

UNTERSUCHUNG DER GENETISCHEN VARIABILITÄT DER UNGARISCHEN GÄNSEN

Aliczki K.¹ - Mihók S.¹-Glössel J.²- Dieringer D.²

¹University of Debrecen, Center of Agricultural Sciences, Debrecen, Hungary,

²University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna

1. Einleitung

Die **ungarische Gans** hat heutzutage, nach der Größe und der Art der Fortpflanzung, Eigenschaften einer lebenden Genreserve. Für so eine gefährdete Nutztier rasse, stellt sich ganz besonders die Frage der genetischen Distanz zu anderen Rassen. Die Untersuchung hatte zwei Ziele: Zum einen sollte die genetische Variabilität der ungarischen Glattfeder- und Lockengans festgestellt werden. Zum anderen sollte die genetische Beziehung der ungarischen Locken- und Glattfedergans zur Emdener Gans untersucht werden. Als Außerguppe wurde eine Graugans Population verwendet. Zur Abschätzung der genetischen Variabilität wurden **Mikrosatelliten** aus anderen Wassergeflügelrassen benutzt. Weil die Zahl der verfügbaren Mikrosatelliten bei Wassergeflügel sehr beschränkt ist (BUCHHOLZ *et al.*, 1998; MAAK *et al.*, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2001), haben die Mikrosatelliten-Adaptationsstudien große Bedeutung.

2. Material und Methode

Für die Untersuchung wurden Blutproben von insgesamt 329 Gänsen aus **vierzehn** verschiedene **Populationen** (Ungarischen Locken- und, Glattgans, Emdener Gans) entnommen. Die Populationen stammen aus Ungarn und Transsilvanien.

Als Kontrollegruppe wurde eine Graugans Population verwendet. Die DNS Proben der Graugansindividuen wurden von *Veterinärmedizinischen Universität Wien* zur Verfügung gestellt. *Abbildung 1.* zeigt eine Karte über die Herkunft der Populationen.

Abb.1.

Herkunft der Populationen



1. Locken1 (n=64); 2. Locken2 (n=24); 3. Locken3 (n=7); 4. Locken4 (n=10); 5. Locken5 (n=12); 6. Locken6 (n=11); 7. Locken7 (n=6); 8. Locken8 (n=7); 9. Orosházi (n=8); 10. Oros x Locken (n=21); 11. Parlagi (n=9); 12. Babati1 (n=64); 13. Babati2 (n=23); 14. Emdener (n=63); 15. Graugans (n=21)

Die DNS wurde aus Blut isoliert (NAGY, 2003). Um den Erfolg der **DNS-Isolation** zu kontrollieren und eine semiquantitative Abschätzung der DNS-Menge durchzuführen, wurden die DNS-Proben auf Agarosegele aufgetragen.

Die ausgewählten **23 Mikrosatelliten** waren vorher nur bei anderen Arten (Ente bzw. Kanadische Gans) benutzt worden und wurden hier erstmalig bei domestizierter Gans verwendet.

Fünfzehn verwendete Mikrosatellitenmarker wurden aus der Ente (*Somateria mollissima* und *Anas platyrhynchos*) isoliert und charakterisiert (PAULUS *et al.*, 2003, MAAK *et al.*, 2003) und acht stammten aus der kanadischen Gans (*Branta canadensis*) (CATHEY *et al.*, 1998; BUCHHOLZ *et al.*, 1998).

Die Funktion der ausgewählten 23 Mikrosatelliten wurde erst bei 8 Individuen getestet. Die optimalen PCR-Bedingungen, hinsichtlich Anlagerung-Temperatur und Anzahl der Zyklen wurden durch eine **Reaktionsoptimierung** ermittelt. Zu diesem Zweck wurde für jeden Mikrosatelliten einzeln eine *Test-PCR* durchgeführt. Der Name, Herkunft, PCR Profil (Anlagerung-Temperatur, Anzahl der Zyklen) und Referenten der verwendeten Mikrosatellitenmarker sind in *Tabelle 1.* aufgeführt. Die funktionierenden Marker wurden gekennzeichnet.

Die **Fragmentlängenbestimmung der Amplifikate** erfolgte mit einer lasergestützten *Kapillarelektrophorese*. Dazu stand ein ABI Prism™ 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Wien) zur Verfügung. Die Auswertung der Typisierungen erfolgte mit den Softwareprogrammen GeneScan® 2.1. und Genotyper® 2.1. (Applied Biosystems, Wien).

