

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
"Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft"

The logo consists of the letters 'U', 'S', and 'L' in a stylized, hand-drawn font. The 'U' is green, the 'S' is black, and the 'L' is red. Below the letters are two parallel green diagonal lines.

Forschungsbericht

Nr. 98

**Abstammungskontrolle beim Schwein nach
tierschonender Probenentnahme**

Verfasser:

K. Wimmers, S. Ponsuksili, S.-D. Rasad, E. Tholen, K. Schellander

Institut für Tierzuchtwissenschaft

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2297; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, Januar 2003

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Karl Schellander

Projektbearbeiter: Dr. rer. nat. K. Wimmers
Dr. sc. agr. S. Ponsuksili
M.S. Anm.Sci S.-D. Rasad
Dr. agr. E. Tholen

Institut für Tierzuchtwissenschaft
Endenicher Allee 15
53115 Bonn
Tel.: 0228/73 2280; Fax: 0228/73 2284

Zitiervorschlag:

Wimmers K., S. Ponsuksili, S.-D. Rasad, E. Tholen, K. Schellander (2003): Abstammungskontrolle beim Schwein nach tierschonender Probenentnahme. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 98, 56 Seiten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Probenstellung/Wissensstand	1
1.2 Zielsetzung	4
2. Material und Methoden	5
2.1 Auswahl der Tiere, Gewebe und Haarproben	5
2.2 DNA-Isolierung	5
2.3 Auswahl der Mikrosatellitenmarker	6
2.4 Durchführung der PCR	9
2.5 Auftrennung der PCR-Produkte und Allelbestimmung	11
2.6 Biometrische Auswertung	12
3. Ergebnisse	14
3.1 Eignung der Haarwurzelzellen als DNA-Quelle für Mikrosatellitentypisierung	14
3.2 Anzahl der gefundenen Allele	14
3.3 Analyse der Allelfrequenzen	16
3.4 Heterozygotiegrad	16
3.5 Genetisches Gleichgewicht	18
3.6 Berechnung des Polymorphic Information Content (PIC) und der Ausschlusswahrscheinlichkeit (EXP)-Werte	22
3.7 Ermittlung eines kombinierten Markersets mit hohem Informationsgehalt und hoher Ausschlusswahrscheinlichkeit	22
3.8 Multiplex-PCR für Abstammungskontrolle	27
4. Diskussion	28
4.1 Anzahl der Allele	28
4.2 Allelfrequenzen	31
4.3 Heterozygotiegrad	31
4.4 Kopplungsungleichgewicht innerhalb der Populationen	32
4.5 Ausschlusswahrscheinlichkeit	32
4.6 Polymorphism Information Content	34
4.7 Abstammungs- und Identitätskontrolle	35
5. Zusammenfassung	36

6. Schlussfolgerung für die Umsetzung in die Praxis	38
7. Literaturverzeichnis	38
8. Anhang	42
9. Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten	54
10. Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte	54
11. Liste der über Veröffentlichungen	54
12. Liste über Vorträge	55
13. Liste über Pressemitteilungen	55
14. Liste über Posterpräsentationen, Vorführung und Demonstrationen	55
15. Kurzfassung	55

1. Einleitung

1.1 Problemstellung/Wissensstand

Jedes Zuchttier, das in ein Zuchtbuch eingetragen wird, muss entsprechend dem Tierzuchtgesetz eine nachgewiesene Abstammung aufweisen. Die Abstammungsangaben werden in der Tierzucht daher routinemäßig überprüft. Beim Schwein erfolgt dies derzeit noch über Blutgruppentypisierungen. Der Hauptnachteil dieses Verfahrens liegt darin, dass dazu frische Blutproben benötigt werden. Blutentnahmen sind beim Schwein nur nach Fixierung der Tiere mit einer Oberkieferschlinge möglich. Infolge der Stressbelastung sind Ausfälle der Tiere in nennenswerter Höhe zu erwarten.

Ein weiterer Nachteil der Blutgruppen- oder Serumtypisierungen liegt in der reduzierten Sicherheit, falsche Abstammungen oder Herkünfte zu erkennen. Im vorliegenden Projekt wurden Sicherheiten von über 99,9 % ermittelt, während die bisherigen Verfahren Sicherheiten zwischen 95 % und 98 % erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wird eine für das Tier völlig belastungsfreie Methode zur Abstammungskontrolle vorgestellt, die auf der Analyse der DNA-Variation beruht. Diese bezieht sich auf den Nachweis der richtigen Abstammung und die Bestätigung einer angegebenen Abstammung mit hohen Sicherheiten. Damit wird auch eine eindeutige Identifizierung eines Einzeltieres möglich. Dabei sollen als Probenmaterial Haarwurzelzellen verwendet werden, wie sie an allen Haaren, die einfach ausgezupft werden, zu finden sind. Die Abstammung wird anhand der individuellen Variation bestimmter Abschnitte der Erbsubstanz (DNA) ermittelt, die aus den Haarwurzelzellen isoliert wird. Mit Hilfe eines automatischen Analysegeräts werden tierindividuelle DNA-Muster ermittelt, die mit hoher Sicherheit Abstammung und Identität des betreffenden Tieres klären bzw. nachweisen können. Die Abstammungs- und Identifikationskontrolle mittels DNA-Analyse an Haarproben ist beim Schwein noch nicht etabliert und soll einen wichtigen Beitrag hinsichtlich Tierschutz, Verfahrenstechnik und Wirtschaftlichkeit in der Schweinehaltung darstellen.

Methoden der Abstammungs- und Identitätskontrolle

Die Entwicklung der Abstammungskontrolle begann Anfang des letzten Jahrhunderts. Mit Hilfe der Blutgruppenanalyse werden die landwirtschaftlichen Nutzierrassen Rind, Schwein und Pferd untersucht. Zur Reduktion der Kosten dieser Verfahren, aber auch um mehr Sicherheit bei den Ergebnissen zu erzielen, werden zunehmend molekulargenetische Methoden eingesetzt. Ein Diagnoseverfahren ist die Mikrosatellitenanalyse. Mit deren Hilfe wird eine statistisch gesicherte Aussage gewährleistet und Abstammungsfragen lassen sich bis zu einer Sicherheit von 99,9 %

klären (Glodek et al. 1993).

Die Kosten für die Abstammungskontrolle mittels Genotypisierung werden vor allem durch die DNA-Analyse bestimmt. Durch eine zunehmende Standardisierung der Analytik ist hier seit einigen Jahren ein dramatischer Preisverfall zu beobachten, der weiter anhält. So sind die Kosten pro Analyse von über 100 DM auf weniger als 50 DM gesunken. Mit der Entwicklung einer vollständigen Automatisierung und der Etablierung der neuen SNP-Methode, gekoppelt mit MALDI-Massenspektrometrie („Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization“), besteht weitere Aussicht auf Kostensenkung.

Die Abstammungskontrolle durch die Blutgruppenanalyse und biochemische Polymorphismen

Die Blutgruppenanalyse begann Anfang des letzten Jahrhunderts. Bei den Untersuchungen mit menschlichem Blut erbrachte Landsteiner (1901) den Beweis, dass es sich bei der Agglutination der Erythrozyten eines Individuums durch das Serum eines anderen Individuums innerhalb der gleichen Spezies um ein physiologisches Merkmal handelt. Bei den biochemisch determinierten Strukturen an der Oberfläche der Erythrozyten, den Blutgruppenfaktoren, handelt es sich um antigen wirksame Glykoproteide. Durch Antikörper, die in den Seren anderer Individuen vorhanden sind, können sie erkannt werden, es kommt zur Agglutination von Antikörper und Antigen (Tolle 1960). Nachdem das ABO-System beim Menschen entdeckt und nachgewiesen war, dass die Blutgruppenfaktoren dominant vererbt werden (Landsteiner 1901), wurden Untersuchungen vorgenommen, ähnliche Eigenschaften der Erythrozyten bei Haustieren zu finden.

Beim Schwein werden die Blutgruppen mit Großbuchstaben von A bis P bezeichnet (16 Blutgruppen). Die internationale Nomenklatur für die Blutgruppen ist EA (erythrocyte antigen) und wird vor den Buchstaben der Blutgruppen geschrieben. Bei den porcinen Blutgruppen unterscheidet man zwischen offenen und geschlossenen Blutgruppensystemen. Die offenen Blutgruppensysteme mit Faktoren, die in keinem Antigen-Antikörper Test eine Reaktion zeigen: EAA (A-0 Blutgruppe), EAC, EAH, EAJ, EAK, EAM, EAP. In den geschlossenen Systemen reagiert immer mindestens ein Faktor im Blutgruppentest: EAB, EAD, EAE, EAF, EAG, EAI, EAL, EAN, EAO. Für die Genotypisierung der Tiere anhand der Blutgruppen kann bei den offenen Systemen nicht in jedem Fall zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren unterschieden werden (Vögeli 1990).

