

Geelkruinkwak

strandvondst Ouddorp (ZH) 14 mei 2021



Vondst

Op 14 mei 2021 waren Esther Kraaijeveld-de Jong en ik op zoek naar broedende bontbekplevieren op het strand van Ouddorp, Goeree. Ter hoogte van de Middelduinen vonden we een dode vogel op het vloedmerk die in de eerste instantie onze wenkbrauwen deed rijzen. Het duurde even tot het kwartje viel en we ons realiseerden dat het formaat, de zware dolksnavel, lange poten en grijze vleugels op een zwartkruinkwak *Nycticorax nycticorax* wezen. We deelden een foto in de appgroep van voormalig Alphense vogelaars, waarop Remco Hofland de mogelijkheid van een geelkruinkwak *Nyctanassa violacea* opperde. In Egypte kon het immers ook. Bij nadere inspectie leek de vogel inderdaad lichte veren over de hele lengte van de kruin te hebben. Maar ook lichte veren op de keel. In verwarring stopten we de vogel in een plastic zak en namen hem mee om er thuis nog eens beter naar te kijken. Daar bleken er ook lichte randen langs de grote dekveren te lopen, wat paste op geelkruin, maar niet op zwartkruinkwak. Ondertussen wezen zowel Kees de Vries als Robbin van Dijk op de omhoog gekromde ondersnavel, die bij een zwartkruinkwak juist recht is. De vogel werd overgedragen aan Naturalis, waar het skelet in de collectie is opgenomen (RMNH.AVES.259422). Bij de preparatie werd een aantal veren en een weefselmonster bewaard. Met dat laatste is een DNA analyse uitgevoerd, die de determinatie als geelkruinkwak bevestigde.

Beschrijving

De beschrijving is gebaseerd op foto's en aantekeningen gemaakt op de dag van de vondst. Biometrie is opgemeten door de preparateur van Naturalis (Becky Desjardins; bijlage 1).

GENDER De preparateur meende eierstokken te zien, wat zou duiden op een vrouw.

GROOTE & BOUW Een kleine reiger met stevige dolkvormige snavel, vrij lange nek en poten. *Snavel*. Lengte 67,64 cm. Zware, donkere dolksnavel. De boven- en ondersnavel krommen beide naar de punt toe (fig.1 a). Snavel in bovenaanzicht opvallend breed (fig. 1b).

Vleugel. Lengte 210 cm. Brede, ronde vleugel (fig. 2).

Poten. Tarsuslengte 102,4 cm. Stevige, vrij lange poten.

KOP Grotendeels zwart; donkerder dan grijze nek. Lichte veren over de hele lengte van de kruin. Twee lange witte sierveren vanaf de achterkant van de kruin. Lichte veren op de wang en op ondersnavel (fig. 1a).

BOVENDELEN Grijs.

ONDERDELEN Grijs.

VLEUGEL Boven en onderzijde staalgrijs. Langs in ieder geval de grote dekveren zijn lichte randen te zien (fig. 2).

MAAGINHOUD De maaginhoud werd beschreven als volgt: "Well, it's really just mush. No scales. I'm not sure it was a fish. Probably DNA needs to be done. And there wasn't much - through rot or starvation I don't know." De maag is bewaard. Mogelijk lukt het nog om er DNA en/of isotopen onderzoek aan te doen, maar in de huidige corona situatie verloopt dit erg traag.



Figuur 1. Kop en snavel (boven zijaanzicht, onder bovenaanzicht).



Figuur 2. Vleugel bovenaanzicht. Let op de lichte randen van de grote dekveren.

