FACULTEIT DIERGENEESKUNDE
accredited by EAEVE

GENETISCHE PROFILERING EN KWALITEITSMERKERS BIJ DE SPORTDUIF

Aantal woorden: 10 733

Maarten Rombouts
Studentennummer: 01603912

Promotor: Prof. dr. Luc Peelman
Promotor: D'arts. Ruben Lanckriet

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2018 – 2019

UNIVERSITEIT GENT

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

Voorwoord

Graag wil ik enkele personen bedanken voor het tot stand brengen van deze masterproef mogelijk te maken.

Professor Peelman, mijn promotor, voor het in goede banen leiden van het onderzoek. Voor de tijd die u hebt kunnen vrijmaken om mij te ontvangen en de inzichten die ik kreeg om het werk tot een goed einde te brengen.

Ruben Lanckriet, mijn co-promotor, om de gegevens van de populatie topduiven af te leveren. En voor de belangrijke onderzoeksvragen te stellen voor het onderzoek.

Linda Impe van het Labo Dierlijke Genetica om mij wegwijs te maken in het labo en het geduld dat hier soms gepaard heeft moeten gaan.

Verder wil ik alle liefhebbers bedanken die belangeloos stalen hebben afgestaan voor het tot stand brengen van mijn Belgische controle populatie. Hun passie voor de duivensport is bewonderenswaardig.

Inhoudsopgave

Samenvatting ... 5
1 Inleiding ... 6
2 Prestatiegenen ... 7
2.1 Het Lactaat dehydrogenase A - Gen (*LDH-A*) ... 7
2.2 Het dopamine receptor D4 – gen (*DRD4*) ... 9
2.3 Andere kandidaat genen ... 11
3 Marker assisted selection ... 12
4 Fingerprinting & ouderschapscontrole ... 12
5 Doelstelling ... 14
6 Materiaal en methoden ... 14
6.1 Staalname ... 14
6.2 DNA extractie ... 15
6.3 PCR ... 15
6.4 Gel elektroforese ... 17
6.5 EXO-AP reactie ... 18
6.6 Sequenering ... 19
7 Resultaten ... 21
7.1 *LDHA*/HaeIII ... 21
7.2 *DRD4*/MnII ... 23
7.3 *DRD4* MnII/BstCI ... 24
7.4 Gecombineerde genotypen: *LDHA* + *DRD4* MnII/Bst4CI in de populatie topduiven ... 25
8 Discussie ... 27
9 Conclusie ... 29
10 Literatuurlijst ... 30

Samenvatting

In de literatuur werden enkele genetische varianten beschreven die gecorreleerd zijn aan prestatie bij duiven. De variant g.2582481G>A van het *LDHA* gen en de varianten g.129456C>T en g.129954C>T van het *DRD4* gen zijn hiervan momenteel het meest waardevol in fokprogramma's en het beste onderzocht. Hoewel niet exact geweten is hoe de genen hun invloed op het prestatievermogen uitoefenen, staat de correlatie met prestatie vast. In het onderzoek werd een controlepopulatie van willekeurige Belgische, jonge duiven gegenotypeerd. DNA werd geëxtraheerd uit veren en na amplificatie gesequeneerd volgens de Sanger methode. De verkregen genotypefrequenties voor de vermelde varianten werden vervolgens vergeleken met deze van eerder getypeerde Belgische topduiven die geselecteerd werden op strenge prestatiecriteria. In eerder uitgevoerde internationale studies werd gevonden dat de vermelde varianten meer voorkomen bij duiven die goed presteren op korte vluchten. In dit onderzoek werd gevonden dat voornamelijk de vermelde *LDHA* variant meer voorkwam bij topduiven voor middellange afstandsvluchten en dat beide *DRD4* varianten een belangrijkere rol vervullen bij de topduiven voor extreem lange afstand.

1 Inleiding

De wilde rotsduif (*Columba livia*), die heden ten dage nog steeds te vinden is rond het Middellandse zeegebied, is de voorvader van de hedendaagse reisduif. Het is, na de kip, de tweede vogelsoort die gedomesticeerd werd en dit gebeurde in 3 verschillende regio's: Egypte, China en het gebied tussen Tigris en Eufraat (Shapiro, 2013). In de eerste plaats werd de duif voornamelijk aangehouden voor vleesproductie. Desondanks werd ze niet zelden gebruikt als symbool van vruchtbaarheid, vrede en vrijheid. In de geschiedschrijving wordt verhaald over duiven als boodschapper van nederlaag of overwinning op het slagveld (Hermans, 1985). Dit suggereert dat ook in de oudheid de eigenschap van duiven om over lange afstand terug te keren naar het oorspronkelijke nest naar waarde werd ingeschat. Ook in de recentere literatuur zijn verhalen over gevleugelde oorlogshelden uit de eerste en tweede wereldoorlog terug te vinden (Verbeke, 2003).

Duiven worden gekweekt voor tal van doeleinden. Zo kunnen verschillende types van duiven onderscheiden worden, zoals bv sierduiven, structuurduiven en postduiven. De eerste twee types in deze opsomming worden vandaag de dag minder gezien en krijgen zelfs de stempel zeldzaam te zijn (Stringham et al., 2012; Traxler et al., 2000). De belangstelling in de postduiven is in de laatste jaren zeer sterk toegekomen. Dit komt mede omdat zij relatief weinig onderhoud vragen en makkelijk te huisvesten zijn (Cousquer en Parsons, 2007). Omstreeks het begin van de 19de eeuw ontstond de duivensport, bijna synchroon, in Antwerpen en in Luik. De populariteit van de sport is gestaag toegenomen tot het werd uitgeroepen als volksvermaak nummer 1 in België tijdens het interbellum (Verbeke, 2003).

De essentie van de hedendaagse duivensport is nog dezelfde als deze die beoefend werd tussen WO I en WO II. De duiven worden gelost op een vooraf bepaalde locatie en keren zo snel mogelijk weer naar de duiventil, waarvan de coördinaten gekend zijn bij het lokale duivenverbond[1]. De dieren worden onderverdeeld in 3 categorieën op basis van leeftijd: jong, jaarling en oud. De af te leggen afstanden worden op hun beurt onderverdeeld in 3 categorieën: vitesse, halve fond en fond. Onder vitesse of sprint verstaat men afstanden tussen 60 en 300km. Halve fond vluchten zijn vluchten van middellange afstand tussen 300 en 500 km. Tenslotte overbruggen duiven die meedoen aan fondvluchten enorm lange afstanden van 500 tot maximaal 1350 km (Hermans J., 1985). Fondvluchten worden niet georganiseerd voor jonge duiven [2].

Figuur 1: Een lossing van reisduiven voor een wedstrijd.
Figuur afkomstig van https://www.huisdieren.nu/vogels/soorten/sportduiven/training/lossing-4/

[1]: https://www.pipa.be/nl/newsandarticles/pigeonandloft laatst gecontroleerd op 20/05/2019

[2]: https://www.kbdb.be/nl/vluchten-5/vluchtprogramma laatst gecontroleerd op 20/05/2019

Ondertussen wordt de duivensport reeds decennialang wereldwijd beoefend. Hoewel in West-Europa de populariteit tegenwoordig een dip kent, vindt men in landen zoals het Verenigd Koninkrijk, Duitsland, België en Nederland nog talrijke duivenliefhebbers terug (Cousquer en Parsons, 2007). Met het oog op betere vliegprestaties, hebben duivenmelkers steeds geselecteerd op oriëntatie vermogen, snelheid en uithoudingsvermogen (Dybus et al., 2006). Men neemt aan dat het uiteindelijke resultaat van de individuele duif afhangt van tal van factoren. Naast omgevingsfactoren zoals de weersomstandigheden bij lossen en tijdens de vlucht, voeding en de gebruikte trainingsmethoden heeft de genetische predispositie van een duif een niet te verwaarlozen aandeel in de wedstrijdresultaten (Proskura et al., 2014). Dit betekent dat sommige duiven een groter genetisch potentieel bezitten en onder dezelfde omstandigheden betere prestaties zullen neerzetten dan anderen. De genetische waarde van een duif kan bepaald worden aan de hand van bepaalde kwaliteitsmerkers, waarvoor aangetoond is dat ze positief correleren met de wedstrijdprestatie.

Als er een lijn van duiven opduikt die betere resultaten neerzet, zijn veel liefhebbers geneigd om een van deze elite duiven of hun afstammelingen aan te schaffen. Indien deze duiven drager zijn van de gewenste allelen, kunnen ze een meerwaarde betekenen in fokprogramma's voor een verder doorgedreven, positieve selectie naar een beter genetisch potentieel van de sportduiven (Gazda et al., 2018).

2 Prestatiegenen

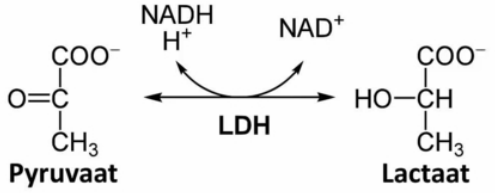
Kwekers van duiven zijn steeds op zoek naar manieren om hun duiven een voordeel te bieden. In het licht hiervan zijn er tal van onderzoeken gebeurd naar de genetica van de duiven, om hier deze voordelen in te vinden. Reeds in het begin van deze eeuw werd onderzoek verricht naar het voorkomen van polymorfismen in specifieke genen van de duif (Traxler et al., 2000). Hieruit werden kandidaat single nucleotide polymorphisms (SNP's) gedistilleerd die correleerden met het vliegvermogen op lange en/of korte afstand (Dybus et al., 2006; Ramadan et al., 2013). De selectie van de kandidaat genen gebeurt op basis van gekende fysiologische of biologische effecten van de genen of de enzymen waarvoor de genen coderen en het ingeschatte verband met het doel van de selectie, in dit geval prestatie (Dybus et al., 2006).

Inmiddels werd voor twee genen aangetoond dat variaties er in gecorreleerd zijn met de vliegprestaties van duiven, nl. 1 SNP in *lactaat dehydrogenase type A* (Proskura et al., 2014) en twee SNP's in de *dopaminereceptor D4* (Proskura et al., 2015). Andere bestudeerde kandidaat genen *zijn F-Ker* (Proskura et al., 2017) en het α^A*-globine* gen (Dybus et al., 2018).

2.1 Het Lactaat dehydrogenase A - Gen (*LDH-A*)

Het *LDH-A* gen is het eerste gen dat gesuggereerd werd als potentiële merker voor prestatie bij de duif (Traxler et al., 2000). Het *LDH-A* gen staat samen met het *LDH-B* en het *LDH-C* gen in voor het coderen van het LDH of lactaat dehydrogenase enzym. De distributie van deze drie genen is weefselspecifiek (Dybus et al., 2006). Het *LDH-A* gen wordt teruggevonden in de spier, *LDH-B* in het hart en *LDH-C* in de testes (Markert et al., 1975). Het *LDH-A* zou beter geschikt zijn voor anaerobe weefsels en *LDH-B* zou beter zijn voor de oxidatie van lactaat in aerobe weefsels (Mannen et al., 1997). Deze genen zijn voorlopig nog niet toegewezen aan een bepaald chromosoom, zoals vermeld staat op de website van NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). De meeste vogelsoorten bezitten meerdere microchromosomen (Burt, 2002) wat de chromosomale positiebepaling van genen aanzienlijk bemoeilijkt.

