

Moleculaire technieken onthullen geheimen in de vogelwereld

Ken Kraaijeveld & Femmie Kraaijeveld-Smit

Department of Zoology
University of Melbourne
Parkville, Victoria 3010
Australië
E-mail: k.kraaijeveld@
pgrad.unimelb.edu.au

Bij het oplossen van moordzaken en zedendelicten zijn moderne moleculaire technieken al niet meer weg te denken. Net als Hercule Poirot had ook Charles Darwin vast gewaterdand bij de extra dimensie die de ontdekking van het DNA-molecuul zou geven aan het onderzoek van de levenswandel van organismen. Wie is de dader of wie is de vader? Deze vraag kan dankzij de snel voortschrijdende ontwikkelingen in de moleculaire biologie nu vrij eenvoudig worden beantwoord. Ecologen en gedragsonderzoekers passen deze technieken toe bij het bepalen van verwantschappen tussen soorten, populaties of individuen en het karakteriseren van bepaalde eigenschappen die niet direct aan een individu te zien zijn, zoals sekse. Dit artikel geeft een aantal voorbeelden uit recent onderzoek.

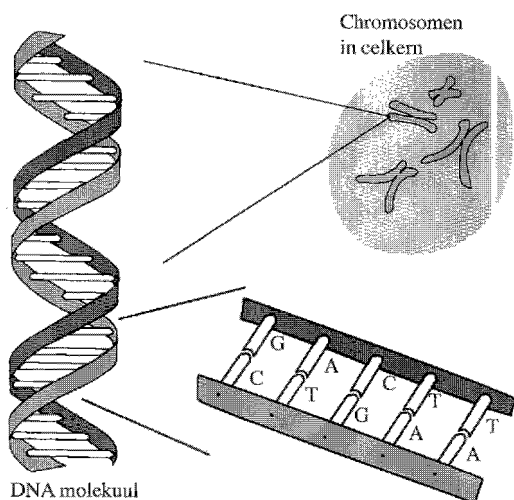
Toen Watson en Crick in 1953 de structuur van het DNA-molecuul beschreven (figuur 1), zetten zij één van de grootste biologische stappen voorwaarts sinds de publicatie van *The Origin of Species* (Darwin 1859); een gegeven waar zij zich ten volle van bewust waren (Watson 1968). Sindsdien onthulden genetici in een razend tempo een moleculaire wereld waarvan de complexiteit menig niet-geneticus enigszins ontgoocheld achterliet. Genetica bleef dan ook lange tijd het exclusieve domein van de geneticus.

Met de ontwikkeling van de zogenaamde 'polymerase chain reaction' (PCR), is hierin echter verandering gekomen. PCR is een relatief simpele techniek (figuur 2) waarmee een specifiek stukje van het DNA vele malen kan worden vermenigvuldigd. Welk deel van het DNA wordt vermenigvuldigd hangt af van de 'primers' die men aan de reactie toevoegt. Het grote voordeel van deze techniek is dat niet meer dan een klein druppeltje bloed, een schacht van een veer of een eimembraan nodig is om genoeg DNA te verzamelen voor een analyse. Zoogdieronderzoekers kunnen DNA verkrijgen uit haren en uitwerpselen. De techniek wordt veel gebruikt in de genetica, maar blijkt ook een zeer handig hulpmiddel in ecologisch en evolutionair onderzoek. Vragen die tot voor kort onbeantwoordbaar waren, kunnen nu met behulp van deze methoden worden opgelost. De toepassingen vallen feitelijk uiteen in twee typen. Ten eerste kunnen verwantschappen tussen ver-

schillende individuen worden bepaald. Dit kan op allerlei niveaus: men kan verwantschappen bepalen tussen verschillende ordes, families of soorten, maar ook tussen verschillende populaties van dezelfde soort, of zelfs tussen leden van hetzelfde gezin. Al naar gelang de hoeveelheid genetische variatie die men verwacht (veel als men twee soorten bekijkt, weinig als men broers en zussen vergelijkt), verschilt de te gebruiken techniek. De reden hiervoor is dat verschillende delen van het DNA verschillen in de snelheid waarmee zich in de tijd veranderingen opstapelen. De meest gebruikte toepassingen van verwantschapsanalyse zijn fylogenetisch onderzoek en het bepalen van reproductief succes. Van dit eerste type toepassingen worden in dit artikel enige voorbeelden besproken, te weten het bepalen van vaderschappen, en soortvorming bij Bonte Strandlopers *Calidris alpina*. Het tweede type toepassing doet zich voor wanneer het genotype (het genetische 'bouwplan' van een individu) iets zegt over het fenotype (de eigenschappen van dat individu: het eindresultaat van het samenspel tussen genetische en omgevings-invloeden). Zo kan men bijvoorbeeld aan de hand van DNA vaststellen wat voor geslacht een vogel heeft (zie later in dit artikel). Een ander voorbeeld is de relatie die blijkt te bestaan tussen de gezondheid van een vogel en het DNA in het *Major Histocompatibility Complex* (MHC). Dit MHC-DNA is betrokken bij het immuunsysteem en bepaalde typen van

dit DNA zorgen voor een beter afweersysteem dan andere. Bij Fazanten *Phasianus colchicus* correleren deze 'goede genen' ook met langere sporen bij de hanen. De hennen paren bij voorkeur met hanen met lange sporen, en dus indirect met hanen met goede MHC-genen (von Schantz *et al.* 1996).