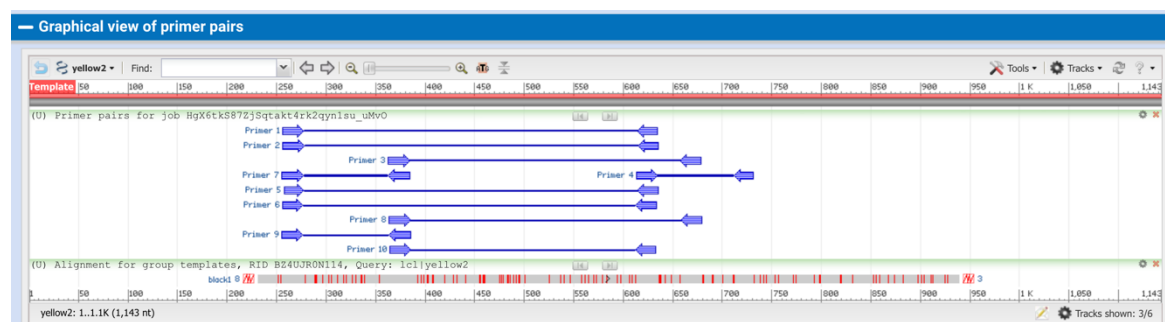
DNA analyse

Primer design

Op NCBI waren cytochrome B sequenties aanwezig van vijf zwartkruinkwakken en drie geelkruinkwakken (tabel 1). Cytochrome B is een mitochondriaal gen dat veel gebruikt wordt voor fylogenetische studies. Deze sequenties zijn tegen elkaar gelegd met behulp van *custal omega*. Uit deze alignment bleek dat zwartkruin- en geelkruinkwak op meer dan 60 posities consistent van elkaar verschilden. Op stukken waar de sequentie van beide soorten overeenkwamen zijn polymerase chain reaction (PCR) primers ontwikkeld met *primer blast*. Met deze primers is PCR uit te voeren op DNA van zowel zwartkruin- als geelkruinkwak. Uit de output van *primer blast* (fig. 3) werden twee sets primers gekozen om mee verder te werken (sets 1 en 3). Deze primers amplificeerden twee deels overlappende delen van het cytochrome B gen.

Tabel 1. Gegevens cytochrome B accessions die zijn gebruikt om primers te ontwikkelen en als vergelijkingsmateriaal.

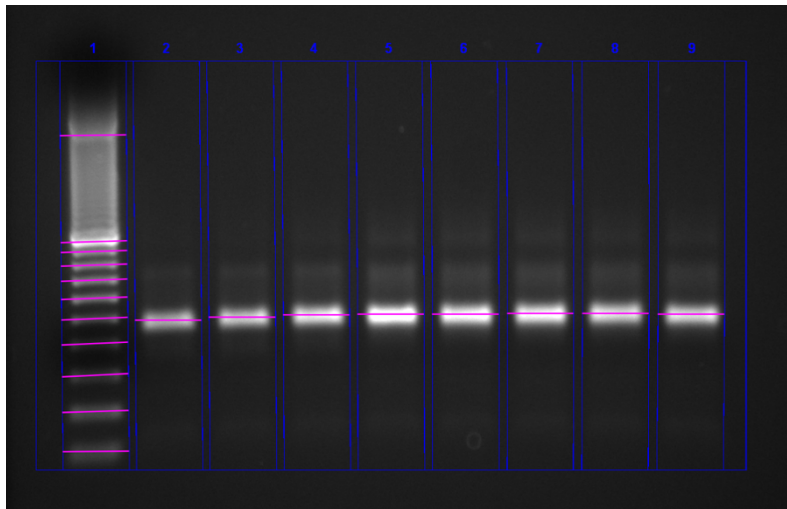
Soort	Accession nummer	Jaar	Plaatst
Geelkruinkwak	KX534435	2016	Virgin Islands (USA)
	EU166979	2007	USA
	AF193828	1999	Louisiana (USA)
Zwartkruinkwak	MH645657	2012	India
	AF193829	1999	USA
	HM804879	2010	India
	HM804878	2010	India
	HM804877	2010	India
	GU346977	2009	Taiwan



Figuur 3. Output van *Primer Blast*. De grijze balk onderaan het figuur geeft de overeenkomst tussen de gebruikte sequenties (drie sequenties van geelkruinkwak, zes sequenties van zwartkruinkwak) weer, waarbij grijze delen hetzelfde zijn en rode strepen verschillen aangeven. Het algoritme heeft primers (de blauwe pijlen) ontwikkeld op de grijze delen, zodat deze passen op zowel geelkruinkwak als zwartkruinkwak. De blauwe lijn tussen de twee primers van een paar is het gebied dat geamplificeerd wordt tijdens PCR. Primer paren 1 en 3 zijn gebruikt in deze studie.

DNA extractie en PCR

DNA werd geïsoleerd uit het weefselmonster dat door Naturalis was bewaard met de QIAmp mini kit (Qiagen) volgens de instructies van de fabrikant. Twee afzonderlijke PCR reacties werden uitgevoerd in triplo, elk met één van de twee primer paren. Een klein deel van het PCR product werd zichtbaar gemaakt via gelelectroforese op een agar gel. Zoals verwacht uit de Primer Blast amplificeerde primerset 1 een product van 377 baseparen en primerset twee een product van 315 baseparen (figuur 4).



