

Mikrosatellitenanalyse in einer Population von Baudet du Poitou-Eseln

C. Schelling¹, C. Hagger¹, A. Pienkowska², J.-P. Siegfried³, G. Stranzinger¹

¹Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich und der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich,

²Department of Animal Breeding and Genetics, Agricultural University of Poznań, ³Werner Stamm-Stiftung zur

Erhaltung seltener Einhufer in Oberwil

Zusammenfassung

Eine Gruppe von Baudet du Poitou-Eseln wurde mit Hilfe von Mikrosatelliten genetisch charakterisiert. Die Resultate wurden zur Überprüfung der Abstammungen und zur Schätzung der genetischen Variabilität herangezogen. Es konnte bestätigt werden, dass ein für das Pferd entwickelter Abstammungstest ohne Probleme bei dieser Hausesel-Rasse eingesetzt werden kann und, dass mit 13 variablen Mikrosatelliten weit über 99% von falschen Abstammungen erkannt werden könnten. Die genetische Variabilität dieser Eselgruppe ist vergleichbar mit der einer repräsentativen Stichprobe von Baudet du Poitou-Eseln in Frankreich.

Schlüsselwörter: Esel – Mikrosatelliten – PCR – *Equus asinus* – Poitou

Microsatellite analysis in a population of Baudet du Poitou donkeys

A population of Baudet du Poitou donkeys was genetically characterized using microsatellites. The results were used to verify the pedigrees and to estimate the genetic variability. It could be confirmed that a equine parentage test kit works well for donkeys and that by using 13 microsatellites more than 99% of wrong pedigree informations would be detected. The genetic variability was comparable to a representative group of Baudet du Poitou donkeys in France.

Key words: donkey – microsatellites – PCR – *Equus asinus* – Poitou

Einleitung

Beim Baudet du Poitou-Esel handelt es sich um eine der ältesten Hauseselrassen. Eintragungen im Zuchtbuch können bis ins Jahr 1884 zurückverfolgt werden. Der Poitou-Esel wurde ausschliesslich zur Produktion von Maultieren eingesetzt. Mit dem starkem Niedergang der Maultierzucht in den 1960er Jahren schien auch das Schicksal dieser Hauseselrasse besiegelt zu sein. Der dramatische Rückgang wurde erst gestoppt, als der Bestand weltweit auf rund 80 Tiere geschrumpft war. Internationale Bestrebungen zur Rettung dieser Rasse waren erfolgreich und nachdem, aufgrund einer gesteigerten Nachfrage, auch katalanische und portugiesische Esel eingekreuzt wurden, ging man 1995 daran, ein neues Zuchtbuch zu erstellen. Es konnten über 200 reinrassige Baudet du Poitou-Esel und viele Kreuzungen (*Ane croisé du poitou*) gezählt werden. Neben der Einführung von Transpondern, soll eine routinemässige molekularge-

netische Abstammungskontrolle mithelfen, Einzeltiere zu identifizieren und die Reinheit der Rasse in Zukunft zu sichern.

Bei der Durchführung von Abstammungskontrollen kommen heute bei Mensch und Tier vermehrt Mikrosatelliten zum Einsatz, die auf einfache Weise aus der DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vermehrt und analysiert werden können. Diese Mikrosatelliten sind aber nicht nur wichtig, um Verwandtschaftsgrade zwischen einzelnen Tieren zu bestimmen, sondern sie sind auch potentiell ideale genetische Marker, um die genetische Variabilität innerhalb und zwischen Populationen zu messen. Das Wissen um das Ausmass der genetischen Variabilität in einer gefährdeten Population ist, neben der Abstammungskontrolle, die wichtigste Voraussetzung, um sinnvolle Zuchtstrategien zu entwickeln. So kann beispielsweise das Verpaaren von zu nahe verwandten Tieren vermie-

den, und Tiere mit optimalem genetischen Hintergrund für den Austausch zwischen Populationen selektioniert werden.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren: Die Anwendbarkeit eines für das Pferd entwickelten molekulargenetischen Abstammungstests bei einer Baudet du Poitou-Eselzucht zu überprüfen, die genetische Variabilität zu schätzen und mit der Variabilität einer anderen Population derselben Rasse in Frankreich zu vergleichen.

