

DNA-analyse: achter de grenzen van de biometrie

DNA analysis: beyond the limits of morphometrics

PAUL W. WENINK, COR J. SMIT, MARCEL G.J. TILANUS, WIM B. VAN MUISWINKEL & ALLAN J. BAKER

De Nederlandse getijdegebieden zijn van groot belang voor veel trekkende watervogelsoorten. Ze vervullen een functie als ruigebied (Boere 1976) en zijn belangrijk voor het aanleggen van vetreserves die nodig zijn om de lange reis naar de broed- of overwinteringsgebieden te kunnen volbrengen (o.a. Piersma & Jukema 1990). Het totaal aantal watervogels in de Nederlandse Waddenzee in het najaar bedraagt ongeveer 900 000 exemplaren (Smit & Wolff 1980). In het Deltagebied nemen de aantallen geleidelijk toe in de loop van de herfst. Hier zijn de grootste aantallen watervogels in december en januari aanwezig: ongeveer 600 000 (Meininger *et al.* 1984).

Waddenzee en Delta liggen voor watervogels op een strategisch heel belangrijke positie. Ze liggen op een kruispunt van trekwegen tussen de overwinteringsgebieden langs de kusten van West-Europa en West-Afrika en de broedgebieden op de toendra's van het hoge noorden. De broedgebieden strekken zich uit van NO-Canada in het westen tot Centraal-Siberië in het oosten (Smit & Piersma 1989). In de doortrek- en overwinteringsgebieden komen deze verschillende broedpopulaties bij elkaar. Veel watervogelsoorten zijn buiten de broedtijd met meer dan één populatie in de Waddenzee en de Delta vertegenwoordigd. Voor zover mogelijk kan daarom alleen in de broedgebieden van gescheiden populaties gesproken worden. Soms zijn de broedpopulaties van een soort aan de hand van lichaamsmaten, via de biometrie, van elkaar te onderscheiden. Er kan echter ook zoveel overlap zijn in de lichaamsmaten van verschillende populaties dat dit niet mogelijk is, zelfs niet na een geavanceerde statistische analyse van de meetgegevens (o.a. Wymenga *et al.* 1990).

Ringprogramma's hebben tot dusver de meeste informatie over trekroutes opgeleverd (Speek & Speek 1984). Vondsten en terugvangsten hebben echter een vrij incidenteel karakter en omvatten vaak maar een deel van de trekroute van een soort. Van veel doortrekkende vogels is nog steeds niet goed bekend uit welk broedgebied zij afkomstig zijn en waar zij de winter doorbrengen, ook doordat populaties binnen een soort verschillende trekstrategieën kunnen hebben. Het lijkt niet mogelijk om deze vragen met de bestaande technieken op te lossen. Daarom hebben wij in de afgelopen jaren

gewerkt aan het toepasbaar maken van een techniek, waarmee het mogelijk is om afzonderlijke vogels "onder de veren te kijken". Basis van deze techniek is de analyse van een klein deel van het genetisch materiaal van een vogel. Uitgaande van slechts een enkele druppel bloed kan het DNA van een vogel worden gekarakteriseerd. In dit artikel laten wij zien dat het mogelijk is om verschillen in het DNA te gebruiken om vogelpopulaties te onderscheiden. Het onderzoek is in eerste instantie gericht op één soort.

De beschikbare kennis over de Bonte Strandloper *Calidris alpina*

Bonte Strandlopers behoren tot de meest talrijke steltlopers in de Nederlandse getijdegebieden. In de Nederlandse Waddenzee zijn maximaal 274 000 exemplaren geteld (Boere & Smit 1980), in de Delta maximaal 110 000 (Meininger *et al.* 1984). Wereldwijd worden er van de Bonte Strandloper zes (Prater *et al.* 1977) tot zeven (Greenwood 1986) ondersoorten herkend op basis van verschillen in lichaamsmaten. De Bonte Strandloper is morfologisch één van de best gedifferentieerde steltloper-soorten. Dit wil zeggen dat de broedpopulaties onderling een vrij grote variatie in lichaamsmaten vertonen. Over het bestaan van sommige ondersoorten bestaat desondanks onduidelijkheid vanwege de overlap in lichaamsmaten tussen de broedpopulaties. Verschillen in grootte tussen de twee sexen, die uiterlijk niet van elkaar zijn te onderscheiden, dragen hier toe bij.

De Bonte Strandlopers die voorkomen langs de kusten van West-Europa en West-Afrika maken gebruik van de zogenaamde Oostatlantische trekbaan (Smit & Piersma 1989). De volgende ondersoorten of populaties worden hier herkend:

- (1) Een kleine populatie afkomstig uit NO-Groenland, behorende tot de ondersoort *arctica*, die overwintert langs de kusten van West-Afrika. De grootte van deze populatie wordt geschat op 15 000 exemplaren (Smit & Piersma 1989).
- (2) Een populatie broedend op IJsland en ZO-Groenland, behorende tot de ondersoort *schinzii*, die evenals de ondersoort *arctica* via de Engelse kust trekt naar de overwinteringsgebieden langs de

kusten van West-Afrika. Deze populatie heeft een omvang van 800 000 vogels (Smit & Piersma 1989).