Figuur 4. Gelfoto van het PCR product van primer sets 1 (laan 1, 2, 5 en 6) en 2 (laan 3, 4, 7, en 8). In laan 1 in een DNA ladder te zien, waarvan voor elk bandje de lengte bekend is.

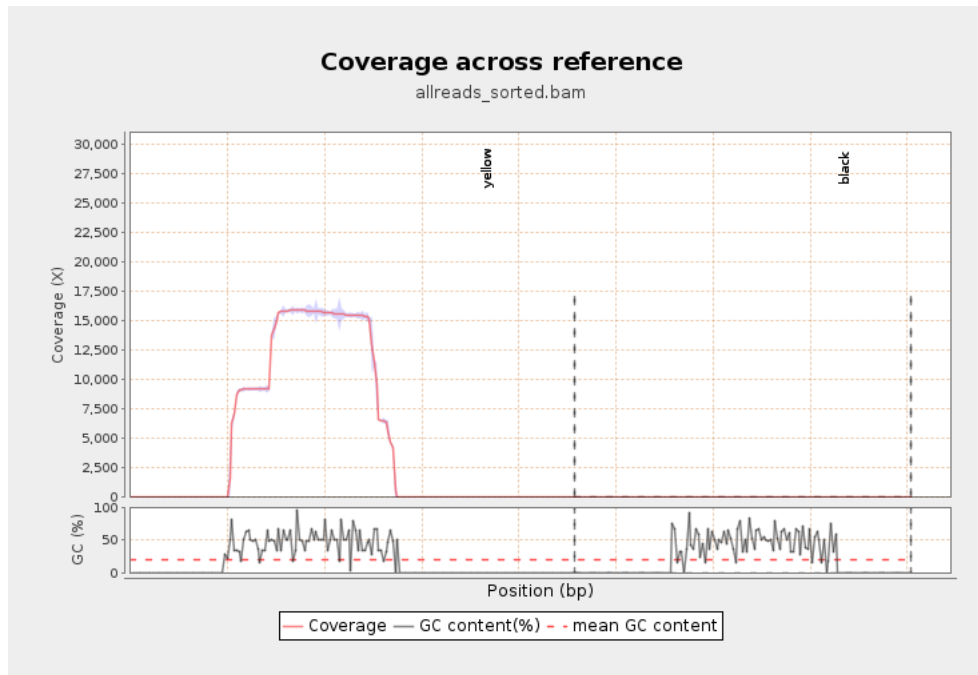
Sequencing

Het PCR product werd opgewerkt voor sequencing op een Oxford Nanopore 'flongle' volgens standaard protocollen. Bij deze techniek wordt het DNA molecuul (hier een PCR fragment) gebonden aan een motor eiwit en door een nanoporie in een membraan getrokken. Over deze membraan staat een potentiaalverschil en de verschillende basen (de DNA 'letters') verstoren dit ieder op een kenmerkende manier als ze door de porie gaan. Dit signaal wordt gemeten en omgezet naar sequentie. In vergelijking met de standaard Sanger sequencing techniek worden met Oxford Nanopore relatief veel foutjes gemaakt. Dit wordt ondervangen door meerdere kopieën van hetzelfde stuk DNA af te lezen. De foutjes zitten random verdeeld over de verschillende reads, waardoor je de overlap tussen reads kunt gebruiken om ze te corrigeren.. De sequencing resulteerde in 16,539 reads, wat wil zeggen dat 16,539 PCR kopieën zijn afgelezen.