Tiere, Material und Methoden

Tiere, Probenmaterial und Probenentnahme

Aus einer kleinen Baudet du Poitou-Eselzucht, die von der Werner Stamm-Stiftung zur Erhaltung seltener Einhufer in Oberwil unterhalten wird, wurden von 22 Tieren (9 Esel; 13 Eselinnen) durch Venenpunktion je 50 ml Vollblut entnommen und unmittelbar mit der Zugabe von EDTA ungerinnbar gemacht. Diese Blutproben wurden bis zur Extraktion der DNA bei -20°C gelagert. Zwanzig Esel sind verwandt (Abb. 1) und es war möglich, schriftliche Angaben über die Abstammungen molekulargenetisch zu überprüfen.

DNA-Aufarbeitung für PCR

Die DNA wurde aus den Leukozyten von je 1 ml Blut mit einer Methode isoliert (Kawasaki, 1990), die ausreichende Mengen für 500-1000 PCR-

Reaktionen liefert. Für die Analysen wurden Aliquots bei 4°C gelagert und die restliche DNA wurde bei -20°C eingefroren. Zusätzlich wurde genomische DNA eines Pferdes als Positivkontrolle für die PCR-Reaktionen eingesetzt.

PCR und Auswertung der PCR-Produkte

Für die Mikrosatellitenanalyse wurde der kommerziell erhältliche PCR-Multiplex Kit Stockmarks für Pferde (Perkin-Elmer, Europe) eingesetzt. Dabei können in zwei Multiplex-Reaktionen 8 (VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, HMS6, HTG7, HMS3) beziehungsweise 4 (AHT5, ASB2, HTG10, HMS2) Mikrosatelliten simultan vermehrt werden. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die PCR-Bedingungen folgten der Vorschrift des Stockmark Kits.

Weitere 6 Mikrosatelliten (HTG15, HMS5, HMS15, ECA3, HMS18, HMS20; Microsynth, Balgach) wurden einzeln vermehrt (Guérin et al., 1994; Guérin und Bertaud, 1996; Godard et al., 1997; Ellegren et al., 1992; Tokazi et al., 1995) und untersucht. Die PCR-Ansätze waren identisch mit denen der Multiplex-Reaktionen mit der Ausnahme, dass für alle Reaktionen 6 pmol Primer (jeweils ein Primer am 5'-Ende mit Fluoreszenzfarbstoff markiert) und PCR-Puffer und das Taq Polymerase-Enzym von Pharmacia eingesetzt wurden.

Nach der Amplifikation wurden alle Proben gemäss den Empfehlungen des Stockmark Kits für die