Die Abstammungskontrolle mittels DNA-Marker

Für Herkunfts- und Identitätskontrolle werden DNA-Marker-Systeme benötigt, die hochpolymorph und leicht nachzuweisen sind. Im letzten Jahrzehnt sind verschiedene Techniken entwickelt worden, um polymorphe Loci zu identifizieren. Dazu gehören:

RFLPs (restriction fragment length polymorphisms),
 SSCPs (single-strand conformational polymorphisms),
 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis),
 RAPD (random-amplified polymorphic DNA),
 AFLPs (amplification fragment length polymorphisms) und
 VNTRs (variable number of tandem repeats)

VNTRs wurden 1989 von Tautz als Hypervariabilität kurzer DNA-Sequenzmotive (Mikrosatelliten) beschrieben und finden heute in der Abstammungskontrolle bei Mensch, Rind, Huhn und Pferd Anwendung (Alford et al., 1994; Marklund et al., 1994; Binns et al., 1995; Glowatzki-Mullis et al., 1995; Hussein et al., 1996; Fredholm und Wintero, 1996; Bowling et al., 1997, Wimmers et al., 1998). Beim Pferd wurde von der International Society for Animal Genetics ein Set von Mikrosatelliten zur Abstammungskontrolle empfohlen. Hier bietet die Industrie bereits einen Analysekit an (Stock Marks for Horses, PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt). Die Mikrosatelliten erfüllen die Bedingungen, die an DNA-Marker für die Abstammungskontrolle gestellt werden: Sie werden kodominant vererbt, sind keimbahnstabil, hochpolymorph und kommen in großer Anzahl (mehrere tausend) gleichmäßig über das Genom verteilt vor (Litt und Luty, 1989). Damit können Mikrosatelliten auch in der Kopplungskartierung eingesetzt werden. Der Informationsgehalt eines einzelnen Locus innerhalb einer Population hängt von seinem Polymorphiegrad (Anzahl der Allele) und der Verteilung der Allelfrequenzen ab. Im US-Pig Gene Mapping Coordination Programme (<http://www.genome.iastate.edu/pig.html>) sind derzeit 1824 Loci verzeichnet. Von diesen Loci sind 1203 Mikrosatelliten. Die Zahl der Allele pro Locus beim Schwein kann bis über 25 gehen (Alexander et al., 1996). Zur Analyse der Abstammung wird eine Kombination aus mehreren Loci eingesetzt, um die in der Praxis geforderten hohen Ausschlusssicherheiten (99 % und mehr) zu erhalten. Die Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt mehrere Loci in einer Reaktion gleichzeitig zu analysieren. Zur Größenbestimmung der Allele können automatisierte Verfahren besonders effizient eingesetzt werden. Beim Rind wurde die Multiplex-PCR - Mikrosatellitenanalyse mit anschließender semiautomatischer fluoreszenzunterstützter Detektierung der Allele zur Abstammungskontrolle mit sehr hoher Ausschlusssicherheit eingesetzt (Hussein et al., 1996; Heyen et al., 1997; Peelman et al., 1998). Abhängig von der Anzahl der analysierten Loci und der untersuchten Rasse werden mit diesem Verfahren beim

Rind Ausschlusssicherheiten zwischen 95 und 99,99 % erreicht (Heyen et al., 1997). Der Ausschluss einer Abstammung mit einem einzigen Marker sollte sorgfältig erwogen werden, weil die natürliche Mutationsrate an den Mikrosatellitenloci mit berücksichtigt werden sollte. Sie liegt beim Schwein im Bereich von $5 \cdot 10^{-7}$ (Ellengren et al., 1995). Deshalb sollte in zweifelhaften Fällen ein zweiter Ausschluss herangezogen werden. Zusätzlich zur Abstammungskontrolle sind Multiplex-Analysen in der Forensik, der Genomkartierung und der Genomanalytik einsetzbar und von großer Bedeutung. Bei der Identifizierung von Chromosomenregionen, die quantitative Leistungsmerkmale mit geringer Heritabilität beeinflussen (Vitalität, Krankheitsresistenz, etc.), ist dieses Verfahren eine Methode der Wahl (Ron et al., 1996).

Im Mittelpunkt dieses Projekts steht die Entwicklung eines Abstammungskontrollverfahrens basierend auf den polymorphen Mikrosatellitenloci. In dieser Studie sollen 27 Loci ausgewählt und auf ihr Potential hin untersucht werden, Individuen der drei wichtigsten, in Nordrhein-Westfalen gehaltenen Schweinerassen zu unterscheiden. Aus diesen Untersuchungen sollen letztlich die aussagekräftigsten Loci ausgewählt werden, um ein Set von 9 - 12 Loci zusammenzustellen, mit dem Tiere aller drei Rassen genau identifiziert werden können. Dieses Set ist so konzipiert, dass es in einem Multiplexverfahren effizient analysiert werden kann, wobei als DNA-Quelle Haarwurzelzellen verwendet werden sollen.

1.2 Zielsetzung

Ziel dieses Projekts ist die Etablierung der Abstammungs- und Identitätskontrolle beim Schwein mittels DNA-Analyse an ausgezupften Haaren. Dazu wird ein Set von Mikrosatellitenmarkern zusammengestellt, das einen möglichst geringen Analysenaufwand mit hoher Aussagesicherheit erfordert. Daher müssen hochinformativ Marker in den Rassen identifiziert und hinsichtlich ihrer Eignung für eine multiplexe PCR zusammengestellt werden.

Ziele im einzelnen:

1. Identifizierung von Markern, die in allen Rassen informativ sind, wobei die tierschonende Probenentnahme (ausgezupfte Haare) die Grundlage der DNA-Gewinnung ist.
2. Berechnung des Informationsgehaltes des Markers und der kombinierten Ausschlusswahrscheinlichkeiten mit statistischen Methoden.
3. Definition eines kombinierten Markersets zur schnellen, kostengünstigsten und sichersten Analyse der Abstammung und Identität.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Tiere, Gewebe und Haarproben

In dieser Arbeit werden je 50 unverwandte Tiere der Schweinerassen DE (Deutsches Edelschwein), DL (Deutsche Landrasse) und Pi (Pietrain) untersucht. Gewebeproben dieser Tiere wurden dankenswerter Weise vom Schweinezüchtverband Nord-West zur Verfügung gestellt.

2.2 DNA-Isolierung

Ohrgewebe

Kleinfingernagelgroße Ohrrandstücke wurden mit einer Kerbzange entnommen. Die Gewebeproben wurden in reiskorngroße Stücke zerschnitten (2-6 Stücke) und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Hinzugefügt wurden 500 µl Verdauungspuffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0), 15 µl Proteinasestocklösung (20 mg/ml) und 35 µl SDS-Lösung (10 % w/v).

Es erfolgte eine Inkubation bei 55 °C über Nacht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 3 ml Phenol-Chloroform zugegeben um überschüssiges Protein zu binden. Nach einer Zentrifugation (10 min, 10.000 g, RT) wurde der klare Überstand in ein neues Röhrchen überführt.

Nach diesem Schritt wurde der Lösung 3 ml Chloroform zugegeben und anschließend zentrifugiert (10 min, 10.000 g, RT). Der klare Überstand wurde wieder in ein neues Röhrchen überführt und die DNA mit 1/10 Volumen Natrium-Acetat (3 M, pH 5,2) und von 1 Volumen Isopropanol gefällt. Die so gewonnene DNA wird mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen. Nach der Entfernung des Alkohols wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer gelöst.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden die OD-Werte bei 260/280 nm gemessen.

Haarwurzeln

8 – 10 Haare wurden im Bereich des Widerristes mit einer konventionellen Flachzange an ihrer Basis erfasst und ausgezogen. Die sichtbaren Haarwurzeln wurden vom Haarschaft mit einer Schere abgetrennt und 6 Stück mit 50 µl Verdauungspuffer und 1,25 µl Proteinkinase K vermischt. Der Ansatz wurde kurz bei 10000 U/min zentrifugiert. Die Verdauung erfolgte über 12h im Thermocycler bei 55 °C. Die Proteinase wurde bei 95 °C für 10 Minuten deaktiviert. Diese DNA Lösung wurde anschließend auf 10 °C abgekühlt. Von diesem DNA-Ansatz wurde für die PCRs jeweils 1 µl verwendet.

2.3 Auswahl der Mikrosatellitenmarker

Für die Analyse wurden 25 Mikrosatellitenmarker verwendet, die im Rahmen eines EU-Projektes zur Evaluierung europäischer Schweinerassen empfohlen wurden (<http://toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel/Listset.htm>).

Die Primersequenzen der verwendeten Mikrosatellitenmarker sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Primersequenzen der verwendeten Mikrosatellitenmarker

No	Chrom.	Locus	5' – 3' Primer (vorwärts)	3' – 5' Primer (rückwärts)	Referenz
1	1p	CGA	GACACAGTGGATGGCATTG	ACATCCCTAAGGTCGTGGC	Moran (1993)
2	1q	S0155	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTG	AAAGTGGAAAGAGTCAATGGCTAT	Ellengren et al. (1994)
3	2p	SW240	AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG	AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA	Rohrer et al. (1994)
4	2q	S0226	GGTTAAACTTTTNCCTCAATACA	GCACTTTTAACTTTCATGATGCTCC	Robic et al. (1994)
5	3p	SW72	ATCAGAACAGTGCGCCGT	TTTGAAAATGGGGTGTTTCC	Rohrer et al. (1994)
6	3q	S0002	GAAGCCAAAGAGACAACCTGC	GTTCTTTACCCACTGAGCCA	Fredholm et al. (1993)
7	4	S0227	GATCCATTTATAATTTTAGCACAAAGT	GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC	Robic et al. (1994)
8	5	S0005	TCTTCCCTCCTGGTAACTA	GCACTTCCTGATTCTGGGTA	Fredholm et al. 1993)
9	5	IGF1	CATATTTTCTGCATAACTTGAACCT	GGGTATTGCTAGCCAGCT	Moran (1993)
10	6	SW122	TTGTCTTTTATTTTGCTTTTGG	CAAAAAAGGCAAAAGATTGACA	Rohrer et al. (1994)
11	7	S0101	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG	GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	Ellengren et al. (1994)
12	7	S0115	TGATGCACTGTGTGGGCCACACCA	ACCATGGCTTGAGCTTGAGCCAGC	Ruyter et al. (1994)