LDH is een enzym dat deel uitmaakt van het metabolisme van vogels en zoogdieren. Het katalyseert de conversie van lactaat naar pyruvaat met de oxidatie van NAD+ naar NADH als co-enzym (Salway, 2016). Dit pyruvaat kan op zijn beurt ingezet worden in de gluconeogenese of verder gebruikt worden in de citroenzuurcyclus na conversie naar Acetyl-COA door het pyruvaat dehydrogenase (Salway, 2016). In het kader van extreme inspanning blijkt lactaat een efficiëntere precursor voor de glycogenolyse dan glucose (Brooks, 1986). Lactaat dehydrogenase speelt dus een enorm cruciale rol in zowel de uithouding van de spieren, recuperatie als aerobe capaciteit (Ramadan et al., 2013). In een onderzoek naar de effecten van training op de borstspier van duiven, vonden Chaplin et al. (1997) dat vogels die getraind werden voor explosieve, korte afstanden een hogere LDH activiteit hadden in vergelijking met vogels die getraind werden met het oog op een groter uithoudingsvermogen. Deze laatste groep had echter wel de hoogste piek-lactaat niveaus. Het is dus zo dat er, afhankelijk van de trainingsmethodes, een conversie kan zijn in de iso-enzymen van lactaat dehydrogenase die tot expressie komen in de borstspier (Chaplin et al., 1997). Vergelijkbare resultaten werden gevonden bij humane atleten (Apple en Rogers, 1986).



Figuur 2: LDH katalyseert de omkeerbare reactie van lactaat naar pyruvaat met NAD+ als co-enzym.

In het *LDH-A* gen werden gebruik makend van twee restrictie enzymen, HaeIII en NlaIV, telkens twee polymorfismen gevonden (Dybus et al., 2006). Voor het polymorfisme in de *LDHA*/Hae III locus werd later gevonden dat er een significant verschil is in het voorkomen van de verschillende allelen tussen duiven die ingezet worden in de duivensport tegenover sierduiven (Dybus et al., 2006). In een ander onderzoek werden in het *LDHA* gen zes polymorfismen gevonden, namelijk een indel en 5 SNP's (Ramadan et al., 2013). Ook hier zag men verschillen met betrekking tot de allelen tussen sportduiven en sierduiven. Een volgende stap om te kunnen spreken over een prestatie gen is kijken of het gunstige genotype inderdaad meer voorkomt bij topduiven. Voor het *LDHA*/HaeIII SNP werd het g.2582481A genotype significant meer gezien bij topduiven. Het effect werd gevonden voor alle wedstrijden samen en voor de korte wedstrijden. Er werd besloten dat het voorkomen van het g.2582481G>A polymorfisme geassocieerd is met een predispositie voor betere resultaten op korte vluchten (Proskura et al., 2014).

```
  1 tgaaggggta cacatcatgg gctattggcc tctctgtggc agatttagct gaaacgatta
 61 tgaagaattt gagaagagtg cacccaatct ctacagttgt taaggtgagc gcctgtttt
121 tgctaacttt tgtcttactg agacctaaaa accttgggaa ttctgaagaa cagtcataac
181 tttctagttt aatttcaact aaattctgag ttttcttgat aggacattct atagaatgaa
241 ttctagccta accatcctta cctgcttttc agggcatgca tggaataaaa gaagacgtct
301 tcctaagtgt tccttgtgta ctgggcagca gtggcatcac tgatgtagtg aagatgatcc
361 taaaacctga ggaagaggac aaattaagga agagtgcaga tacactctgg ggaatccaga
421 agg
```

```
  1 tgaaggggta cacatcatgg gctattggcc tctctgtggc agatttagct gaaacgatta
 61 tgaagaattt gagaagagtg cacccaatct ctacagttgt taaggtgagc acctgtttt
121 tgctaacttt tgtcttactg agacctaaaa accttgggaa ttctgaagaa cagtcataac
181 tttctagttt aatttcaact aaattctgag ttttcttgat aggacattct atagaattaa
241 ttctagccta accatcctta cctgcttttc agggcatgca tggaataaaa gaagacgtct
301 tcctaagtgt tccttgtgta ctgggcagca gtggcatcac tgatgtagtg aagatgatcc
361 taaaacctga ggaagaggac aaattaagga agagtgcaga tacactctgg ggaatccaga
421 agg
```

Figuur 3: boven g.2582481G allel, onder g.2582481A allel
Uit: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ019874.1 laatst gecontroleerd op 20/05/2019

Een significant hogere expressie van *LDHA* werd gevonden bij heterozygote duiven. Naast het genotype zijn er echter nog tal van factoren die een invloed uitoefenen op de expressie van *LDHA*. Zo ziet men een kleine toename in expressie bij duivinnen in vergelijking met doffers (Jedrzejczak-Silicka et al., 2018). Dit kan een verklaring zijn voor het feit dat duivinnen betere resultaten behalen dan doffers in dezelfde wedstrijden (Proskura et al., 2014).

De manier waarop de g.2582481G>A variant zijn invloed uitoefent op de prestatie is alsnog onbekend. Aangezien introns niet-coderende sequenties zijn, zullen ze weinig functioneel verschil geven op de enzymwerking. Ze kunnen echter wel het niveau van de genexpressie beïnvloeden (Wang et al, 2002). Proskura et al. (2014) hebben een aantal hypotheses gepostuleerd: de g.2582481G>A mutatie ligt zeer dicht bij de G/T splice donor site. Tijdens het verwijderen van de introns kan het dus zijn dat het pre-mRNA splicing proces wordt beïnvloed en bijgevolg ook de genexpressie. LDH wordt soms ook gezien als hormoon met een werking op het centrale zenuwstelsel (Newman et al., 2011) en kan eventueel het gedrag van een duif sturen. Het is echter ook mogelijk dat de g.2582481G>A SNP in compleet linkage disequilibrium is met een, nog onbekend, functioneel SNP en momenteel als merker hiervoor dient (Proskura et al., 2014).

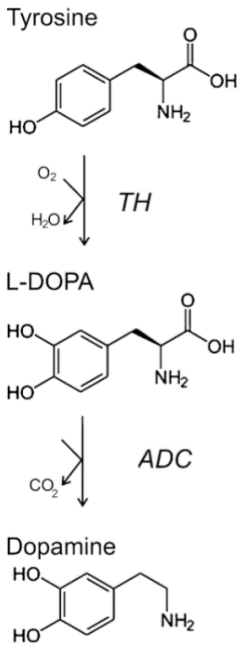
In recent onderzoek worden polymorfismen in het *LDHA* gen ook in verband gebracht met de overleving van duiven tijdens wedstrijden. Predatie door roofvogels en ongunstige levensomstandigheden zijn gevaren waaraan duiven het hoofd moeten bieden (Ramadan et al., 2018). *LDHA* polymorfismen vertonen een associatie met het niet-polymorfe *adenylaat cyclase activating polypeptide 1 gen (ADCYAP1)*. Dit gen wordt op zijn beurt geassocieerd met gedragsveranderingen tijdens de trek van trekvogels. Van de (TTTAT) - microsatelliet in intron 6 van het *LDHA* gen werden 3 potentiële allelen gevonden: S, M en L van respectievelijk 595, 600 en 605 baseparen lang. Met behulp van geschatte fokwaarden werd naar de overlevingskans van de individuele duiven gepeild en hierbij bleek dat S+ individuen significant beter voor scoren (Ramadan et al., 2018).

2.2 Het dopamine receptor D4 – gen (*DRD4*)

SNP's in het *DRD4* gen werden recent gesuggereerd als merkers die een positieve correlatie vertonen met het prestatiepotentieel van sportduiven (Proskura et al., 2015).

Dopamine is als neurotransmitter ondergebracht in de groep van de catecholamines (Rondou et al., 2010). Dopamine wordt gesynthetiseerd uit tyrosine (Figuur 4). In een eerste, snelheidsbepalende stap wordt het tyrosine geconverteerd naar L-DOPA. Deze reactie wordt gekatalyseerd door tyrosine hydroxylase (TH). In de tweede stap wordt het L-DOPA gecarboxyleerd naar dopamine met het aromatisch L-aminozuur decarboxylase (AADC) als katalysator (Rondou et al., 2010).

Tal van belangrijke functies in de hersenen worden gemedieerd door dopamine. Zo speelt het een rol in motorische output, motivatie en beloning, leren, geheugen en endocriene regulatie. Om deze taken uit te voeren, bindt dopamine op dopamine receptoren. Deze receptoren zijn G-proteïne gekoppelde receptoren (Rondou et al., 2010). De gekende receptoren in de hersenen die op deze manier dopamine kunnen binden zijn de dopamine receptoren 1 – 5. Deze receptoren worden opgedeeld in 2 grote groepen. Dit zijn de D1-like receptoren, waartoe D1 en D5 toe behoren en D2-like receptoren, waartoe D2, D3 en D4 toe behoren.



Figuur 4: Dopamine wordt gesynthetiseerd uit tyrosine
Uit: Rondou et al,., 2010

De D2-like receptoren worden onderbroken door introns waardoor isovormen ontstaan als gevolg van alternatieve splicing (Rondou et al., 2010).

Dopamine speelt een belangrijke rol in het gedrag van zoogdieren. Bij de mens wordt aangenomen dat het gedrag voor een deel gemedieerd wordt door neurotransmitters. Cloninger (1987) gaf aan dat er drie erfelijke aspecten zijn, namelijk het opzoeken van nieuwigheid (NS), het ontwijken van schade of kwetsuren (HA) en de afhankelijkheid van beloningen (RD). NS wordt gemedieerd door de transmissie van dopamine, HA is afhankelijk van serotonine en RD van noradrenaline (Cloninger, 1987).

De dopamine receptor D4 bevat 7 transmembranaire structuren die koppelen aan een G-proteïne (Missale et al., 1998). Het meest bekende polymorfisme in het *DRD4*-gen wordt gevonden in exon 3. Dit exon codeert voor de derde intracellulaire lus van de receptor (Van Tol et al., 1992). De polymorfismen in dit exon worden geassocieerd met hoe neofiel een individu is (Ebstein et al., 1996). Zo zijn er associaties gevonden tussen het aantal variable number tandem of repeats (VNTR) polymorfismen en bepaalde gedragingspatronen zoals seksuele promiscuïteit (Garcia et al., 2010), gebruik van verdovende middelen (Lusher et al., 2001) en het nemen van financiële risico's bij mannen (Dreber et al., 2009). Ook bij andere zoogdieren werd het *DRD4*-gen reeds onderzocht. Polymorfismen in exon 3 van de hond werden geassocieerd met agressiviteit en impulsiviteit (Hejjas et al., 2007) terwijl variatie in intron 2 werd geassocieerd met sociale impulsiviteit (Hejjas et al., 2009) en met communicatie of leervermogen (Hori et al., 2013). Bij runderen werden veranderingen in temperament in verband gebracht met *DRD4* varianten (Sifuentes-Rincón et al., 2016).

Voor het aviaire *DRD4*-gen vond men voor 75 verschillende vogelsoorten polymorfismen in de extracellulaire regio van de receptor. De graad van variatie in het gen verschilt tussen de verschillende taxa. Ook vond men bewijzen van natuurlijke selectie in deze regio, wat het functionele belang van de receptor aantoont (Abe et al., 2011). Koolmezen (*Parus major*) vertonen verschillende persoonlijkheden in associatie met *DRD4* polymorfismen (Korsten et al., 2010). Zo zullen heterozygote mannetjes sneller zijn om nestjongen te voederen en vertonen ze verschillende gedragingen tegenover homozygote mannetjes tijdens het maken van het nest. Het werd reeds aangetoond dat neofiel en exploratie gedrag correleert met agressie en angst (Hollander et al., 2008). Ook bij koolmezen heeft een SNP in het *DRD4* (SNP830) een invloed op hierop. Zo bezoeken heterozygote individuen nieuwe objecten sneller en vaker dan hun homozygote soortgenoten (Timm et al., 2015). Bij withalsvliegenvangers (*Ficedula albicollis*) vond men eveneens polymorfismen in het *DRD4* gen. Hier zag men dat AC heterozygote dieren voor het SNP764 minder risico namen bij het hof maken van de wijfjes in vergelijking met de AA homozygoten (Garamszegi et al., 2014). Hieruit blijkt dat ook bij vogels polymorfismen in het *DRD4* gen geassocieerd zijn met verschillen in gedragingen en het al dan niet nemen van risico's.