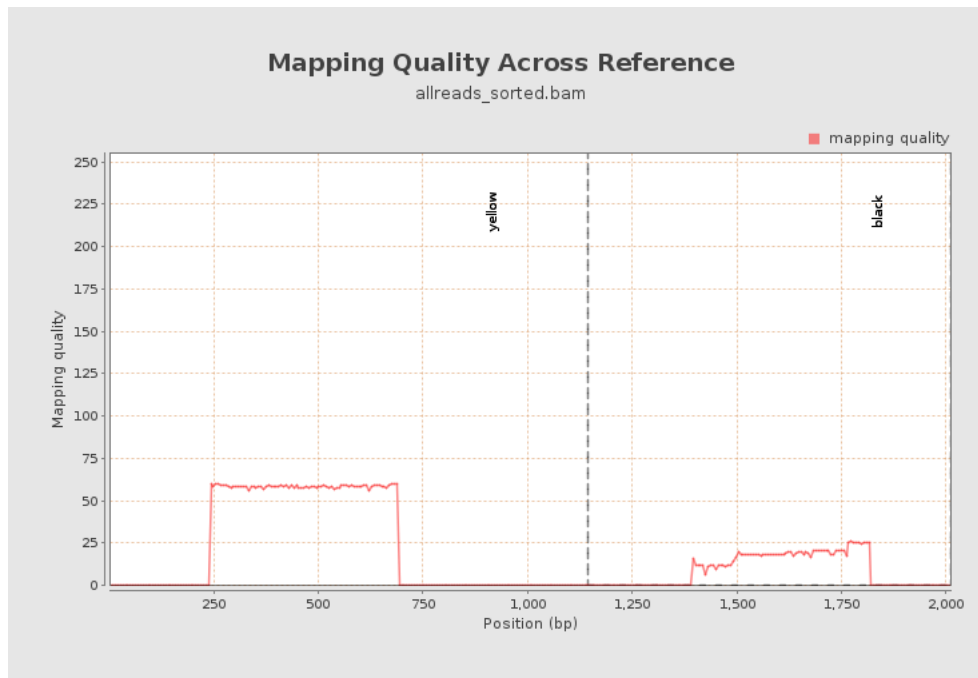
Read mapping

Van zowel de zwartkruin- als greenkruinkwak werd een representatieve sequentie uitgezocht om dienst te doen als referentie. Voor de geelkruinkwak was dit accession EU166979. Deze twee sequenties werden samengevoegd in een multifasta bestand. De 16,539 reads uit de nanopore sequencing werden langs deze referentiesequentie gelegd met behulp van *minimap2*. Hierbij had het algoritme dus de mogelijkheid elke read te plaatsen tegen de zwartkruin- of de geelkruinreferentiesequentie, waarbij het altijd zou kiezen voor degene met de meeste gelijkheid. Uiteindelijk plaatste *minimap2* vrijwel alle reads langs de geelkruin referentie (fig. 5). Slechts enkele reads werden langs de zwartkruin

referentie geplaatst en dan alleen als secundaire alignment. De kwaliteit van alignment (een maat gebaseerd op het aantal aanpassingen die de software moest aanbrengen in de read om deze te kunnen plaatsen) was in dit geval veel lager dan bij alignment tegen de geelkruinkwak (fig. 6). Dat laatste wil zeggen dat diezelfde read bij voorkeur tegen de geelkruinreferentie werd geplaatst, maar met meer verschillen ook langs de zwartkruin referentie kon worden geplaatst. Deze alignment werd gevisualiseerd in de *integrative Genome Viewer* (fig. 7).



Figuur 5. Vizualisatie van de read alignment met *qualimap*. Het bovenste paneel geeft de *coverage* weer, ofwel het aantal reads dat tegen elke positie van de referentiesequentie geplaatst werd. De linkerhelft is de alignment tegen de geelkruinkwakreferentie, het rechterdeel tegen dat van de zwartkruinkwak. Te zien is dat de vrijwel alle reads tegen de geelkruinkwak werden geplaatst (de coverage komt boven de 15000x). Slechts enkele reads werden tegen de referentie van de zwartkruinkwak geplaatst (coverage te laag om op deze schaal te zien). Verder is bij de alignment tegen de geelkruinkwak het aantal geplaatste reads lager aan de zijkanten en hoger in het centrale deel van de referentiesequentie. Dit komt omdat het centrale deel werd geamplificeerd door zowel primer paar 1 als 3 (zie ook fig. 3). Het onderste paneel geeft het GC percentage weer.



Figuur 6. De alignment kwaliteit over de referentiesequenties van de geelkruinkwak (links) en de zwartkruinkwak (rechts). Te zien is dat de reads met een hogere kwaliteit (rond de 60) tegen de referentiesequentie van de geelkruinkwak geplaatst konden worden dan tegen de zwartkruinkwak (kwaliteitsscore lager dan 25). Dit betekent dat de software veel meer moest aanpassen in de reads om deze tegen de zwartkruinkwakreferentie te plaatsen dan tegen de geelkruinkwakreferentie.