(3) Een populatie broedend in Noord-Scandinavië en West-Siberië, behorende tot de ondersoort *alpina*. Deze overwintert langs de kusten van West- en Zuid-Europa en in Noord-Afrika. Van de Bonte Strandlopers in de Nederlandse Waddenzee en de Delta behoren de meeste tot deze ondersoort. De grootte van deze populatie wordt geschat op ruim 1.3 miljoen vogels (Smit & Piersma 1989).

(4) Een kleine populatie, in totaal naar schatting slechts 2000 paren, eveneens aangeduid met *schinzii*, die broedt in de landen rond de Oostzee en die overwintert langs de kusten van ZW-Frankrijk, het Iberisch schiereiland en NO-Marokko (Jönsson 1986).

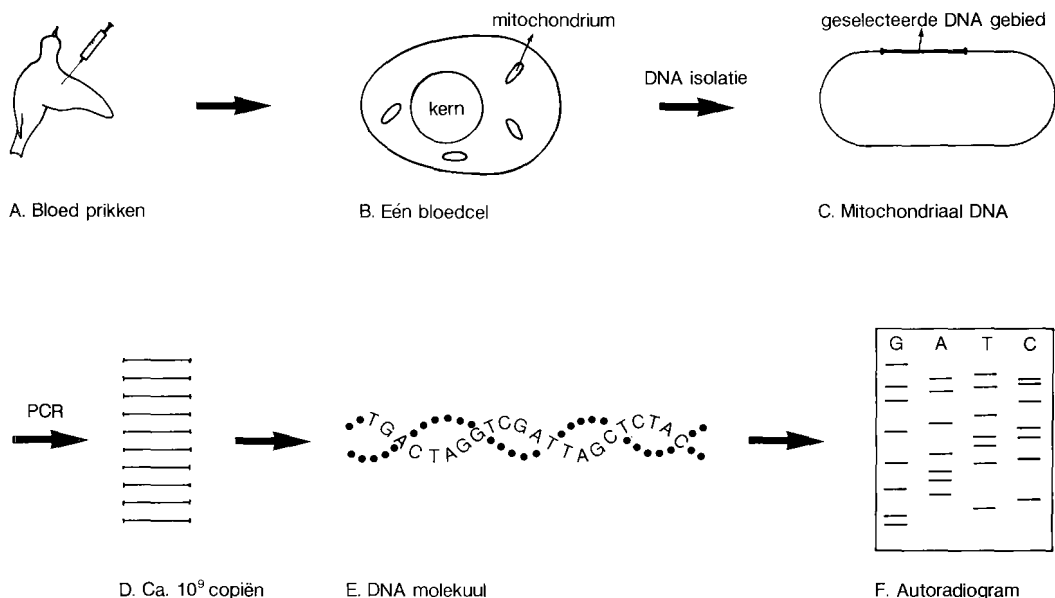
(5) Er bestaan aanwijzingen dat vogels van de Centraal- en Oostsiberische ondersoort *sakhalina* zo nu en dan in de Waddenzee opduiken (Boere & Smit 1980). De ligging van de geografische grens tussen de broedgebieden van *alpina* en *sakhalina*, ergens in de uitgestrekte toendra's van Siberië, is echter niet goed bekend.

De methode van DNA-analyse

De moleculaire biologie houdt zich bezig met het erfelijkheidsmolecuul DNA en de moleculen die hiervan zijn afgeleid, het RNA en de eiwitten. Het DNA bevat de blauwdruk van alle eigenschappen van een organisme en daarmee tevens van de uiterlijke verschijningsvormen. Al die informatie ligt opgesloten in de specifieke volgorde van vier basen: Adenine (A), Cytosine (C), Guanine (G) en Thymine (T), moleculen die onderdeel zijn van de bouwstenen van het DNA. Een belangrijk kenmerk van DNA is dat die basenvolgorde (ook wel sequentie genoemd) niet onveranderlijk wordt overgeërfd. Er kunnen mutaties optreden in de basenvolgorde. Mutaties vinden in principe bij toeval plaats en het kan duizenden jaren duren voordat zo'n verandering optreedt in het DNA. Op basis van mutaties vindt evolutie plaats. Door de basenvolgorde van verschillende vogels te vergelijken kan hun onderlinge verwantschap op de meest objectieve wijze worden bepaald. Iets dergelijks is voorheen door middel van de zogenaamde DNA-hybridisatietechniek op grote schaal toegepast om de verwantschappen van hogere taxa binnen het vogelrijk te bepalen (Sibley & Ahlquist 1986). Deze techniek meet de grove overeenkomst in basenvolgorde van het totale DNA van verschillende vogels. Voor de nauwe verwantschappen binnen een soort is deze benadering niet nauwkeurig genoeg. Voor de bestudering daarvan willen we "in het DNA" kijken, door gericht op een klein stukje DNA de precieze volgorde van de basen te bepalen. Mutaties worden dan individueel zichtbaar.