Zoals het bovenstaande aangeeft zijn de mogelijkheden zeer uiteenlopend en nieuwe toepassingen komen regelmatig aan het licht. Dit



Figuur 1. Structuur van het DNA. DNA bestaat uit twee om elkaar heen gekrulde suikerketens, verbonden door vier soorten basen: adenine, thymine, guanine en cytosine, (A, T, G en C). Deze wenteltrapstructuur, de bekende 'dubbele helix', is vervolgens weer om zichzelf gekruld en vormt zo een chromosoom. De hele genetische code van een individu ligt in duplo opgeslagen in een aantal van deze chromosomen (de mens heeft er $2 \times 23 = 46$). Van elke ouder erft men één kopie. Iedere cel heeft een volledig pakket chromosomen, opgeslagen in de celkern. De volgorde waarin de vier basen naast elkaar liggen, vormt de basis voor de genetische code. Ze vormen een vierletterig alfabet dat door de cellen gelezen wordt als instructies bij het maken van eiwitten. Een gen is een deel van het DNA dat instructies bevat voor het maken van een bepaald eiwit. Andere delen van het DNA hebben andere functies, zoals het aan- of uitschakelen van een bepaald gen, wat dus bepaalt of een bepaald eiwit wel of niet wordt aangemaakt in een cel. Omdat al het DNA in duplo aanwezig is in een cel, heeft men van ieder stuk DNA, ongeacht of dit nu een gen is of niet, twee kopieën (allelen). *DNA structure. DNA exists of two twisted carbohydrate chains that are held together by four types of bases: adenine, thymine, guanine and cytosine (A, T, G and C). This double helix is twisted round itself and makes up a chromosome. The whole genetic code of an individual is stored in duplicate in a number of these chromosomes (humans have $23 \times 2 = 46$ chromosomes). One copy is inherited from each parent. Every cell contains a complete set of chromosomes stored in the nucleus. The order of the four bases is the basis of the genetic code. They form a four syllable alphabet that is read by the cells in the construction of a certain protein.*

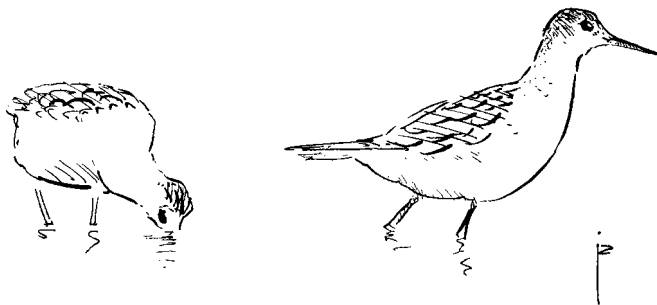
artikel heeft niet de pretentie al deze mogelijkheden uitputtend te behandelen. Aan de hand van enkele voorbeelden willen we een kijkje in de DNA-keuken geven om zo het soort resultaten dat behaald kan worden te illustreren.

Wie is de vader?

Reproductief succes, ofwel het aantal jongen dat een individu ter wereld brengt, is één van de meest cruciale gegevens in evolutionair onderzoek. Immers, alleen de genen van een vogel die jongen krijgt, leven voort in de volgende generatie. Als men bijvoorbeeld wil achterhalen of de kraag van een mannetje *Philomachus pugnax* het resultaat is van het grotere succes van mannetjes met een grote kraag, ten opzichte van mannetjes met een minder opvallende kraag, zal men te weten moeten komen welke van de twee de meeste jongen krijgt. Tegelijkertijd is reproductief succes ook één van de moeilijkst te meten broedbiologische gegevens. Wanneer men een mannetje een nest met jongen ziet voeren, betekent dat niet dat die jongen genetisch gezien van hem zijn. Zelfs het zien van een copulatie, in veel gevallen op zichzelf al buitengewoon moeilijk, is geen garantie dat die twee partners ook daadwerkelijk samen jongen zullen krijgen.

De methode voor het identificeren van de ouders die de laatste jaren opmars maakt in de evolutionaire biologie is dezelfde als welke tegenwoordig wordt gebruikt bij het opsporen van criminelen: microsatellieten. Microsatellieten zijn korte stukjes DNA van twee tot zes base-paren (bijvoorbeeld CA) die een groot aantal keren worden herhaald (CACACACA... etc.). Dit soort 'stotter-DNA' komt veel voor in het genetisch materiaal van de meeste levende wezens, inclusief vogels, maar waar het precies voor dient weet niemand. Vroeger dacht men dat het nergens toe diende en werd het 'rommel-DNA' genoemd. De laatste jaren komen er geluiden dat het wel degelijk een functie heeft (Moxon & Wills 1999).

Voor de ornitholoog die wil weten welke vader bij welk kuiken hoort, doet de functie van microsatellieten er echter niet toe. Van groter belang is dat microsatellieten met grote regelmaat (in evolutionaire termen) een sectie verliezen of er een stukje bij krijgen, waardoor een streng bestaande uit 20 keer herhaalde CA's verandert in een streng met 19 of 21 keer herhaalde CA's. In tegenstelling tot mutaties in genen (die voor ei-



witten coderen) worden deze mutaties niet opgeruimd en zo kunnen er binnen een populatie dus een heleboel verschillende versies (allelen) van dezelfde microsatelliet voorkomen. Deze versies erven over van ouder op kind volgens de geneticawetten van Mendel.