Tabelle 1.

Verwendete Mikrosatelliten

No.	Mikrosatellit	Herkunft	Anlagerung Temperatur	PCR-Zyklen	Referent
1.	Smo1	Somateria mollissima	54 °C	38	1.
2.	Smo4	Somateria mollissima	55 °C	38	1.
3.	Smo6	Somateria mollissima	65 °C	38	1.
4.	Smo7	Somateria mollissima	60 °C	38 → 29	1.
5.	Smo8	Somateria mollissima	54 °C	38	1.
6.	Smo9	Somateria mollissima	61 °C	38	1.
7.	Smo10	Somateria mollissima	50 °C	38	1.
8.	Smo11	Somateria mollissima	61 °C	38	1.
9.	Smo12	Somateria mollissima	49 °C	38 → 29	1.
10.	Smo13	Somateria mollissima	65 °C	38	1.
11.	APH02	Anas platyrhynchos	62 °C	29	2.
12.	APH08	Anas platyrhynchos	58 °C	29	2.
13.	APH12	Anas platyrhynchos	52 °C	30	2.
14.	APH13	Anas platyrhynchos	52 °C	30	2.
15.	APH16	Anas platyrhynchos	52 °C	29	2.
16.	TTUG-1	Branta canadensis	55 °C	35 → 30	3.
17.	TTUG-2	Branta canadensis	55 °C	35 → 30	3.
18.	TTUG-3	Branta canadensis	53 °C	35	3.
19.	TTUG-4	Branta canadensis	55 °C	35	3.
20.	TTUG-5	Branta canadensis	59 °C	35 → 27	3.
21.	Bcap1	Branta canadensis	56 °C → 57 °C	27	4.
22.	Bcap3	Branta canadensis	56 °C → 57 °C	27	4.
23.	Bcap9	Branta canadensis	56 °C	26	4.

1.= PAULUS *et al.*(2003), 2.= MAAK *et al.*(2003) , 3= CATHEY *et al.* (1998), 4.=BUCHHOLZ *et al.*(1998)

Die **genetische Diversität** einer Population lässt sich recht gut an der Anzahl der Allele und der Allelverteilung abschätzen. Die *Allelfrequenzen* sowie die *Anzahl der Allele* pro Locus (EWENS, 1972; KIMURA, *et al.* 1975) wurden mit dem Softwareprogramm MSA4.00 (DIERINGER, 2003) berechnet. Auch die *erwartete* sowie die *beobachtete Heterozygotie*, das heißt der Anteil der heterozygoten Tiere in der Population, ist ein guter Hinweis auf die genetische Variabilität. Diese Werte wurden auch mit dem Softwareprogramm MSA4.00 (DIERINGER, 2003) berechnet. Alle Daten wurden auf *Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht* (HWG) mit Hilfe des Softwareprogramms Genepop v.3.4d. (RAYMOND, 1995) untersucht. Der paarweise **Homogenitätstest** (F_{ST}) wurde mit dem Softwareprogramm MSA4.00 (DIERINGER, 2003) berechnet. Die **paarweise genetische Distanzen** aller Populationen wurden nach *Nei's Standard Genetik Distanzen* (NEI, 1978) und nach *die Anteile an gemeinsamen Allele* ("proportion of shared alleles" = POSA) (BOWCOCK *et al.*, 1994) bestimmt. Alle diese Distanzen wurden mit dem Softwareprogramm MSA4.00 (DIERINGER, 2003) berechnet. Das Konstruieren von *phylogenetischen Bäumen* kann zur Darstellung von genetischen Distanzen verwendet werden. Für den Populationsbaum wurde das Distanzmaß nach Proportion der gemeinsamen Allele (BOWCOCK *et al.*, 1994) verwendet. Der phylogenetische Baum wurde nach dem "Neighbor-Joining"-Verfahren (SAITOU *et al.*, 1987)

konstruiert. Dafür wurde das Softwarepaket Phylip (FELSENSTEIN, 1993) verwendet. In diesem Fall wurden die Distanzen zwischen den Individuen aufgrund der Anteile an gemeinsamen Allele ("proportion of shared alleles") berechnet (BOWCOCK *et al.*, 1994). Die Darstellung der phylogenetischen Bäume erfolgte mit dem Softwareprogramm TreeViewPPC v.1.6.5. (PAGE, 1996).