De lengte van het totale DNA-molecuul van een vogel beslaat ten minste een miljard(!) basen. Voor onze analyse moeten we ons beperken tot een stuk van ten hoogste duizend basen. Ieder deel van het DNA gedraagt zich verschillend en daarom maakt het veel uit welk deel van het DNA bekeken wordt. Voor onze analyse is het relatief kleine mitochondriale DNA zeer geschikt. Dit cirkelvormige DNA-molecuul bevindt zich in de mitochondria, microscopisch kleine lichaampjes in het cytoplasma van de cel, die de cel van energie voorzien. Het mitochondriale DNA muteert met een relatief grote snelheid en hiervan wordt dankbaar gebruik gemaakt in ons onderzoek. Sterker nog: het is een voorwaarde om DNA-analyse met succes toe te kunnen passen voor het onderscheiden van populaties. Een andere belangrijke eigenschap van het mitochondriale DNA is dat het maternaal (dat wil zeggen alleen van moeder op kuiken) overerft. Daarmee is het slechts enkelvoudig aanwezig, terwijl de chromosomen (het kern-DNA) dubbel aanwezig zijn: één set afkomstig van de vader en één van de moeder. Uitwisseling tussen de verschillende chromosomen komt daarom in het geval van mitochondriaal DNA niet voor. Het gevolg is dat een onderzochte groep vogels meer eenvormigheid zal vertonen voor het mitochondriale DNA. Dit vereenvoudigt de analyse aanzienlijk.

De door ons gekozen techniek is de sequentie-analyse van het mitochondriale DNA. Daarbij wordt van een deel van het mitochondriale DNA-molecuul de basenvolgorde bepaald. Deze techniek omvat een aantal stappen die we hier kort omschrijven. Ter illustratie is in figuur 1 een schematisch overzicht opgenomen. Na een succesvolle vangst wordt van een vogel voorzichtig de hoofdader aan de onderzijde van de vleugel aangeprikt. Ten minste één druppel bloed wordt geconserveerd in 70% alcohol. In het laboratorium wordt via biochemische methoden het totale DNA (zowel kern-DNA als mitochondriaal-DNA) uit de bloedcellen geëxtraheerd. Het is tegenwoordig mogelijk om uit het enorm complexe DNA-mengsel specifiek dat stukje DNA te vermenigvuldigen waarin wij zijn geïnteresseerd. Dit gebeurt door middel van de zogenaamde "Polymerase Chain Reaction": PCR (Mullis 1990). Met deze techniek is het mogelijk een afgebakend deel van het mitochondriale DNA-molecuul miljardvoudig te vermenigvuldigen. Hierdoor krijgen wij de beschikking over een enorm aantal kopieën van alleen dit ene DNA-fragment, zodat het mogelijk wordt hiervan de basenvolgorde te bepalen. Dit gebeurt in vier sequentiereacties, waarbij de positie van iedere afzonderlijke base (A, C, G of T) in de DNA-keten wordt bepaald (Sanger 1981). Tijdens de vier sequentiereacties ontstaan er reeksen van DNA-fragmenten die steeds één base in lengte van elkaar verschillen. Deze DNA-fragmenten, die tijdens de reactie



Figuur 1. Van Bonte Strandloper naar DNA-sequentie: Schematische weergave van de toegepaste DNA-sequentie-analysetechniek. (A) Van een vogel worden een paar druppels bloed afgenomen. (B) Uit de vele bloedcellen wordt het DNA geïsoleerd. Een bloedcel is weergegeven. (C) Van het mitochondriale DNA wordt een deelgebied door middel van de PCR (Polymerase Chain Reaction) techniek vermenigvuldigd. (D) Dit levert een zeer groot aantal kopiën van het mitochondriale DNA-fragment op. (E) De opbouw van een DNA-fragment is weergegeven. (F) Van het DNA-fragment kan de specifieke basenvolgorde worden bepaald. Deze is uiteindelijk zichtbaar op een autoradiogram. *From Dunlin to DNA sequence: diagram of the DNA sequence-analysis technique. (A) A few drops of blood are collected. (B) DNA is isolated; one blood cell is depicted. (C) A piece of mitochondrial DNA is amplified by the polymerase chain reaction (PCR). (D) A large number of copies of the DNA piece is obtained. (E) The composition of DNA is shown. (F) DNA sequence can be read from an autoradiograph.*