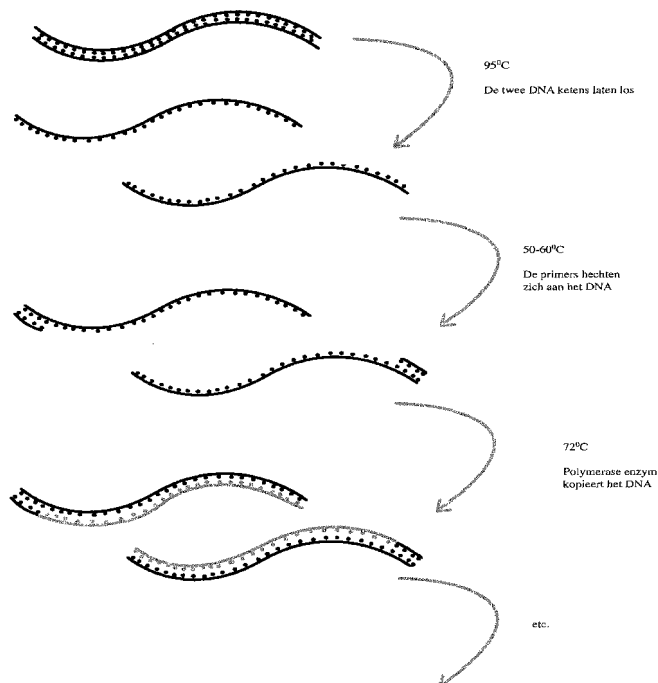
De lengteverschillen tussen microsatellieten kunnen zichtbaar worden gemaakt op een gel. Omdat de lengte zo vaak verandert, is de kans groot dat de lengte van een bepaalde microsatelliet verschillend is op de twee chromosomen van een vogelkuiken. Aangezien het kuiken het ene chromosoom van zijn moeder en het andere van zijn vader erft, is het mogelijk te achterhalen wie dat zijn, mits men DNA monsters heeft van de mogelijke ouders (figuur 3). Een voorbeeld (de nummers staan voor het aantal CA's): vader heeft 20 op het ene chromosoom en 18 op het andere en moeder heeft 21 en 17. De nakomelingen van dit stel zullen dus bestaan uit vier mogelijke combinaties: 20-21, 20-17, 18-21 en 18-17. Iedere andere combinatie is dus niet van dit paar. Stel bijvoorbeeld dat een kuiken in het nest van dit paar de combinatie 21-22 heeft. Die 22 komt bij geen van beide ouders voor, maar de 21 heeft hij of zij van de moeder. Dit geeft aan dat de moeder een slippertje heeft gemaakt.

Deze ontdekking heeft onze kijk op de vogelwereld danig op z'n kop gezet. Vogels werden vaak gezien als het schoolvoorbeeld van monogamie in de dierenwereld. Het mannetje en het vrouwtje helpen allebei met het grootbrengen van hun kroost en blijven soms hun hele leven bij elkaar. Die hechte vogelgezinnetjes blijken nu echter met grote regelmaat deels uit nageslacht van de 'melkboer' te bestaan. Tien tot twintig procent buitenechtelijke jongen in het nest van een zangvogel is niets bijzonders. De onbetwiste kampioenen in het vreemdgaan zijn de 'Fairy-wrens' *Malurus cyaneus* uit Australië, die met recht de meest ontrouwe vogels ter we-

reld worden genoemd. Meer dan 75% van de jongen in het gemiddelde nest van deze spectaculair gekleurde vogeltjes is niet het product van de man die ze voert (de 'sociale vader', Mulder *et al.* 1994). Voor de Fairy-wrens is overspel een serieuze zaak. De mannen voeren een speciale dans op om buitenechtelijke dames het hof te maken. De vrouwen gaan hier niet onmiddellijk op in, maar verlaten 's ochtends voor dag en dauw hun territorium om met de aantrekkelijkste buurman te paren. Uiteraard roepen deze bevindingen vele nieuwe vragen op. Wat heeft die ander dat haar eigen man niet heeft? En waarom voert haar eigen man die buitenechtelijke jongen eigenlijk?

Het aantal soorten dat met deze techniek (en de inmiddels wat ouderwets geachte 'multi-locus fingerprinting') is getest op huwelijkse trouw groeit gestaag en enige patronen beginnen vorm te krijgen. Zo is het duidelijk dat buitenechtelijk gedrag het meest voorkomt onder de zangvogels. Soorten als Noordse Stormvogel *Fulmarus glacialis* en de meeste roofvogels lijken het minder vaak te vertonen (zie bijvoorbeeld Birkhead 2000). Een van de meest interessante inzichten tot nu toe is de relatie die blijkt te bestaan tussen de frequentie van buitenechtelijke jongen en de kleurrijkheid van de volwassen mannen (Møller & Birkhead 1994, Owens & Hartley 1998). Sexuele selectie via vrouwelijke voorkeur werd traditioneel gezien als verklaring voor de kleurrijkheid van mannen in polygame soorten als pauwen *Pavo cristatus* of paradijsvogels, maar blijkt dus even goed te werken bij monogame soorten. Dit verklaart waarom mannelijke vinken *Fringilla coelebs*, Blauwborsten *Luscinia svecica* en Fairy-wrens kleurrijker zijn dan vrouwelijke. De mogelijkheden van verwantschapsonderzoek op familie-niveau zijn echter zeer uitgebreid en ook bij wat minder voor de hand liggende toepassingen zijn interessante resultaten behaald. Zo kon