Bij duiven werden, gebruik makend van restrictie endonucleasen, 3 SNP's geïdentificeerd in het *DRD4*-gen: SNP g.129954C>T (Bst4CI), SNP g.129662A>C (BstC8I) en SNP g.129456C>T (MnII). De laatste twee zijn in compleet linkage disequilibrium en zullen dus altijd tezamen overerven. In de associatie met prestatie werden daarom enkel SNP g.129954C>T en SNP g.129456C>T bekeken (Proskura et al., 2015). SNP g.129456C>T blijkt positief geassocieerd te zijn met prestatie op korte afstand. Heterozygote dieren behalen meer ace points in vergelijking met homozygote CC dieren. Bij inachtneming van de twee SNP's tezamen blijken dubbel heterozygoten CTCT het hoogste aantal ace punten te krijgen en dubbel homozygoten CCCC het laagste aantallen ace punten (Proskura et al., 2015).

Naar verschillen in gedragingen bij duiven met polymorfismen in het *DRD4* gen is tot op heden nog geen onderzoek verricht.

2.3 Andere kandidaat genen

De SNP's in *LDHA* en *DRD4* zijn de best bestudeerde en algemeen aanvaarde merkers voor de prestatie bij duiven. Het testen van duiven op de aanwezigheid van het *LDHA*-HaeIII polymorfisme wordt elk jaar meer uitgevoerd in commerciële laboratoria (Jedrzejczak-Silicka et al., 2018). Doordat *DRD4* een relatief nieuwe merker is, wordt hij in de literatuur momenteel minder vermeld. Hiernaast zijn er echter nog enkele polymorfismen in kandidaat genen die voorgesteld werden.

Een polymorfisme dat voorgesteld werd als potentiële merker is een SNP in de 3' UTR (untranslated region) van het α^A*-globine* gen (Dybus et al., 2008). Het α^A*-globine* gen codeert voor het HbA, de enige hemoglobine component die teruggevonden wordt bij de duif (Ikehara et al., 1997). Het polymorfisme dat gevonden werd, is een C/T mutatie en werd opgespoord met het restrictie-enzym BseLI. De regio waarin dit polymorfisme wordt teruggevonden maakt dat de mutatie mogelijk een invloed heeft op de genexpressie als gevolg van een verschil in stabiliteit van het geproduceerde mRNA (Dybus et al., 2008). Dit kan op zijn beurt het zuurstoftransport beïnvloeden en een potentieel voordelig effect hebben op de prestatie van reisduiven. Dit werd echter nog niet aangetoond (Dybus et al., 2008).

Een tweede potentiële kwaliteitsmerker is een polymorfisme in vederkeratine (*F-KER*) (Proskura et al., 2017). Het gaat hierbij om een polymorfisme in het 83ste codon van het *F-KER* gen. Het resultaat hiervan is dat er een cysteïne naar glycine substitutie ontstaat (Dybus en Haase, 2011). Het verlies van cysteïne, een zwavelhoudend aminozuur, kan het verlies van een disulfide binding betekenen en zo grote structurele en functionele gevolgen hebben voor het keratine-eiwit (Proskura et al., 2017). SNP g.710G>T is zeldzaam in alle duivenpopulaties maar wordt toch meer dan driemaal meer teruggevonden bij sportduiven dan bij sierduiven. Aangezien veren het gereedschap zijn waarmee de sportduif de vlucht tot een goed einde moet brengen, is het dus niet ver gezocht dat een mutatie die de veren negatief beïnvloedt, negatieve selectie zou ondergaan in een populatie reisduiven (Dybus en Haase, 2011). Het tegenovergestelde is echter waar. Duiven die homozygoot zijn voor het wildtype, scoren beter dan de homozygoten met de mutatie (Proskura et al., 2017). Dit geldt echter enkel voor lange wedstrijden (>500 km). Op korte wedstrijden (< 400 km) scoren de heterozygoten beter (Proskura et al., 2017).

Ramadan et al. (2018) stelden tevens het *serotonine-transporter* (*5-HTT*) gen en het *mitochondrial-ATP6* gen voor als genen met een potentieel effect op de vliegprestaties van sportduiven. Het *5-HTT* kan de persoonlijkheid beïnvloeden van de duiven en *ATP6* heeft een effect op de fysieke mogelijkheden van de duiven. In hun onderzoek werden vooralsnog geen polymorfismen in deze genen gevonden (Ramadan et al., 2018) maar verder onderzoek zal moeten uitwijzen of deze kandidaat genen iets kunnen opleveren.

Bij een screening naar het hele genoom van de sportduiven door Gazda et al. (2018) werden de genen *CASK*, *SIK1* en *PTPRD* gepostuleerd als eventuele kandidaat genen. Bij sequenering van het hele genoom kan men de tekenen van positieve selectie herkennen en de selectie hierop doordrijven (Gazda et al., 2018). Het *CASK*-gen heeft een invloed op de neuro-musculaire juncties (Gardner et al., 2006) . Het SIK1 gen heeft een invloed op de regulatie van de spiergroei en op de hepatische lipogenese (Berdeaux et al., 2007; Yoon et al., 2009). Het PTPRD-gen heeft een invloed op de grootte en werking van de hippocampus (Uetani et al., 2000). De hippocampus wordt bij duiven op zijn beurt geassocieerd met spatiale oriëntatie en navigatie (Gagliardo et al., 1999).

Het is echter onmogelijk om een enkele SNP aan te duiden als zaligmakend op gebied van prestatie. Men moet zich bewust zijn dat complexe eigenschappen zoals snelheid, uithouding, atletisch vermogen en een superieure oriëntatie niet afhangen van een of enkele loci maar het resultaat zijn van een polygenische structuur, die daarnaast ook nog afhangt van verschillende milieuinvloeden zoals

voeding, trainingsmethoden en weersomstandigheden tijdens de wedstrijd (Gazda et al., 2018; Proskura et al., 2014). Superieure prestatie hangt dan ook af van een complex samenspel tussen het milieu en verschillende orgaansystemen. Zo spelen het cardiovasculair-, respiratoir-, musculoskeletaal- en zenuwstelsel allen een belangrijke rol (Caspermeyer, 2018).

3 Marker assisted selection

Marker en genome assisted selection (MAS) wordt reeds lang gebruikt in de veeteelt. Een eerste toepassing was de Hal-1843 merker bij het varken in de vroege negentiger jaren ter preventie van maligne hyperthermie (Knol et al., 2016). Nog bij het varken gaat selecteren op mager vlees vaak gepaard met een verlies in vleeskwaliteit door verlies van intramusculair vet. Door het onderkennen van referentiegenen is het mogelijk om te selecteren op een verhoging van de vleeskwaliteit terwijl het vlees mager blijft (Erkens et al., 2006). Hiernaast zijn merkers bekend met een associatie met magerheid en berengeur om zo de negatieve effecten op reproductie die samengaan met een vermindering in berengeur te omzeilen (Schroyen et al., 2015).

De besproken merkers bij duiven kunnen op dezelfde manier gebruikt worden om de liefhebbers de mogelijkheid te geven weloverwogen keuzes te maken om het genetisch potentieel van de dieren te maximaliseren (Proskura et al., 2014; Ramadan et al., 2013).

Identificatie van zoveel mogelijk geassocieerde merkers zal de effectiviteit van marker assisted selection verhogen aangezien prestatie een polygenische aangelegenheid is (Gazda et al., 2018).

4 Fingerprinting & ouderschapscontrole

Om kwaliteitsmerkers efficiënt en zinvol in te zetten in fokprogramma's ter verbetering van het genetische potentieel van de sportduiven, is identificatie van individuele duiven en ouderschapscontrole noodzakelijk. Duiven werden in het verleden immers louter op basis van een, al dan niet frauduleuze, pedigree soms voor heel hoge bedragen verkocht. Om liefhebbers meer houvast te geven voor hun aankopen, was er veel vraag naar een DNA afstammingsbewijs. Om aan deze vraag te voldoen en een gestroomlijnde methode tussen verschillende laboratoria te verkrijgen, stelde het ISAG, International Society for Animal Genetics, een merkerpaneel voorop bestaande uit 16 short tandem repeat (STR) loci of microsatellieten. De duif werd hierin voorafgegaan door rund, paard, kat en hond (de Groot en van Haeringen, 2017).

In een studie omtrent de validiteit van de genetische fingerprinting en afstammingscontrole door middel van het ISAG-merkerpaneel werd de genetische diversiteit van de verschillende merkers uitvoerig getest door het bepalen van verwachtte heterozygotie (HE), geobserveerde heterozygotie (HO) en polymorphism information content (PIC-waarde) van verschillende populaties (de Groot en van Haeringen, 2017). Als controle op de afstamming werd de uitsluitingskans per merker (UP) berekend. De UP geeft de kans weer om een vals toegekende ouderschap te ontdekken . Dit kan gebeuren op basis van 1 gekende ouder of meer betrouwbaar op basis van beide ouders. Hierbij wordt algemeen gestreefd naar een UP van > 0.9999. (de Groot en van Haeringen, 2017). Een groot voordeel van een gestandaardiseerd paneel is dat, indien verschillende internationale laboratoria werken met dezelfde merkersystemen, de gegevens gemakkelijk kunnen uitgewisseld worden.

Aan de kwaliteitscontrole via het gebruik van het ISAG-paneel kan eventueel een geslachtsbepaling toegevoegd worden. De kennis van het geslacht van de vogel kan gebruikt worden voor extra identificatie van het individuele dier. Het is immers moeilijk om op basis van het fenotype het geslacht van, voornamelijk jonge, duiven te determineren (de Groot en van Haeringen, 2017). Bovendien blijken duivinnen gemiddeld betere vliegresultaten te behalen dan doffers (Proskura et al., 2014), dit eventueel door een toegenomen expressie van *LDHA.*

Geslachtsbepaling bij vogels gebeurt meestal via detectie van het *chromo-helicase-DNA-binding gen (CHD-W)* gen. Bij de meeste vogels, waaronder ook duiven, is dit gen gelokaliseerd op het W-chromosoom en bijgevolg enkel aanwezig bij vrouwelijke vogels. Als controle wordt meestal gebruik gemaakt van het sterk gelijkende *CHD-Z* gen, aanwezig op het Z-chromosoom en dus terug te vinden bij de beide geslachten (Griffiths et al., 1998).

5 Doelstelling

Het doel van het onderzoek luik van deze masterproef was een frequentiestudie van de g.2582481G>A SNP in *LDHA* en de g.129456C>T SNP in *DRD4* uit te voeren in een willekeurige Belgische populatie jonge duiven en de resultaten hiervan te vergelijken met de eerder bepaalde frequenties in populatie Belgische topduiven. Dit om na te gaan of de eerder beschreven positieve associatie voor prestatie ook aanwezig is in de Belgische populatie.

Tevens werd gekeken naar verschil in voorkomen van de combinaties van SNP's g.129954C>T en g.129456C>T in het *DRD4*-gen waarbij de populatie topduiven werd onderverdeeld per wedstrijdcategorie: sprint, middellange en extreem lange afstand.

6 Materiaal en methoden

6.1 Staalname

Voor de controlepopulatie wordt gedoeld op een willekeurige duif, zoals ze op het hok van de gemiddelde Belgische liefhebber zit. Om zo weinig mogelijk invloed te hebben van selectie opgelegd door de liefhebber, werden enkel stalen verzameld van jonge duiven die nog geen deel hebben genomen aan wedstrijdvluchten. De duiven werden willekeurig geselecteerd. Zo werden bijvoorbeeld bij vaccinatie de laatste 5 duiven van de mand bemonsterd. In totaal werden 107 duiven gekozen van 26 verschillende liefhebbers, verdeeld over 3 Vlaamse provincies. Er werden maximaal 5 duiven van dezelfde liefhebber meegenomen. Voor de privacy van de liefhebbers werden de resultaten van de duiven anoniem verwerkt.

