

Het gebruik van DNA voor vogelonderzoek

Kees van Oers

Inleiding

Voor veel ringers zullen de woorden *genetisch* en *moleculair* een lichte huivering opwekken en wordt bij het woord DNA de bladzijde al snel omgeslagen op zoek naar iets tastbaars. Toch is er veel informatie te halen uit het erfelijk materiaal van onze vogels wat ons een aantal interessante inzichten kan geven. In dit artikel geef ik een overzicht over wat DNA, het erfelijk materiaal van een organisme ons kan vertellen, dus wacht even met de bladzijde omslaan. Door het steeds goedkoper en eenvoudiger worden van moleculair genetisch onderzoek is het gebruik van DNA erg toegenomen. Een goede mogelijkheid dus om eens te bekijken of met eenvoudige middelen ook ringers een bijdrage kunnen leveren.

Wat is DNA?

DNA of Desoxyribonucleïnezuur is de belangrijkste chemische drager van erfelijk overdraagbare informatie in alle bekende organismen. Met erfelijk overdraagbaar bedoelen we dat de informatie van ouders wordt overgedragen op hun nakomelingen. Een DNA-molecuul bestaat uit twee lange strengen van nucleotiden, die aan elkaar zijn verbonden door zogenaamde basenparen. Er zijn verschillende basen, die we ook wel letters geven (C, T, G en A) en de volgorde van deze verschillende letters wordt ook wel een sequentie genoemd (bv. ACTGAGAGATC). De kracht van DNA is dat er oneindig veel sequentie mogelijkheden zijn en daarom kan DNA unieke erfelijke informatie bevatten. DNA strengen vormen chromosomen en verschillende organismen hebben verschillende aantallen van deze chromosomen. Zo heeft de mens 24 paar van deze chromosomen en een koolmees 40 paar.

Waar halen we bij vogels DNA vandaan?

Een groot voordeel in vergelijking met andere organismen is dat er bij vogels DNA in de celkernen van rode bloedcellen aanwezig is. Voor het grootste gedeelte van genetisch onderzoek heb je slechts een klein beetje van dit DNA nodig. Dat betekent in de praktijk dat een klein druppeltje bloed van 5 tot 10 microliter vaak al genoeg is om DNA te krijgen voor een aantal van deze analyses. Het afgenomen bloed wordt opgeslagen in een vloeistof (buffer) die, afhankelijk van de buffer, in een vriezer of bij kamertemperatuur een aantal jaren goed blijft.

Als alternatief voor bloedafname is het ook mogelijk

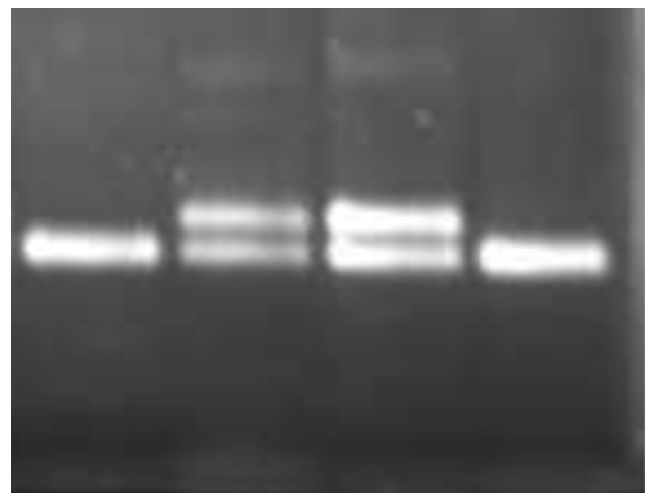
om een aantal veertjes te verzamelen (trekken). Doordat samen met groeiende veertjes vaak wat cellen meekomen en in volgroeide veren pulpcellen zitten, is het mogelijk uit slechts een klein aantal veertjes genoeg DNA te halen voor een DNA analyse (Taberlet & Bouvet 1991).