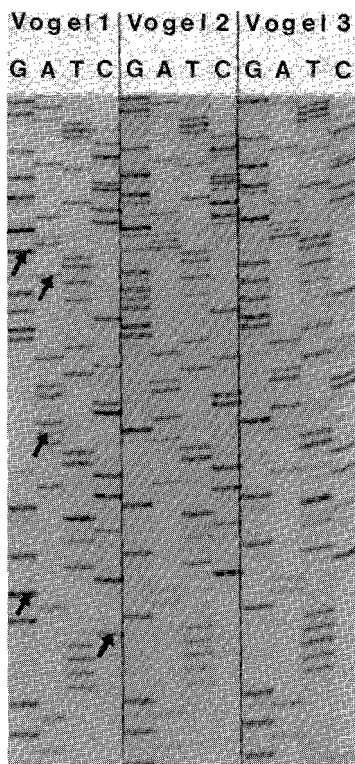
licht radioactief zijn gemaakt, worden in vier lanen exact op grootte gescheiden. Dit gebeurt onder invloed van een spanningsveld over een gel die als een zeef werkt. Het DNA-bandenpatroon dat daarbij ontstaat, wordt vervolgens zichtbaar gemaakt op een röntgenfilm. Een voorbeeld van zo'n autoradiogram is te zien in figuur 2. Nadat de vogel is "doorgelicht" kunnen van het autoradiogram de sequenties worden afgelezen en in de computer worden ingevoerd (zie figuur 3). De basenvolgorde kunnen nu met elkaar worden vergeleken.

Resultaten van DNA-analyse bij de Bonte Strandloper

Als eerste aanzet tot een analyse van de ondersoorten die gebruik maken van de Oostatlantische trekbaan, hebben wij 25 broedende Bonte Strandlopers bekeken. Van ieder van deze vogels zijn drie verschillende mitochondriale DNA-fragmenten, elk met een lengte van ongeveer 300 basen, vermenigvuldigd. Tezamen is steeds de volgorde van 910 basen bepaald. Deze sequenties zijn onderling vergeleken.

Drie van de broedvogels zijn afkomstig van IJsland, dertien van de Hardangervidda in Zuid-

Noorwegen en negen van het Taymyr-schiereiland in Centraal-Siberië. Vergelijking van de DNA-sequenties van de vogels uit deze drie broedgebieden levert een verrassend beeld op. De drie IJslandse vogels zijn identiek voor de gehele sequentie. Onder de dertien vogels van de Hardangervidda daarentegen wordt een aanzienlijke variatie aangetroffen. Het aantal mutaties tussen de verschillende vogels is weliswaar gering (met hierop één belangrijke uitzondering), maar de dertien vogels vallen uiteen in liefst negen verschillende sequentietypen. Deze zijn weergegeven in figuur 4. Hierin stelt ieder uiteinde van een vertakking een afzonderlijk sequentietype voor. Voor de negen Bonte Strandlopers afkomstig van Taymyr geldt ongeveer hetzelfde als voor de Noorse vogels; onder deze vogels worden niet minder dan zes verschillende sequentietypen aangetroffen. Bij de interpretatie van de gegevens is het belangrijk om al deze verschillende sequenties de analyse niet onnodig te laten bemoeilijken. Het gaat hier namelijk om verschillen van slechts één tot vijf mutaties op een totaal van meer dan 900 basen. Een sequentievariatie tot ongeveer 0.5% dus. Dit is blijkbaar de natuurlijke variatie binnen een groep vogels die behoren tot een zelfde broedpopulatie. Waar het ons vooral om gaat ech-



Figuur 2. Autoradiogram met DNA-sequentie. In deze figuur is een klein deel van de basenvolgorde in het mitochondriale DNA van drie Bonte Strandlopers uit de Waddenzee weergegeven. De basenvolgorde wordt in vier lanen (G = Guanine, A = Adenine, T = Thymine, C = Cytosine) als bandjes van onder naar boven gelezen. Onderlinge mutaties zijn aangegeven door pijlen in de sequentie van vogel 1. De vogels 2 en 3 zijn identiek voor dit deel van de sequentie, terwijl vogel 1 hierin sterk verschilt. In combinatie met figuur 4: vogel 1 = WZ 1, vogel 2 = WZ 2, vogel 3 = WZ 3. In combinatie met figuur 3: de weergegeven sequentie loopt van base 23 (onder) tot base 93 (boven). *Autoradiograph showing mitochondrial DNA sequence of three Dunlins from the Wadden-sea. DNA sequence is read in four lanes from bottom to top (G = Guanine, A = Adenine, T = Thymine, C = Cytosine). Mutations are marked by arrows in the first sequence. The sequence is identical for Dunlins 2 and 3.*

