92-99

## Verantwoording

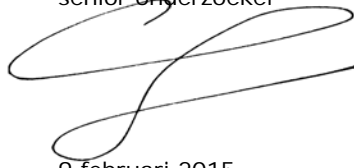
Rapportnummer : C025.15

Projectnummer : 4304103601

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het betreffende afdelingshoofd van IMARES.

Akkoord: Prof. Dr. A. Smaal  
senior onderzoeker

Handtekening:



Datum: 9 februari 2015

Akkoord: Dr. Ing. R. Trouwborst  
afdelingshoofd Delta

Handtekening:



Datum: 9 februari 2015

## Bijlage A. Samenvatting test aanwezigheid CVI

Resultaten van de analyse van aanwezigheid van het oosterherpesvirus (OsHv-1) in oesters verzameld op 27 juni en 24 juli 2013. Per familie is aangegeven wat het totaal gewicht was (totaal gewicht (g)), het gemiddelde gewicht per individu (gem. gewicht (g)), het aantal oesters (N oesters), het aantal dode oesters (N dood), het percentage sterfte (% sterfte), het aantal monsters dat per familie is geanalyseerd op OsHv-1 (N pools), het aantal monsters dat positief scoorde op aanwezigheid van het virus (N pools pos OsHv-1) en het percentage positieve monsters (% pos).

6/27/2013		7/24/2013															
Familie	totaal gewicht (g)	gem. gewicht (g)	# oesters	# dood	% sterfte	# pools	# pools pos OsHv-1	% pos	Familie	totaal gewicht (g)	gem. gewicht (g)	# oesters	# dood	% sterfte	# pools	# pools pos OsHv-1	% pos
1	60.2	2.2	28	0	0.0	8	0	0.0	1	59.8	1.9	31	19	61.3	4	3	75.0
3	17.6	0.6	32	0	0.0	3	0	0.0	3	20.1	0.6	35	34	97.1	1	1	100.0
8	68.5	2.4	29	0	0.0	8	0	0.0	8	70.2	2.1	34	17	50.0	6	5	83.3
9	42.2	1.4	30	1	3.3	15	0	0.0	9	59.2	1.7	35	26	74.3	9	3	33.3
10	34.8	1.2	29	0	0.0	14	0	0.0	10	71.7	2.1	34	20	58.8	14	12	85.7
11	21.0	0.7	32	1	3.1	15	0	0.0	11	35.9	1.0	35	27	77.1	6	3	50.0
14	31.4	1.1	29	0	0.0	15	0	0.0	14	73.2	2.3	32	5	15.6	27	20	74.1
15	38.9	1.3	29	1	3.4	14	0	0.0	15	48.6	1.3	33	26	78.8	7	4	57.1
16	20.6	0.6	32	1	3.1	-	0	-	16	62.7	1.6	40	18	45.0	6	1	16.7
17	29	0.7	39	0	0.0	35	0	0.0	17	24.6	0.8	32	31	96.9	1	0	0.0
18	20.8	0.7	30	0	0.0	30	4	13.3	18	35.7	1.7	32	2	6.3	15	31	87.5
19	23.1	0.8	29	1	3.4	13	0	0.0	19	46.6	1.6	30	8	26.7	11	2	18.2
20	23.4	0.8	31	0	0.0	7	0	0.0	20	32.3	0.9	29	5	17.2	13	0	0.0
21	25.4	0.8	31	0	0.0	14	0	0.0	21	24.1	0.3	48	46	208.0	leeg	0	0.0
22	25.2	0.9	30	0	0.0	14	0	0.0	22	32.8	1.0	32	24	75.0	9	7	77.8
23	23.7	0.7	36	1	2.8	10	0	0.0	23	32.8	1.0	32	24	75.0	9	7	77.8
26	16.8	0.5	32	2	6.3	12	0	0.0	26	16.1	0.4	39	39	100.0	leeg	0	0.0
28	73.5	2.3	32	0	0.0	14	0	0.0	28	106.5	3.7	29	6	20.7	12	4	33.3
30	22	0.6	34	2	5.9	-	0	-	30	33.4	1.0	35	20	57.1	7	5	71.4
31	26	0.7	37	0	0.0	11	0	0.0	31	35.8	1.1	32	24	75.0	8	3	37.5
33	61.5	2.1	29	1	3.4	9	0	0.0	33	40.6	1.2	33	23	69.7	10	2	20.0
34	25.2	1.0	26	0	0.0	5	0	0.0	34	39.6	1.0	41	23	56.1	9	8	88.9
35	18.3	0.6	31	2	6.5	12	0	0.0	35	12.3	0.3	37	37	100.0	leeg	0	0.0
36	21.4	0.7	31	3	9.7	12	0	0.0	36	28.3	0.9	30	29	96.7	1.0	1	100.0
38	34.2	1.1	31	1	3.2	11	0	0.0	38	23.3	0.6	37	37	100.0	leeg	0	0.0
vers dood	31.3	1.6	20	3	nvt	4	0	0.0									