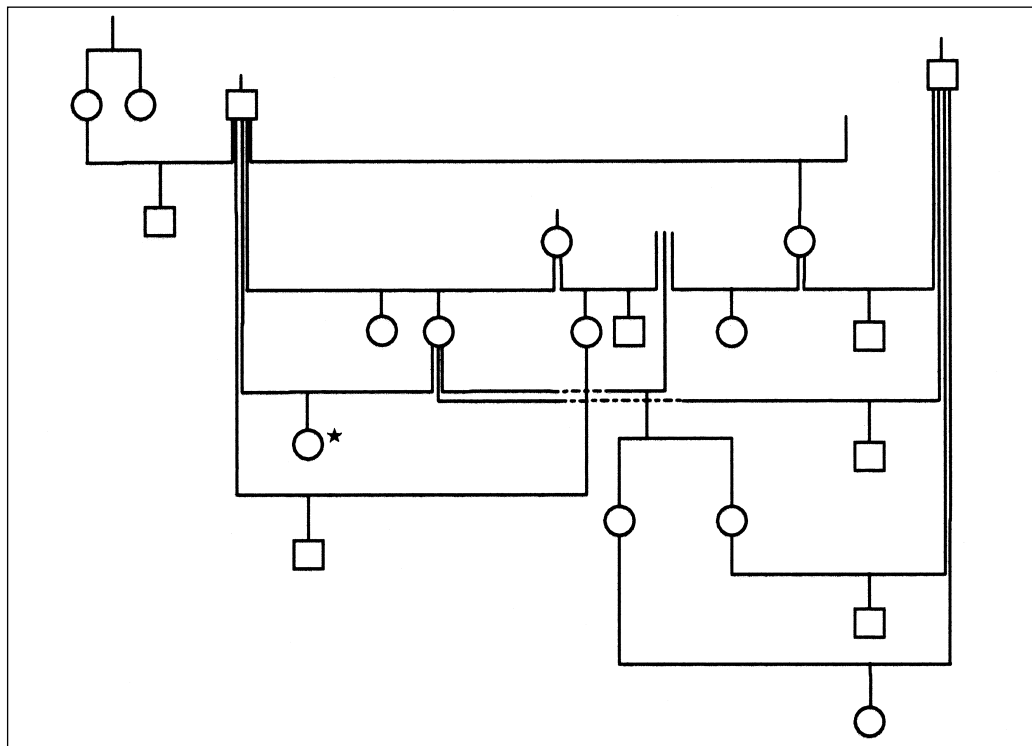


Abbildung 1: Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Esel. Zwei mit dieser Gruppe nicht direkt verwandte Esel sind nicht aufgeführt. Die Esel und Eselinnen sind durch die Symbole Quadrat bzw. Kreis ersichtlich. Die mit dem Stern bezeichnete Eselin weist einen Inzuchtgrad von 0.25 (Vater-Tochter Paarung) auf.

Gelelektrophorese vorbereitet und geladen. Die Auftrennung der Allele erfolgte in einer 6% denaturierenden Gelelektrophorese bei 2400 V für 6.5 Stunden mit einem ABI 373 DNA Sequenator (Perkin Elmer). Die Gele wurden mit GeneScan Analysis 2.0 analysiert und die Daten anschliessend mit Genotyper Software verarbeitet.

Statistische Berechnungen

Obwohl die Eselgruppe sehr klein war (22) und bis auf zwei Esel alle Tiere verwandt waren, wurden statistische Berechnungen durchgeführt. Die Allele der Mikrosatelliten wurden ausgezählt und deren Frequenz bestimmt. Die genetische Variabilität eines Mikrosatelliten k innerhalb der Population wurde mit dem erwarteten Heterozygotiegrad als $H_k = 1 - \sum_i p_i^2$ nach Nei (1975) berechnet. Sie beschreibt die Wahrscheinlichkeit, zufällig ein für den Marker k heterozygoties Tier aus der Stichprobe zu ziehen. Die Wahrscheinlichkeit, zwei Tiere mit demselben Genotyp zufällig aus der Stichprobe zu ziehen, wurde nach Hanset (1976) als $P_1 = \sum_i p_i^4 + 4 \sum_{i < j} (p_i p_j)^2$ berechnet. Die Ausschlusswahrscheinlichkeiten wurden ebenfalls nach Hanset (1976) bestimmt mit $P_E = \sum_{i < j} p_i p_j (1 - p_i p_j) + 3 \sum_{i < j < k} p_i p_j p_k (1 - p_i p_j - p_j p_k - p_k p_i)$.

Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits früher gezeigt wurde, können equine Primerpaare eingesetzt werden, um Mikrosatelliten beim Hausesel zu amplifizieren (z.B. Lagarde, 1995, Boscher et al., 1996). Erfolgreiche «cross-species-PCR» von Mikrosatelliten wurde auch für viele andere nahe verwandte Arten beschrieben. Primerpaare des Haushundes (*Canis familiaris*) können beispielsweise beim afrikanischem Wildhund (Schelling et al., 2000a), beim Rotfuchs (Schelling et al., 1998) und beim Wolf (Schelling et al., 2000b) amplifiziert werden. In dieser Arbeit konnten mit 18 equinen Primerpaaren beim Poitou-Esel 15 Mikrosatelliten amplifiziert werden. Je ein Mikrosatellit (HTG6 und ASB2) der beiden Multiplex-Reaktionen, sowie ein Mikrosatellit (HMS20) der Single-Plex-Reaktionen konnten trotz wiederholten Versuchen (unterschiedliche Zyklenzahl und Annealing-Temperaturen) nur aus der Positivkontrolle (genomische DNA Pferd) amplifiziert werden. Dieser hohe Prozentsatz (83%) von amplifizierbaren Mikrosatelliten kann durch die enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen dem Pferd (*Equus caballus*) und dem Hausesel (*Equus asinus*), die sich erst vor ca 2.5 Millionen Jahren getrennt haben sollen (Oakenfull et al., 1998), erklärt werden. Für die beiden Primerpaare ASB2