ter, zijn de verschillen die de sequenties van de vogels uit de diverse broedgebieden vertonen. Nader bestudering hiervan (figuur 3) laat zien dat de sequentie van de IJslandse vogels niet veel verschilt van die van de Noorse Bonte Strandlopers. Zij onderscheiden zich door ongeveer vier mutaties van de Noorse vogels (ongeveer, omdat het ervan afhangt met welke Noorse Bonte Strandloper deze vogels worden vergeleken). Dit komt overeen met de grootte van de onderlinge variatie tussen de Noorse Bonte Strandlopers. In feite kan het IJslandse sequentietype daarom worden ingedeeld bij de Noorse sequentietypen. Belangrijk is echter op te merken dat twee van de mutaties bij niet één van de Noorse vogels worden aangetroffen en dus "IJsland-specifiek" kunnen zijn. Worden de Taymyr

vogels in de vergelijking betrokken, dan blijkt in één keer een duidelijke "sprong" te worden gemaakt. Deze vogels onderscheiden zich van de gezamenlijke Europese groep vogels met zo'n zestien mutaties over 910 basen, wat overeenkomt met ongeveer 2% sequentieverschil (figuur 4). Dit verschil geeft aan dat deze vogels tot een andere ondersoort behoren. Zo'n toewijzing op basis van een percentageverschil in DNA-sequentie is op zichzelf arbitrair te noemen, maar is in dit geval mede gebaseerd op een overeenkomstig percentageverschil met twee Amerikaanse ondersoorten die hier verder buiten beschouwing blijven. De sequentietypen die in Noorwegen en Siberië voorkomen laten enkele belangrijke uitzonderingen zien op de geringe variatie die gevonden wordt binnen een broedgebied. Onder de dertien Noorse vogels werden er namelijk twee gevonden, die aan het Taymyr-type beantwoordden, en onder de vogels van Taymyr werd er één gevonden die precies het Noorse sequentietype had (figuur 4: respectievelijk ZN 1, ZN 6 en TA 9). Dit is een aanwijzing dat er enige uitwisseling van vogels tussen de verschillende broedpopulaties plaatsvindt.

Naar aanleiding van deze resultaten is het allereerst van belang om vast te stellen dat de mitochondriale DNA-fragmenten, die voor deze studie zijn geselecteerd, tussen de vogels van één soort variabel zijn. Daardoor is het nu mogelijk de genetische afstanden tussen populaties te meten. De analyse van meer dan 900 basen DNA-sequentie biedt hierbij een grote statistische zekerheid. In de bepaling zit vanzelf een interne standaard opgenomen: verschillen de sequenties van twee vogels nauwelijks, dan zijn zij nauw verwant; bestaat er een groter verschil dan zijn zij minder nauw verwant. Voor een indeling in ondersoorten wordt vooralsnog teruggegrepen op de indeling zoals die op basis van biometrische meetgegevens bestaat. Er is zodoende geen aanleiding om onder de hier geanalyseerde groep van 16 Europese vogels meer dan één ondersoort te onderscheiden, naar aanname *Calidris alpina alpina*. De afwijking in sequentiesamenstelling van de drie IJslandse vogels is dermate gering dat er voorlopig geen genetische basis bestaat voor het onderscheiden van een aparte IJslandse ondersoort. Het aantal onderzochte IJslandse vogels is echter nog te gering voor een definitieve conclusie. Op basis van het grote sequentieverschil met de Europese vogels ligt het voor de hand de vogels van het Taymyr-schiereiland in te delen bij de ondersoort *Calidris alpina sakhalina*. De waargenomen vermenging van broedvogels die tot de twee ondersoorten behoren, wil niet perse zeggen dat de uitwisseling tussen vogels van de Hardangervidda en het Taymyr schiereiland heeft plaatsgevonden. In de uitgestrekte broedgebieden die hier tussen liggen kunnen immers vogels met identieke sequentietypen