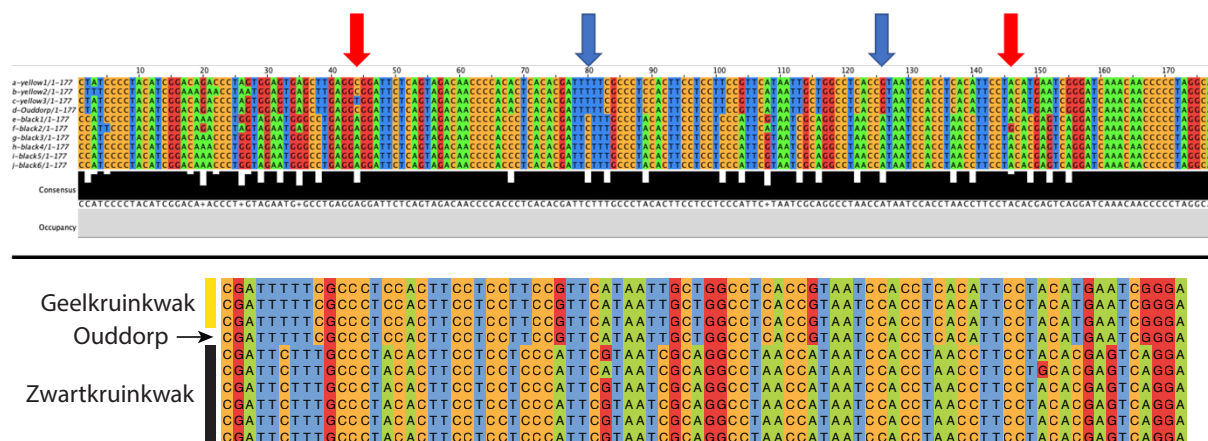


Figuur 7. Alignment van de oxford nanopore reads tegen de referentiesequentie van de geelkruinkwak. De referentiesequentie (letters gecodeerd op kleur) is te zien in het onderste paneel. Paneel A geeft een staafdiagram van het aantal reads dat tegen elke positie van de referentiesequentie is geplaatst weer, overeenkomstig met het linkerdeel van fig. 5. Paneel B geeft het bovenste deel van de alignment van individuele reads tegen de referentiesequentie weer. Elke regel is een read, waarbij de grijze delen dezelfde sequentie hebben als de referentie, gekleurde verticale lijntjes zijn één-letter verschillen tussen de read en referentie, witte stukjes met een zwarte horizontale streep zijn deleties (stukjes uit

de referentie die ontbreken in de read) en parse haakjes zijn inserties (stukjes in de read die niet in de referentie voorkomen). Te zien is dat de meeste inserties en deleties slechts in een enkele read voorkomen, wat erop duidt dat dit sequencingfoutjes zijn geweest. Een aantal één-letter verschillen komen wel in de meeste reads terug, wat erop wijst dat hier de sequentie van de Ouddorpse vogel afwijkt van de referentiesequentie.