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Mikrosatellitenadaptation

Vierzehn von 23 Mikrosatelliten konnten bei den Gansindividuen amplifiziert werden und zehn Locus waren polymorph. Bei den polymorphen Mikrosatelliten variierte der Anzahl der Allele zwischen zwei und zwölf. Die erwartete Heterozygotie der Locus war zwischen 3-78% und die beobachtete Heterozygotie der Locus war zwischen 1-72%. Die *Tabelle 2.* zeigt die amplifizierte Mikrosatelliten, gefundene Allele, Allellänge und Heterozygotie.

Tabelle 2.

Amplifizierte Mikrosatelliten

Mikrosatellit	Anzahl die Allele	Allellänge (bp)	Heterozygotie
Smo7	2	188-190	29%
Smo12	2	73-75	9%
APH12	4	150-154	31%
APH13	2	162-164	38%
TTUG-1	3	130	1%
TTUG-2	2	110-114	39%
TTUG-5	12	108-124	72%
Bcap1	6	176-231	40%
Bcap3	3	111-121	47%
Bcap9	4	151-160	30%

3.2. Genetische Diversität der Populationen

Für die Feststellung der genetischen Variabilität in der Ungarischen Gans Populationen wurde die durchschnittliche Anzahl der Allele, die beobachtete (H_O) und erwartete Heterozygotie (H_E) sowie die Abweichung von Hardy Weinberg Gleichgewicht in jede Gruppe berechnet (*Tabelle 3*).

Tabelle 3.

Variabilität der Populationen

Population	n	Anzahl der Allele	H_O	H_E	pHW	
Locken1	64	3,4	0,36	0,38	0,001	***
Locken2	24	2,8	0,33	0,35	0,575	n.s.
Locken3	7	2,4	0,36	0,36	0,999	n.s.
Locken4	10	2,7	0,31	0,35	0,566	n.s.
Locken5	12	2,2	0,37	0,34	0,910	n.s.
Locken6	11	2,6	0,28	0,35	0,044	*
Locken7	6	2	0,35	0,31	0,806	n.s.
Locken8	7	2,3	0,35	0,43	0,280	*
Orosházi	9	2	0,35	0,33	0,872	n.s.
Oros xLocken	8	2,1	0,31	0,33	0,623	n.s.
Parlagi	21	2,7	0,32	0,34	0,437	n.s.
Babati1	64	3,3	0,35	0,36	0,133	n.s.
Babati2	23	2,7	0,33	0,32	0,440	n.s.
Emdener	62	3,2	0,35	0,37	0,204	n.s.
Graugans	21	3,1	0,31	0,35	0,249	n.s.

Die durchschnittliche Anzahl der Allele betrug über alle 15 Populationen 2,6. Es wurde bestimmt, dass sich zwei Locken (Locken2, Locken4), zwei Glattfeder (Babati1, Babati2), die Emdener und die Graugans Population nach die Allelverteilung aller verwendeten Mikrosatelliten-Marker im *Hardy-Weinberg Gleichgewicht* befand. Es konnte bei drei Populationen (Locken1, Locken6, Locken8) eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet werden. Bei drei

Lockenfeder (Locken3, Locken5, Locken7), zwei Glattfeder (Orosházi, Parlagi) und bei den gekreuzten Populationen (Oros x Locken) war die Allelzahl unter durchschnitt und die Heterozygotie relativ hoch. Diese Werte zeigen der Anfangsstand der *Flaschenhals-effekt* bei diesen Populationen. Genetischer Flaschenhals bezeichnet eine starke genetische Verarmung, die durch eine sehr kleine, oft nur aus wenigen Individuen bestehende Population hervorgerufen wird. Durch eine Flaschenhals-effekt wird die genetische Variabilität einer Population stark verringert. Dies kann dazu führen, dass bestimmte Allele eliminiert werden.