De genotypen van de populatie topduiven werden aangeleverd door PiGen vof. Hierbij werden zeer strenge criteria gehanteerd voor de evaluatie van de prestaties van deze duiven. Ook deze resultaten werden anoniem verwerkt.

De topduiven werden per afstand opgedeeld in 3 categorieën. De duiven die toegelaten werden hebben zelf topresultaten neergezet volgens de criteria of sporadisch werd een top kweekduif toegelaten tot een categorie op voorwaarde dat zij ouder is van ten minste 3 verschillende nakomelingen die aan de criteria voldoen per categorie.

Korte afstand (80-250km): een asduiftitel en een minimumcriterium van gemiddeld 3x resultaat in de top 1% en 1x in de top 0.1% van een wedstrijd per jaar deelname aan wedstrijden wordt vereist. In deze categorie bevinden zich o.a. 4 verschillende duiven die eerste nationale asduif snelheid KBDB werden; 1 olympiadeduif sprint; één 3°, twee 4°, één 5°, één 7°, één 9° nationale asduif snelheid KBDB.

Een eerste nationale asduif is de beste duif van een land in de desbetreffende categorie. Elk jaar dingen duizenden tot tienduizenden duiven voor deze titel. Een eerste olympiadeduif is de beste duif van dat land over twee jaar voor een desbetreffende categorie.

Middellange afstand (300-850km): een minimumresultaat van gemiddeld 2x resultaat in de top 1% van een wedstrijd per jaar deelname aan wedstrijden is vereist. De meeste duiven in deze categorie zijn geklasseerd in een nationale asduifranking en/of olympiade van hun desbetreffende land en/of hebben naast de minimumvereisten een 1e prijs gehaald nationaal van een wedstrijd (concours van duizend of duizenden duiven). In deze categorie bevinden zich o.a. 14 verschillende duiven die eerste nationale asduif KBDB werden in de categorieën middellange afstand, lange afstand of allround; 10 verschillende duiven die eerste olympiadeduif waren voor een categorie voor hun land; 3 2° nationale asduiven, 4 3° nationale asduiven, 5 5° nationale asduiven, 1 7° nationale asduif, 2 8° nationale asduiven, 1 10° nationale asduif in de categorieën middellange afstand of lange afstand.

Extreem lange afstand (900-1200km): een minimumcriterium van gemiddeld 1,5x resultaat in top 1% of 1x resultaat in top 0.1% van een wedstrijd per jaar deelname aan wedstrijden is vereist. In deze categorie bevinden zich o.a. 9 verschillende duiven die eerste nationale asduif werden in de categorie extreem lange afstand; 3 eerste prijs winnaars op een internationaal concours ; 5 eerste prijs winnaars op een nationaal concours; 4 2° prijs winnaars op een nationaal concours; 1 3° prijs winnaar op een nationaal concours, 3 duiven geklasseerd in de eerste 10 nationale asduiven.

6.2 DNA extractie

DNA werd geëxtraheerd uit de veren van de vogels. De reagentia gebruikt voor DNA extractie zijn:

Lysebuffer K:

- 10ml 1M Tris-HCl pH 8,3
- 50ml 1 M KCl
- 20ml Tween 20
- Water toevoegen tot 1000ml

Proteïnase K (20mg/ml)

- Proteïnase K (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Duitsland)
- Oplossen in 1mM Tris-HCl pH 7,5

Per staal wordt van 5 veren de calamus afgesneden en in een eppendorf buisje gebracht. Bij de calami wordt lysebuffer toegevoegd, gemengd met proteïnase K. De proteïnase K wordt pas op het einde bij de lysebuffer gevoegd in een verhouding 1µl in 200µl lysebuffer. De lysebuffer verzekert de juiste pH en de juiste omstandigheden om de lysereactie optimaal te laten verlopen. Het mengsel van calami, lysebuffer en porteïnase K wordt kort gecentrifugeerd en hierna in een warmwaterbad gebracht van 56°C gedurende 45 minuten. Hierna wordt het mengsel gedurende 10 minuten in een warmwaterbad van 94°C gebracht. Deze temperaturen zijn respectievelijk de optimale temperatuur voor de werking van het proteïnase K en de temperatuur waarbij het proteïnase K geïnactiveerd wordt. Na afkoelen wordt het mengsel opnieuw gecentrifugeerd en bewaard bij 4°C. Indien de stalen langer bewaard moeten worden, kan dit bij een temperatuur van -20°C.

6.3 PCR

In de PCR of polymerase chain reactie wordt uit een mengsel van template DNA, DNA polymerase, primers, dNTP's en buffer een specifiek fragment DNA tussen 2 gekende sequenties geselecteerd en geamplificeerd (Mullis et al., 1986). Op basis van de flankerende sequenties worden specifieke oligonucleotiden ontworpen, dit zijn de primers. In dit geval waren er reeds primers beschreven in de literatuur (Proskura et al., 2014). Voor het onderzoek naar het voorkomen van de SNP's in *DRD4* en *LDHA* werden de primers voor beide genen uit de literatuur geëvalueerd en licht aangepast.

```
TTTTAACTTCCAAGTTTCCACTGTGACTGCAGGGAATAGTGTAAAATGCAAGTAGAGTTCTTTACTGCTG
AGTTCATTTCAGTTCTGTCAGCACATCAGTCAAGTTTCTGATGTCCCCAAATTGATTAAGGCACCTCAAA
AAGCCCTTCTTCCAAACTTTAAATATTTCAGTTGCTGGTATTTGTATTTTAACAAATACCTTTGTCTCTG
CAGTGCCTATGAGGTCATCAAACTGAAGGGGTACACATCATGGGCTATTGGCCTTTCTGTGGCAGATTTA
GCTGAAACGATTATGAAGAATTTGAGAAGAGTGCACCCAATCTCTACAGTTGTTAAGGTGAGCGGCCTGT
TTTTGCTAACTTTTGTCTTACTGAGACCTAAAAACCTTGGGAATTCTGAAGAACAGTCATAACTTTCTAG
TTTAATTTCAACTAAATTCTGAGTTTTCTTGATAGGACATTCTATAGAATGAATTCTAGCCTAACCATCC
TTACCTGCTTTTCAGGGCATGCATGGAATAAAAGAAGACGTCTTCCTAAGTGTTCCTTGTGTACTGGGCA
GCAGTGGCATCACTGATGTAGTGAAGATGATCCTAAAACCTGAGGAAGAGGACAAATTAAGGAAGAGTGC
AGATACACTCTGGGGAATCCAGAAGGAACTACAGTTTTAAATCTGCCCAAGCAGTTCACTCTTTACATTT
```

Zelf ontworpen primers

Primers volgens literatuur

HaeIII knipplaats

Mutatie = G>A

```
GCTCTACTGCGCCATGTTCCAAGGACTCAAGCGCTGGGAAGAAGCCAGGAAGGCCAAGCTAAGGGGGAGT
ATCTACGGGGCCAACAGGAAGCTCTATCACCCCTCAACCTTTATTGAGAGAGAGCAAACGGGACTGGAGC
CGGAGGAGTGCGGCCCTTACGCCCACTCCAGCCACCCTGGGGACTATGTGATGAACAATGGCATCCCGAC
TGTCTCCTATCCCCACCTCAAGTACCCACCCCCCGGACACGGTCGGAAACGGGCCAAGATCAACGGCCGG
GAGCGGAAGGCCATGCGGGTGCTGCCTGTCGTCGTCGGTGAGCAGAGGCGGTGATGGCTGGGGAAGGGTG
GGAGACGCTGTGTTGTCCTGCAGCGGGGTTCAGGCTGGCAGGGTGTGTCTGAACCACACTTCTCCTTGCT
GGAGGAGATGAAGGCGAGATAAAAGCCACCCCCTTCATGTCCCACCTCCTCGGTGCCATGTCTTTGGTCC
```

Zelf ontworpen primers

Primers volgens literatuur

MnlI knipplaats

Mutatie = C>T

Figuur 5: Boven: primer selectie voor LDHA-gen. Onder: primer selectie voor het *DRD4*-gen

De keuze van primers is gebaseerd op 2 belangrijke criteria, nl. de specificiteit en efficiëntie van het amplificeren van het DNA fragment. De specificiteit wordt gedefinieerd door het aantal gevallen van mispriming dat voorvalt. De efficiëntie wordt gezien als de nabijheid van de resultaten van een primerpaar tot een perfecte vermeerdering in tweevoud per cyclus. Voor een behoud van specificiteit en efficiëntie, zal men primerparen selecteren met een minimale smelttemperatuur van 54°C. De lengte van de primers die hiervoor gebruikt wordt is 18 – 24 oligonucleotiden (Dieffenbach et al., 1993). In het Labo Dierlijke Genetica (LDG) wordt een smelttemperatuur van primers tussen 60 en 68°C verkozen. De lengte van de oligonucleotiden varieert tussen 18 en 27 baseparen. Een ander belangrijk criterium is de plaats van het 3' uiteinde. Men wil dat er een minimale mismatching bestaat tussen de 5-6 nucleotiden van het 3' uiteinde (Dieffenbach et al., 1993). Verder dient complementariteit die zelf-priming of primer-dimeren kan veroorzaken vermeden te worden.

Voor het *LDHA*-gen werd gekozen voor een forward primer met een lengte van 27bp en een reverse primer met een lengte van 20bp. Bij het *DRD4*-gen hebben de forward en de reverse primer een lengte van 21 bp. De forward primer loopt van het 5' naar het 3' uiteinde. De reverse primer loopt van het 3' uiteinde naar het 5' uiteinde. De smelttemperatuur (Tm) situeert zich voor alle primers rond 60°C.

Samenstelling PCR-mix

Component	Concentratie	Eindconcentratie	PCR-reactie in 10µl
Buffer (+MgCl2)	10x	1x	1µl
Primers	5µM (+ en -)	0,5µM	1µl
dNTP's (nucleotiden)	1µM	0,2 µM	0,2µl
Tempase (polymerase)	5 U/µl	0,5 U/µl	0,1 µl
Water		Tot 10 µl	5,7 µl
DNA			2µl

Voor de PCR reactie wordt een mengsel gemaakt van 1µl 10x buffer, 1µl van een mengsel van de + en– primers van 5µM, 0,2 µl dNTP's met een concentratie van 1 µM en 0,1µl Tempase met een concentratie van 5U/µl. Dit geheel wordt aangelengd met water tot men 8 µl mengsel heeft. Hieraan voegt men 2µl template DNA toe.

Buffer (+Mg^{2+}) (VWR International): De PCR reactie gaat door in een buffer die een geschikte omgeving creëert voor de activiteit van het DNA polymerase (Tempase). De pH van de buffer situeert zich meestal tussen 8,0 en 9,5. Het Mg2+ ion wordt toegevoegd als cofactor voor de activiteit van het DNA polymerase. Het helpt bij de stabilisatie tijdens het incorporeren van de dNTP's tijdens polymerisatie door het faciliteren van de complexvorming tussen de primers en DNA template.

dNTP's (VWR International): Deoxynucleoside trifosfaten bestaan uit 4 nucleotiden, dATP, dCTP, dGTP en dTTP. Dit zijn de bouwstenen van de nieuw gevormde DNA strengen. Ze worden toegevoegd in equimolaire concentraties om een optimaal incorporeren te garanderen.

TEMPase (VWR International): TEMPase is een hot start DNA polymerase. Het is een gemodificeerde versie van het Taq DNA polymerase dat inactief is bij kamertemperatuur. Het wordt geactiveerd tijdens de eerste PCR cyclus van 15' bij 95°C. Hierdoor zal er geen mispriming gebeuren bij lage temperatuur wat een hogere specificiteit en efficiëntie tot gevolg zal hebben.