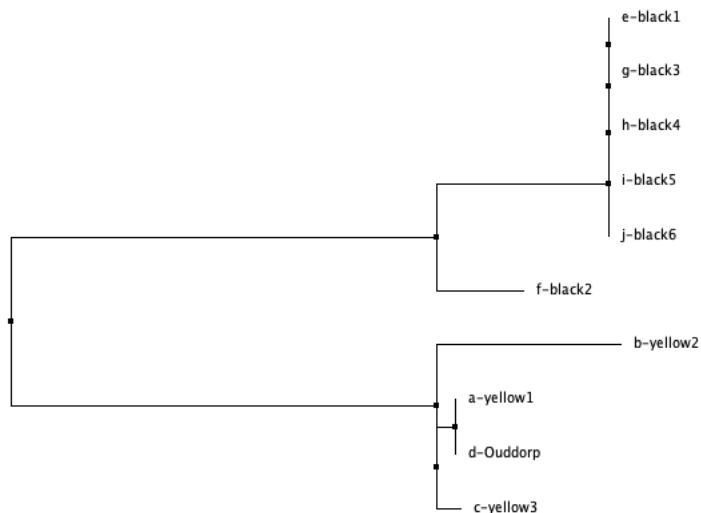
Consensus sequentie

Om de sequentie van de Ouddorpse reiger beter te kunnen vergelijken met de variatie binnen en tussen geelkruin- en zwartkruinkwak werd er handmatig een consensus samengesteld uit de alignment in fig. 7. Voor iedere positie werd bepaald welke letter er door de meeste reads werd ondersteund. Dat kwam erop neer dat de acht één-letter verschillen in fig. 7 in de referentie werden aangepast naar de letter van de Ouddorpse vogel. De resulterende consensus sequentie werd gedeponereerd bij NCBI genbank (bijlage 2). Bij een *blastn* search bleek volledig identiek aan een van de andere geelkruinkwaksequenties (accession KX534435). De consensussequentie werd toegevoegd aan de eerder gemaakte multiple sequence alignment die ook werd gebruikt voor primer design. Er werd alleen gekeken naar het deel van deze alignment waarvoor alle tien sequenties beschikbaar waren (niet alle originele sequenties waren even lang) wat resulteerde in een alignment van 177 letters. Een deel van het resultaat is te zien in fig. 8. In het totaal waren er 20 posities waar geelkruinkwak consistent een andere letter had dan zwartkruinkwak. In alle gevallen had de Ouddorpse vogel dezelfde letter als geelkruinkwak. Twee voorbeelden zijn in fig. 8 aangegeven met een blauwe pijl. Op 10 posities was er variatie binnen geelkruin en/of zwartkruinkwak (twee voorbeelden aangegeven met rode pijl in fig. 8). In elk van deze gevallen had de Ouddorpse vogel een variant die ook in sommige geelkruinkwaksequenties voorkwam.



Figuur 8. Multiple sequence alignment van een deel van de onderzochte sequentie. Letters (A, T, G en C) zijn kleur-gecodeerd. Van boven naar beneden: drie geelkruinkwakken, de Ouddorpse vogel, zes zwartkruinkwakken. Blauwe pijlen zijn voorbeelden van posities waar de geelkruinkwakken consistent verschillen van de zwartkruinkwakken. Rode pijlen zijn voorbeelden van posities waar er variatie is binnen de geelkruinkwakken en/of zwartkruinkwakken. Het onderste paneel is ingezoomd op een stukje van de alignment voor betere leesbaarheid.

Een fylogenetische boom gemaakt met de *nearest neighbour* methode op basis van deze alignment plaatst de Ouddorpse vogel tussen de geelkruinkwakken (fig. 9).



Figuur 9. Fylogenetische boom gemaakt met de *neighbour joining* methode op basis van de alignment in fig. 8.

Conclusie

De DNA analyse laat onomstotelijk zien dat de Ouddorpse vogel een geelkruinkwak was. Dit wordt verder ondersteund door uiterlijke kenmerken als snavelvorm, lichte kruinveren en lichte randen langs de grote dekveren.

Herkomst

Waar deze vogel vandaan kwam weet ik natuurlijk ook niet. Hieronder een aantal overwegingen die al dan niet relevant zijn:

- De noordkant van Goeree kijkt uit op een drukke scheepvaartroute. Vanaf het strand zijn meestal meerdere vrachtschepen te zien die liggen te wachten op toegang tot de Rotterdamse haven.
- Op de plek waar de vogel gevonden werd spoelen met een zekere regelmaat zeevogels aan die waarschijnlijk niet met een schip zijn meegekomen (o.a. 2 noordse stormvogels in april 2021 en een papegaaiduiker in december 2021).
- De vogel had al zijn veren nog en stonk verschrikkelijk. Hij moet vrij kort daarvoor overleden zijn en had zeker niet dagenlang dood op het dek van een schip gelegen of lang in zee gedreven.
- Er zijn eerdere gevallen van Amerikaanse reigerachtigen op het Europese vasteland (groene reiger in Nederland en Frankrijk 2006-2009, geelkruinkwak Egypte januari 2021).
- Het geval van een gezenderde purperreiger die vanuit Nederland bijna de kust van Brazilië bereikte in 2007 (https://www.sovon.nl/sites/default/files/doc/Sovon-Nieuws_2015-3-p14-15_Verborgen-spektakel.pdf) toont aan dat reigers rare dingen kunnen doen.

Verantwoording

Vondst Ken en Esther Kraaijeveld

Preparatie Becky Desjardins (Naturalis Biodiversity Center)

Primer design en sequentie analyse Ken Kraaijeveld

DNA extractie, PCR en sequencing Nikola Petrusevski (Leiden Centre for Applied Bioscience)

Advies en logistiek Peter de Knijff, Justin Jansen, Kees de Vries, Robbin van Dijk

Bijlagen

Bijlage 1. Biometrische gegevens.