## Bijlage B. Fokwaarden van verschillende families



familie	sire	dam	breeding values and se				rank		Weighted index	Rank	TOP 10
			bw	se	surv	se	rank	surv			
1	dam7	sire8	0.095	1.117	-0.003	0.031	22.0	14.0	18.0	13	
2	dam2	sire2	0.534	1.144	0.011	0.031	27.0	26.0	26.5	4.5 TOP	
3	dam22	sire23	-0.004	1.200	0.000	0.031	14.5	17.5	16.0	17	
6	dam23	sire22	0.071	1.129	0.007	0.031	18.5	23.5	21.0	8.5 TOP	
7	dam25	sire24	0.053	1.204	0.003	0.032	17.0	20.0	18.5	11	
8	dam7	sire7	0.201	1.117	-0.005	0.031	23.0	9.0	16.0	17	
11	dam10	sire11	-0.042	1.141	-0.005	0.031	12.5	6.5	9.5	23.5	
12	dam18	sire20	-0.246	1.126	-0.003	0.031	7.5	12.5	10.0	21	
13	dam1	sire1	-0.098	1.145	-0.005	0.031	10.0	10.0	10.0	21	
14	dam5	sire6	0.046	1.117	0.006	0.031	16.0	22.0	19.0	10 TOP	
16	dam15	sire16	0.085	1.120	-0.002	0.031	20.5	15.5	18.0	13	
17	dam19	sire21	0.256	1.145	0.002	0.031	24.0	19.0	21.5	7 TOP	
18	dam4	sire5	-0.659	1.117	-0.005	0.031	1.0	8.0	4.5	26.5	
20	dam13	sire14	0.921	1.148	0.019	0.031	30.0	30.0	30.0	1 TOP	
21	dam11	sire11	-0.042	1.141	-0.005	0.031	12.5	6.5	9.5	23.5	
23	dam9	sire10	0.260	1.142	0.003	0.031	25.0	21.0	23.0	6 TOP	
24	dam14	sire16	0.085	1.120	-0.002	0.031	20.5	15.5	18.0	13	
25	dam15	sire17	-0.136	1.142	0.007	0.031	9.0	25.0	17.0	15	
26	dam12	sire13	-0.387	1.142	-0.009	0.031	5.0	4.0	4.5	26.5	
27	dam20	sire19	0.764	1.146	0.014	0.031	28.5	28.5	28.5	2.5 TOP	
29	dam14	sire15	0.320	1.142	0.013	0.031	26.0	27.0	26.5	4.5 TOP	
30	dam17	sire18	-0.544	1.120	-0.017	0.031	3.5	1.5	2.5	29	
31	dam18	sire19	0.764	1.146	0.014	0.031	28.5	28.5	28.5	2.5 TOP	
32	dam22	sire22	0.071	1.129	0.007	0.031	18.5	23.5	21.0	8.5 TOP	
33	dam8	sire4	-0.251	1.140	-0.007	0.031	6.0	5.0	5.5	25	
34	dam16	sire18	-0.544	1.120	-0.017	0.031	3.5	1.5	2.5	29	
35	dam12	sire9	-0.599	1.142	-0.013	0.031	2.0	3.0	2.5	29	
36	dam19	sire20	-0.246	1.126	-0.003	0.031	7.5	12.5	10.0	21	
37	dam21	sire23	-0.004	1.200	0.000	0.031	14.5	17.5	16.0	17	
38	dam11	sire12	-0.045	1.142	-0.004	0.031	11.0	11.0	11.0	19	