Tab. 1 Fortsetzung

No	Chrom.	Lokus	5' – 3' Primer (vorwärts)	3' – 5' Primer (rückwärts)	Referenz
13	8	S0178	TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG	GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT	Ellengren et al. (1994)
14	8	S0225	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA	CAGGTGGAAAGAATGGAATGAA	Robic et al. (1994)
15	9	SW911	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC	CATCTGTGGAAAAAAAAAAGCC	Rohrer et al. (1994)
16	10	SW951	TTTCACAACCTCTGGCACCAG	GATCGTGCCCAAATGGAC	Rohrer et al. (1994)
17	11	S0386	TCCTGGGTCTTATTTTCTA	TTTTTATCTCCAACAGTAT	Riquet et al. (1995)
18	13	S0215	TAGGCTCAGACCCTGCTGCAT	TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT	Robic et al.(1999)
19	13	S0068	AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT	CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	Fredholm et al. (1993)
20	14	SW857	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC	GATCCTCCTCCAAATCCCAT	Rohrer et al. (1994)
21	15	SW936	TGAAAATAGGATGAAGAAGGGG	TTATGTGAGCACATGTGACACC	Rohrer et al. (1994)
22	15	S0355	TCTGGCTCCTACACTCCTTCTTGATG	TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA	Robic et al. (1994)
23	16	S0026	AACCTTCCCTTCCCAATCAC	CACAGACTGCTTTTTACTCC	Coppieters et al. (1993)
24	17	SW24	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC	ATCCAAATGCTGCAAGCG	Rohrer et al. (1994)
25	X	S0218	GTGTAGGCTGGCGGTTGT	CCCTGAAACCTAAAGCAAAG	Robic et al. (1994)

2.4 Durchführung der PCR

Die Mikrosatellitenloci wurden mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) amplifiziert. Diese Methode ermöglicht die spezifische Vermehrung von DNA-Fragmenten durch eine zyklische Wiederholung von drei Reaktionsschritten. Zuerst wird die DNA bei 94 °C (3 min) denaturiert, so dass sich die Doppelstränge trennen und als Einzelstränge vorliegen. In einem zweiten Schritt lagern sich Primer bei spezifischen Temperaturen an die komplementären Abschnitte der Einzelstränge an (Annealing). Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung der Primer zu zwei neuen Doppelsträngen (Extension). Die neu entstandenen Produkte dienen im nächsten Reaktionszyklus als Matrize, so dass die DNA-Fragmente durch PCR exponentiell amplifiziert werden.

Die optimalen PCR-Bedingungen hinsichtlich Annealing-Temperatur und Anzahl der Zyklen wurden durch eine Reaktionsoptimierung ermittelt (Tabelle 2 und Tabelle 3). Zu diesem Zweck wurde für jeden Mikrosatelliten einzeln eine Test-PCR durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden mehrere Loci in einer Multiplex-PCR amplifiziert, wodurch ein Rationalisierungseffekt erreicht werden konnte. Dies machte nach der Einzeloptimierung einen zweiten Optimierungsschritt erforderlich. Dabei wurde unter Variation der Primerkonzentrationen und der Zyklenzahl das PCR-Ergebnis der gemeinsam amplifizierten Mikrosatelliten-Marker aufeinander abgestimmt.

Der Ansatz für eine PCR-Reaktion (Endvolumen 15 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

50 ng genomische DNA
1,5 µl 10 x PCR-Puffer (GeneCraft-BioTherm)
1 µl MgCl₂ (50 mM/ml, GeneCraft-BioTherm)
1 µl dNTP (10 pmol/µl, Carl Roth)
0,2 - 0,3 µl je Primer (10 mM/ml, Menge in Tabelle)
1 U Taq Polymerase (5 units/µl, GeneCraft-BioTherm)
Wasser (ddH₂O) auf Endvolumen auffüllen

Die Multiplex-Sets und die Ergebnisse der PCR-Optimierung sind aus der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 2: Verwendete Mikrosatelliten

No.	Mikrosatellit	*) Markierung (nm)	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
1	CGA	700	250-320	61
2	S0155	700	150-166	60
3	SW240	700	96-115	55
4	S0226	700	181-205	60
5	SW72	700	100-116	56
6	S0002	700	190-216	62
7	S0227	700	231-256	56
8	S0005	700	205-248	55
9	IGF1	700	197-209	57
10	SW122	800	110-122	53
11	S0101	700	197-216	60
12	S0115	700	195-208	66
13	S0178	800	110-124	58
14	S0225	700	170-196	55
15	SW911	800	153-177	55
16	SW951	700	125-133	58
17	S0386	800	156-174	48
18	S0215	800	135-168	55
19	S0068	800	211-260	62
20	SW857	700	144-160	61
21	SW936	700	80-117	58
22	S0355	700	243-277	65
23	S0026	700	92-106	57
24	SW24	800	96-121	58
25	S0218	700	164-184	57

*) Primer 5' Fluoreszenzmarkierung IRD800- (800 nm-Kanal) bzw. IRD700-Farbstoff (700 nm-Kanal) für die Detektion der DNA-Fragmente.

Tab. 3: PCR-Multiplexe zur Genotypenbestimmung

Multiplex-Set	Locus	μl je Primer	Annealing-Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Anzahl Zyklen
1	SW72	0,2	57	26
	S0225	0,2		
	S0005	0,2		
	SW122	0,3		
	S0068	0,3		
2	SW240	0,2	57	26
	SW857	0,2		
	S0101	0,2		
	SW24	0,3		
	S0215	0,3		
3	S0155	0,2	57	26
	S0226	0,2		
	S0227	0,2		
	S0178	0,3		
4	S0002	0,2	57	26
	SW936	0,2		

2.5 Auftrennung der PCR-Produkte und Allelbestimmung

Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde mit einem automatischen Sequenziergerät (LI-COR, DNA Analyzer, GENE READIR 4200, MWG-BIOTECH) in einem Polyacrylamidgel durchgeführt. Die Elektrophorese-Platten wurden mit Aquadest und Ethanol gewaschen und im Bereich des Kammes mit Bindsilan versehen. Danach wurden die Spacer zwischen den Glassplatten platziert und die Gelkammer zusammengesetzt. In die Gelkammer wurde eine 6 %-ige Gellösung, mit folgender Zusammensetzung gegossen:

1. 20 ml Sequagel XR (6 %) (SQG-XR-842 MWG National Diagnostics)
2. 5 ml Sequagel Complete Buffer Reagent (National Diagnostics)
3. 268 μl DMSO (Carl Roth GmbH)
4. 200 μl 10 % APS

Nach der Polymerisation des Gels wurde die Gelkammer in den Sequenzierautomaten gehängt.

Die Sequenzer wurden mit einem Liter 1xTBE Puffer befüllt und der Vorlauf gestartet, um das Gel auf 50 °C zu temperieren. Danach wurde der Kamm aus dem Gel entnommen. Um die Taschen besser zu sehen wird eine Mischung aus Beladungspuffer und Formamid (1:1) hineinpipettiert. Die PCR-Produkte (je 1 µl) wurden mit Sequenzer-Beladungspuffer (10-15 µl) versetzt und je 1 µl in die Geltaschen eingefüllt. Bei jeder Beladung der Geltaschen mit den Proben wurden zusätzlich 3 Taschen mit einem Längenstandard befüllt. Dieser Längenstandard (75, 100, 105, 120, 145, 175, 200, 204, 230, 255, 300, 320 Basenpaare) wurde im Institut hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei maximal 1500 V, 40 mA, 40 W und bei 50 °C durchgeführt.

Die Auswertung der Elektrophoresegele wurde mit dem Softwarepaket One-Dscan (Scanalytics, A Division of CSPI, USA) durchgeführt. Das Gel wurde zunächst über den Längenstandard kalibriert. Danach erfolgte die Bestimmung aller vorkommenden Allele. Bei der Bestimmung der Allellängen wurde ein Abstand von mindestens zwei Basenpaaren zwischen aufeinander folgenden Allelen festgelegt.

2.6 Biometrische Methoden

Der Heterozygotiegrad

Für die genetische Variation innerhalb einer Population wurde der Heterozygotiegrad berechnet. Der Heterozygotiegrad der einzelnen Genorte und die durchschnittliche Heterozygotie aller untersuchten Genorte wurde mit dem Programm GDA (Genetic Data Analysis) ermittelt.

Der beobachtete (H_o) und der erwartete Heterozygotiegrad (H_e) für einen Locus wurde nach folgender Formel ermittelt (Nei 1978):

Beobachteter Heterozygotiegrad (H_o):

$$H_o = \frac{1}{N} \left[\sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k A_i A_j \right]$$

k : Zahl der Allele

$A_i A_j$: Zahl der Tiere, die den Genotyp mit den Allelen i und j tragen

N : Tierzahl insgesamt

Erwarteter Heterozygotiegrad (He):

$$H_e = \frac{2N \left(1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \right)}{2N - 1}$$

k : Zahl der Allele

P_i : Allelfrequenz des i-ten Allels

N : Tierzahl insgesamt

Der durchschnittliche Heterozygotiegrad aller betrachteten Loci wurde als arithmetisches Mittel berechnet.

Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Dieses Test wurde mit der Software GENEPOP V1.2 (Raymond und Rousset 1994) berechnet.

