

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen
slechts toegestaan met uitdrukkelijke toestemming
van het NIOZ.

Geslachtsdeterminatie bij de Zeekoet (Uria aalge) d.m.v.
gaschromatografische analyse van het plasma

door

J. van der Steen

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctorale studie
in het tijdvak maart 1974 - september 1974

aan

het NIOZ te Texel

voor

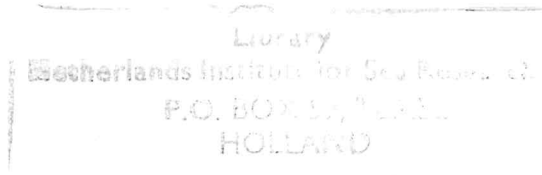
Prof. Dr. J.P. Kruijt

Zoölogisch Laboratorium

Rijksuniversiteit Groningen

onder supervisie van

C. Swennen



NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLICATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1975 - 14

Geslachtsdeterminatie bij de Zeekoet (Uria aalge) d.m.v.

gaschromatografische analyse van het plasma

door

J. van der Steen

Intern verslag

Inhoud:

I. Summary	1
Samenvatting	1
II. Inleiding	2
III. Materiaal en methode	2
IV. Resultaten	4
V. Discussie	5
VI. Literatuur	6

Tabellen

Figuren

I. SUMMARY

The lipid fractions of the plasma of 44 guillemots (Uria aalge) is analysed, by means of a gas chromatograph, to sex these sea birds. The ultimate determination was obtained by comparing the relative peak surface of a peak between males and females. The method appeared to have a significance of 75-90% in relation to a subsequent study of the behaviour of the birds.

SAMENVATTING

De lipidfractie van het plasma van vierenvestig Zeekoeten (Uria aalge) is geanalyseerd met behulp van een gaschromatograaf, teneinde het geslacht van deze vogels te kunnen vaststellen. Voor de uiteindelijke

determinatie werd gebruik gemaakt van een verschil in relatief pickoppervlak van één pick tussen mannetjes en vrouwtjes. De gebruikte methode bleek na vergelijking met de gegevens van het aansluitend gedragsonderzoek een betrouwbaarheid te hebben van 75-90%.

II. INLEIDING

Voor biologisch en ethologisch onderzoek aan dieren is het van groot belang de sexe van de dieren te kennen. Wil men dieren in gevangenschap tot voortplanting brengen dan is een juiste verdeling van de sexen in de kooien noodzakelijk. Bij de Zeekoet valt het geslacht echter niet op uitwendige morphologische kenmerken vast te stellen (STORER, 1962). In de loop der tijd zijn voor vogelsoorten, waarvan de sexedeterminatie moeilijkheden oplevert, enkele technieken ontwikkeld om het geslacht te bepalen. Technisch het eenvoudigst is een onderzoek van de cloaca, zowel zonder als met een cloacoscoop. Dit geeft voor jonge eendachtigen, kippen en pinguins goede resultaten. Eventueel kan gebruik gemaakt worden van chromosomen onderzoek door middel van weefselkweek uit de veerpulpa (HOFFMANN, 1972). Voor roofvogels ontwikkelde DIETER (1973) een methode waarbij door centrifugale chromatografie op silica-gel kolommen een analyse gemaakt wordt van de steroid hormonen in het plasma.

Om redenen van technische en/of praktische aard was geen van deze methoden voor ons op korte termijn bruikbaar. Gezocht werd daarom naar een nieuwe methode, die werd gevonden door analyse van de lipidfractie van het plasma met behulp van gaschromatografie.