Figuur 2. Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA van de te onderzoeken vogel wordt samen met een aantal ingrediënten in een speciale machine razendsnel van temperatuur veranderd. Het proces bestaat uit drie stappen, die ieder hun eigen specifieke temperatuur hebben. Na een cyclus is de DNA-streng gekopieerd. De nieuw aange maakte streng dient nu ook als basis voor nieuwe kopieën en na iedere cyclus is het aantal kopieën dus verdubbeld. Door dit zo'n 30 keer te herhalen krijgt men voldoende kopieën van dit stuk DNA voor verdere verwerking. *Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA of the bird to be examined is mixed with a number of ingredients in a special machine at rapidly changing temperatures. The process entails three phases, each characterised by its own temperature. After one cycle the DNA-strain is copied and both copies produce further copies, so that the number of copies doubles after each cycle. By repeating this process 30 times the DNA sample has become large enough for further processing.*



bijvoorbeeld met behulp van DNA worden vastgesteld dat mannetjes Witbaardmannikins *Manacus manacus* die net als bijvoorbeeld Korhoenders *Tetrao tetrix* op baltsplaatsen paren, niet willekeurig over deze baltsplaatsen verdeeld zijn. Mannetjes die familie van elkaar zijn vormen clusters op de baltsplaats. Vrouwjes worden aangetrokken door baltsplaatsen met veel mannetjes en door samen te baltsen trachten de familieleden gezamenlijk zoveel mogelijk vrouwjes te bevruchten. Aangezien het genetische materiaal van familieleden voor een groot deel gelijk is, hebben ook die mannetjes die geen paringen krijgen toch genetisch voordeel van de situatie (Shorey *et al.* 2000). Nauwe verwantschap is daarentegen een nadeel als het gaat om partners in een broedend paartje. In een geïsoleerde populatie Grote Karekieten *Acrocephalus arundinaceus* in Zweden konden onderzoekers aantonen dat naarmate de genotypes van de partners meer overeen kwamen (m.a.w. een hogere inteeltcoëfficiënt hadden) het broedsucces lager was (Bensch *et al.* 1994).

Het voetspoor van de evolutie

Verschillende delen van het DNA muteren met verschillende frequenties. Genen coderen voor

eiwitten en een mutatie in een gen zou tot gevolg hebben dat het verkeerde eiwit wordt gebouwd, wat catastrofaal kan zijn. Levende wezens hebben in de loop van de evolutie buitengewoon effectieve systemen ontwikkeld om mutaties in genen te repareren. Het gevolg is dat veel genen in de loop van de evolutie hetzelfde zijn gebleven en vandaag de dag kunnen worden teruggevonden in het DNA van zowel de mens als van een platworm.

Delen van het DNA die niet voor eiwitten coderen, maar bijvoorbeeld bepalen in welke mate een gen tot expressie komt, worden minder snel gerepareerd. DNA dat helemaal nergens toe dient, zoals bovengenoemde microsatellieten, worden schijnbaar nauwelijks opgeruimd. Zo verschillen delen van het DNA dus in de frequentie waarmee er mutaties in optreden, of beter gezegd, niet hersteld worden. Als men een idee heeft van de mutatiegevoeligheid van het stuk DNA dat men onderzoekt, kan men dit gebruiken om in te schatten hoe lang twee populaties van elkaar gescheiden zijn geweest (de zogenaamde 'moleculaire klok'). Hoe langer twee populaties van elkaar gescheiden zijn geweest, hoe meer tijd ze hebben gehad om unieke mutaties te 'verkrijgen'. Hoe meer mutaties een populatie heeft die niet in een andere populatie voorkomen, hoe langer deze twee dus geschei-

den zullen zijn geweest. Het zal niet lang duren voordat twee populaties die niet meer samen reproduceren unieke varianten van hun microsatellieten ophopen en microsatellieten zijn dus erg bruikbaar om heel nauwkeurig naar populatiestructuren te kijken. Voor vergelijking tussen bijvoorbeeld verschillende ondersoorten zijn ze echter te variabel. Voor dit doel doet men er beter aan om naar een wat minder mutatiegevoelig deel van het DNA te kijken.

Mitochondriën zijn onderdelen van de cel die fungeren als kleine 'energie-fabriekjes'. Ze erven over van moeder op kind en bevatten hun eigen DNA, het mitochondriaal DNA (mtDNA). Bepaalde delen van het mtDNA muteren vaak genoeg om bruikbaar te zijn voor het vergelijken van populaties die honderdduizenden (maar geen miljoenen) jaren van elkaar gescheiden zijn geweest. Als men iets weet van de mutatiesnelheid van zo'n stuk mtDNA (bijvoorbeeld 20% basenverschil per miljoen generaties) kan men dus schattingen maken van het aantal generaties dat tussen de twee populaties in ligt.