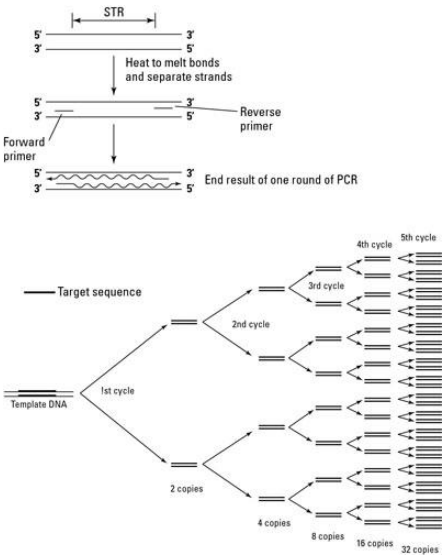
Template DNA: In dit geval is het template DNA het genomisch DNA zoals het werd geëxtraheerd uit veren in punt 6.2.

Water (Fisher reagents): Het water dat gebruikt wordt is gedeïoniseerd en vrij van RNAse en DNAse.

PCR programma

1	14'30''	95°C (denaturatie)	
2	30''	95°C	Stap 2 t.e.m. 4 herhalen (29-39x)
3	30''	Meestal tussen 60°C – 68°C (annealing)	
4	1'	72°C (elongatie)	
5	10'	72°C (elongatie)	
6	Bewaren	4°C of 15°C	

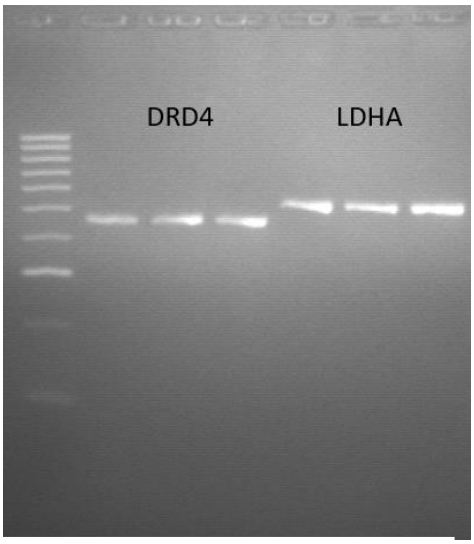
Het PCR programma (Figuur 5) bestaat uit 3 grote delen. In het eerste deel wordt het template DNA gedenatureerd. Deze stap wordt 15 minuten aangehouden voor de activatie van het TEMPase. Hierna volgt de hybridisatie. In het volgende deel, stap 2 tot en met 4, zal men de denaturatie gedurende 30 seconden laten doorgaan. Hierna volgt 30 seconden op 60-68°C, afhankelijk van de smelttemperatuur, waarbij de primers binden op het complementaire stuk van het template DNA. Hierna gebeurt de elongatie, waarbij de dNTP's worden gebonden en zo het PCR product verlengen. Het TEMPase kan 1000bp per minuut incorporeren. Deze 3 stappen worden 35x herhaald. De laatste stap is een langere elongatie om alle niet of slechts gedeeltelijk verlengde producten af te werken. Het PCR product wordt bewaard bij 4°C.



Figuur 5: PCR-reactie
Afkomstig van https://www.dummies.com/education/science/biology/dna-technology-copying-a-gene-with-pcr/

6.4 Gel elektroforese

Om het welslagen van de PCR te evalueren, wordt na afloop van de reactie gel elektroforese toegepast. Indien het gewenste resultaat bekomen wordt, zullen de DNA fragmenten doorheen de agarose gel migreren en oplichten bij het bekijken onder UV-licht.



Figuur 6: resultaat van Agarose gel elektroforese. De *LDHA*-fragmenten zijn groter en zullen dus minder snel migreren.

Bij gel elektroforese migreren elektrisch geladen deeltjes doorheen agarose gel onder invloed van een elektrische stroom die wordt opgewekt in een tray waarbij grotere fragmenten minder makkelijk migreren dan kleine, waardoor ze trager zullen zijn. De grootte van de fragmenten wordt beoordeeld met behulp van een basenparenladder. Aan de agarose gel wordt ethidium bromide toegevoegd, dat intercaleert met de basenparen in het DNA. Hierdoor zal het DNA oplichten onder de UV-lamp.

Hier wordt een 2% Agarose gel geselecteerd voor fragmenten kleiner dan 500 baseparen. De fragmenten voor *LDHA* en *DRD4* zijn respectievelijk 509 en 438 baseparen lang. Een mengsel van PCR product, zoals het verkregen werd in 6.3. en ladingsbuffer wordt in de agarose gel geladen waarna een spanning van 150V gedurende 30 minuten wordt aangelegd. Als controle wordt een 1kb+ ladder gebruikt. Na het migreren van de fragmenten doorheen de gel, wordt een foto gemaakt onder een UV-lamp ter controle van de aanwezigheid van de fragmenten.

TBE buffer: De 10x TBE buffer (0,45M Tris-Boraat en 0,01M EDTA) wordt gemaakt door 109,03g Tris (Gentaur; MG 121,14), 55,65g Boorzuur (VWR; MG 61,83) en 40ml 0,5M EDTA pH 8 samen te voegen en aan te lengen met gedemineraliseerd water tot 2l en te mengen. De 2 l wordt gealiquoteert in 5x 400ml en gesteriliseerd in de autoclaaf. Voor de aanmaak van 1x TBE buffer, giet men 1 fles van 400ml geautoclaveerde 10x TBE in een 5l fles en lengt men aan tot 4l met gedemineraliseerd water.

2% Agarose gel (< 500 bp): De elektroforese tray wordt geselecteerd en gevuld met 1x TBE-buffer. 150ml van de 1x TBE-buffer wordt in een Erlenmeyer gegoten en met de roervlo op de roerplaat gezet. 2,8gr Agarose (Eurogentec) wordt toegevoegd en grondig geroerd. Na het verwijderen van de roervlo gaat de Erlenmeyer met de agarose en 1x TBE-buffer gedurende 1 minuut in de microgolfoven. Vervolgens wordt de erlenmeyer voorzichtig geschud. Hierna gaat de erlenmeyer opnieuw in de microgolfoven tot schuimvorming optreedt en wordt opnieuw voorzichtig geschud. Deze stap wordt minstens 1x herhaald. Tenslotte moet de erlenmeyer eventjes afkoelen, waarna 28 µl ethidiumbromide (Sigma-Aldrich; 10 mg/ml) wordt toegevoegd. Men mengt opnieuw voorzichtig en giet de gel in de tray. Deze gel laat men gedurende 20 minuten polymeriseren.

PCR product: Een mengsel van 5µl water, 5µl ladingsbuffer en 2µl PCR-product wordt opgeladen op de gel in de gleufjes die achtergelaten worden door het kammetje.

Ladingsbuffer: ladingsbuffer is een 1% ficoll oplossing met een mespunt bromofenolblauw.

6.5 EXO-AP reactie

Alvorens men een sequeneringsreactie wil uitvoeren, moet het post-PCR product dat bekomen is, opgeschoond worden. Hiervoor doet men een EXO-AP reactie. Men verwijdert zo de primers die niet geïncorporeerd zijn en men inactiveert dNTP's die niet zijn geïncorporeerd. Het verkregen resultaat is klaar om te sequeneren.

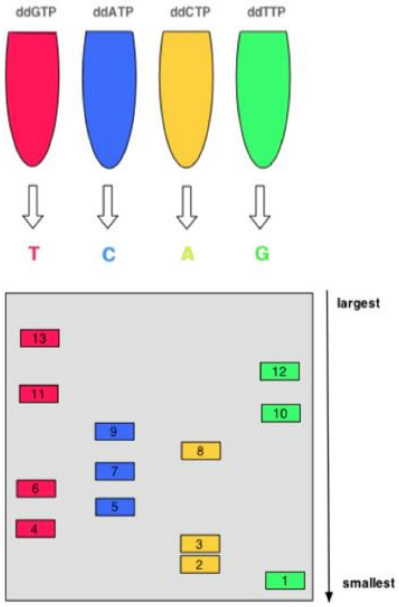
EXO-AP: Exonuclease I (Bioké) met een concentratie van 15U/µl wordt gemengd met antarctic fosfatase (Bioké) van 5U/µl in een verhouding 4U Exo/2U AP. 0,6µl wordt per 8µl resterend PCR product toegevoegd.

PCR programma:

1.	30’	37°C: Exonuclease en fosfatase werking
2.	15’	80°C : Inactiveren van enzymen
3.	Bewaren	4°C

6.6 Sequenering

De sequeneringsreactie wordt uitgevoerd met behulp van een PCR. Het verkregen product wordt naar Eurofins in Duitsland gestuurd voor scheiding op een automatische sequencer. Het sequeneren is gebaseerd op de dideoxysequencing zoals beschreven door Fred Sanger. Hier voegt men dideoxynucleotiden (ddNTP’s) aan het mengsel toe, waardoor de synthesereactie vroegtijdig zal stoppen. Het polymerase zal immers niet werken als er geen 3’ hydroxyl groep aanwezig is. De reactie wordt 4x uitgevoerd, 1x voor elk van de verschillende dideoxynucleotiden (A, G, C en T). Al deze reacties zullen in een polyacrylamide gel gescheiden worden. Men gebruikt hiervoor polyacrylamide in plaats van agarose omdat het scheidend vermogen van polyacrylamide hoger is waardoor een hogere resolutie wordt bekomen en kleine fragmenten, tot 1 nucleotidepaar verschillend van elkaar, kunnen gescheiden worden. De sequentie wordt van onder naar boven afgelezen en omgezet in een electropherogram .



Figuur 7: Sanger sequentie: https://cm.jefferson.edu/learn/laboratory-technologies/

PCR mix

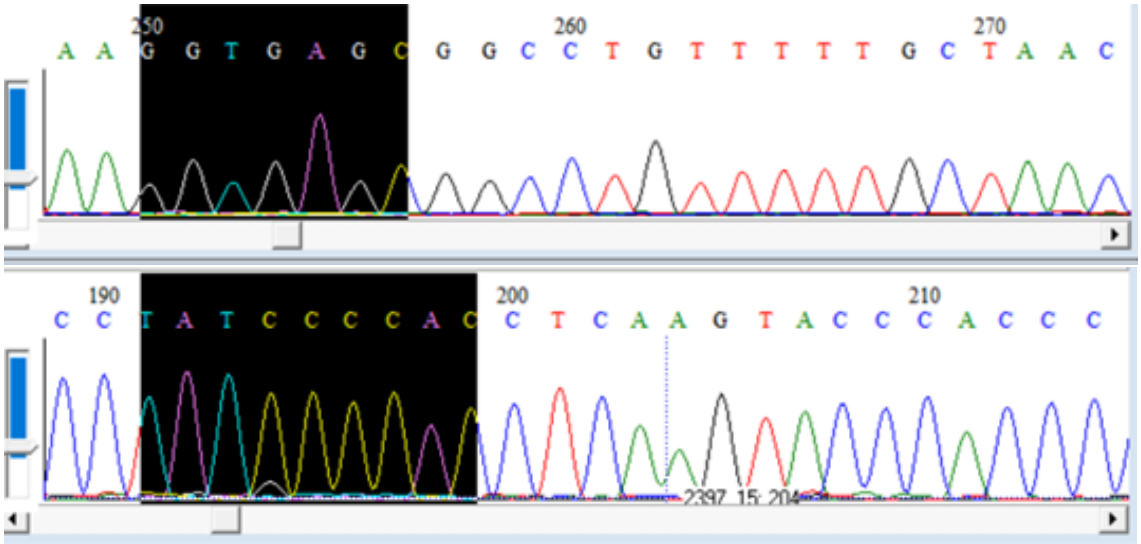
0,5 µl	RR-mix: BigDye™ TerminatorSequencing kit
2,0 µl	5x seq. Buffer (= 200mM Tris-HCl, pH 8 + 5mM MgCl2)
2,0 µl	20 ng/µl PCR-product: voor fragmenten tussen 500 en 1000 baseparen wordt 20ng/SEQ gebruikt.
1,5 µl	2µM sequencing primer: enkel de + of – primer wordt gebruikt.
4,0 µl	Water

Voor de sequentie volgens de Sanger methode voegt men 0,5µl RR-mix bij 2,0µl 5x buffer. Deze buffer bestaat uit 200 mM Tris-HCl en 5mM MgCl2. Vervolgens wordt 2,0µl opgeschoond PCR-product toegevoegd. Voor fragmenten tussen 500 en 1000 baseparen wordt 20 ng/SEQ gebruikt. Bij het toevoegen van 1,5µl primer is het belangrijk dat alleen de + of – primer wordt gebruikt in een 2µM concentratie. Het staal wordt afgewerkt met 4,0µl water zodat men een eindproduct van 10µl krijgt. De stalen worden per gen, resp. *LDHA* en *DRD4* in een 96 well plaat geplaatst, met 1 merker op de H12 plaats. Elke well wordt aan een staal toegewezen. Hierop volgt de PCR om de sequeneringsreactie te voltrekken.