Genetische markers

Aangezien we niet de complete basevolgorde van elk individu kunnen bepalen, moeten we voor elke specifieke vraag via een andere methode te werk gaan. Vaak wordt gewerkt met zogenaamde moleculaire *markers*. Dit zijn korte stukjes DNA sequentie die variëren tussen individuen. Dit kan variatie zijn in de sequentie zelf, dus in de letters (sequentie polymorfisme), maar ook in de lengte van de sequentie (lengte polymorfisme).

Als we het over variatie in slechts 1 basenpaar hebben, noemen we de marker een SNP (snip; Single Nucleotide Polymorphism). SNPs zijn op grote schaal aanwezig op elk genoom en vormen de basis voor veel variatie binnen een soort. Zo komen er bij de koolmees ongeveer 2 miljoen SNPs voor op het hele genoom (van Bers *et al.* 2010).

Ook microsatellieten worden vaak gebruikt voor genetisch onderzoek. Dit zijn stukjes sequentie met een herhaalde component erin. Zo kan het bijvoorbeeld een herhaling van de letters TAGA zijn. Individuen van een soort verschillen dan in het aantal TAGA herhalingen van deze microsatelliet. Zo kan één individu bijvoorbeeld 4 van deze TAGA stukjes hebben en een ander 6. Als we de microsatelliet dus bekijken, dan verschillen individuen in de lengte van dat stukje DNA.



Figuur 1. Gedeelte van een gel met een bandenpatroon van 2 mannetjes (1 bandje) en 2 vrouwtjes (2 bandjes) koolmezen.



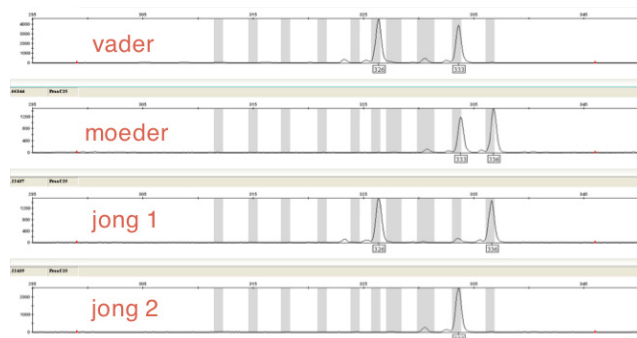
Buiten deze twee markers bestaan er nog een heleboel andere markers, met namen als AFLPs, RAPDs minisatellieten en CNVs of mtDNA. Allemaal hebben ze als overeenkomst dat ze variatie meten. Voor elke specifieke vraag is het belangrijk de beste soort markers te nemen. Zo is het voor ouderschapsanalyse goed om microsatellieten te nemen, maar voor grootschalige projecten is het beter SNPs te gebruiken. Ten eerste vanwege de hoeveelheid informatie die 1 marker heeft, maar ook vanwege de kosten. SNPs zijn relatief goedkoop als grote aantallen bekeken worden, microsatellieten zijn duurder maar ook veel variabelere binnen populaties.