Een mooi voorbeeld van de resultaten die men hiermee kan bereiken is een onderzoek aan Bonte Strandlopers (Wenink *et al.* 1996). Paul Wenink bepaalde de basenvolgorde van een deel van het mtDNA van Bonte Strandlopers uit de hele wereld. Het blijkt dat verschillende populaties van deze soort van verschillende leeftijd zijn. Zo is de ondersoort uit Canada ruim 300 000 jaar oud, terwijl drie Europese ondersoorten binnen de laatste 10 000 jaar van elkaar zijn gescheiden. Met dit soort informatie kunnen we de ontstaansgeschiedenis reconstrueren. Zo is bijvoorbeeld lange tijd gedacht dat de ijstijden hebben geleid tot de vorming van veel vogelsoorten. De enorme ijskappen op het noordelijk halfrond zouden de populaties in verschillende eenheden hebben opgedeeld, die zich vervolgens ontwikkelden tot nieuwe soorten. Dit blijkt echter niet waar te zijn. Praktisch alle vogelsoorten zijn veel ouder dan de ijstijden (Klicka & Zink 1997).

Mitochondriaal DNA erft over van moeder op kind. Evolutie in mtDNA heeft dus alleen betrekking op de vrouwelijke lijn. Zo zou het bijvoorbeeld theoretisch mogelijk zijn dat er lange tijd geen uitwisseling van vrouwelijke Bonte Strandlopers tussen Canada en elders was, terwijl Europese mannen nog regelmatig in Canada kwamen. Een prachtig voorbeeld van dergelijke evolutie in één sekse en tevens een fraai voorbeeld van inventief gebruik van moleculaire

technieken vinden we in een recente studie aan Koekoeken *Cuculus canorus* (Gibbs *et al.* 2000). Het was reeds lang bekend dat vrouwelijke Koekoeken eieren van een bepaald type leggen die sterk gelijken op de eieren van hun gastheer. Zo zijn er graspieper-Koekoeken, karekiet-Koekoeken, roodborst-Koekoeken, etc. Onderzoekers vroegen zich af waarom deze Koekoek-varianten zich niet tot aparte soorten ontwikkelden. Om deze vraag op te lossen vergeleken ze het DNA van de verschillende lijnen. De onderzoekers beperkten zich echter niet tot één type DNA, maar bekeken zowel een aantal microsatellieten als het mtDNA. Het resultaat was opmerkelijk: de verschillende lijnen varieerden niet in hun microsatellieten, die via beide ouders overerven, maar wel in hun mtDNA, dat



Figuur 3. Autoradiogram van de PCR producten van een microsatelliet van een familie Zwarte Zwanen *Cygnus atratus*. M=man, V=vrouw, 1-5=kuikens. Ieder kuiken heeft één bandje ('allel') van de vader en één van de moeder, behalve kuiken nummer 1, die een allel bezit dat in geen van beide ouders voorkomt. Dit kuiken is niet het nageslacht van een van de partners (het allel dat wel met die van de ouders overeenkomt kan van zowel de vader of de moeder zijn). Inspectie van meerdere van dit soort microsatellieten is nodig om vast te stellen of dit komt doordat het kuiken geadopteerd is, of doordat de vrouw vreemd is gegaan. *Autoradiogram of PCR products of a microsatellite of a family of Black Swan Cygnus atratus.* M=male, V=female, 1-5=cygnets. Every cygnet got one band (allele) from the father and one from the mother, except cygnet 1, that has an allele that does not occur in either parent (the allele corresponding to the parents could be both the father's or the mother's). An investigation of more microsatellites is needed to know whether this chick was adopted or that the female mated with another male.

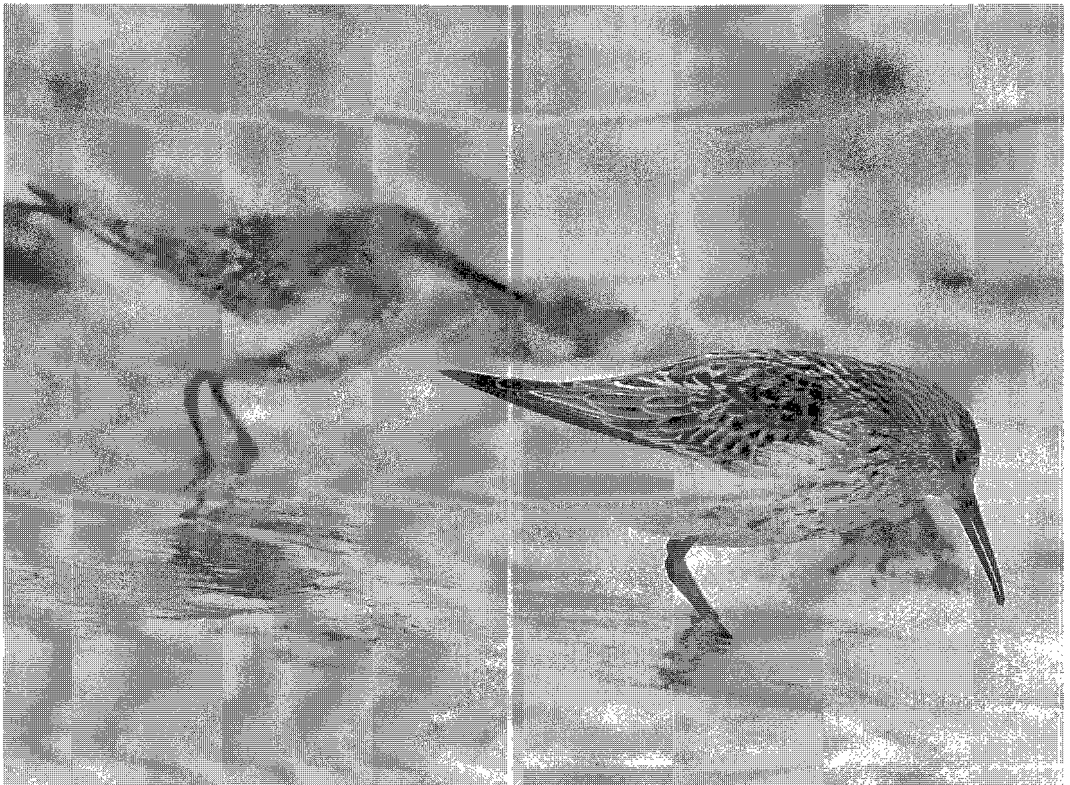
alleen via de moeder overerft. Met andere woorden, er bestaan genetische verschillen tussen de Koekoek-lijnen, maar die beperken zich tot de vrouwen. Doordat de mannen met alle typen vrouwen paren, voorkomen zij dat de verschillende lijnen van elkaar geïsoleerd raken en zo aparte soorten vormen.