PCR programma

1	2’00’’	95°C	
2	20’’	95°C	Stap 2 t.e.m. 4 herhalen (25x)
3	10’’	55°C	
4	4’	60°C	
5	Bewaren	4°C	

Eens de stalen afgewerkt zijn, kan men de resultaten downloaden van de Eurofins website. Voor het openen van de bestanden is de BioEdit Sequence Alignment editor nodig. Deze is vrij te downloaden. Het resultaat dat men krijgt is een electropherogram, het eindproduct van de Sanger sequentie. In het electropherogram gaat men op zoek naar de positie van de SNP. Voor *LDHA* is dit gesitueerd rond het 260ste basepaar, voorafgegaan door GGTGAGC. Voor *DRD4* vindt men de SNP rond het 200ste basepaar, voorafgegaan door TATCCCCAC.



Figuur 8 : Boven: electropherogram voor LDHA, onder: electropherogram voor DRD4 MnII

Voor de interpretatie van het electropherogram kijkt men naar de locatie van het SNP. Er zijn nu 3 mogelijkheden:

- Een enkele zwarte (G) of blauwe piek (C) betekent een homozygoot wildtype voor *LDHA*, resp. *DRD4* MnII.
- Een dubbele piek zwart(G)/groen(A) of blauw(C)/rood(T) betekent een heterozygote mutant voor *LDHA*, resp. *DRD4* MnII.
- Een enkele groene (A) of rode (T) piek betekent een homozygoot mutant genotype voor *LDHA*, resp. *DRD4* MnII.

In figuur gaat het dus om een C/C individu op de bovenste afbeelding en een G/G individu op de onderste.

7 Resultaten

In totaal werden 107 duiven bemonsterd. De stalen werden verwerkt en de sequenties werden gecontroleerd op de aanwezigheid van de SNP's voor *LDHA*/HaeIII en *DRD4* MnII zoals beschreven door Proskura et al. (2014). De populatie die gecontroleerd wordt, bestaat enkel uit jonge duiven. Zo is het effect van selectie door de liefhebber geminimaliseerd.

7.1 *LDHA*/HaeIII

Tabel 1: Genotypefrequenties van de g.2582481G>A SNP in het *LDHA* gen bij een willekeurige populatie Belgische jongen duiven en een populatie topduiven, onderverdeeld per wedstrijdcategorie. Significante verschillen worden in vetjes aangeduid.

Categorie	n	Genotype			Allelenfrequentie		P- waarde
		GG	GA	AA	G	A	Chi²
Controle	107	79 0,7383	24 0,2242	4 0,0374	0,8505	0,1495	
Populatie topduiven	110	69 0,6273	33 0,3	8 0,07273	0,7772	0,2227	0,18
Vitesse	16	14 0,875	1 0,0625	1 0,0625	0,9063	0,0937	0,31
Middellang	68	36 0,5294	26 0,3824	6 0,0882	0,7206	0,2794	**0,015**
Zeer lang	26	19 0,7308	6 0,2308	1 0,0385	0,8462	0,1538	0,99

Voor de statistische analyse van de resultaten gebruikt men de Chi-kwadraat test om een associatie tussen de twee categorische variabelen na te gaan.

In de Chi-kwadraat test, kijkt men naar de effectieve aantallen in de populatie en vergelijkt men deze met de verwachte waarde in de populatie. In dit geval kan men besluiten dat het voorkomen van gunstige genotypen niet significant verschilt tussen de controle populatie en de topduiven. Dit werd herhaald voor alle subpopulaties van de topduiven. Men ziet dat enkel de duiven gespecialiseerd in middellange afstand significant verschillen met de controle populatie.

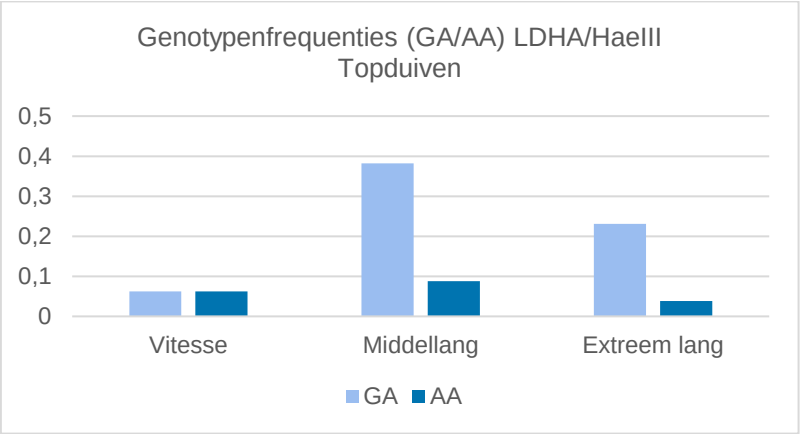
Tabel 2: Chi² test voor 2 categorische veranderlijken: controle VS topduiven

	Controle	Topduif	Totaal	Percentage
G/G	79	69	148	0,6820276
G/A	24	33	57	0,2626728
A/A	4	8	12	0,0552995
Totaal	107	110	217	1
H0: er is geen verschil in het voorkomen van gunstige genotypen tussen controle en topduiven				
Als er geen verschil is verwacht men van respectievelijk de controle en de topduiven:				
Verwachte waarde	Controle	Topduif		
G/G	72,9769585	75,023041		
G/A	28,1059908	28,894009	p= 0,18366949	
A/A	5,91705069	6,0829493		

Tabel 3: Vergelijking subpopulaties topduiven. Significante verschillen worden in vetjes aangeduid.

Categorie	P-waarde
Vitesse - Middellang	**0,03297**
Vitesse - Zeer lang	0,35609
Zeer lang - Middellang	0,202041

Met behulp van de Chi-kwadraat test ziet men echter enkel een verschil indien men de vitesse subpopulatie met middellange afstandsduiven vergelijkt.



Figuur 9: grafiek met de genotypenfrequenties van dragers van de positieve variaties in het *LDHA* gen

Uit deze resultaten blijkt dat het *LDHA*/HaeIII polymorfisme het meest aanwezig is bij duiven die uitblinken in middellange afstand (300-850 km) wedstrijden.

7.2 *DRD4*/MnII

Tabel 4: Genotypische frequenties van de g.129456C>T SNP op het *DRD4* gen bij een willekeurige populatie Belgische jongen duiven en een populatie topduiven, onderverdeeld in wedstrijdcategorie. Significante verschillen worden aangeduid in vetjes.

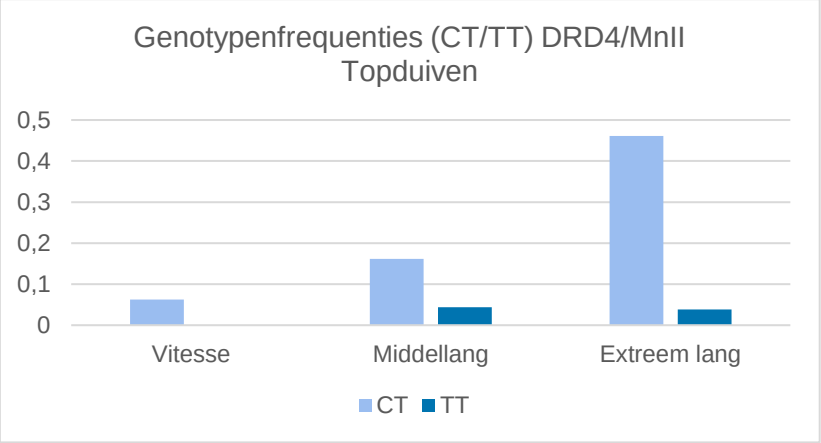
Categorie	n	Genotype			Allelenfrequentie		P-waarde
		CC	CT	TT	C	T	Chi²
Willekeurige populatie	107	98 0,9159	9 0,0841	0 0	0,9579	0,0421	
Populatie topduiven	110	82 0,7454	24 0,2182	4 0,0364	0,8545	0,1455	**0,002**
Vitesse	16	15 0,9375	1 0,0625	0 0	0,9688	0,0312	0,7679
Middellang	68	54 0,7941	11 0,1617	3 0,0441	0,875	0,125	**0,02**
Zeer lang	26	13 0,5	12 0,4615	1 0,0385	0,7308	0,2692	**<0,001**

Voor het nagaan van een associatie tussen 2 categorische variabelen wordt een Chi-kwadraat test gebruikt. SNP g.129456C>T komt significant meer voorkomt bij de populatie topduiven tegenover de controlepopulatie. In een vergelijking van de subpopulaties van de topduiven vergelijkt met de controlepopulatie is enkel de vergelijking met de vitessegroep niet significant.

Tabel 5: Vergelijking subpopulaties topduiven. Significante verschillen worden in vetjes aangeduid.

Categorie	P-waarde
Vitesse - Middellang	0,3822
Vitesse - Zeer lang	**0,0139**
Middellang - Zeer lang	**0,0100**

De Chi-kwadraat test bewijst een significant verschil tussen subpopulatie duiven die extreem lange afstand afleggen en de subpopulatie middellange of Vitesse duiven.



Figuur 10: grafiek met de genotypenfrequenties van dragers van de positieve variaties in het *DRD4* gen

Uit deze resultaten kan men afleiden dat het *DRD4*/MnII polymorfisme het meest aanwezig is bij duiven die uitblinken in extreem lange afstand (900 – 1200 km) wedstrijden.

7.3 *DRD4* MnII/BstCI

Voor de populatie sportduiven werden 2 SNP's op het *DRD4* getest. Volgens Proskura et al. (2014) zullen dubbele heterozygoten (CTCT) betere vliegresultaten behalen.

Tabel 6: Genotypische frequenties van g.129456C>T gecombineerd met de g.129954C>T SNP op het *DRD4* gen bij een populatie topduiven, onderverdeeld in wedstrijdcategorie. De eerste CC verwijst naar g.129954C>T en de laatste twee naar g.129456C>T. Significante resultaten worden aangeduid in vetjes.

Categorie	n	Genotype					
		CCCC	CCCT	CCTT	CTCC	CTCT	TTCC
Populatie topduiven	110	54 0,4909	21 0,1909	4 0,0364	25 0,2273	3 0,0273	3 0,0273
Vitesse	16	13 0,8125	1 0,0625	0 0	2 0,125	0 0	0 0
Middellang	68	32 0,4706	10 0,1471	3 0,0441	20 0,2941	1 0,0147	2 0,0294
Zeer lang	26	9 0,3462	10 0,3846	1 0,0385	3 0,1154	2 0,0769	1 0,0385

Uit de resultaten blijkt dat er een trend is naar het meer voorkomen van het T-allel naarmate de afstand van de races toeneemt. Dit is in dit geval echter niet statistisch significant volgens de Chi-kwadraat test.

Tabel 7: Vergelijking subpopulaties topduiven. Significante verschillen worden in vetjes aangeduid.