und HMS20 konnten keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden, obwohl sie in einer auf andere Weise zusammengesetzten Multiplex-Reaktion (Boscher et al., 1996) Mikrosatelliten des Hausesels amplifizierten. Ob die unterschiedliche Zusammensetzung der Primerpaare der beiden Multiplex-Reaktionen oder ob populations-spezifische Mutationen in der Primerbindungsstelle der Mikrosatelliten für die fehlende Amplifikation, wie es beispielsweise für HMS3 und ASB2 bei Lippizanern beschrieben wurde (Achmann et al., 2001), verantwortlich sind, wurde nicht weiter untersucht. Von den 15 amplifizierbaren Mikrosatelliten waren zwei Systeme monomorph (HMS5, HMS15). Die Variabilität der 13 polymorphen Mikrosatelliten war sehr unterschiedlich und schwankte zwischen 2 (HTG4, HMS3, HTG 15, ECA3) und 7 (AHT5) Allelen. Durchschnittlich konnten 3.5 Allele pro Mikrosatellit (22 untersuchte Esel) nachgewiesen werden. Die Variabilität war im 4er Multiplex am höchsten (durchschnittlich 5.3 Allele), gefolgt vom 8er Multiplex (durchschnittlich 3.1 Allele) und von der Single-Plex Gruppe (2.6 Allele).

Um die genetische Variabilität mit einer repräsentativen Stichprobe (31 Esel) von französischen Baudet du Poitou-Eseln vergleichen zu können, wurden zusätzlich 6 weitere Mikrosatelliten, die nicht im kommerziellen Test für das Pferd enthalten sind, einzeln vermehrt und untersucht. So wurde es möglich, Resultate von 7 Mikrosatelliten (VHL20, HTG4, HMS6, HMS18, ECA3, HTG15, HMS5) direkt zu vergleichen. Die genetische Variabilität der französischen Poitou-Esel war mit durchschnittlich 2.9 Allelen pro Mikrosatellit (9 untersuchte Mikrosatelliten) leicht geringer. Wäre aber ein sehr polymorphes System (AHT5) in der französischen Studie miteinbezogen worden, bestünden keine Unterschiede bezüglich der durchschnittlichen Zahl von nachweisbaren Allelen. Die genetische Variabilität (P_1) innerhalb der Poitouesel-Population wurde nach der Methode von Hanset (1976) bestimmt (Tab. 1). Der Vergleich der genetischen Variabilität zwischen den beiden Baudet du Poitou-Populationen zeigte, dass in seltenen Fällen (z. B. HMS 18) Abweichungen in der Zahl der nachgewiesenen Allele auftraten. Es handelte sich aber immer um Allele mit sehr kleinen Frequenzen, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie bei der Untersuchung grösserer Tierzahlen ebenfalls entdeckt würden. Die Resultate unterstützen die Annahme, dass beide Esel-Populationen von denselben Foundertieren abstammen und, dass es seit der Trennung nicht zu grossen Veränderungen der genetischen Variabilität gekommen ist. Um mögliche Einkreuzungen von nicht-reinrassigen Poitou-Esel in der jungen Ge-

	Multiplex 1						Multiplex 2			Singleplexes			
	VHL20	HTG4	HMS6	HTG7	AHT4	HMS7	HMS3	HTG10	HMS2	AHT5	HMS 18	HTG 15	ECA3
	3	2	3	4	4	4	2	5	4	7	4	2	2
	95–0.21	173–0.89	158–0.82	156–0.06	158–0.52	179–0.04	168–0.37	108–0.05	242–0.39	155–0.09	186–0.14	136–0.32	159–0.98
	93–0.02	171–0.11	156–0.07	152–0.60	156–0.02	173–0.30	166–0.63	104–0.40	236–0.20	153–0.14	184–0.02	132–0.68	157–0.02
	81–0.77		150–0.11	146–0.03	152–0.41	171–0.64		102–0.42	234–0.36	151–0.27	180–0.82		
				134–0.31	142–0.05	169–0.02			100–0.10	228–0.05	149–0.04	178–0.02	
								94–0.03		137–0.23			
										135–0.43			
										129–0.05			
H	0.37	0.2	0.31	0.55	0.56	0.5	0.47	0.65	0.68	0.65	0.35	0.44	0.04
PI	0.45	0.66	0.49	0.263	0.219	0.327	0.393	0.19	0.165	0.191	0.5	0.413	0.923
PE	0.16	0.353	0.159	0.18	0.267	0.184	0.715	0.369	0.375	0.9	0.154	0.681	0.076
				CEP 0.84					CEP 0.96			CEP 0.75	