III. MATERIAAL EN METHODE

Van vijf op het instituut aangebrachte Zeekoeten, die het slachtoffer waren van stookolie en in slechte conditie verkeerden, is bloed afgetapt, waarna door sectie het geslacht is vastgesteld. Het bloed werd door

toevoeging van heparine onstolbaar gemaakt en gekoeld. Hierna werd het gedurende 4 minuten gecentrifugeerd in een tafelcentrifuge (MSE, 4000 toeren/minuut). Het aldus verkregen plasma werd gedecanteerd en en voor verdere bewerking bewaard bij -40°C . Voor gebruik werd het plasma twee keer onteiwit door extractie met twee volume eenheden dichloormethaan (CH_2Cl_2 , bidestillata). Na elke extractie werd de onderstaande vloeistof afgepipetteerd en overgebracht in een kolfje met glazen stop. De aldus in dichloormethaan opgeloste, verkregen lipidfractie van het plasma is vervolgens onder vacuum drooggedroogd (Rotavapor R, Büchi), waarbij er voor gezorgd werd dat de temperatuur van het waterbad beneden 35°C , het kookpunt van CH_2Cl_2 , bleef.

Het verkregen residu werd hierna opgelost in een mengsel van dichloor methaan en methanol (9 : 1) en overgebracht in een klein puntbuisje. Deze handeling werd vijf maal herhaald. De verkregen hoeveelheid werd vervolgens onder stikstof ingedampt, waarna het residu werd opgelost in Kooldisulfide (CS_2). Hiervan werd 5 μl ingespoten in een gaschromatograaf (Tracor 550, Technation) onder de volgende condities (BURCHFIELD & STORRS, 1970).

Chromatograph	: Tracor 550
Column dimensions	: 6 ft x 2.5 mm
Solid support	: Chromosorb W.AW(DCMS) 80-100 Mesh
Stationary phase	: 3.8% SE-30
Temperature	: 200°C
Carrier gas	: N_2
Detector	: flame ionisation
Analysis time	: 85 minutes

De resultaten zijn geanalyseerd en de pieken in percentages uitgedrukt volgens de formule:

$$(1) \text{ per cent} = 100 \cdot \frac{a_i}{\sum_{j=1}^n a_j}$$

a = peak area

n = total number of peaks

Na analyse van de resultaten is van alle vierenvoertig Zeekoeten vier ml. bloed afgetapt uit de vleugelvene ter hoogte van de ulna en volgens de hierboven beschreven methode bewerkt.

IV. RESULTATEN

Uit de sectie bleek dat van de vijf op het NIOZ aangebrachte stookolie-slachtoffers vier vogels van het mannelijke en één van het vrouwlijke geslacht waren. De vijf vogels waren alle in het tweede levensjaar.

Bij de resultaten verkregen uit de gaschromatograaf bleek er een grote variatie tussen de vogels onderling te bestaan wat betreft de absolute hoogte van de verkregen pieken. De piekoppervlakken zijn derhalve in percentages uitgedrukt (1).

Het aantal pieken bedraagt negentien. Deze zijn genummerd van a t/m s. Op grond van de resultaten verkregen met deze vijf vogels is voor de uiteindelijke bepaling van geslacht bij de overige vogels gebruik gemaakt van de 18e piek, piek r. De retentietijd van deze piek bedraagt 54 minuten onder de vermelde condities. In Fig. 1 zijn de chromatogrammen voor respectievelijk een mannetje en een vrouwtje weergegeven. Het oppervlak van piek r is bij het vrouwtje relatief kleiner dan bij het mannetje.

Voor de mannelijke exemplaren bedraagt het gemiddeld oppervlak 6.5%, voor de vrouwelijke exemplaren 2.5%, met resp. een standaarddeviatie van $\pm 2.6\%$ en $\pm 1.7\%$. Voor de determinatie van het geslacht gold als criterium voor een mannetje dat het piekoppervlak r meer dan 3.9% bedroeg, voor een vrouwtje dat het piekoppervlak r minder dan 3.9% bedroeg. Tijdens een hierop aansluitend gedragsonderzoek zijn de resultaten hiervan vergeleken met de determinatie van het geslacht met behulp van de gaschromatograaf. Deze staan samengevat in Tabel II.

De geslachtsdeterminatie m.b.v. gaschromatografische analyse van

het plasma was voor 75% zeker in overeenstemming met de gegevens van het gedragsonderzoek, in 15% van de gevallen bestond er twijfel, en 10% was fout gedetermineerd. (Tabellen I en II).