Polymorphic Information Content (PIC)

Als Maß für den Polymorphiegrad und Aussagekraft zur Differenzierung zwischen Populationen und Individuen wird der PIC-Wert (Polymorphic Information Content, Botstein et al. 1980) nach folgender Formel berechnet:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{u=1}^z P_u^2 \right) - \sum_{u=1}^{z-1} \sum_{v=u+1}^z 2P_u^2 P_v^2$$

Z : Anzahl der Allele

P_u, P_v : relative Häufigkeit des u-ten und v-ten Allels am betrachteten Locus

Ausschlusswahrscheinlichkeit (EXP) und kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit (cEXP)
Zur Schätzung der Aussagekraft der Mikrosatelliten zur Abstammungskontrolle wird die Ausschlusswahrscheinlichkeit (EXP) sowie die kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit (cEXP) für alle beobachteten Loci berechnet.

$$EXP = \sum_{u=1}^z P_u(1 - P_u)^2 - 1/2 \sum_{u=1}^{z-1} \sum_{v=u+1}^z P_u^2 P_v^2 (4 - 3P_u - 3P_v)$$

Z : Anzahl der Allele

P_u, P_v : relative Häufigkeit des u-ten und v-ten Allels am betrachteten Locus

Zudem wurde die kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit über alle 25 Genorte berechnet:

$$cEXP = 1 - \prod_{i=1}^l (1 - EXP)$$

\prod : Produktsumme

l : Anzahl Loci

3. Ergebnisse

3.1 Eignung der Haarwurzeln als DNA-Quelle für Mikrosatellitentypisierung

Die „Haarwurzeln-DNA“ ergab in den PCR-Ansätzen dieselben Ergebnisse wie die DNA aus Gewebeprobe. Da für einen PCR-Ansatz 1 μ l „Haarwurzeln-DNA“ verwendet werden konnte, liegt eine ausreichende Menge an DNA vor, die für weit mehr Genotypisierungen verwendet werden kann als für die Abstammungs- und Identitätskontrolle benötigt wurde.

3.2 Anzahl der gefundenen Allele

An den 25 untersuchten Loci wurden insgesamt 253 Allele identifiziert (Tabelle 4). Der Mikrosatellit CGA zeigte die größte Anzahl von Allelen (16), der Mikrosatellit S0215 war mit drei Allelen am geringsten polymorph. Im Durchschnitt waren 6 Allele zu finden.

Tab. 4: Mikrosatelliten, minimale und maximale Allellänge, Anzahl der Allele

Mikr.	Allellänge (bp)	Anzahl an Allelen			Insgesamt
		DE	DL	Pi	
CGA	263 - 318	12	13	3	16
S0155	134 - 164	5	6	6	9
SW240	89 - 117	9	9	11	13
S0226	178 - 201	4	7	2	8
SW72	93 - 118	6	7	4	11
S0002	169 - 216	10	7	11	13
S0227	227 - 250	4	5	3	6
S0005	202 - 243	7	6	11	12
IGF1	222 - 244	6	7	7	9
SW122	95 - 119	6	5	6	9
S0101	197 - 216	5	7	3	7
S0115	177 - 225	7	7	6	10
S0178	106 - 120	5	7	4	8
S0225	165 - 187	6	6	4	8
SW911	147 - 196	5	7	9	15
SW951	120 - 132	5	3	6	7
S0386	151 - 171	7	7	5	10
S0215	152 - 159	3	3	2	3
S0068	226 - 260	5	11	6	13
SW857	138 - 161	11	7	6	11
SW936	81 - 116	7	7	9	10
S0355	241 - 268	8	6	7	11
S0026	93 - 115	3	5	5	7
SW24	92 - 118	9	9	7	12
S0218	143 - 203	6	9	4	15
Σ		161	173	147	253
\emptyset		6,44	6,92	5,88	10,12

3.3 Analyse der Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen wurden durch einfaches Auszählen der gefundenen Allele in den einzelnen Populationen für die jeweiligen Loci ermittelt und sind im Anhang nach der Anzahl der Allele geordnet dargestellt (Tabelle 5). Alle Marker zeigten unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen. Bei jedem der untersuchten Genorte kamen ein oder wenige Allele in fast allen Populationen relativ häufig vor, wohingegen die übrigen Allele in nur niedriger Frequenz vorlagen. So variierte beim Marker SW951 beispielsweise das Allel 122 zwischen 0,1 (DE) bis 0,6 (DL), das Allel 124 zwischen 0,22 (Pi) bis 0,34 (DE) und das Allel 128 zwischen 0,02 (DE) bis 0,11 (DL). Der Marker S0225 zeigte bei seinem häufigsten Allel 187 die größte Frequenzvariation von 0,17 (DL) bis 0,84 (Pi). Eine alternative Verteilungsform wurde bei Marker S0215 beobachtet. An diesem Genort waren die beiden Allele 152 und 154 in allen Populationen am häufigsten vertreten. Bei einem Teil der Marker zeigte die Allelverteilung Rassenspezifität. So kam das Allel 165 vom Marker S0225 mit einer Frequenz von 0,06 rassenspezifisch vor. Das Allel 169 desselben Markers kam mit einer Frequenz von 0,2 rassenspezifisch bei DE vor. Weitere Allele, die nur bei einer Rasse gefunden wurden, sind in Tabelle 8 im Anhang zu finden.

3.4 Heterozygotiegrad

Da die Heterozygotie ein Maß der diskriminierenden Stärke eines molekulargenetischen Markers ist, wurden die Heterozygotie-Werte der einzelnen Loci für die Abstammungskontrolle geschätzt. Die Heterozygotie war moderat bis hoch mit Werten für die beobachtete Heterozygotie, H_o , zwischen 0,12 und 1,0 (Tabelle 6). Der beobachtete Heterozygotiegrad (H_o) lag im Durchschnitt bei 0,67 (DE = 0,66; DL = 0,71 und Pi = 0,62), variierte über die verschiedenen Genorte jedoch von 0 bis 1.

Die Werte für die erwartete Heterozygotie, H_e , lagen zwischen 0,24 und 0,89 mit einem Durchschnitt von 0,69 (DE = 0,69; DL = 0,74 und Pi = 0,65). Die beobachtete Heterozygotie lag in allen Rassen nahe an der erwarteten Heterozygotie. Sie war am Locus S0215 in allen Rassen deutlich reduziert. Eine rassenspezifische Reduktion des Heterozygotiegrades wurde bei Locus S0026 und S0386 (DL) und bei Locus CGA (Pi) beobachtet.

Tab. 6: Erwartete und beobachtete Heterozygotie (He und Ho) für 3 Rassen und 25 Mikrosatellitenloci

No.	Mikrosatellit	He			Ho		
		DE	DL	Pi	DE	DL	Pi
1	CGA	0,87	0,89	0,43	0,89	0,74	0
2	S0155	0,65	0,78	0,66	0,48	0,55	0,61
3	SW240	0,68	0,81	0,83	0,61	1	0,72
4	S0226	0,53	0,77	0,34	0,57	0,7	0,42
5	SW72	0,76	0,77	0,46	0,74	0,86	0,42
6	S0002	0,84	0,82	0,84	0,93	0,93	0,79
7	S0227	0,56	0,64	0,67	0,53	0,46	0,47
8	S0005	0,78	0,81	0,81	0,85	0,73	0,83
9	IGF1	0,79	0,81	0,77	0,86	0,91	0,94
10	SW122	0,67	0,76	0,79	0,54	0,65	0,8
11	S0101	0,74	0,71	0,47	0,55	0,74	0,21
12	S0115	0,75	0,74	0,77	0,48	0,73	0,81
13	S0178	0,56	0,82	0,69	0,84	0,93	0,85
14	S0225	0,58	0,72	0,28	0,34	0,6	0,12
15	SW911	0,64	0,66	0,88	0,76	0,67	0,88
16	SW951	0,73	0,52	0,54	0,66	0,5	0,44
17	S0386	0,69	0,7	0,5	0,72	0,27	0,49
18	S0215	0,54	0,54	0,42	0,07	1	0
19	S0068	0,24	0,85	0,71	0,24	0,94	0,71
20	SW857	0,86	0,8	0,76	0,83	0,77	0,7
21	SW936	0,76	0,75	0,86	0,78	0,88	0,81
22	S0355	0,81	0,58	0,7	0,89	0,58	0,92
23	S0026	0,6	0,72	0,66	0,93	0,2	0,91
24	SW24	0,88	0,83	0,76	0,82	0,77	0,83
25	S0218	0,74	0,71	0,7	0,8	0,81	0,92
	Σ	17,27	18,52	16,29	16,7	17,89	15,62
	\emptyset	0,69	0,74	0,65	0,67	0,72	0,62

3.5 Genetisches Gleichgewicht

Die gefundene Allelverteilung wurde an jedem Locus auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht getestet (Software GENEPOP). Die Allele zeigten zwischen den Populationen eine hochsignifikant unterschiedliche Verteilung (Tabelle 7). Die Genotypverteilung zeigte zwischen den Populationen ebenfalls signifikante Unterschiede (Tabelle 8). Eine Ausnahme bildet hier lediglich der Locus S0215, der aufgrund seines geringen Polymorphismus geringe Informativität aufweist.

Bei der Überprüfung der Kopplungsgleichgewichte zwischen den Populationen wurden die Fis-Werte, als Maß für die Abweichung von Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, getestet.

Die Tabelle 9 zeigt die Fis-Werte zwischen den Populationen. Die Untersuchung auf Kopplungsgleichgewicht für alle Loci-Paare in jeder Rasse zeigte bei einigen Paaren ein signifikantes Kopplungsgleichgewicht. Dies war nicht systematisch über mehrere Rassen gegeben (z.B. eine hochsignifikante Abweichung bei Mikrosatellit S0225 bei Rasse DE und Pi).