3.3. Genetische Diversität der Populationen

Durch Auszählen der gefundenen Allele wurden die Allelfrequenzen in den einzelnen Populationen für die jeweiligen Loci ermittelt. Fixierte Unterschiede in den *Allelfrequenzen* wurden nicht festgestellt. Vielmehr kamen gemeinsame Allele bei Ungarischen Locken-, und Glattfedergans und bei die Emdener Ganspopulation vor, die jedoch teilweise in recht unterschiedlichen Häufigkeiten auftraten. Die ungarischen Populationen waren anhand von Allelfrequenzen gleichmäßig. *Die Anzahl der privaten Allele* einer Population gegenüber andere Populationen kann als genetische Distanz gedeutet werden. Je mehr private Allele eine Gruppe aufweist, desto weniger hat sie mit den anderen Gruppen gemeinsam, desto weiter ist sie genetisch von den anderen entfernt. Die Unterschiede waren hier bei den untersuchten Gruppen nicht so groß. Zwei Populationen (Locken1, Graugans) zeigten über alle Loci vier private Allele. Die Frequenzen dieser populationsspezifischen Allele waren eher niedrig und lagen fast alle unter 10%.

Der mit der Softwareprogramm MSA 4.00 durchgeführte Homogenitätstest (F_{ST} -Wert) ergab keine signifikante Differenzierung zwischen der meisten Populationen (*Tabelle 4*).

Tabelle 4.

Ergebnisse der paarweise Homogenitätstest (F_{ST}) über 10 Loci

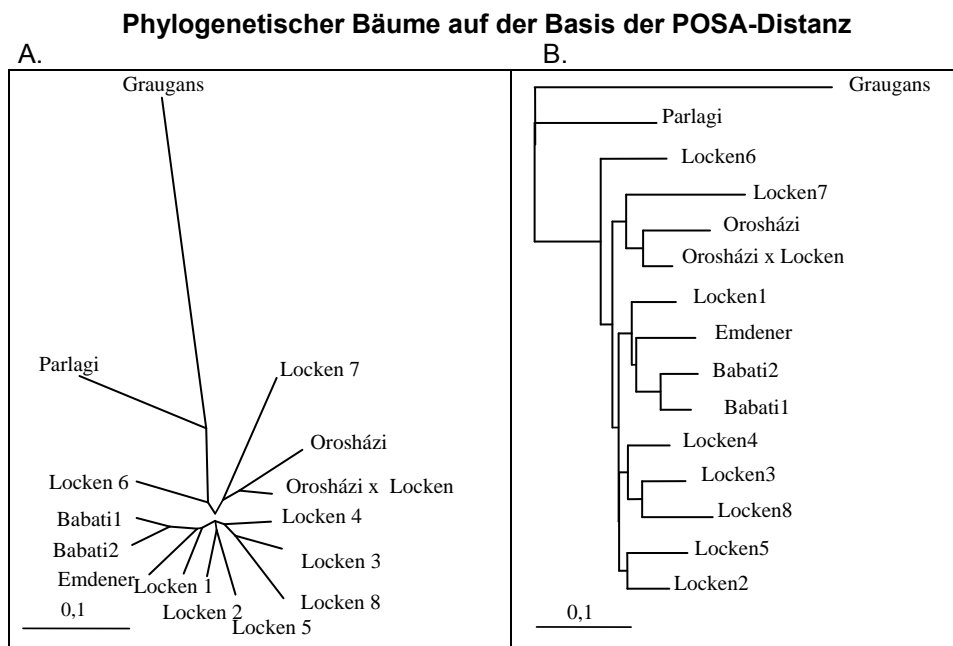
	Lock 1	Lock2	Lock3	Lock4	Lock5	Lock6	Lock7	Lock8	Oros	Ox L	Parl	Bab1	Bab2	Emdener
Lock2	n.s													
Lock3	n.s	n.s												
Lock4	n.s	n.s	n.s											
Lock5	n.s	n.s	n.s	n.s										
Lock6	n.s	n.s	n.s	n.s	*									
Lock7	*	*	*	*	*	*								
Lock8	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	*							
Oros	n.s	n.s	*	n.s	*	*	*	n.s						
O x L	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	*	*	n.s	n.s					
Parl	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*				
Bab1	n.s	n.s	n.s	n.s	*	n.s	*	n.s	*	n.s	*			
Bab2	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	*	n.s	n.s	*	*	n.s		
Emdener	n.s	n.s	n.s	n.s	*	*	*	n.s	*	n.s	*	n.s	n.s	
Graugans	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Mit * gekennzeichnete Populationspaare unterschieden sich signifikant ($p \leq 0,05$), n.s. = nicht signifikant.

Die Auswertung lässt feststellen, dass die ungarische Gans Populationen sehr homogen waren. Die Untersuchung konnte zwischen acht ungarische Gansgruppen und die Emdener Gans keine genetische Differenzierung aufzeigen. Eine locken- (Locken7) und eine glattfeder (Parlag) Population zeigten eine ausgeprägte genetische Differenzierung von alle anderen ungarischen Populationen sowie von der Emdener Population.