Geslachtsbepaling

Bij veel vogelsoorten is het moeilijk op basis van uiterlijke kenmerken de sexe van een individu te bepalen. Dit geldt in grote mate voor nestjongen, maar bij ongeveer 50% van alle vogelsoorten zijn ook volwassen mannen en vrouwen moeilijk of niet van elkaar te onderscheiden aan de hand van veldkenmerken. Aangezien er een duidelijk genetisch verschil is tussen mannelijke en vrouwelijke organismen, is het wel mogelijk met DNA analyses een onderscheid te maken tussen mannetjes en vrouwtjes. Het meest opvallende verschil bij gewervelde dieren is dat de zogenaamde sex-chromosomen van mannetjes en vrouwtjes niet even groot zijn. Bij zoogdieren noemen we dit het X- en Y-chromosoom, waarbij het Y-chromosoom slechts weinig genetische informatie bevat. Mannetjes hebben een X en een Y en vrouwtjes twee X-chromosomen. Bij vogels is dit omgekeerd; mannen hebben twee gelijke chromosomen (Z) en vrouwtjes twee ongelijke (W en Z). Eén van de meest gebruikte methodes, ontwikkeld door Griffiths *et al.* (1998), maakt gebruik van twee genen op deze sex-chromosomen. Het CHD-W gen is aanwezig op het W-chromosoom en is dus uniek voor vrouwtjes. Het CHD-Z gen is aanwezig op het Z-chromosoom dat zowel mannetjes als vrouwtjes bezitten. Bij de meeste vogelsoorten bestaat er een lengteverschil tussen deze genen. Op een gel kan, door middel van elektrische lading, de lengte van verschillende stukjes DNA als een bandenpatroon zichtbaar worden gemaakt. Doordat vrouwtjes dus twee genen hebben van verschillende lengte en mannen twee dezelfde genen, is dit verschil zichtbaar op zo'n gel in het bandenpatroon. Mannen hebben slechts één band en vrouwtjes twee (Figuur 1). In principe kan dit op elk laboratorium met de juiste apparatuur gedaan worden. Op het Nederlands Instituut voor Ecologie is dit een standaardprocedure.

Ouderschapsbepaling

Al lijken veel van de vogelsoorten die we observeren keurige paartjes te vormen, toch blijkt dat veel vrouwen vreemd gaan en dus eieren leggen die door andere mannen bevrucht zijn. Ook kan het voorkomen dat een vrouwtje, bij gebrek aan bijvoorbeeld een eigen nest, een ei in het nest van een ander vrouwtje legt. Ook zijn er soorten die een gemeenschappelijk nest gebruiken om hun eieren in kwijt te kunnen. Om bij een broedsel te kijken of de ouders die op het nest geobserveerd zijn wel de echte ouders zijn, hebben we DNA van de ouders en van de jongen nodig. We maken daarbij gebruik van het feit dat DNA uit twee strengen bestaat. Een marker komt dus op elk van die strengen voor en bij het testen van een marker zullen dus per individu twee waardes tevoorschijn komen, we noemen dit allelen. Bij geslachtelijke voortplanting zal het DNA van elke nakomeling uit een stukje van de streng van de vader (vader-allel) en een moeder-allel bestaan (Figuur 2). Als een individu afwijkt van deze verwachting, dan hebben we te maken met een buitenechtelijk jong of eidumpen. Als het moederallel wel klopt, maar dat van de vader niet, is de nakomeling buitenechtelijk. Als we genoeg markers (bij voorkeur variabele microsatellieten) gebruiken, kunnen we zelfs de biologische vader terugvinden, mits we die ook bemonsterd hebben natuurlijk.



Figuur 2. Een schermafdruk van een microsatellietanalyse. De analyse is van een familie koolmezen, met een vader, een moeder en twee jongen. De donkere vlakken geven aan waar mogelijke piekjes kunnen liggen. Deze microsatelliet heeft dus 10 verschillende allelen in de populatie. In deze familie heeft elk jong één piekje van elke ouder, wat aangeeft dat, op basis van deze microsatelliet, dit de biologische ouders zijn. Het onderste jong heeft slechts één piekje. Dit komt doordat het twee keer hetzelfde allel heeft (homozygoot): één van moeder en één van vader.