Tab. 7: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Allelverteilung zwischen den Populationen

Locus	P-value	S.E.
CGA	0	0
S0155	0	0
SW240	0	0
S0226	0	0
SW72	0	0
S0002	0	0
S0227	0	0
S0005	0	0
IGF1	0	0
SW122	0	0
S0101	0	0
S0115	0	0
S0178	0	0
S0225	0	0
SW911	0	0
SW951	0	0
S0386	0	0
S0215	0,0010	0,0004
S0068	0	0
SW857	0	0
SW936	0	0
S0355	0	0
S0026	0	0
SW24	0	0
S0218	0	0

Testskombination (Fisher's method)

Tab. 8: Ergebnisse des Tests auf unterschiedliche Genotypverteilung zwischen den Populationen

Locus	P-value	S.E.
CGA	0	0
S0155	0	0
SW240	0	0
S0226	0	0
SW72	0	0
S0002	0	0
S0227	0	0
S0005	0	0
IGF1	0	0
SW122	0	0
S0101	0	0
S0115	0	0
S0178	0	0
S0225	0	0
SW911	0	0
SW951	0	0
S0386	0	0
S0215	0,0168*	0,0023
S0068	0	0
SW857	0	0
SW936	0	0
S0355	0	0
S0026	0	0
SW24	0	0
S0218	0	0

(Fisher's method)

Tab. 9: Fis-Werte geschätzt für 3 Rassen und 25 Mikrosatelliten

POP Mikr.	DE Fis	DL Fis	Pi Fis
CGA	-0,0150 ^{ns}	0,1680***	1,0000***
S0155	0,2630**	0,2980*	0,0780**
SW240	0,1090**	-0,2390 ^{ns}	0,1390***
S0226	-0,0650 ^{ns}	0,0980 ^{ns}	-0,2500 ^{ns}
SW72	0,0310 ^{ns}	-0,1170 ^{ns}	0,0830*
S0002	-0,1090 ^{ns}	-0,1360 ^{ns}	0,0560*
S0227	0,0470 ^{ns}	0,2790 ^{ns}	0,3030*
S0005	-0,0930 ^{ns}	0,0980 ^{ns}	-0,0330 ^{ns}
IGF1	-0,0930 ^{ns}	-0,1240 ^{ns}	-0,2310 ^{ns}
SW122	0,1950 ^{ns}	0,1400 ^{ns}	-0,0070 ^{ns}
S0101	0,2580**	-0,0400 ^{ns}	0,5590**
S0115	0,3650**	0,0160 ^{ns}	-0,0620 ^{ns}
S0178	-0,5220 ^{ns}	-0,1310 ^{ns}	-0,2450 ^{ns}
S0225	0,4170***	0,1770*	0,5650***
SW911	-0,0260***	0,1560***	0,0030 ^{ns}
SW951	0,1000 ^{ns}	0,0430*	0,1980 ^{ns}
S0386	-0,0410*	0,6200***	0,0270*
S0215	0,8770***	-0,8920 ^{ns}	1,0000***
S0068	0,0100 ^{ns}	-0,1070 ^{ns}	0,0050 ^{ns}
SW857	0,0400 ^{ns}	0,0460 ^{ns}	0,0860 ^{ns}
SW936	-0,0360 ^{ns}	-0,1670 ^{ns}	0,0560 ^{ns}
S0355	-0,0920 ^{ns}	0,0060 ^{ns}	-0,3220 ^{ns}
S0026	-0,5540 ^{ns}	0,7250***	-0,3920 ^{ns}
SW24	0,0590 ^{ns}	0,0800*	-0,1030 ^{ns}
S0218	-0,0700 ^{ns}	-0,1410 ^{ns}	-0,3290 ^{ns}

S-HW : Signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

* = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$

3.6 Berechnung des Polymorphic Information Content (PIC) und der Ausschlusswahrscheinlichkeit (EXP)-Werte

Die Tabelle 10 zeigt die PIC- und EXP-Werte von 25 Mikrosatelliten, die aus den beobachteten Allelfrequenzen berechnet wurden. Die Mikrosatelliten erwiesen sich als sehr informativ mit PIC-Werten über alle Tiere zwischen 0,42 und 0,87 (DE = zwischen 0,23 und 0,85; DL = zwischen 0,41 und 0,87; Pi = zwischen 0,26 und 0,84).

Die Aussagekraft der Mikrosatellitenanalysen zur Abstammungskontrolle ist von der relativen Häufigkeit der Allele in den betreffenden Populationen abhängig und nicht von den Genotypen eines konkreten Falles. Die Ausschlusswahrscheinlichkeit ist um so größer, je höher die Anzahl von Allelen an einem Locus in einer Population ist und je einheitlicher die relative Häufigkeit der Allele ist. Für die untersuchten drei Rassen wurden Ausschlusswahrscheinlichkeiten über alle Tiere zwischen 26,4 % und 80,3 % (DE zwischen 29,6 % und 74,7 %; DL zwischen 25,4 % und 77,6 % und Pi zwischen 15,1 % und 72,9 %) für einen Locus gefunden.

3.7 Ermittlung eines kombinierten Markersets mit hohem Informationsgehalt und hoher Ausschlusswahrscheinlichkeit

Anhand der PIC-Werte wurden jene Loci identifiziert, die über alle drei Rassen den höchsten Informationsgehalt aufwiesen. Dazu wurden die Loci innerhalb der Rassen nach ihren PIC-Werten von 1 (höchster PIC-Wert) absteigend gereiht. Für die kombinierte Reihung wurde die Summe der Ränge zwischen den Rassen innerhalb eines Locus gebildet. Die Summen ergaben die Reihenfolge der Marker. Der Marker mit der niedrigsten Rang-Summe ist damit bezogen auf den PIC über alle Rassen am höchsten informativ. Die Tabelle 11 zeigt das Ergebnis dieser Reihung. Auf dieser Rechnung aufbauend wurden die kombinierten Ausschlusswahrscheinlichkeiten bei der Betrachtung mehrerer Loci berechnet. Die Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse bei Kombination von 1-8 Loci, vergleichend zwischen den Rassen dargestellt. Dabei zeigt sich, dass sich im untersuchten Material mit der Nutzung von nur 6 Loci cEXP von 99,7 % erzielen lassen.

Tabelle 13 zeigt die kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit über alle Rassen. Hier wird mit 6 Loci eine Sicherheit von 100 % erreicht.

Tab. 10: Ausschlusswahrscheinlichkeit (EXP) und PIC aller untersuchten Loci innerhalb der untersuchten Schweinerassen

Mikrosatellit	PIC				EXP			
	DE	DL	Pi	Alle	DE	DL	Pi	Alle
CGA	0,85	0,87	0,37	0,89	0,75	0,78	0,22	0,8
S0155	0,57	0,74	0,59	0,83	0,4	0,58	0,42	0,71
SW240	0,65	0,77	0,81	0,86	0,5	0,63	0,68	0,76
S0226	0,42	0,73	0,28	0,63	0,26	0,57	0,15	0,46
SW72	0,71	0,73	0,42	0,81	0,55	0,57	0,27	0,69
S0002	0,81	0,78	0,81	0,88	0,68	0,64	0,68	0,78
S0227	0,50	0,59	0,59	0,65	0,34	0,42	0,4	0,48
S0005	0,73	0,77	0,78	0,83	0,58	0,62	0,65	0,72
IGF1	0,75	0,77	0,72	0,82	0,6	0,63	0,57	0,69
SW122	0,61	0,71	0,75	0,8	0,43	0,54	0,59	0,66
S0101	0,68	0,67	0,37	0,77	0,51	0,51	0,22	0,62
S0115	0,70	0,69	0,72	0,8	0,54	0,53	0,56	0,67
S0178	0,48	0,79	0,63	0,77	0,31	0,65	0,45	0,63
S0225	0,53	0,68	0,26	0,67	0,36	0,51	0,15	0,51
SW911	0,56	0,61	0,84	0,81	0,39	0,44	0,73	0,69
SW951	0,67	0,46	0,49	0,63	0,51	0,29	0,33	0,47
S0386	0,63	0,65	0,47	0,66	0,46	0,49	0,31	0,5
S0215	0,46	0,42	0,33	0,43	0,3	0,25	0,19	0,26
S0068	0,23	0,82	0,66	0,68	0,13	0,69	0,49	0,53
SW857	0,83	0,77	0,71	0,82	0,71	0,62	0,56	0,69
SW936	0,71	0,71	0,84	0,78	0,55	0,55	0,72	0,64
S0355	0,78	0,53	0,64	0,73	0,63	0,36	0,47	0,58
S0026	0,53	0,67	0,61	0,74	0,35	0,5	0,44	0,58
SW24	0,85	0,8	0,71	0,88	0,74	0,67	0,55	0,78
S0218	0,69	0,67	0,63	0,86	0,52	0,51	0,46	0,75

Tab. 11: Reihung der Mikrosatellitenmarker nach Rang-Summen der PIC-Werte

No.	Mikrosatellit	*) Markierung (nm)	Chrom.	Länge (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
1	S0002	700	3q	190-216	57
2	SW24	800	17	96-121	57
3	S0005	700	7	205-248	57
4	SW857	700	14	144-160	57
5	IGF1	700	5	197-209	57
6	SW936	700	15	80-117	57
7	SW240	700	2p	96-115	57
8	CGA	700	1p	250-320	57
9	S0115	700	7	195-208	57
10	SW122	800	6	110-122	57
11	S0355	800	15	243-277	57
12	SW911	800	9	153-177	57
13	S0178	800	8	110-214	57
14	S0218	700	X	164-184	57
15	S0101	700	7	197-216	57
16	SW72	700	3p	100-116	57
17	S0068	800	13	211-260	57
18	S0155	700	1q	150-166	57
19	S0026	700	16	92-106	57

In Tabelle 12 sind die kombinierten Ausschlusswahrscheinlichkeiten für 1 bis 9 Loci für die 3 Rassen angegeben, wobei die Loci für jede Rasse nach abnehmender Ausschlusswahrscheinlichkeit sortiert wurden. Es wird ersichtlich, dass für jede Rasse bereits mit der Kombination von acht Loci eine Ausschlusswahrscheinlichkeit über 99,9 % erreicht wird.