Categorie	P-waarde
Vitesse - Middellang	0,2727
Vitesse - Zeer lang	0,0621
Middellang - Zeer lang	0,0633

7.4 Gecombineerde genotypen: *LDHA* + *DRD4* MnII/Bst4CI in de populatie topduiven

Hier wordt gekeken naar toegenomen frequenties van variaties in de *DRD4* SNP's in elk van de genotypen van het *LDHA* gen.

Tabel 8: Genotypische frequenties van het g.2582481G>A SNP op het *LDHA* gen en SNP g.129456C>T gecombineerd met de SNP g.129954C>T op het *DRD4* gen bij een populatie topduiven, gespecialiseerd in Vitesse vluchten.
De eerste CC verwijst naar g.129954C>T en de laatste twee naar g.129456C>T.

LDHA/HaeIII	n	*DRD4* /Bst4CI/MnII					
		CCCC	CCCT	CCTT	CTCC	CTCT	TTCC
Vitesse	16	13	1	/	2	/	/
GG	14	11	1	/	2	/	/
AG	1	1	/	/	/	/	/
AA	1	1	/	/	/	/	/

Geen van de *LDHA*/HaeIII genotypen vertoont significant meer gewenste genotypen in de *DRD4* SNP's (p= 0,99).

Tabel 9: Genotypische frequenties van het g.2582481G>A SNP op het *LDHA* gen en SNP g.129456C>T gecombineerd met de SNP g.129954C>T op het *DRD4* gen bij een populatie topduiven, gespecialiseerd in middellange vluchten.
De eerste CC verwijst naar g.129954C>T en de laatste twee naar g.129456C>T.

LDHA/HaeIII	n	*DRD4* /Bst4CI/MnII					
		CCCC	CCCT	CCTT	CTCC	CTCT	TTCC
Middellang	68	32	10	3	20	1	2
GG	36	16	5	2	11	1	1
AG	26	11	4	1	9	/	1
AA	6	5	1	/	/	/	/

Geen van de *LDHA/HaeIII* genotypen vertoont significant meer gewenste genotypen in de *DRD4* SNP's (p= 0,96).

Tabel 10: Genotypische frequenties van het g.2582481G>A SNP op het *LDHA* gen en SNP g.129456C>T gecombineerd met de SNP g.129954C>T op het *DRD4* gen bij een populatie topduiven, gespecialiseerd in extreem lange vluchten.
De eerste CC verwijst naar g.129954C>T en de laatste twee naar g.129456C>T.

LDHA/HaeIII	n	*DRD4* /Bst4CI/MnII					
		CCCC	CCCT	CCTT	CTCC	CTCT	TTCC
Lange afstand	26	9	10	1	3	2	1
GG	19	6	7	/	3	2	1
AG	6	3	2	1	/	/	/
AA	1	/	1	/	/	/	/

Geen van de *LDHA*/HaeIII genotypen vertoont significant meer gewenste genotypen in de *DRD4* SNP's (p=0,27).

Voorkomen van combinaties voorkeursgenotypen, onderverdeeld in groep
Het voorkomen van de combinaties aan voorkeursgenen werd vergeleken met de verschillende wedstrijdgroepen. De combinaties van voorkeursgenen die gevonden werden zijn: GA/CTCC, AA/CCCT, GA/CCCT, AG/CCTT en AG/TTCC. Hierin werd naar een significant resultaat gezocht.

- GA/ CTCC: komt 9x voor bij middellange afstands duiven, niet bij vitesse noch bij extreem lange afstandsduiven.
- AA/ CCCT: komt 1x voor bij extreem lange afstandsduiven en 1x bij middellange afstandsduiven, niet bij vitesseduiven.
- GA/ CCCT: komt 4x voor bij middellange afstandsduiven en 2x bij extreem lange afstandsduiven.
- AG/CCTT: komt 1x voor bij middellange afstand en 1x bij extreem lange afstand.
- AG/ TTCC: komt 1x voor bij middellange afstandsduiven, niet bij extreem lange of vitesse duiven.

8 Discussie

***LDHA*/HaeIII**

Voor het opbouwen van de controlepopulatie werden 107 willekeurige Belgische jonge duiven getest op het *LDHA*/HaeIII (g.2582481G>A) polymorfisme. Hieruit blijkt dat 73,84% het G/G genotype, 24,42% het G/A en 3,74% het A/A genotype bezitten zoals afgebeeld in tabel 1.

In de literatuur vermelden Proskura et al. (2014) dat de aanwezigheid van het A allel geassocieerd is met verhoogde prestatie van de duiven voor alle afstanden samen en meest uitgesproken voor korte afstanden. Dit is echter niet wat uit dit onderzoek van de Belgische populatie komt. Hieruit is gebleken dat er geen statistisch significante verschil bestaat tussen de genotypefrequenties van de populatie topduiven en de controlepopulatie voor alle afstanden tezamen. Wel werd er een statistisch significant verschil gevonden tussen de controlepopulatie en de subpopulatie topduiven op middellange afstand. Bijkomend werd ook een significant verschil gevonden indien in de populatie topduiven de vitesse duiven worden vergeleken met de middellange afstandsduiven. Er kan dus besloten worden dat de G/A en A/A genotypen best kunnen ingezet worden voor middellange afstand, aangezien zij hier in genetisch opzicht beter op voorbereid zouden zijn.

Vitesse getrainde duiven hebben een hogere LDH activiteit in de spier in vergelijking met duiven die getraind worden voor lange afstand (Chaplin et al., 1997). Deze verhoogde LDH kan betekenen dat duiven mits de correcte verzorging, training en veterinaire ondersteuning geen voordeel ondervinden van de veranderde enzymexpressie die resulteert uit het G/A genotype op korte afstanden (60-300km). Middellange afstandsduiven, die door de training die ze verkregen een lagere LDH activiteit maar hogere piek lactaat niveaus bezitten, zullen wel een voordeel ondervinden van de toegenomen genexpressie. Hierdoor ziet men een significant groter aandeel G/A duiven onder de topduiven in de subpopulatie middellange afstand (300-850km). Duiven die extreem lange afstanden vliegen (900 – 1200km) vertonen verrassend genoeg geen significante verhoging van de aanwezigheid van de G/A heterozygoten. Dit kan betekenen dat er andere factoren belangrijker worden als de afstand nog groter wordt. Aangezien g.2582481G>A een invloed heeft op de enzymexpressie van het lactaat dehydrogenase (Jedrzejczak-Silicka et al., 2018) kan door te kijken naar het duivenspel en de invloed van training op de pectoraalspieren de resultaten van dit onderzoek verklaard worden.

Verder kan men opmerken dat de Poolse controlepopulatie uit het onderzoek van Proskura et al. (2014) significant minder (p=0,014) G/A en A/A individuen telt dan de Belgische controlepopulatie van jonge duiven uit deze studie. Dit kan mede de kwaliteit van de Belgische reisduif verklaren en bewijs leveren van het strenge selectiebeleid dat de gemiddelde Belgische liefhebber voert. Dit gezegd zijnde moet besloten worden dat het homozygote A/A genotype extreem zeldzaam blijft.

***DRD4*/MnII**

Voor het *DRD4*-gen werden eveneens 107 jonge duiven getest. Dit keer op het SNP g.129456C>T. Uit de resultaten blijkt dat 91,59% van de geteste duiven het CC genotype dragen en slechts 8,41% van de dieren draagt het CT genotype. Het TT genotype werd niet teruggevonden in de controlepopulatie.

Ook hier wordt in de literatuur gewag gemaakt van een positief effect van heterozygotie in het SNP g.129456C>T (Proskura et al., 2015) echter ook dit wordt niet teruggevonden in het onderzoek. Integendeel, men ziet een statistisch significant verschil tussen de controle populatie, de gehele groep topduiven en de subpopulaties middellange en extreem lange afstand. Enkel de vitesse subpopulatie vertoont geen significant verschil met de controle populatie. Verder blijkt het g.129456C>T ook significant meer voor te komen bij extreem lange afstandsduiven in vergelijking met de middellange

subpopulatie. Deze middellange subpopulatie heeft op zijn beurt een significant meer voorkomen van g.129456C>T dan de vitesse subpopulatie.

In tegenstelling tot het g.2582481G>A wordt er voor g.129456C>T ook een positieve associatie tussen het voorkomen van het polymorfisme en de extreem lange afstand gezien. Als hypothese kan men voorstellen dat de duiven lange en extreem lange vluchten meer doorzettingsvermogen zullen nodig hebben dan hun soortgenoten die uitblinken in vitesse vluchten. Aangezien polymorfismen in *DRD4* in verschillende zoogdieren en vogels in verband met persoonlijkheidskenmerken kan ook veronderstel worden dat duiven die drager zijn van het T-allel meer wilskracht hebben en meer zelfvertrouwen of minder angst hebben bij het verlaten van de massa duiven op weg naar het eigen hok. Dit zal in de toekomst verder onderzocht moeten worden.

***DRD4*: combinatie in de populatie topduiven**

In de populatie topduiven werd gezocht naar significante verschillen met betrekking tot de combinatie van deze 2 SNP's. Hier werd door Proskura et al. (2014) het grootste effect gevonden bij dubbele heterozygoten, de CTCT individuen. De meeste CTCT individuen werden gevonden bij de subpopulatie extreem lange afstand. Een significant verschil kon in deze populatie echter niet gevonden worden. Men kan echter wel een voorzichtige niet-significante trend zien van het voorkomen van een hogere frequentie van polymorfismen naarmate de afgelegde afstand van de duiven toeneemt.

Een belangrijke opmerking in dit geval is dat de steekproefgrootte beperkt is. Hierdoor is er een grotere kans om een type II fout (=β) te maken. Een type II – fout wordt gemaakt wanneer een nulhypothese onterecht wordt aanvaard. De statistische power (1-β) kan stijgen door een toegenomen steekproefgrootte.

Gecombineerde genotypen: *LDHA*/HaeIII + *DRD4* MnII/Bst4CI in de populatie topduiven

Het is interessant te weten of er in de populatie met individuen die drager zijn van een van de gewenste genotypen van het g.2582481G>A SNP, ook een toename is van de gewenste g.129456C>T/g.129954C>T genotypen. Dit werd onderzocht in de populatie topduiven, in elk van de subpopulaties. Er werden echter geen significante verschillen gevonden. Opnieuw is er hier echter een grotere kans op het maken van een type II fout aangezien de steekproefgrootte beperkt is.

Indien men gaat kijken naar het voorkomen van significante verschillen in de genotypen die teruggevonden worden, kan men zien dat er bij de vitesse duiven geen combinaties van geprefereerde genotypen voor de beide genen tezamen voorkomen. Bij middellange en extreem lange vliegduiven wel, maar er is geen significant verschil in de hoeveelheid van voorkomen tussen beide, hoewel men een voorzichtige trend kan zien dat ze bij middellange afstandsduiven meer zouden kunnen voorkomen. ($p = 0,2472$).

9 Conclusie

Uit het uitgevoerde onderzoek kan worden afgeleid dat het gebruik van marker assisted selection met behulp van *DRD4* en *LDHA* mogelijk is op maat van het geprefereerde spel van de liefhebber in kwestie.

Liefhebbers die als einddoel vitesse voor ogen hebben, zullen een minder grote efficiëntie zien dan andere spelvormen bij het gebruik van deze merkers.

Deze die op middellange afstand willen spelen, zijn zowel gebaat bij het gebruik van de *LDHA* merker als de *DRD4* merker. Op middellange afstand blijkt dat *LDHA* varianten het grootste effect hebben op prestatie en kunnen gunstige *DRD4* varianten deze ondersteunen.

Liefhebbers die extreem lange afstand duiven willen kweken zullen meer moeten selecteren op het voorkomen van het T-allel in van *DRD4*/MnII.