V. DISCUSSIE

Bij de gebruikte methode ter bepaling van het geslacht van de Zeekoeten is als maat het relatief oppervlak van één piek genomen. Het zou echter beter geweest zijn indien eerst de identiteit van de betreffende stof was vastgesteld, waarna een interne standaard toegevoegd had kunnen worden. Met deze methode is het mogelijk meer exacte resultaten te verkrijgen. Binnen het kader van dit onderzoek viel dit echter niet te verwezenlijken.

Slechts de identiteit van één stof kon worden vastgesteld, nl. piek 5, waarvan de retentietijd overeenkwam met die van cholesterol. Bij een aantal monsters kwam op het chromatogram een verontreiniging voor. Bij controle bleek dit alleen het geval bij geplasmolyseerde bloedmonsters. Dit tengevolge van het feit dat het afgetapte bloed met te grote kracht uit de injectiespuit in een buisje, waarin het tijdelijk werd bewaard, was gespoten. Deze verontreiniging bemoeilijkte de berekening van het relatief pieroppervlak in hoge mate.

Het feit dat de resultaten van het gedragsonderzoek niet altijd in overeenstemming waren met die van de determinatie m.b.v. gaschromatografische analyse van het plasma kan deels aan bovenstaande feiten worden toegeschreven, deels aan mogelijk een verkeerd gedragspatroon van enkele van de op dat moment nog niet geslachtsrijpe Zeekoeten.

De gebruikte methode heeft als groot voordeel dat men slechts een zeer kleine hoeveelheid bloed hoeft af te tappen, dat ingevroren kan worden tot het wordt geanalyseerd.

Het verdient aanbeveling dat een paar waarvan het geslacht bekend is in een blindoefening wordt gebruikt, voordat een serie vogels wordt geanalyseerd. Verwacht kan worden dat de betrouwbaarheid van de determinatie, die bij de geanalyseerde Zeekoeten 75%-90% bedraagt door toepassing van verbeterde methodes nog sterk vergroot kan worden.

VI. LITERATUUR

BURCHFIELD, H.P. & E.E. STORRS, 1970. Biochemical application of Gaschromatography. Academic Press New York, U.S.A.
517-520.

DIETER, M.P., 1973. Sex determination of Eagles, Owls and Herons by analyzing plasma steroid hormones. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife. Special Scientific Report Wildlife no. 167.

HOFFMANN, R., 1972. Einfache Methode zur Darstellung von Vogelchromosomen aus der Federpulpa. Jour. f. Ornitholog. 111: 334-336.

OOSTEN, J.R. VAN, & J.W. FORESTER, 1974^x. Sexing techniques on birds. Gamebird Gazette 23 (2): 20-21.

STORER, R., 1952. A comparison of Variation, Behaviour and Evolution in the Sea Birds genera Uria and Cepphus. Univ. Calif. Publ. Zoöl. 52: 121-222.

SWENNEN, C., 1973. Nieuwe mogelijkheden voor laboratoriumonderzoek aan zeevogels. Het Vogeljaar 21 (2): 323-327.

^x (niet gezien).

Tabel I (Kooi 1)

Nr.	Kleurcode	Geslachtsdeterminatie	
		plasma	gedrag
786	-- r -- a	man	vrouw?
788	-- g -- a	man	man
789	r w -- a	vrouw	vrouw
790	r g -- a	vrouw	vrouw
791	w r -- a	man	vrouw
792	w g -- a	man	man
793	g r -- a	vrouw	vrouw
794	g w -- a	man	man
795	-- -- r a	vrouw	vrouw
796	-- r r a	vrouw	vrouw?
190	-- g r a	vrouw	vrouw?
799	r r r a	man	man
178	g w w a	vrouw	?
181	-- r g a	man	vrouw
182	-- w g a	vrouw	vrouw?
186	r g g a	man	man
194	w w g a	vrouw	vrouw
192	-- a g g	?	?
195	w w -- a	man	man
189	-- a r r	vrouw	vrouw
798	g g -- a	vrouw	man
191	r r -- a	?	vrouw?
188	-- a w w	man	man
184	r r g a	man	vrouw

Tabel II (Kooi 2)