Preparator Desjardins Preparator number _____
 Prep date _____


NCB Naturalis Bird Prep form

Genus Nyctanassa species violacea
 Dutch name Geelkruinval donateur / collector ten Kraaijveld
 Date died 5-14-2021 date at Naturalis 26 May 2012
 Locatie Duddorp - 6 zeeoep en strand cause of death _____
 Other notes Middelduinen 51.9389 * 3.9474
 weight
 total length bill 67.64
 wing span chord 210
 tarsus 102.4
 skull ossification (0-100%) _____
 seks ♀ description possible ovarian follicles
 fat non bursa non
 body molt notes non
 wing molt notes non tail molt notes _____
 stomach: saved
 DNA sample (Y/N) tissue sampled _____
 sample number D1

ACV _____

wing molt specifics

Primaries		Secondaries		Staart	
left	right	left	right	left	right
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	5
6		6		6	6
7		7			
8		8			
9		9			
10		10			
		11			
		12			
		13			
		14			



what was prepared
 (circle what applies)
 skin, skeleton, skull, DNA, feathers, spread wing
x2
 technique (washed, if chemicals were used)

RMNH.AVES. 259422
 registratie datum _____

Bijlage 2. Voorlopige Genbank submittie (wacht nog op goedkeuring door genbank staf).

preliminary GenBank flatfile(s):

```
LOCUS      ouddorp_consensus_manual 423 bp      DNA           linear       VRT 29-DEC-2021
DEFINITION Nyctanassa violacea mitochondrion.
ACCESSION
VERSION
KEYWORDS
SOURCE     mitochondrion Nyctanassa violacea (yellow-crowned night heron)
ORGANISM   Nyctanassa violacea
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
           Archelosauria; Archosauria; Dinosauria; Saurischia; Theropoda;
           Coelurosauria; Aves; Neognathae; Pelecaniformes; Ardeidae;
           Nyctanassa.
REFERENCE  1 (bases 1 to 423)
AUTHORS   Kraaijeveld, K.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (29-DEC-2021) Leiden Centre of Applied Bioscience, Leiden
           University of Applied Sciences, Darwinweg 24, Leiden 2333 CR, The
           Netherlands
COMMENT   Bankit Comment: LocalID:ouddorp_consensus_manual.
           Bankit Comment: BankIt2535073.

           ##Assembly-Data-START##
           Assembly Method      :: minimap2 v. 2.24
           Assembly Name       :: consensus
           Coverage            :: 15000
           Sequencing Technology :: Oxford Nanopore
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source              1..423
                               /organism="Nyctanassa violacea"
                               /organelle="mitochondrion"
                               /mol_type="genomic DNA"
                               /isolation_source="dead bird"
                               /specimen_voucher="RMNH_AVES_259422"
                               /bio_material="tissue"
                               /db_xref="taxon:56294"
                               /sex="female"
                               /dev_stage="adult"
                               /country="Netherlands"
                               /collection_date="14-May-2021"
           gene                <1..>423
                               /gene="cytB"
           CDS                  <1..>423
                               /gene="cytB"
                               /note="[intronless gene]"
                               /codon_start=3
                               /transl_table=2
                               /product="cytochrome B"
                               /translation="GASFFFCIYLHIGRGLYGSYLYKETWNTGVILLLLTMLATAFV
                               GYVLPWQMSFWGATVITNLFSAIPYIGQTLVEWAWGGFSVDNPTLTRFFALHFLLPF
                               MIAGLTVIHLTFLHESGSNNPLGIVSNCDKIPFHPYFS"
BASE COUNT 105 a    139 c    67 g    112 t
ORIGIN
    1 acggtgcctc attcttcttc atttgcattt accttcacat cggccgaggt ctctactatg
    61 ggtcctacct atacaaagaa acttgaaaca caggagtcat ctcctactc accctaatag
   121 caactgcctt cgtagggtac gtactgcat gaggacagat atctttctga ggcgccacag
   181 tcatacccaa cctattctcc gctatccct acatcggaca gaccctagtg gagtgagctt
   241 gaggcggtt ctcagtagac aacccacac tcacacgatt ttctgcctc cacttcctcc
   301 ttccggttcat aattgctggc ctcaccgtaa tccacctcac attcctacat gaatcgggat
   361 caaacaaccc ctaggcatac gtatctaact gtgataaaat tccattccac ccctacttct
   421 cca
```

//