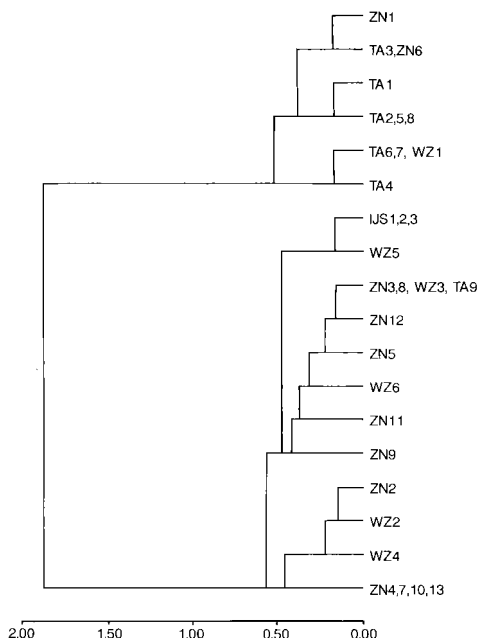
IJSLAND	TGGTACGACTGGTGTGACTTCGAGAGTTTTGAAGTGTCTGCACTTAGACCAATCATGG	60
Z. NOORW	TGGTACGACTGGTGTGACTTCGAGAGTTTTGAAGTGTCTGCACTTAGACCAATCATGG	60
TAYMYR	TGGTACGACTGGTGTGCACTTCGAGAGTTCGAGCTGTCTGCACTTAAACCAATCATAG	60
	* * *	
IJSLAND	CGTGTGTTAAAGCACTGCCGTACGCTTTAGAGAGTTTAAATGCATAATCCTAACAGTTG	120
Z. NOORW	CGTGTGTTAAAGCACTGCCGTACGCTTTAGAGAGTTTAAATGCATAATCCTAACAGTTG	120
TAYMYR	CGTGTATTAAGCACTGCCGTACGCTTTAGAGAGTTTAAATGCATAATCCTAACAGTTG	120
	* * *	
IJSLAND	ATGGGTTTAGTACGTTGTGTGAATATTCCTAGGTTTCATGCTTCGGTTATCCTCTGGA	180
Z. NOORW	ATGGGTTTAGTACGTTGTGTGAATATTCCTAGGTTTCATGCTTCGGTTATCCTCTGGA	180
TAYMYR	ATGGGTTTAGTACAGTGTGTGAATATTCCTAGGTTTCATGCTTCGGTTACCTCTGGA	180
	* * *	
IJSLAND	GGCGGGTGAGAGGTGAAGAGGTGTATAGCCCGGTTGTAATTAATGGATTGGAACATGG	240
Z. NOORW	GGCGGGTGAGGGGTGGAGAGGTGTATAGCCCGGTTGTAATTAATGGATTGGAACATGG	240
TAYMYR	GGCGGGTGAGGGCGGAGAGGTGTATAGCCCGGTTGATAGATTAAATGGATTGGAACATGG	240
	* *	
IJSLAND	ATGGTATGTAGTATGGGGGGGACAAGTATATGCAGCGCACCAATAATTGGACA	295
Z. NOORW	ATGGTATGTAGTATGGGGGGGACAAGTATATGCAGCGCACCAATAATTGGACA	295
TAYMYR	ATGGTATGTAGTATGGGGGGGACAAGTATATGCAGCGCACCAATAATTGGACA	295

Figuur 3. Vergelijking van drie DNA-sequenties. Hier worden 295 basen vergeleken (van één Polymerase Chain Reaction fragment) voor drie verschillende sequentietypen. Alle drie vogels van IJsland hebben de bovenste sequentie. De middelste sequentie komt voor bij twee Bonte Strandlopers uit Zuid-Noorwegen (ZN 3, ZN 8: zie figuur 4) en drie vogels van Taymyr hebben de onderste sequentie (TA 2, TA 5, TA 8). Mutaties tussen de sequentietypen van IJsland en Noorwegen zijn boven de sequenties door middel van sterren aangegeven. Mutaties tussen het Noorse en het Taymyr-sequentietype zijn onder de sequenties door middel van sterren aangegeven. Hieruit blijkt hoe weinig de IJslandse vogels van de Noorse vogels verschillen, terwijl de Siberische Bonte Strandlopers duidelijk tot een andere groep behoren. *Comparison of 295 bases of mitochondrial DNA sequence. The upper sequence is shared by all three Dunlins from Iceland. The middle sequence is present in two Dunlins from the Hardangervidda in southern Norway. Three Dunlins from Taymyr, Siberia show the lower sequence. Mutations are marked by asterisks: above the sequences between Iceland and Norway; below the sequences between Norway and Taymyr.*

voorkomen. Een mogelijke verklaring voor de vermenging is dat Bonte Strandlopers van de verschillende broedpopulaties met elkaar in contact komen tijdens overwintering of doortrek. Er kan dan een huwelijk worden gesloten dat één van beide partners naar een ander broedgebied leidt. Als een vrouwtje uit broedgebied A mee gaat met een mannetje uit broedgebied B, zal het nageslacht eveneens het sequentietype uit gebied A vertonen. Als het mannetje uit B uitwijkt naar broedgebied A, dan is dat met onze analyse van het mitochondriaal DNA (dat immers van moeder op kuiken overerft!) bij de eerste generatie kuikens al niet meer te achterhalen. Deze voorlopige resultaten geven aan dat er uitwisseling optreedt, maar het heeft duidelijk niet tot een volledige vermenging geleid. Dit is op zich een opmerkelijk resultaat. Het geeft aan dat de bestudeerde vogels een sterke plaatstrouw aan hun broedgebied vertonen. Zou dat, gedurende de duizenden jaren dat de trekwegen van deze populaties waarschijnlijk al bestaan, niet het geval zijn geweest, dan zou er nu geen sprake zijn van geografisch gebonden sequentietypen.