Tab. 12: Kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit (cEXP) der drei Schweinerassen DE, DL, Pi

Komb. Mikr.		cEXP (DE)	cEXP (DL)	cEXP (Pi)
1	S0002	0,6410	0,68	0,6830
2	S0002 SW24	0,8800	0,91	0,8690
3	S0002 SW24 S0005	0,9550	0,96	0,9500
4	S0002 SW24 S0005 SW857	0,9830	0,9900	0,9780
5	S0002 SW24 S0005 SW857 IGF1	0,9940	0,9960	0,9900
6	S0002 SW24 S0005 SW857 IGF1 SW936	0,9970	0,9980	0,9970
7	S0002 SW24 S0005 SW857 IGF1 SW936 SW240	0,9990	0,9990	0,9990
8	S0002 SW24 S0005 SW857 IGF1 SW936 SW240 CGA	1,0000	1,0000	0,9990

Tab. 13 Kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeiten aller Rassen

		cEXP
1	S0002	0,7820
2	S0002 SW24	0,9520
3	S0002 SW24 S0005	0,9860
4	S0002 SW24 S0005 SW857	0,9960
5	S0002 SW24 S0005 SW857 IGF1	0,9990
6	S0002 SW24 S0005 SW857 IGF1 SW936	1,0000

3.8 Multiplex-PCR für Abstammungskontrolle

Ziel der vorliegenden Arbeit war ein optimales Markersset für eine routinemäßige Abstammungs- und Identifikationskontrolle beim Schwein zu etablieren.

Tabelle 11 zeigt die 19 Loci, die für eine Routine-Abstammungskontrolle besonders geeignet erscheinen. Aus den Loci wurden drei Multiplex-PCR mit jeweils 5 Loci zusammengestellt. Tabelle 15, 16 und 17 zeigen die PCR-Konditionen und die Ausschlusswahrscheinlichkeiten für Multiplex 1, 2 und 3. Die kombinierten Ausschlusswahrscheinlichkeiten sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 15: Multiplex-PCR 1, Reaktionsbedingungen und Ausschlusswahrscheinlichkeiten

No	Mikrosatellit	Markierung (nm)	Allellänge (bp.)	Annealing Temp. (°C)	cEXP			
					DE	DL	PI	Alle
1	SW936	700	80 - 117	57				
2	SW857	700	144 - 160	57				
3	S0115	700	195 - 208	57				
4	CGA	700	250 - 320	57				
5	S0068	800	211 - 260	57	0,987	0,995	0,978	0,997

Tab. 16: Multiplex-PCR 2, Reaktionsbedingungen und Ausschlusswahrscheinlichkeiten

No	Mikrosatellit	Markierung (nm)	Allellänge (bp.)	Annealing Temp. (°C)	cEXP			
					DE	DL	PI	Alle
1	SW240	700	96 - 115	55				
2	S0101	700	197 - 216	55				
3	S0355	700	243 - 277	55				
4	SW122	800	110 - 122	55				
5	SW911	800	153 - 177	55	0,969	0,970	0,985	0,996

Tab. 17: Multiplex-PCR 3, Reaktionsbedingungen und Ausschlusswahrscheinlichkeiten

No	Mikrosatellit	Markierung (nm)	Allellänge (bp.)	Annealing Temp. (°C)	cEXP			
					DE	DL	PI	Alle
1	S0026	700	92 - 106	58				
2	SW951	700	125 - 133	58				
3	S0225	700	170 - 196	58				
4	S0227	700	231 - 256	58				
5	S0178	800	110 - 124	58	0,905	0,965	0,895	0,979

Tab. 18: Kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeiten der Multiplexe 1, 2 und 3

Kombination	cEXP			
	DE	DL	PI	Alle
1, 2	1,000	1,000	1,000	1,000
1, 3	0,999	1,000	0,998	1,000
1, 2, 3	1,000	1,000	1,000	1,000

4. Diskussion

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines optimalen Markersets für eine routinemäßige Abstammungs- und Identifikationskontrolle. Für diese Untersuchung stand eine Auswahl von 25 Mikrosatelliten zur Verfügung, mit denen effiziente Multiplexsets erstellt werden sollten. Das Tiermaterial setzte sich aus drei Schweinerassen (DE, DL und Pi) zusammen, die vom Schweinezüchterverband Nord-West zur Verfügung gestellt wurden.

4.1 Anzahl der Allele

Für die Populationsuntersuchungen wurden zunächst die Parameter „Anzahl der Allele“ und „Allelfrequenzen“ erfasst (Tabelle 4). In der vorliegenden Untersuchung konnten bei 50 % der verwendeten Mikrosatelliten über alle Rassen mehr als 9 Allele gefunden werden. So sind die Loci CGA, SW240, S0002, SW911, S0068, S0218 und SW240 über alle Rassen mit mehr als 13 Allelen extrem polymorph. Beim Vergleich der Anzahl an gefundenen Allelen mit anderen Literaturangaben gab es keine wesentlichen Unterschiede und die in der vorliegenden

Untersuchung ermittelten Werte liegen in den Bereichen, die in der Literatur dokumentiert werden (Tabelle 19). Die größte Abweichung zwischen den Rassen liegt hier bei CGA (DL mit 13 Allelen und Pi mit 3 Allelen) vor. Die gefundenen Allele an diesem Genort weisen bei den drei Literaturangaben deutliche Unterschiede auf.

Die durchschnittliche Allelzahl über alle Loci in allen Rassen beträgt 6,41 (5,88 – 6,44). Beim Rind wurde eine durchschnittliche Allelzahl über alle Loci in allen Rassen von 6,4 (3,1 – 9,6; Medjugorac 1998) und beim Pferd von 5,3 (2,6 – 6,9; Roßnagel, 1999) gefunden. Dies zeigt, dass die untersuchten Schweinerassen eine ähnlich durchschnittliche Allelzahl der Loci aufwiesen wie andere Tierarten bei vergleichbaren Untersuchungen.

Tab. 19: Anzahl der gefundenen Allele im Vergleich mit anderen Autoren

Mikr.	Allellänge (bp.)	Anzahl an Allelen						
		1	2	3	4	DE*	DL*	Pi*
CGA	263 - 318	16	12	20	20	12	13	3
S0155	134 - 164	4	6	5	7	5	6	6
SW240	89 - 117	7	8	7	11	9	9	11
S0226	178 - 201	5	9	7	13	4	7	2
SW72	93 - 118	6	8	5	9	6	7	4
S0002	169 - 216	6	7	9	16	10	7	11
S0227	227 - 250	2	10		8	4	5	3
S0005	202 - 243	5	7	17	20	7	6	11
IGF1	222 - 244	6	10	6	12	6	7	7
SW122	95 - 119	5	10	7	9	6	5	6
S0101	197 - 216	4	9	10	8	5	7	3
S0115	177 - 225	9				7	7	6
S0178	106 - 120	5	4	10	11	5	7	4
S0225	165 - 187	3	8	8	10	6	6	4
SW911	147 - 196	4	9	8	9	5	7	9
SW951	120 - 132	4	5	5	4	5	3	6
S0386	151 - 171	5	10	8	8	7	7	5
S0215	152 - 159	2	10	4	8	3	3	2
S0068	226 - 260	6	9	14	16	5	11	6
SW857	138 - 161	8	6	7	9	11	7	6
SW936	81 - 116	6	13	10	11	7	7	9
S0355	241 - 268	6	14	4	8	8	6	7
S0026	93 - 115	4	8	6	7	3	5	5
SW24	92 - 118	6	8	8	13	9	9	7
S0218	143 - 203					6	9	4

1: Kleinwächter, 2001

2: Archibald et al., 1995

3: Mertinez et al., 2000

4: Laval et al., 2000

*: eigene Untersuchung

4.2 Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen wurden mit dem Programm Genetic Data Analysis (Lewis und Zaykin, 2001) berechnet und sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Eine besondere Allelfrequenzverteilung ist am Locus S0215 zu sehen. Das Allel 154 ist bei allen Rassen am häufigsten vertreten (0,50 – 0,70). Bei Locus S0068 kommt mit 0,86 die höchste Allelfrequenz bei der Rasse DE vor. Die Allelfrequenzen der anderen Rassen sind in diesem Allel deutlich geringer.

Eine Tendenz zur Fixierung ist bei einer Allelfrequenz von über 0,70 gegeben (Rossnagel, 1999). Bei der vorliegenden Untersuchung zeigt sich aber keine Tendenz zur Fixierung, da die Allelfrequenz nur etwa 0,60 beträgt.

Beim Vergleich zwischen den Rassen zeigen sich rassenspezifische Allele, die nur in einer bestimmten Rasse vorkommen.

Bei der Rasse Pi ist z.B. am Locus S0225 das Allel 165 vorhanden, dieses Allel zeigt sich nicht in den anderen untersuchten Rassen. Ein weiteres Beispiel ist der Locus S0218. Hier zeigen sich bei der Rasse DL 7 Allele, doch bei der Rasse Pi und DE sind diese Allele nicht zu identifizieren.

4.3 Heterozygotiegrad

Das Ausmaß der Heterozygotie pro Locus hängt von der Anzahl der Allele und von den Allelfrequenzen ab. Je mehr Allele an einem Locus vorkommen und je ähnlicher die Allelfrequenzen sind, desto höher ist der Heterozygotiegrad (Weir, 1996). In der vorliegenden Untersuchung wurde der höchste Wert für die Heterozygotie an den Loci SW240 und S0215 bei der Deutschen Landrasse mit einem Wert von 1,00 festgestellt, während der niedrigste Heterozygotiegrad mit 0,12 am Locus S0225 bei der Rasse Pietrain auftrat (Tabelle 6).

Die hohe Anzahl an Allelen pro Locus und die hohen PIC-Werte sowie die hohe beobachtete Heterozygotie belegen, dass die Loci hoch polymorph sind und damit für die Vaterschaftsanalyse gut geeignet sein sollten. So hat der Locus SW240 in DE und DL 9 Allele in Pi 11 Allele, Ho-Werte zwischen 0,61 und 1,0 sowie PIC-Werte zwischen 0,65 und 0,81.