Nr.	Kleurcode	Geslachtsdeterminatie	
		plasma	gedrag
800	r w r a	man	man?
160	r g r a	man	man
161	w r r a	vrouw	vrouw
162	w w r a	man	man
163	w g r a	man	man
164	g r r a	vrouw	vrouw
165	g w r a	vrouw	vrouw
166	g g r a	vrouw	vrouw
167	-- w a	vrouw	vrouw
168	-- w w a	man	man
169	-- r w a	man	man
170	-- g w a	vrouw	vrouw
171	r r w a	vrouw	?
172	r w w a	man	man
173	r g w a	man	vrouw
175	v w v a	vrouw	vrouw
176	v g w a	man	man
177	g r w a	vrouw	vrouw
180	-- -- g a	m n	vrouw
183	-- g g a	vrouw	vrouw

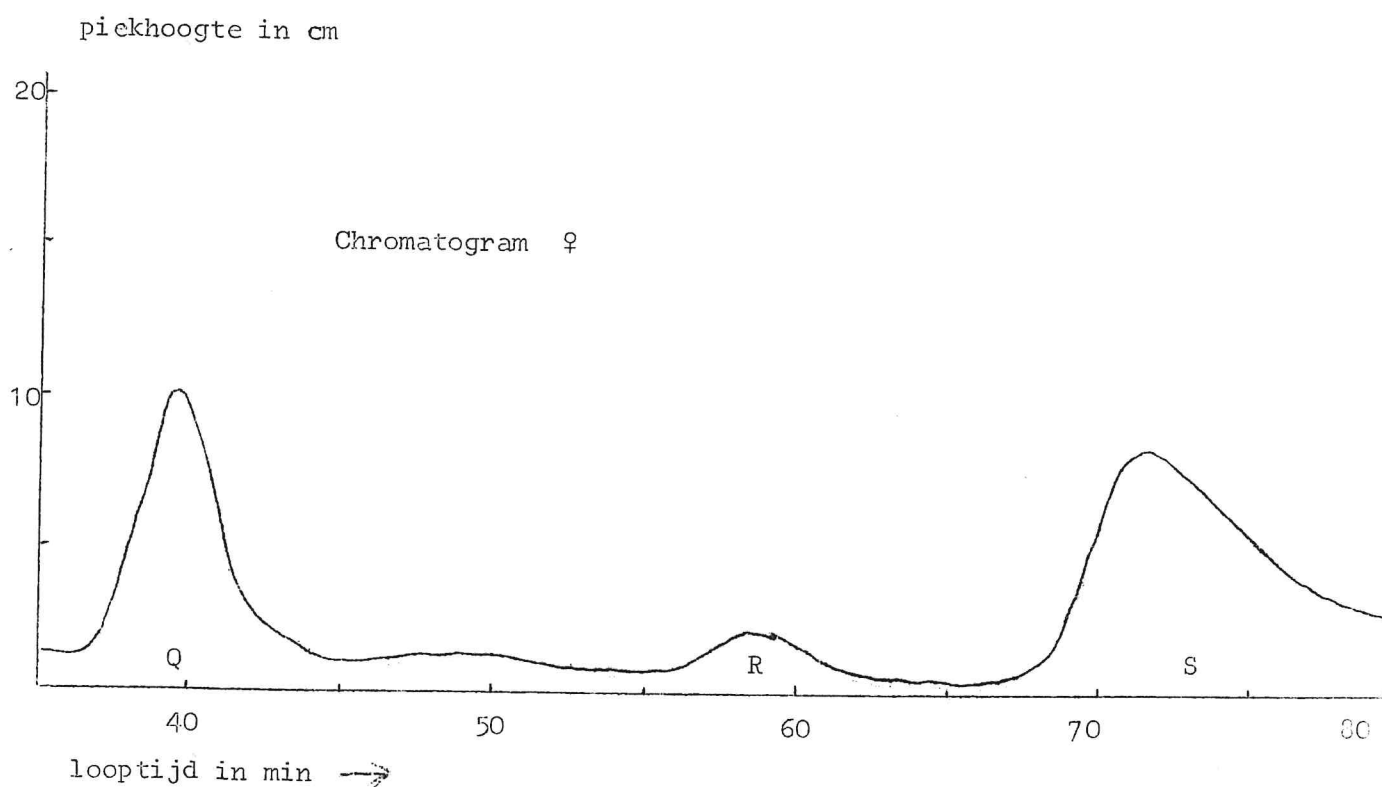
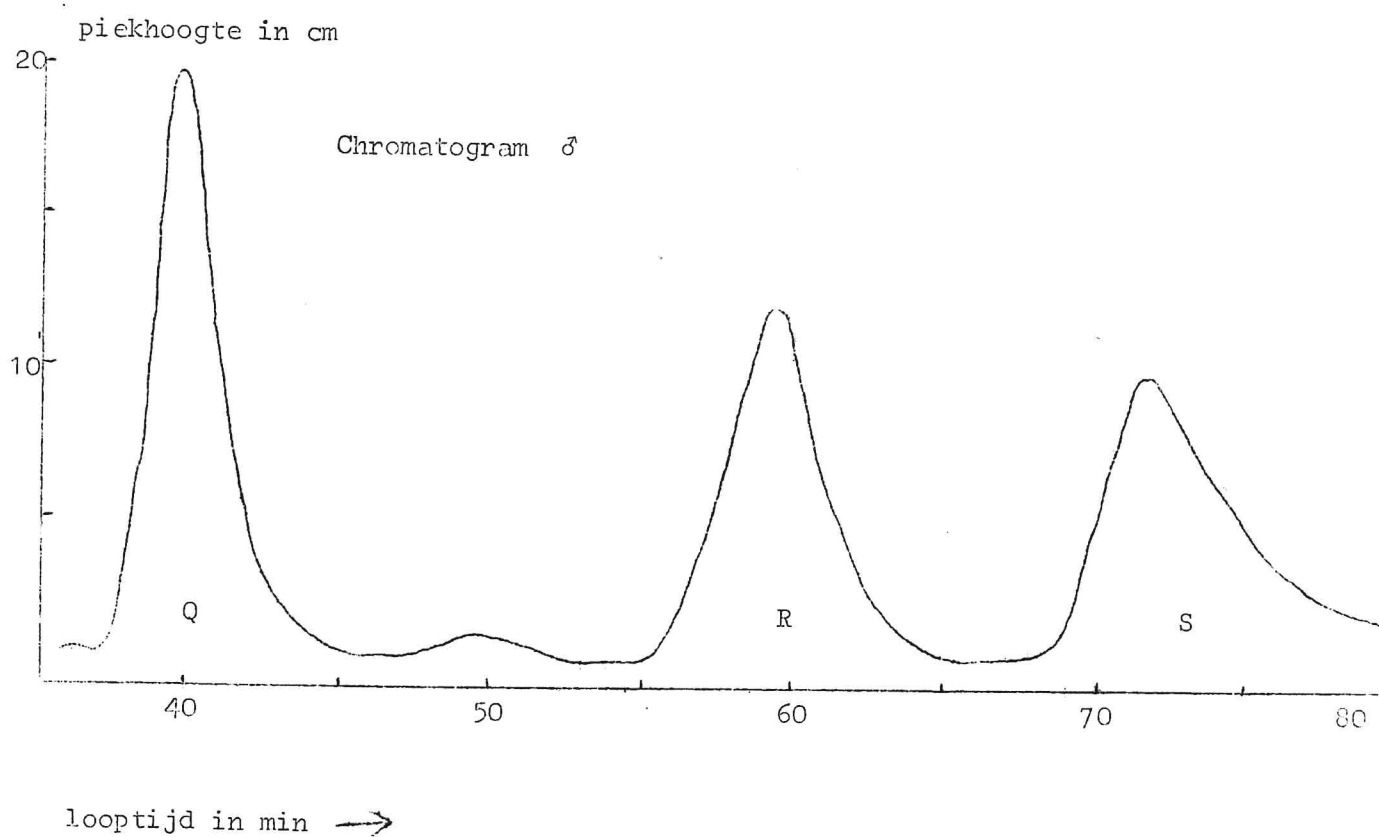


Fig. 1. Gaschromatogram van mannelijke en vrouwelijke zeekoet.