De definiëring van ondersoorten zal op een nog krachtiger basis plaats moeten vinden: meer vogels van een groter aantal broedgebieden dienen te worden geanalyseerd. Voor een nauwkeurige bepaling van de geografische grenzen tussen broedpopulaties, zo die al scherp bestaan, is een aaneenschakeling van vangplaatsen nodig. Door het aanleggen van een "referentiebibliotheek van DNA-sequen-

tietypen", kan wellicht in de toekomst van individueel doortrekkende en overwinterende vogels worden bepaald tot welke broedpopulatie zij behoren. In een eerste aanzet daartoe, met een beperkte referentieset op basis van de hier bekeken broedgebieden, hebben wij van zes Bonte Strandlopers uit de internationale Waddenzee dezelfde DNA-sequentie bekeken. Vijf van deze vogels zijn gevangen in het najaar. Één van deze vogels (WZ 5 in figuur 4) blijkt nagenoeg dezelfde sequentie te hebben als de IJslandse vogels, met een verschil van slechts één mutatie. De vier overigen corresponderen vrijwel geheel met, of zijn identiek aan één van de Noorse sequentietypen. De zesde Bonte Strandloper (WZ 1) betreft een in het voorjaar gevangen vogel die het uitzonderlijk grote gewicht vertoonde van maar liefst 90 gram. Het normale gewicht van opvettende Bonte Strandlopers bedraagt 70 tot maximaal 80 gram (Goede *et al.* 1990). Het grote gewicht geeft aan dat deze vogel een verre reisbestemming heeft gehad. Na analyse blijkt de DNA-sequentie precies overeen te komen met die van twee vogels van het Taymyr-schiereiland (namelijk TA 6 en TA 7 in figuur 4). De combinatie van het grote gewicht, grote lichaamsmaten (vleugel 127 mm, snavel 37.7 mm, kopsnavel 62.2 mm) en het DNA-sequentietype, maken het zeer waarschijnlijk dat deze vogel behoort tot een ver oostelijk broedende Siberische populatie. Dat is een nieuwe aanwijzing dat de ondersoort *sakhalina* in de Waddenzee voorkomt.



Figuur 4. Stamboom verkregen door vergelijking van DNA-sequenties. Door paarsgewijze vergelijking van 910 basen voor 33 Bonte Strandlopers zijn aan de hand van de opgetreden mutaties steeds de procentuele verschillen in DNA-sequentie berekend. Deze percentages zijn onder de stamboom weergegeven. De stamboom drukt de onderlinge verwantschap van de vogels uit. Aan het uiteinde van iedere vertakking zijn de individuele vogels van het betreffende sequentietype aangegeven. ZN = Zuid-Noorwegen (Hardangervidda), TA = Taymyr-schiereiland, Siberië, IJS = IJsland, WZ = Waddenzee. Het valt op dat de 33 Bonte Strandlopers in twee hoofdgroepen uiteen vallen (boven: ZN 1 tot en met TA 4 en onder: IJS 1 tot en met ZN 13), die onderling 1.8 % in DNA sequentie verschillen. De procentuele verschillen binnen elk van deze groepen zijn daarmee vergeleken gering. Het verschil tussen WZ 5 en ZN 9 bedraagt bijvoorbeeld 0.4 %. *DNA sequence tree obtained by pairwise comparison of 910 bases for 33 Dunlins. Percentages of DNA sequence divergence are on the horizontal axis. Listed at the tip of each branch are the birds that share identical DNA sequences. ZN = Southern Norway (Hardangervidda), TA = Taymyr peninsula, Siberia, IJS = Iceland, WZ = Waddensea. The two major genetic clusters, representing two different subspecies, are separated by a 1.8 % sequence divergence.*

Conclusie en vooruitzicht

De hier gepresenteerde resultaten laten zien dat DNA-analyse een geschikte methode is voor de bestudering van vogelpopulaties. Een belangrijke volgende fase in het onderzoek is het verzamelen van bloedmonsters uit zoveel mogelijk verschillende broedgebieden. Het is duidelijk dat vele van deze broedgebieden "aan het einde van de wereld" liggen. Daarom houden de auteurs zich warm aanbevelen voor een ieder die het zo ver zoekt: bloedafname is vrij eenvoudig en de benodigde materialen zijn licht in gewicht. Door van meer broedvogels een DNA-plaatje te maken, zal moeten blijken hoe sterk sequentietypen aan de ver-

schillende broedgebieden zijn gebonden. Alleen wanneer er maar weinig of geen uitwisseling tussen broedgebieden optreedt, zal DNA-analyse een hoge voorspellingswaarde hebben over de herkomst van trekkende en overwinterende vogels. Dat lijkt het geval te zijn bij de Bonte Strandloper. Gegevens over opvetgewicht en doortrekdatum kunnen een waardevolle aanvulling vormen op de methode. Het ligt in onze bedoeling om in de nabije toekomst DNA van de Oostzeepopulatie van de Bonte Strandloper te analyseren. Deze populatie omvat slechts enkele duizenden vogels en is daarom kwetsbaar. Pas nadat is vastgesteld in hoeverre deze populatie genetisch verwant is aan de noordelijker broedende Bonte Strandlopers, kan het specifieke belang van deze populatie op de juiste waarde worden geschat.