Verder onderzoek naar de combinaties in de SNP's van beide genen kan een nog beter inzicht geven in het koppelen van spelniveau aan de betere genotypen in dit spel. Het kan ook interessant zijn de prestaties van de duiven die drager zijn van mutaties in beide SNP's te vergelijken met deze van duiven die dragers zijn van mutaties op slechts 1 gen of op geen van beide.

10 Literatuurlijst

Abe, H., Ito, S.i., Inoue-Murayama, M., 2011. Polymorphisms in the extracellular region of dopamine receptor D4 within and among avian orders. Journal of molecular evolution 72, 253-264.

Apple, F.S., Rogers, M.A., 1986. Skeletal muscle lactate dehydrogenase isozyme alterations in men and women marathon runners. Journal of applied physiology 61, 477-481.

Berdeaux, R., Goebel, N., Banaszynski, L., Takemori, H., Wandless, T., Shelton, G.D., Montminy, M., 2007. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. Nature medicine 13, 597.

Brooks, G., 1986. Lactate production under fully aerobic conditions: the lactate shuttle during rest and exercise, In: Federation proceedings, pp. 2924-2929.

Burt, D., 2002. Origin and evolution of avian microchromosomes. Cytogenetic and genome research 96, 97-112.

Caspermeyer, J., 2018. Using Whole-Genome Analysis to Home in on Racing Pigeon Performance. Molecular biology and evolution.

Chaplin, S., Munson, M., Knuth, S.T., 1997. The effect of exercise and restraint on pectoral muscle metabolism in pigeons. Journal of Comparative Physiology B 167, 197-203.

Cloninger, C.R., 1987. A systematic method for clinical description and classification of personality variants: A proposal. Archives of general psychiatry 44, 573-588.

Cousquer, G., Parsons, D., 2007. Veterinary care of the racing pigeon. In practice 29, 344-355.

de Groot, M., van Haeringen, W.A., 2017. An evaluation of the International Society for Animal Genetics recommended parentage and identification panel for the domestic pigeon (Columba livia domestica). Animal genetics 48, 431-435.

Dieffenbach, C., Lowe, T., Dveksler, G., 1993. General concepts for PCR primer design. PCR methods appl 3, S30-S37.

Dreber, A., Apicella, C.L., Eisenberg, D.T., Garcia, J.R., Zamore, R.S., Lum, J.K., Campbell, B., 2009. The 7R polymorphism in the dopamine receptor D4 gene (DRD4) is associated with financial risk taking in men. Evolution and Human Behavior 30, 85-92.

Dybus, A., Chang, M., Cheng, Y., Szatkowska, I., 2008. DNA polymorphism of the α4-globin gene in domestic pigeon. Animal Science Papers and Reports 26, 219-226.

Dybus, A., Haase, E., 2011. Feather keratin gene polymorphism (F-KER) in domestic pigeons. British poultry science 52, 173-176.

Dybus, A., Pijanka, J., Cheng, Y.-H., Sheen, F., Grzesiak, W., Muszyńska, M., 2006. Polymorphism within the LDHA gene in the homing and non-homing pigeons. Journal of Applied Genetics 47, 63-66.

Dybus, A., Proskura, W., Pawlina, E., Nowak, B., 2018. Associations between polymorphisms in the myostatin, αA-globin and lactate dehydrogenase B genes and racing performance in homing pigeons. Veterinární medicína 63, 390-394.

Ebstein, R.P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E.R., Nemanov, L., Katz, M., Belmaker, R.H., 1996. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. Nature genetics 12, 78.

Erkens, T., Van Poucke, M., Vandesompele, J., Goossens, K., Van Zeveren, A., Peelman, L.J., 2006. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. BMC biotechnology 6, 41.

Gagliardo, A., Ioalé, P., Bingman, V.P., 1999. Homing in pigeons: the role of the hippocampal formation in the representation of landmarks used for navigation. Journal of Neuroscience 19, 311-315.

Garamszegi, L.Z., Mueller, J.C., Markó, G., Szász, E., Zsebők, S., Herczeg, G., Eens, M., Török, J., 2014. The relationship between DRD 4 polymorphisms and phenotypic correlations of behaviors in the collared flycatcher. Ecology and evolution 4, 1466-1479.

Garcia, J.R., MacKillop, J., Aller, E.L., Merriwether, A.M., Wilson, D.S., Lum, J.K., 2010. Associations between dopamine D4 receptor gene variation with both infidelity and sexual promiscuity. PLoS One 5, e14162.

Gardner, K.L., Sanford, J.L., Mays, T.A., Rafael-Fortney, J.A., 2006. CASK localizes to nuclei in developing skeletal muscle and motor neuron culture models and is agrin-independent. Journal of cellular physiology 206, 196-202.

Gazda, M.A., Andrade, P., Afonso, S., Dilytė, J., Archer, J.P., Lopes, R.J., Faria, R., Carneiro, M., 2018. Signatures of selection on standing genetic variation underlie athletic and navigational performance in racing pigeons. Molecular biology and evolution 35, 1176-1189.

Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K., Dawson, R.J., 1998. A DNA test to sex most birds. Molecular ecology 7, 1071-1075.

Hejjas, K., Kubinyi, E., Ronai, Z., Szekely, A., Vas, J., Miklósi, Á., Sasvari-Szekely, M., Kereszturi, E., 2009. Molecular and behavioral analysis of the intron 2 repeat polymorphism in the canine dopamine D4 receptor gene. Genes, Brain and Behavior 8, 330-336.

Hejjas, K., Vas, J., Topál, J., Szántai, E., Rónai, Z., Székely, A., Kubinyi, E., Horváth, Z., Sasvari-Szekely, M., Miklosi, A., 2007. Association of polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and the activity-impulsivity endophenotype in dogs. Animal genetics 38, 629-633.

Hermans J. H.F., 1985. Handboek sportduiven. BRT.

Hollander, F.A., Van Overveld, T., Tokka, I., Matthysen, E., 2008. Personality and nest defence in the great tit (Parus major). Ethology 114, 405-412.

Hori, Y., Kishi, H., Inoue-Murayama, M., Fujita, K., 2013. Dopamine receptor D4 gene (DRD4) is associated with gazing toward humans in domestic dogs (Canis familiaris). Open Journal of Animal Sciences 3, 54.

Ikehara, T., Eguchi, Y., Kayo, S., Takei, H., 1997. Isolation and sequencing of two alpha-globin genes alpha (A) and alpha (D) in pigeon and evidence for embryo-specific expression of the alpha (D)-globin gene. Biochemical and biophysical research communications 234, 450-453.

Jedrzejczak-Silicka, M., Yu, Y-H., Cheng, Y-H., Dybus, A. (2018). The influence of LDHA gene polymorphism on relative level of itsexpression in racing pigeons. Acta Sci. Pol. Zootechnica, 17(3), 9–16 .

Knol, E.F., Nielsen, B., Knap, P.W., 2016. Genomic selection in commercial pig breeding. Animal Frontiers 6, 15-22.

Korsten, P., Mueller, J.C., Hermannstädter, C., Bouwman, K.M., Dingemanse, N.J., Drent, P.J., Liedvogel, M., Matthysen, E., van Oers, K., van Overveld, T., 2010. Association between DRD4 gene polymorphism and personality variation in great tits: a test across four wild populations. Molecular ecology 19, 832-843.

Lusher, J., Chandler, C., Ball, D., 2001. Dopamine D4 receptor gene (DRD4) is associated with Novelty Seeking (NS) and substance abuse: the saga continues. Nature Publishing Group.

Mannen, H., Tsoi, S., Krushkal, J.S., Li, W.-H., Li, S., 1997. The cDNA cloning and molecular evolution of reptile and pigeon lactate dehydrogenase isozymes. Molecular biology and evolution 14, 1081-1087.
Markert, C.L., Shaklee, J.B., Whitt, G.S., 1975. Evolution of a gene. Science 189, 102-114.

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. Physiological reviews 78, 189-225.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, pp. 263-273.

Newman, L.A., Korol, D.L., Gold, P.E., 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. PloS one 6, e28427.

Proskura, W., Lukaszewicz, A., Dzierzba, E., Cichon, D., Zaborski, D., Grzesiak, W., Dybus, A., 2017. The Cys83Gly amino acid substitution in feather keratin is associated with pigeon performance in long-distance races. Veterinární medicína 62, 221-225.

Proskura, W.S., Cichoń, D., Grzesiak, W., Zaborski, D., Sell-Kubiak, E., Cheng, Y.-H., Dybus, A., 2014. Single nucleotide polymorphism in the LDHA gene as a potential marker for the racing performance of pigeons. The Journal of Poultry Science 51, 364-368.

Proskura, W.S., Kustosz, J., Dybus, A., Lanckriet, R., 2015. Polymorphism in dopamine receptor D4 gene is associated with pigeon racing performance. Anim Genet 46, 586-587.

Ramadan, S., Miyake, T., Yamaura, J., Inoue-Murayama, M., 2018. LDHA gene is associated with pigeon survivability during racing competitions. PloS one 13, e0195121.

Ramadan, S., Yamaura, J., Miyake, T., Inoue-Murayama, M., 2013. DNA polymorphism within LDH-A gene in pigeon (Columba livia). The Journal of Poultry Science 50, 194-197.

Rondou, P., Haegeman, G., Van Craenenbroeck, K., 2010. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. Cellular and molecular life sciences 67, 1971-1986.

Salway, J.G., 2016. Metabolism at a Glance. John Wiley & Sons.

Schroyen, M., Janssens, S., Stinckens, A., Brebels, M., Bertolini, F., Lamberigts, C., Bekaert, K.,

Vanhaecke, L., Aluwe, M., Tuyttens, F., 2015. The MC4R c. 893G> A mutation: A marker for growth and leanness associated with boar taint odour in Belgian pig breeds. Meat science 101, 1-4.

Shapiro, M. D., & Domyan, E. T., 2013. Domestic pigeons. Current Biology, 23(8), R302-R303.

Sifuentes-Rincón, A., Trejo-Tapia, A., Randel, R., Ambriz-Morales, P., Parra-Bracamonte, G., 2016. Bovine dopamine receptors DRD1, DRD4, and DRD5: genetic polymorphisms and diversities among ten cattle breeds. Genet Mol Res 15.

Stringham, S.A., Mulroy, E.E., Xing, J., Record, D., Guernsey, M.W., Aldenhoven, J.T., Osborne, E.J., Shapiro, M.D., 2012. Divergence, convergence, and the ancestry of feral populations in the domestic rock pigeon. Current Biology 22, 302-308.

Timm, K., Tilgar, V., Saag, P., 2015. DRD4 gene polymorphism in great tits: gender-specific association with behavioural variation in the wild. Behavioral Ecology and Sociobiology 69, 729-735.

Traxler, B., Brem, G., Müller, M., Achmann, R., 2000. Polymorphic DNA microsatellites in the domestic pigeon, Columba livia var. domestica. Molecular ecology 9, 366-368.

Uetani, N., Kato, K., Ogura, H., Mizuno, K., Kawano, K., Mikoshiba, K., Yakura, H., Asano, M., Iwakura, Y., 2000. Impaired learning with enhanced hippocampal long-term potentiation in PTPδ-deficient mice. The EMBO journal 19, 2775-2785.

Van Tol, H.H., Wu, C.M., Guan, H.-C., Ohara, K., Bunzow, J.R., Civelli, O., Kennedy, J., Seeman, P., Niznik, H.B., Jovanovic, V., 1992. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. Nature 358, 149.

Verbeke, T., 2003. De oorsprong van de moderne duivensport. Van Mensen en Dingen: tijdschrift voor volkscultuur in Vlaanderen 1.

Yoon, Y.-S., Seo, W.-Y., Lee, M.-W., Kim, S.-T., Koo, S.-H., 2009. Salt-inducible kinase regulates hepatic lipogenesis by controlling SREBP-1c phosphorylation. Journal of Biological Chemistry 284, 10446-10452.

Wang J, Dudley D and Wang XL., 2002. Haplotype-Specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular Biology, 22, 1-4.