Man of vrouw?

De simpelste en meest universele DNA-toepassing die momenteel gebruikt wordt in vogelonderzoek is het bepalen van de sekse met behulp van PCR. Vogels bezitten een chromosoom-paar dat verschilt tussen vrouwen en mannen, Z en W, analoog aan het X en het Y chromosoom in zoogdieren. Omgekeerd aan de situatie bij zoogdieren bezitten bij vogels vrouwen twee verschillende chromosomen, ZW, terwijl mannen twee Z chromosomen hebben.

Op zowel het Z als het W chromosoom ligt het zogenaamde CHD gen (chromo-helicase-DNA-bindend gen). In 1996 ontdekten Engelse en Groningse onderzoekers een set primers (figuur 2) die dit gen in vrijwel alle soorten vogels kun-

nen vermenigvuldigen (Griffith et al. 1996). Alleen in de loopvogels, zoals Struisvogels *Struthio camelus* en Emoës *Dromaius novaehollandiae*, lijkt het niet te werken. Het blijkt nu dat in de meeste vogelsoorten de lengte van het kopie van het CHD gen gelegen op het Z-chromosoom verschilt van dat op het W-chromosoom. Zelfs als dit niet zo is, is het vaak mogelijk om met behulp van restrictie-enzymen een van de twee korter te maken. Restrictie-enzymen herkennen een bepaalde base-volgorde en knippen die vervolgens doormidden. Aangezien de basevolgorde van het gen op het W-chromosoom verschilt van dat op het Z-chromosoom knippen deze enzymen op verschillende plekken. In beide situaties houdt men twee kopieën van het gen over van verschillende lengte voor vrouwtjes (één voor het gen van het Z en één van het W chromosoom) en twee kopieën van gelijke lengte voor mannetjes (beide van het Z chromosoom). Dit lengteverschil kan vervolgens zichtbaar worden gemaakt op een agarose-gel. Na enige tijd ziet men dan dus twee bandjes voor een vrouwtje en één voor een mannetje.



Bonte Strandlopers (Piet Munsterman) *Dunlins* *Calidris alpina*.

Het gebruik van deze methode heeft tot een aantal opzienbarende resultaten geleid. Het is nu mogelijk om de sekse te bepalen in soorten waarvan het mannetje en het vrouwtje er precies hetzelfde uitzien, zoals bijvoorbeeld bij veel papegaaien. Dit is bijvoorbeeld erg nuttig in broedprogramma's van zeldzame vogels. Van de Spix's Ara *Cyanopsitta spixii* was sinds 1987 nog maar één exemplaar in het wild in leven. Om een geschikte partner uit gevangenschap los te laten, was het essentieel te weten of de wilde vogel een man of een vrouw was. Door DNA te isoleren uit een ruiveer van deze vogel kon met behulp van PCR de sekse worden bepaald (het was een man) en een potentiële partner worden uitgezet (Griffith & Tiwari 1995). Sommige onderzoekers maken van de gelegenheid gebruik om te testen of de kakatoe *Cacatua galerita* van oma een mannetje of een vrouwtje is.