Dankwoord Wij zeggen dank aan Hans-Ullrich Rössner (Wereld Natuur Fonds, Duitsland) voor het ter beschikking stellen van de meeste bloedmonsters en aan Prof. Dr. W. J. Wolff (Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek/Vakgroep Natuurbeheer, L.U. Wageningen) voor logistieke ondersteuning.

Summary

In order to overcome limitations encountered by morphometrics in the identification of subspecies and populations of wader species we developed a method of DNA analysis which is able to "look beneath the feathers" of individual birds. The method is based on the amplification and sequence comparison of pieces of hypervariable mitochondrial DNA. In a preliminary analysis of breeding Dunlins from Iceland, Norway and Siberia, we show that two subspecies can readily be told apart (Siberia and Europe). Within Europe no clear genetic differentiation is found between Dunlins from Iceland and Norway. This method of DNA analysis will be useful for the identification of genetic stocks within a species as well as for the elucidation of breeding ground origins of waders on migration. The latter is exemplified by the analysis of a small number of Dunlins from the international Wadden Sea.

Literatuur

- BOERE G. C. 1976. The significance of the Dutch Wadden Sea in the annual life cycle of arctic, subarctic and boreal waders. Part I. The function as a moulting area. *Ardea* 64: 210-291.
- BOERE G. C. & SMIT C. J. 1980. Dunlin (*Calidris alpina* L.). In C. J. SMIT & W. J. WOLFF (red.). Birds of the Wadden Sea: 157-169. Balkema, Rotterdam.
- CRAMP S. & SIMMONS K. E. L. (red.) 1983. Birds of the Western Palearctic, Vol. III. Oxford University Press, Oxford.
- GOEDE A. A., NIEBOER E. & ZEGERS P. M. 1990. Body mass increase, migration pattern and breeding grounds of Dunlins, *Calidris a. alpina*, staging in the Dutch Wadden Sea in spring. *Ardea* 78: 135-144.

- GREENWOOD J. G. 1986. Geographical variation and taxonomy of the Dunlin *Calidris alpina* (L.). Bull. Brit. Orn. Club 106: 43-56.
- JÖNSSON P. E. 1986. The migration and wintering of Baltic Dunlins *Calidris alpina schinzii*. Vår Fågelvärld Suppl. 11: 71-78.
- MEININGER P. L., BAPTIST H. J. M. & SLOB G. J. 1984. Vogeltellingen in het Deltagebied in 1975/76 - 1979/80. Report DDMI-84.23, Middelburg.
- MULLIS K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scient. Am. 262-4: 36-43.
- PIERSMA T. & JUKEMA J. 1990. Budgetting the flight of a long-distance migrant: changes in nutrient reserve levels of Bar-tailed Godwits at successive spring staging sites. Ardea 78: 315-337.
- PRATER A. J., MARCHANT J. H. & VUORINEN J. 1977. Guide to the identification and ageing of holarctic waders. BTO Guide 17, Tring.
- SANGER F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 214: 1205-1210.
- SIBLEY G. & AHLQUIST J. E. 1986. Reconstructing bird phylogeny by comparing DNA's. Scient. Am. 254-2: 68-78.
- SMIT C. J. & PIERSMA T. 1989. Numbers, midwinter distribution, and migration of wader populations using the East Atlantic flyway. In H. BOYD & J. Y. PIROT (red.). Flyways and reserve networks for water birds: 24-63. IWRB Special Publ. 9, Slimbridge.
- SMIT C. J. & WOLFF W. J. 1980. Conclusions and recommendations. In Birds of the Wadden Sea: 5-8. Balkema, Rotterdam.
- SPEEK B. J. & SPEEK G. 1984. Thieme's vogeltrekatlas. Thieme, Zutphen.
- WYMENGA E., ENGELMOER M., SMIT C. J. & VAN SPANJE T. M. 1990. Geographical breeding origin and migration of waders wintering in West Africa. Ardea 78: 83-112.
- P. W. Wenink, Johan de Wittlaan 99, 6828 XE, Arnhem
- C. J. Smit, Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek, Postbus 167, 1790 AD Den Burg
- M. G. J. Tilanus, Diagnostisch DNA Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Utrecht, Postbus 85580, 3508 GA Utrecht
- W. B. van Muiswinkel, Vakgroep Experimentele Diern morfologie en Celbiologie, L.U. Wageningen, Postbus 338, 6700 AH Wageningen
- A. J. Baker, Department of Ornithology, Royal Ontario Museum, 100 Queen's Park, Toronto M5S 2C6, Canada

Aanvaard voor opname 26 april 1992