Aus den Frequenzen der Allele wurden *POSA* und *Nei-Distanzen* zwischen den Populationen errechnet. Die Diversitätsparameter haben die Ergebnisse der Homogenitätstest unterstützt. Eine Möglichkeit, genetische Distanzen graphisch darzustellen, ist das Rekonstruieren *phylogenetischer Bäume*. Dazu wurden in diesem Fall die genetischen Distanzen nach *POSA* ausgewählt, da diese sich gut eignen sollen, die Beziehungen zwischen eng verwandten Populationen, wie hier die vierzehn Ganspopulationen, aufzuklären. Der daraus resultierende „Neighbor-Joining-Baum“ ist in *Abbildung 2* dargestellt. Das Bild „A.“ und „B.“ unterscheidet zwischen Baum mit Wurzel und Baum ohne Wurzel.

Abb.2



4. Konklusion

Man kann die Ergebnisse dieser Arbeit bei dem Erhaltungszuchtprogramm der ungarischen Gans direkt anwenden. Für die Ausarbeitung eines Plans für die Erhaltung seltener Nutztierassen, wie die Ungarische Gans ist, muss man unter anderem die Genfrequenzen kennen und die Distanzen zu anderen Rassen feststellen. Die Bestimmung der Homogenität der Ganspopulationen und die Differenz zwischen die Gruppen ermöglicht die Ausführung einer langfristigen Strategie der Erhaltung dieser gefährdeter Tierrasse.

Mit dem ausgearbeiteten Mikrosatellitenset kann man die Änderung von genetischen Prozessen (z.b. genetische Drift) in der Zukunft routinemäßig verfolgen. Außer die Untersuchung der ungarischen Gans, ermöglicht der Markereset auch die Untersuchung der anderen domestizierten Gansrassen.

Literaturverzeichnis

- Bowcock**, A. M., Ruiz-Lineares, J., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R., Cavalli Sforza, L. L. (1994): High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368., 455-457. p.
- Buchholz**, W.G., Pearce, J.M., Pierson, B.J., Scribner, K.T (1998): Dinucleotide repeat polymorphisms in waterfowl (family Anatidae): characterization of a sex-linked (Z-specific) and 14 autosomal loci. *Animal Genetics* 29. 322-325. p.
- Cathey**, J.C., DeWoody, J.A., Smith, L.M. (1998): Microsatellite Markers in Canada Geese (*Branta canadensis*). *The Journal of Heredity*. 89.(2) 173-174. p.
- Dieringer**, D., Schlotterer, C. (2002) Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*. 3. (1.), 167-169. p.
- Ewens**, W.J. (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Popul. Biol.*3., 87-112. p.
- Felsenstein**, J. (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA. p.
- Kimura**, M., Ohta, T. (1975) Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72. 2761-2764. p.
- Maak**, S., Neumann, K., von Lengerken, G., Gattermann, R (2000) First seven microsatellites developed for the Peking duck (*Anas platyrhynchos*). *Animal Genetics*, 31, 233. p.
- Maak**, S., Wimmers, K., Weigend, S., Neumann, K. (2003): Isolation and characterisation of 18 microsatellites in the Eider duck and their application in other waterfowl species. *Molecular Ecology Notes* 3. 224-227. p.
- Nagy**, T (2002): A genetikai variabilitás vizsgálata őshonos bronzpulyka populáció. Szent István Egyetem, Gödöllő. Diplomadolgozat. Kézirat (Konz.: Varga L., Kurjárné K.E.). 5-55. p.
- Nei**, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89., 583-590. p.
- Page**, R.D. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12., 357-358. p.
- Paulus** K.B., Tiedemann R. (2003): Ten polymorphic autosomal microsatellite loci from the Eider duck *Somateria mollissima* and their cross-species applicability among waterfowl species (Anatidae). *Molecular Ecology Notes*. 3. 250-252. p.
- Raymond** M., Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86., 248-249. p.

Saitou, R.K., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4., 406-425. p.

Takahashi, H., Nirasawa, K., Nagamine, Y., Tsudzuki, M. and Yamamoto, Y. (1998): Genetic relationships among japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *The Journal of Heredity* 89 (6.), 543-546. p.