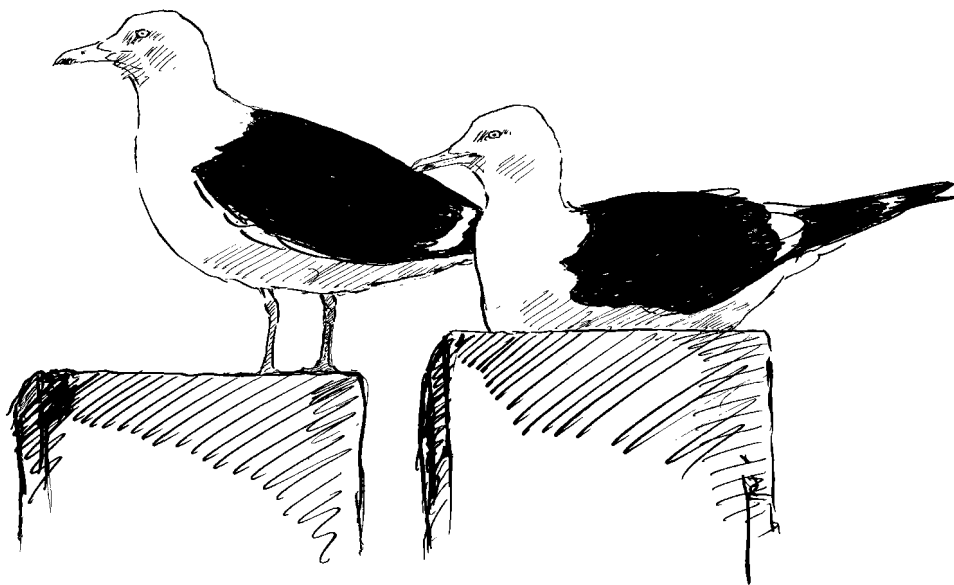
Bij de meeste vogelsoorten zijn volwassen mannen en vrouwen echter wel op kleeft of grootte met redelijk grote zekerheid van elkaar te onderscheiden. Dit is echter zelden het geval bij jonge vogels. Onderzoekers geïnteresseerd in de geslachtsverhouding van broedsels moesten tot voor kort wachten tot de jongen oud genoeg waren om de sekse te bepalen. In de tussentijd waren er vaak al een aantal overleden of verdwenen (mortaliteit onder jonge vogels is vaak hoog) en de resulterende geslachtsverhouding was dus mogelijk niet meer representatief voor de net uitgekomen jongen (primaire geslachtsverhouding). Met deze nieuwe methode kan echter de sekse worden bepaald vrijwel direct nadat het jong het ei verlaat. Het enige dat men nodig heeft is een klein druppeltje bloed. Voor grotere vogels zijn er zelfs manieren om al een bloedmonster te nemen terwijl het jong nog in het ei zit, hetgeen voor soorten waarvan de jongen nestvlinders zijn erg handig is. De zo bepaalde primaire geslachtsverhouding is inmiddels van een groot aantal vogelsoorten bekeken. Het blijkt dat sommige in staat zijn de sekse van hun nageslacht aan te passen aan de omstandigheden waarin ze leven. Op een aantal extreme gevallen na zijn deze manipulaties van de geslachtsverhouding erg subtiel en alleen vast te stellen door het geslacht van grote aantallen jongen moleculair te bepalen. Zo bleek dat vrouwtjes Kleine Mantelmeeuwen *Larus fuscus* die bijgevoerd werden en dus in goede lichamelijke conditie waren, meer zonen produceerden, terwijl vrouwtjes die experimenteel

waren 'uitgeput' vooral dochters maakten. Zonen van deze soort groeien sneller dan dochters en hebben dus relatief gezien meer baat bij de extra voeding die een welldoorvoede moeder in het ei kan stoppen. Dit verschil uitte zich duidelijker naarmate een vrouwtje meer eieren had gelegd. De bijgevoerde vrouwen bleven van het eerste tot het laatste ei iets meer zonen ($\pm 53\%$) produceren dan dochters. De eerste eieren van de uitgeputte vrouwen bevatten ongeveer voor de helft zonen, maar naarmate het legsel groeide en de vrouwtjes steeds meer van haar lichamelijke reserves verbruikten begonnen ze meer dochters te maken (Nager *et al.* 1999).

Kleine Mantelmeeuwen zijn niet de enige vogels die de sekse van hun nageslacht kunnen aanpassen. Vrouwelijke Pimpelmezen *Parus caeruleus* en Withalsvliegenvangers *Ficedula albicollis* die gepaard zijn met aantrekkelijke mannetjes (met respectievelijk een mooi ultraviolet petje en een groot wit voorhoofd), maken meer zonen dan dochters (Ellegren *et al.* 1996, Sheldon *et al.* 1999). Het idee is dat deze vrouwen hopen dat hun zonen die verleidelijke eigenschappen van hun vader erven en veel succes bij de vrouwen zullen hebben. Hierdoor zouden ze hun moeder een hoop kleinkinderen bezorgen. Een bizar en nog onverklaard fenomeen doet zich voor bij Eclectus Papegaaien *Eclectus roratus*. Deze vogels, waarbij het vrouwtje knalrood en het mannetje groen is, blijken in gevangenschap jaar in jaar uit eieren van dezelfde sekse te leggen. Sommige vrouwtjes legden series van 20 mannelijke eieren, om dan vervolgens jarenlang vrouwelijke eieren te produceren (Heinsohn *et al.* 1997).

Het mechanisme waarmee vogels de sekse van hun nageslacht kunnen beïnvloeden is voorlopig nog een mysterie. De sekse van een ei wordt waarschijnlijk slechts enkele uren voor de ovulatie bepaald (Krackow 1995) en de experimenten die tot nu toe zijn uitgevoerd, lijken er op te wijzen dat vrouwtjes gedurende deze periode de geslachtsverhouding manipuleren (Sheldon *et al.* 1999). Een andere mogelijkheid is dat vrouwtjes bevruchte eieren van de 'verkeerde' sekse aborteren na de ovulatie.

Overigens is een algemeen patroon van de beïnvloeding van de geslachtsverhouding dat voor alle vogelsoorten opgaat nog niet gevonden. Er zijn meerdere soorten waarvan op theoretische gronden werd verwacht dat ze de sekse van hun jongen zouden beïnvloeden, waarbij de uitgevoerde testen een negatief resultaat



gaven. Aangezien negatieve resultaten vaak moeilijker en minder leuk zijn om te publiceren, krijgen deze gevallen wellicht wat minder aandacht dan ze zouden verdienen.

Toekomst?