Het bepalen van soorten, ondersoorten en kruisingen

De meeste markers zijn soortspecifiek. Dat wil zeggen dat ze voor elke soort apart ontwikkeld moeten worden. Zo zullen (de meeste) SNPs die

ontwikkeld zijn voor een koolmees niet werken in een kip. Er zijn echter markers die wel variatie tussen (nauw verwante) soorten aan kunnen tonen. Een mooi voorbeeld hiervan is beschreven door Bensch *et al.* (2002). Ze deden onderzoek in het noorden van Spanje en het zuiden van Frankrijk, waar een hybridisatie zone bestaat tussen de gewone tiftjaf *Phylloscopus collybita*, en de Iberische tiftjaf *P. brehmii*. In dit gebied broeden gemengde broedparen en zijn ook dieren aanwezig die de zang van beide soorten beheersen. Bensch en zijn collega's ontwikkelde 13 AFLP markers die aan- of afwezig waren in één van de soorten. Daarna onderzochten ze 91 dieren die op basis van onder andere hun zang aan een bepaalde soort waren toegewezen. De markers wezen uit dat zang alléén geen goede indicatie was voor de soort waartoe een individu behoorde.

Ethische afwegingen

Vaak moeten voor het verzamelen van DNA *invasieve handelingen* worden verricht. Het 'bloeden' van een vogel of het trekken van een veer op zo'n manier dat een vogel er zo min mogelijk ongerief van heeft vergt enige ervaring. De wetgeving schrijft daarom voor dat er voor dit soort handelingen een Dierexperimentencommissie (DEC) protocol nodig is. In dit protocol worden de ethische aspecten van onderzoekshandelingen getoetst. Dit houdt in dat de wetenschappelijke kwaliteit en de maatschappelijke relevantie van een onderzoek worden afgewogen tegen het ongerief dat een dier wat betrokken is bij dit onderzoek moet ondergaan. De intrinsieke waarde van het dier staat hier voorop. Een belangrijke afweging bij genetisch onderzoek is daarom altijd: waarom ga ik DNA verzamelen? De *vraag* moet te allen tijde centraal staan en niet het *verzamelen*.

Literatuur

- Bensch S., Helbig, A.J., Salomon, M. & Seibold, I. 2002. Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Molecular Ecology* 11: 473-481.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. & Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Taberlet, P & Bouvet, J. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *Auk* 108: 959-960.
- Van Bers, N.E.M., van Oers, K., Kerstens, H.H.D., Dibbitts, B.W., Crooijmans, R.P.M.A., Visser, M.E. & Groenen, M.A.M. 2010. Genome-wide SNP detection in the great tit *Parus major* using high throughput sequencing. *Molecular Ecology* 19 (S1): 89-99.

In memoriam: Gerrit Frank

Op 7 juli 2011 is Gerrit Frank op 82 jarige leeftijd overleden.

Een groot deel van zijn leven stond in het teken van vogels, vogels en nog eens vogels. Op jonge leeftijd kreeg Gerrit de liefde voor al wat groeit en bloeit al van zijn vader mee. Die interesse werd nog eens aanzienlijk versterkt toen hij in zijn schooltijd in contact kwam met de vermaarde vogelkundige C.G.B. ten Kate, die hem een schat aan kennis over vogels heeft bijgebracht.

Als gecertificeerd ringer heeft Gerrit ten behoeve van wetenschappelijk onderzoek naar schatting ongeveer 200.000 Europese vogels (meer dan 80 soorten) in zijn handen gehad. Een prestatie die voor slechts weinigen is weggelegd!

Naast het ringwerk hield Gerrit zich ook bezig met het houden en kweken van vele soorten vogels-zangkanaries in het bijzonder en schreef hij over de jaren vele artikelen over vogels in de breedste zin van het woord.



Gerrit Frank in 2009 te Kamperveen (Fotopersbureau Freddy Schinkel).

Als voormalig onderwijzer had Gerrit ook de gave om zijn Ornithologische kennis en kunde effectief aan anderen over te dragen.

Aan mij de eer om Gerrit te bedanken voor al zijn op bevlogen wijze aan mij overgedragen kennis en zijn vertrouwen in mij om zijn geliefde ringstation te continueren.

*Hans Wagenaar, VRS 'de Glinde',
Natuurreservaat 'de Kamperhoek', Flevoland*