Tabelle 1: Amplifizierbare Mikrosatelliten der Baudet du Poitou-Eselpopulation. Die Mikrosatelliten sind geordnet nach Multiplex 1, Multiplex 2, gefolgt von der Gruppe Singleplexes. Die Anzahl gefundener Allele, die Längen der Allelvarianten in Basenpaaren mit der jeweiligen Frequenz können aus dem oberen Teil der Tabelle abgelesen werden. Die Länge der Allele in Basenpaaren wurde aufgrund eines internen Längenstandards und aufgrund der bekannten Länge der Allele des Pferdes (Positivkontrolle) bestimmt. Im unteren Teil sind für alle Mikrosatelliten Angaben über den Grad an genetischer Variabilität (H_k), über die Wahrscheinlichkeit zufällig zwei Esel mit dem identischen Genotyp zu finden (PI) und über die Wahrscheinlichkeit, eine falsche Abstammung zu erkennen (PE), aufgeführt. Die für die beiden Multiplexe und für die Gruppe der Singleplexes kumulierten Ausschlusswahrscheinlichkeiten sind unter CEP zu finden.

schichte der planmässigen Zucht nachzuweisen, wäre die Untersuchung von mehr Tieren oder die Untersuchung von mitochondrialer DNA notwendig.

In vielen Fällen verlässt man sich in Hobby- und Liebhabierzuchten bei der Führung der Zuchtunterlagen nur auf die schriftlichen Angaben über die durchgeführten Verpaarungen. Erfahrungen in der Nutz- und Heimtierzucht machen aber deutlich, dass unabhängige Ueberprüfungen der Abstammungen notwendig und sinnvoll sind. Anhand der Genotypen der 13 polymorphen Mikrosatelliten-Systeme wurden die Elternschaften überprüft und alle Allel-Konstellationen bestätigten die schriftlichen Angaben über die durchgeführten Verpaarungen. Die Ausschlusswahrscheinlichkeit (P_E) wurde aufgrund der Allelfrequenzen (Tab. 1) nach Hanset (1976) bestimmt und die Werte für die einzelnen Mikrosatelliten-Systeme sind in Tab. 1 ersichtlich. Werden sämtliche 13 polymorphe Systeme kumuliert, können weit über 99% der

falschen Abstammungen erkannt werden. Werden alle polymorphen Systeme kumuliert, so ist die Wahrscheinlichkeit, zufällig zwei Esel mit dem identischen Genotyp aus der Population herauszuziehen, verschwindend klein ($P_{1\text{ total}}: 1.0 \times 10^{-6}$). Damit ist der Test, der für Pferde entwickelt wurde, auch für Verwandtschaftsabklärungen bei der Baudet du Poitou Eselrasse geeignet und wird die Selektion geeigneter Zuchttiere in Zukunft unterstützen.

Dank

Die Autoren möchten Frau E. Garbely und Frau Dr. A. Kratzer für die Mithilfe bei der Durchführung der technischen Arbeiten bzw. für die Mithilfe bei der Auswertung der GeneScan-Resultate danken. Der Werner Stamm-Stiftung zur Erhaltung seltener Einhufer in Oberwil danken wir für die Überlassung des Probenmaterials.

Analyse de microsatellites d'une population d'ânes du Baudet du Poitou

Une population d'ânes du Baudet du Poitou fut génétiquement caractérisée à l'aide de microsatellites. Les résultats furent utilisés pour la vérification des pedigrees et la détermination de la variabilité génétique. Il a pu être montré qu'un kit de test de paternité développé pour le cheval pouvait s'appliquer à l'âne et que l'utilisation de 13 microsatellites permettait de détecter plus de 99% des informations erronées de pedigrees. La variabilité génétique était comparable à une population d'ânes du Baudet du Poitou en France.