De grenzen tussen genetica en andere disciplines in de biologie, zoals ecologie en ethologie, zijn aan het vervagen. Het gebruik van nieuwe moleculaire technieken heeft niet alleen binnen de genetica, maar ook daarbuiten tot opzienbarende inzichten geleid. Onderzoekers hebben nu de methoden tot hun beschikking om dieper op onderwerpen als broedstrategieën en soortvorming in te gaan dan ooit tevoren. Ongetwijfeld zullen daar de komende jaren nieuwe technieken aan worden toegevoegd.

Dankwoord

Rob en Marijke Kraaijeveld, Ingrid Tulp, Simon Verhulst en Hans Schekkerman gaven nuttig commentaar op eerdere versies van dit artikel.

Literatuur

Bensch S., Hasselquist D. & von Schantz T. 1994. Genetic similarity between parents predicts hatching failure: nonincestuous inbreeding in the Great Reed Warbler? *Evolution* 48: 317-326.

Birkhead T. 2000. Promiscuity; an evolutionary history of sperm competition and sexual selection. Faber & Faber, London.

Darwin C. 1859. The origin of species by means of natural selection, or the preservation of favored races in the struggle for life. John Murray, London.

Ellegren H., Gustafsson L. & Sheldon B. C. 1996. Sex allocation in response to paternal attractiveness in a wild bird population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 1173-1178.

Gibbs H. L., Sorenson M. D., Marchetti K., Brooke M. L., Davies N. B. & Nakamura H. 2000. Genetic evidence for female host-specific races of the Common Cuckoo. *Nature* 407: 183-186.

Griffith R., Daan S. & Dijkstra C. 1996. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London B* 263: 1251-1256.

Griffith R. & Tiwari B. 1995. Sex of the last wild Spix's Macaw. *Nature* 375: 454.

Heinsohn R., Legge S. & Barry S. 1997. Extreme bias in sex allocation in Eclectus parrots. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264: 1325-1329.

Klicka J. & Zink R. M. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science* 277: 1666-1669.

Krackow S. 1995. Potential mechanisms for sex ratio adjustment in mammals and birds. *Biological Reviews* 70: 225-241.

Møller A. P. & Birkhead T. R. 1994. The evolution of plumage brightness in birds is related to extra-pair paternity. *Evolution* 48: 1089-1100.

Moxon R. E. & Wills C. 1999. DNA microsatellites: agents of evolution? *Scientific American*, January 99: 72-77.

Mulder R. A., Dunn P. O., Cockburn A., Lazenby-Cohen K. A. & Howell M. J. 1994. Helpers liberate female fairy-wrens from constraints on extra-pair mate choice. *Proceedings of the Royal Society of London B* 255: 223-229.

Nager R. G., Monaghan P., Griffith R., Houston D. C. & Dawson R. 1999. Experimental demonstration that offspring sex ratio varies with maternal con-

dition. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96: 570-573.

Owens I. P. F. & Hartley I. R. 1998. Sexual dimorphism in birds: why are there so many different forms of dimorphism? Proceedings of the Royal Society of London B 265: 397-407.

von Schantz T., Wittzell H., Göransson, Grahn M. & Persson K. 1996. MHC genotype and male ornamentation: genetic evidence for the Hamilton-Zuk model. Proceedings of the Royal Society of London B. 263: 265-271.

Sheldon B. C., Andersson S., Griffith S. C., Ornsborg J. & Sendecka J. 1999. Ultraviolet colour variation

influences blue tit sex ratios. Nature 402: 874-877.

Shorey L., Piertney S., Stone J. & Höglund J. 2000. Fine-scale genetic structuring on *Manacus manacus* leks. Nature 408: 352-353.

Watson J. D. 1968. The double helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA. Weidenfeld & Nicholson, London.

Wenink P. W., Baker A. J., Rösner H. & Tilanus M. G. J. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of Holarctic breeding Dunlins (*Calidris alpina*). Evolution 50: 318-330.

DNA as a tool in ornithological research

With the development of new techniques in molecular genetics, many have become available to the ecologically or behaviourally oriented biologist. This paper explains three of the methods most commonly used in ornithology: phylogenetic and population genetic applications, paternity assessment using microsatellite markers and molecular sex-determination. These methods are illustrated by examples of the results that have been obtained.

The basic technique responsible for these advances is the polymerase-chain-reaction (PCR). Using PCR, a small part of the genome can be amplified many times, after which the length or base-pair sequence can be determined. Which part is amplified depends on the primers that are added to the reaction. A recently discovered pair of primers amplifies a gene on the sex chromosomes of virtually all bird species. As the length of this gene varies on the two types of sex chromosomes, the sex of an individual bird can be determined. Length-differences are also used in parentage-assessment. Microsatellites, short repetitive sections of DNA,

are common in the genomes of most organisms. They can vary considerably in length (i.e. number of repeats), which often leads to a large number of different varieties (alleles) of a specific microsatellite in one population. These are inherited according to simple Mendelian genetics and can therefore be used to match parents to their offspring. The application of this method has led to the discovery that extra-pair paternity is a widespread phenomenon in birds. Other sections of the DNA are less variable than microsatellites and these are useful when comparing different species or even different populations of the same species, depending on their mutability. Parts of the maternally inherited mitochondrial DNA are often used for studies of this kind. The base-pair sequence is determined and compared between different populations. When the estimate of the mutation rate of the particular piece of DNA is known, the length of time for which two populations have been isolated from each other can be estimated by counting the number of bases that are different between the two.

These techniques have led to many interesting insights in the life-history and evolution of birds. Undoubtedly new techniques will become available in the future.