In der vorliegenden Untersuchung ist die durchschnittlich beobachtete Heterozygotie (H_o) über alle Loci 0,67 (Tabelle 6). Vergleichbare Ergebnisse finden sich in den Populationsuntersuchungen bei Chen (1994) mit einem Wert für DL von 0,59 und 0,37 für Pi; bei Spitzer et al. (2000) liegt der Wert für DE bei 0,64. Bei einer anderen Studie an 11 europäischen Schweinerassen mit dem gleichen Markersset lagen die Heterozygotiegrade zwischen 0,35 und 0,60 mit einem durchschnittlichen Wert von 0,51 (Laval et al., 2000). In einer Untersuchung von Hussein (1996) wurden die Heterozygotiegrade bei Fleckviehkühen mit sieben Mikrosatelliten-Markern mit Werten zwischen 0,32 und 0,93 angegeben. Wie aus Literaturangaben hervorgeht,

liegt die Heterozygotie beim Menschen tendenziell höher als beim Schwein (Weber und May, 1989, Edwards et al., 1992). Hier wurden für die erwartete Heterozygotie im Durchschnitt Werte zwischen 0,70 und 0,90 ermittelt (Laval et al., 2000).

4.4 Kopplungsungleichgewicht innerhalb der Populationen

Die Tabelle 9 zeigt ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht innerhalb der Populationen. Es wurde aber auch bei verschiedenen Paaren von Mikrosatelliten kein signifikantes Kopplungsungleichgewicht gefunden.

Bei der Analyse des Kopplungsungleichgewichtes besagt die Null-Hypothese, dass die Genotypen bei einem Locus unabhängig von den Genotypen des anderen Locus sind (Raymond und Rousset, 1995). Dies bedeutet, dass mit einem hoch signifikanten und signifikanten Gleichgewicht innerhalb der Population eine Abhängigkeit zwischen den Loci besteht. Locus SW24 zeigt ein signifikantes Gleichgewicht mit mehreren anderen Loci, das heißt, es besteht kein Kopplungsgleichgewicht zwischen Locus SW24 und S0005, SW857, IGF1, SW936, SW240, S0115, S0101, S0068, S0155 und S0026 (Tabelle 9).

Voraussetzung für die Anwendung der Kopplungsanalyse ist das Vorliegen von Familien, deren genetische und verwandtschaftliche Strukturen die Schätzungen der Rekombinationsraten zulassen. Hierzu müssen informative Meiosen bei doppelt heterozygoten Eltern zur Verfügung stehen. Von Bedeutung für die Kopplungsanalyse sind der Informationsgehalt der Marker und die Dichte der Markerkarte (Botstein et al., 1980). Je höher der PIC-Wert der verwendeten Marker ist, desto informativer sind diese Marker für die Kartierung. Locus SW24, S0101, SW857, SW240 und CGA zeigen einen hohen PIC-Wert für alle Rassen zwischen 0,77 und 0,89.

Mit diesem Ergebnis sind diese Marker nicht nur für die Abstammungs- und Identitätskontrolle sondern auch für die Kartierung geeignet.

4.5 Ausschlusswahrscheinlichkeit

Die Werte für die Ausschlusswahrscheinlichkeit für die einzelnen Mikrosatelliten bei der Rasse Deutsche Edelschwein (DE) aus der vorliegenden Untersuchung waren vergleichbar mit denen aus den Arbeiten von Spitzer et al. (2000) und Kleinwächter (2001) und sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tab. 20: Ausschlusswahrscheinlichkeiten einzelner Mikrosatelliten von drei unterschiedlichen Untersuchungen der Rasse DE

Mikrosatellit	Spitzer et al. (2000)	Kleinwächter (2001)	eigene Untersuchung
CGA		0,75	0,75
S0155		0,3	0,4
SW240		0,2	0,5
S0226		0,35	0,26
SW72		0,42	0,55
S0002	0,5	0,47	0,68
S0227		0,13	0,34
S0005	0,71	0,65	0,58
IGF1		0,48	0,6
SW122		0,38	0,43
S0101		0,46	0,51
S0115		0,67	0,54
S0178	0,58	0,21	0,31
S0225		0,19	0,36
SW911		0,38	0,39
SW951		0,39	0,51
S0386		0,41	0,46
S0215		0,03	0,3
S0068		0,24	0,13
SW857	0,62	0,6	0,71
SW936	0,62	0,56	0,55
S0355		0,6	0,63
S0026		0,26	0,35
SW24	0,57	0,52	0,74
S0218			0,52

Diese Tabelle zeigt, dass die höchste Ausschlusswahrscheinlichkeit für die Rasse DE in dieser Untersuchung bei Locus CGA mit 0,74 liegt. Beim Vergleich mit Kleinwächter (2001) kam es zu ähnlichen Ergebnissen. In dieser Untersuchung lag die geringste Ausschlusswahrscheinlichkeit ebenfalls an Locus S0215 mit einem Wert von 0,19 bei Pi. Für DL lag in der vorliegenden Arbeit

die höchste Ausschlusswahrscheinlichkeit bei Locus CGA (Rasse DL) mit 0,77 und Locus SW911 (Rasse Pi) mit 0,73 (Tabelle 10).

Die gegenwärtig genutzte Methode zur Schätzung der Ausschlusswahrscheinlichkeit setzt voraus, dass ein signifikantes Kopplungsgleichgewicht an den Markergenorten besteht, die Berechnung der relativen Häufigkeiten der Allele in einer zufälligen Stichprobe und die Paarungen zufällig erfolgen. Die vorliegende Analyse wurde an einem Tiermaterial durchgeführt, das zum Zweck der Abstammungskontrolle eingereicht wurde. Die Bedingungen für die Anwendung der Methode nach Weir (1996) zur Schätzung der Ausschlusswahrscheinlichkeit sind daher nicht vollständig erfüllt. Dies kommt in der Tatsache zum Ausdruck, dass in der vorliegenden Arbeit für fast alle Rassen eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beobachtet wurde (Tabelle 7, 8). Grundsätzlich können Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf mehreren Ursachen beruhen: Überhöhte Heterozygotie, also negative Fis-Werte, können auf Selektion oder systematischer Auszucht beruhen. Positive Fis-Werte beruhen auf der Tatsache:

1. Der Locus steht unter Selektion,
2. An einem Locus existieren „Null-Allele“,
3. Inzucht liegt vor,
4. Subpopulationen existieren innerhalb einer Population.

Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, bedingt durch Inzucht oder Auszucht, sollten an mehreren Loci in einheitlichem Ausmaß gleichzeitig auftreten. Abweichungen aufgrund von Selektion sollen in der Regel einen Locus über alle Populationen betreffen. Keine der untersuchten Rassen zeigt ausschließlich negative oder positive Abweichungen und keiner der Loci zeigt bei allen Populationen eine einheitliche Abweichung.

„Null-Allele“ sind für die analysierten Mikrosatelliten nicht beschrieben und es traten keine Probleme bei der Darstellung der Genotypen auf.

4.6 Polymorphismen Information Content (PIC)

Die hohe Anzahl an Allelen pro Mikrosatellit-Locus, die hohen PIC-Werte sowie die hohe beobachtete Heterozygotie belegen, dass die Loci hoch polymorph sind und damit für die Vaterschaftsanalyse gut geeignet sein sollen (Hohenhörst et al., 1994).

Tabelle 10 zeigt, dass der höchste PIC-Wert bei Locus CGA mit 0,873 (Rasse DL) und der kleinste PIC-Wert bei Locus S0068 mit 0,231 (Rasse DE) beobachtet wurde. Diese Werte sind begründet, weil der Locus CGA in den vorliegenden Untersuchungen die höchste Anzahl der gefundenen Allele hat und der beobachtete Heterozygotiegrad bei Locus CGA bei Rasse DE und DL mit 0,74 und 0,88 hoch war. Locus S0215 zeigte eine geringe Anzahl und erreicht damit auch geringere PIC-Werte.

Die PIC-Werte über allen Rassen lagen durchschnittlich bei 0,72. Dies bedeutet, dass die verwendeten Mikrosatelliten hoch informativ sind.

Aus der Kombination der durchschnittlichen PIC-Werte und der Rangierung der Summen der PIC-Werte von den 25 Mikrosatelliten wurden die informativsten Mikrosatelliten berechnet und für die Zusammenstellung der PCR-Multiplexe bevorzugt.

4.7 Abstammungs- und Identitätskontrolle

Die Eignung von Mikrosatelliten für Identitäts- und Abstammungskontrollen hängt von der Anzahl der Allele pro Locus, von den Allelfrequenzen sowie von den PIC-Werten ab. Je mehr Allele an einem Locus vorkommen und je kleiner der Unterschied zwischen den Allelfrequenzen ist, desto genauer werden die Identitäts- und Abstammungskontrollen (Chen, 1994).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die PIC-Werte von allen Rassen sehr hoch sind und einen durchschnittlichen Wert von 0,72 erreichen. Der überwiegende Teil der Marker ist somit nach Botstein et al. (1980) als hoch informativ einzustufen.

Bei der Berechnung der kombinierten Ausschlusswahrscheinlichkeit konnte mit nur acht Mikrosatelliten über allen Rassen ein durchschnittlicher Wert von 99,90 erreicht werden. Im Vergleich dazu liegt die Ausschlusswahrscheinlichkeit mit einem Blutgruppensystem bei ca. 95 – 97 % (Spitzer, 2000). Im praktischen Aufwand ist die Abstammungskontrolle mit Hilfe der Mikrosatellitenmarker weniger hoch.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich, dass die verwendeten Mikrosatelliten sehr spezifisch für jede Rasse sind, dies begründet sich in der unterschiedlichen Allelzahl innerhalb der Rassen. Beispielsweise konnten am Mikrosatellit CGA 12 Allele bei der Rasse DE, 13 bei der Rasse DL, jedoch nur 3 Allele bei der Rasse Pi gefunden werden.