Analisi-microsatellite di una popolazione di asini Baudet du Poitou

Una popolazione di asini Baudet du Poitou è stata caratterizzata geneticamente con l'aiuto di markers-microsatelliti. I risultati sono stati utilizzati per la verifica della discendenza e per la determinazione della variabilità genetica. Si è potuto mostrare che un test sviluppato per la discendenza nel cavallo può essere utilizzato senza problemi anche per l'asino domestico e che più del 99% di false discendenze potrebbero venire riconosciute con 13 microsatelliti diversi. La variabilità genetica è paragonabile a quella di una popolazione di asini Baudet du Poitou in Francia.

Literatur

- Achmann R., Huber T., Wallner B., Dovic P. Müller M. Brem G.:* Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse. *Animal Genet.* 2001, 32:52.
- Boscher M.-Y., Mériaux J.-C., Mahla R., Amigues Y.:* Etude phylogénétique comparative entre la race «Baudet du Poitou» et les populations asines françaises à l'aide des techniques de biologie moléculaire. Syndicat mixte du parc naturel Régional du Marais Poitevin et Labogena (1996).
- Ellegren H., Johansson M., Sandberg K., Andersson L.:* Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genet.* 1992, 23:133-142.
- Guérin G., Bertaud M., Amigues Y.:* Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Animal Genet.* 1994, 25:62.
- Guérin G., Bertaud M.:* Characterization of two polymorphic horse microsatellites: HMS15 and HMS 20. *Animal Genet.* 1996, 27:123.
- Godard S., Vaiman D., Oustry A., Nocard M., Bertaud M., Guzylack S., Mériaux J.-C., Cribiu E.-P., Guérin G.:* Characterization, genetic and physical mapping analysis of 36 horse plasmid and cosmid-derived microsatellites. *Mamm. Gen.* 1997, 8:745-750.
- Hanset R.:* Probabilité d'exclusion de paternité et de monozygotie. *Ann. Méd. Vét.* 1976, 119:71-80.
- Kawasaki E. S.:* Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Eds.: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, Academic Press, San Diego, 1990, 146-152.
- Lagarde E.E.:* L'âne Grand Noir du berry. Etude historique et systématique, bases d'une gestion génétique. Thèse vétérinaire, Université de Toulouse, 1995.
- Nei M.:* In: Molecular population genetics and evolution. North Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975.
- Oakenfull E.A., Clegg J.B.:* Phylogenetic relationships within the genus *Equus* and the evolution of alpha and theta globin genes. *J. Mol. Evol.* 1998, 47:772-783.
- Schelling C., Stranzinger G., Dolf G., Schlapfer J., Switonski M.:* Assignment of the canine microsatellite Zu-BeCa1 to canine chromosome 10q22-q24. *Animal Genet.* 1998, 29:398.
- Schelling C., Vennos C., Bertschinger H.J.:* Microsatellite analysis in South African wild dogs. In *Animal Genomics: Synthesis of Past, Present, and Future Directions*. Abstract Book of the 27th ISAG Meeting, Minneapolis, 2000a.
- Schelling C., Schlapfer J., Vennos C., Stahlberger-Saitbekova N., Dolf G.:* Seven novel cosmid-derived canine microsatellites. *Animal Genet.* 2000b, 31:77.
- Tokazi T., Sakagami M., Mashima S., Hirota K., Mukoyama H.:* ECA-3: equine (CA) repeat polymorphism at chromosome 2p1.3-4. *Animal Genet.* 1995, 26:283.

Korrespondenzadresse

Dr. C. Schelling, Arbeitsgruppe Veterinärmedizinische Genetik, Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich und der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich, Tannenstrasse 1, CH-8092 Zürich, Tel.: ++41 (1) 632-32-49, Fax: ++41 (1) 632-11-67, E-Mail: claude.schelling@inw.agrl.ethz.ch

Manuskripteingang: 3. Dezember 2001

In vorliegender Form angenommen: 8. März 2002