In dieser Arbeit wurden die Marker zu PCR-Multiplex-Reaktionen zusammengefasst. Wie aus den Tabellen 15, 16, 17 und 18 ersichtlich ist, können mit diesen komplexen Reaktionen bereits mit der Testung eines Sets hohe Ausschlussicherheiten erzielt werden. Bei Kombination von PCR-Set 1 und 2 werden maximale Sicherheiten von 1 erreicht. Durch die komplexe Reaktion werden pro Set 4 Reaktionsansätze eingespart. Dies führt zu einer bedeutenden Verbilligung des Verfahrens.

Wir haben nicht darauf verzichtet, ein weiteres PCR-Set (PCR 3) zu entwickeln. In seltenen Sonderfällen könnte der Fall eintreten, dass nur ein Ausschluss mit PCR 1 und PCR 2 gefunden wird. Generell werden zur Aussage „falsche Abstammung“ zwei Ausschlüsse verlangt. In solchen Fällen kann dann das System PCR 3 herangezogen werden.

5. Zusammenfassung

Die objektive und endgültige Identifikation der Nutztiere kann derzeit mit der geforderten Sicherheit nur durch die Analytik der DNA-Variation durchgeführt werden. Neben der zentralen Bedeutung richtiger Abstammungsangaben für die Zuchtarbeit ist die Identifikation von Fleisch nach seiner Herkunft ein integrativer Bestandteil in Qualitätsmanagementsystemen zur Qualitätssicherung in der tierischen Erzeugung.

Es war Ziel dieser Arbeit, ein molekulares System zur Abstammungskontrolle und zur Tieridentifikation zu entwickeln, das auf eine tierschonende Probenentnahme aufbaut. Als molekulare Marker wurden Mikrosatellitenloci verwendet. Als DNA-Quelle wurden 6 Haarfollikel von ausgezupften Widerristhaaren verwendet. Nach einem einfachen Verfahren der DNA-Extraktion war die aus den 6 Haarfollikeln gewonnene Menge in Qualität und Quantität ausreichend bis zu 50 PCR-Reaktionen zu fahren.

Für die Analyse wurden 25 Mikrosatellitenmarker verwendet, die im Rahmen eines EU-Projektes zur Evaluierung europäischer Schweinerassen empfohlen wurden (<http://toulouse.inra.fr/lgc/pig/panel/Listset.htm>).

Ziel dieser Arbeit war, ein optimales Markersset für eine routinemäßige Abstammungs- und Identifikationskontrolle beim Schwein zu etablieren.

Für die Isolation wurden Ohrgewebe bzw. Haarfollikelzellen verwendet und die genomische DNA wurde mit der Proteinase-K-Verdauung isoliert.

Die Amplifikation der Allele von 25 Mikrosatellitenloci erfolgte mit Multiplex-PCR und fluoreszenzmarkierten Primern. Diese Methode ermöglicht die spezifische Vermehrung von DNA-Fragmenten durch eine zyklische Wiederholung von drei Reaktionsschritten: Zuerst wird die DNA bei 94 °C (3 min) denaturiert. In einem zweiten Schritt lagern sich Primer bei spezifischen Temperaturen an die komplementären Abschnitte der Einzelstränge an (Annealing). Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung der Primer zu zwei neuen Doppelsträngen (Extension). Die neu entstandenen Produkte dienen im nächsten Reaktionszyklus als Matrize, so dass die DNA-Fragmente durch PCR exponentiell amplifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden mehrere Loci in einer Multiplex-PCR amplifiziert, wodurch ein Rationalisierungseffekt erreicht werden konnte. Dies machte nach der Einzeloptimierung einen zweiten Optimierungsschritt erforderlich. Dabei wurde unter Variation der Primerkonzentrationen und der Zyklenzahl das PCR-Ergebnis der gemeinsam amplifizierten Mikrosatelliten-Marker aufeinander abgestimmt.

Die Auftrennung der PCR-Produkte wurde mit einem automatischen Sequenziergerät (LI-COR, DNA Analyzer, GENE READIR 4200, MWG-BIOTECH) in einem Polyacrylamidgel durchgeführt.

Die Auswertung der Elektrophoresegele wurde mit den Software OneDscan (Scanalytics, Division of CSPI, USA) durchgeführt. Das Gel wurde zunächst über den Längenstandard kalibriert. Danach erfolgte die Bestimmung aller vorkommenden Allele. Bei der Bestimmung der Allellängen wurde ein Abstand von mindestens zwei Basenpaaren zwischen aufeinander folgenden Allelen festgelegt.

Um die genetische Variation innerhalb einer Population zu erfassen wurde der Heterozygotiegrad berechnet. Der Heterozygotiegrad der einzelnen Genorte und die durchschnittliche Heterozygotie über alle untersuchten Loci wurde mit dem Programm GDA (Genetic Data Analysis) ermittelt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit dem Softwarepaket GENEPOP V1.2 nach Raymond und Rousset (1994) berechnet.

Zur Ermittlung der Verwendungsfähigkeit der Mikrosatellitenmarker zur Abstammungskontrolle wurden die Ausschlusswahrscheinlichkeiten (EXP) sowie die kombinierte Ausschlusswahrscheinlichkeit (cEXP) über alle beobachteten Loci sowie der Polymorphism Information Content (PIC) nach folgenden Formeln berechnet:

$$EXP = \sum_{u=1}^z Pu(1-Pu)^2 - 1/2 \sum_{u=1}^{z-1} \sum_{v=u+1}^z Pu^2 P_v^2 (4 - 3Pu - 3P_v)$$

$$cEXP = 1 - \prod_{i=1}^1 (1 - EXP)$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{u=1}^z Pu^2 \right) - \sum_{u=1}^{z-1} \sum_{v=u+1}^z 2Pu^2 P_v^2$$

Z : Anzahl der Allele

$P_u P_v$: relative Häufigkeit des u-ten und v-ten Allels am betrachteten Locus

Π : Produkt Summe

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen :

1. Die Genotypisierung erfolgte nach PCR-Amplifikation der Allele an einem automatischen DNA-Sequenziergerät (LI-COR, DNA Analyzer, GENE READIR 4200 (MWG-BIOTECH)).
2. Über allen 25 untersuchten Loci wurden bei DE 161, bei DL 173 und bei Pi 147 Allele gefunden. Dies entspricht etwa 6 Allelen pro Genort.
3. Die Werte für die beobachtete Heterozygotie lagen zwischen 0,12 und 1,0 und für die erwartete Heterozygotie zwischen 0,24 und 0,89.
4. Es wurden rassenspezifische Allele in allen drei Rassen gefunden.
5. Durch Kombination von nur 6 Loci lassen sich mit der Markerkombination S0002, SW24, S0005, SW857, IGF1 und SW936 Ausschlusswahrscheinlichkeiten von mehr als 99,7 % erreichen.
6. Für die Routineabstammungsanalytik wurden drei Multiplex-PCR-Sets mit je 5 Loci entwickelt. Die Kombination von 2 Fünfersets ergibt Ausschlusssicherheiten von mehr als 99,9 %. Für Spezialfälle kann zusätzlich noch das dritte Set herangezogen werden.

6. Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

Die Praxis benötigt dringend kostengünstige und genaue Abstammungskontrollen, weil gemäß den Richtlinien des Ausschusses für Leistungsprüfung und Zuchtwertfeststellung bei Schweinen (1998) bei 5 % der stationär geprüften Tiere Abstammungskontrollen durchgeführt werden müssen. Dies trifft allein im Bereich der Herdbuchzucht auf jährlich etwa 1000 Schweine zu. Zu diesem Zweck sollten die verfügbaren schonendsten Methoden angewendet werden. Die Nutzung von Haarproben ist im Vergleich zur Blutentnahme ein wichtiger Beitrag zum belastungsarmen und schonenden Umgang mit den Tieren. Neben dem Tierschutzaspekt spielt auch der Kostenaspekt für die Praxis eine bedeutende Rolle. Haarproben können vom geschulten Personal entnommen werden, während Blutproben nur von Tierärzten gezogen werden dürfen.

Neben den genannten Aspekten ist in Zukunft zu erwarten, dass eine sichere Identifizierung von Einzeltieren nicht nur auf züchterische Aktivitäten beschränkt bleibt. Zahlreiche sich im Bereich der Schweineproduktion etablierende Qualitätssicherungssysteme benötigen zur Kontrolle ein effizientes Abstammungsanalysesystem. Dies gilt sowohl aus dem Blickwinkel von Qualitätsfleischprogrammen als auch der Tierseuchenbekämpfung. Zur Abstammungskontrolle sind Blutgruppenanalysen aufgrund tierschutzrelevanter, verfahrenstechnischer und ökonomischer Nachteile nicht akzeptabel, so dass die im Rahmen des Projekts zu erwartenden Ergebnisse von maßgeblicher Bedeutung für die Herkunftssicherung im Bereich der Qualitätssicherung sein werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden zur Zeit direkt in die Praxis umgesetzt. Unser Institut ist Mitglied einer vom „Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion“ ins Leben gerufenen Arbeitsgruppe zur Etablierung molekularer Abstammungs- und Identitätskontrolle beim Schwein. Derzeit ist die Entwicklung so weit, dass deutschlandweit Ringversuche durchgeführt werden sollen, wo vor allem die Genotypen untereinander verglichen werden sollen. In diesem Zusammenhang hat unser Projekt derzeit besonders praktische Bedeutung, weil wir die genetische Variabilität der Marker in den nordrhein-westfälischen Populationen geprüft haben. Sollte von der ZDS-Arbeitsgruppe ein einheitliches System vorgeschlagen werden, so können unsere Züchter direkt auf unsere Daten zurückgreifen.

7. Literaturverzeichnis

Alexander, L.J., Rohrer, G.A., Beattie, C.W. (1996): Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Anim Genet* 22, 137-148

Alford, R.B., Hammond, H.A., Coto, I., Caskey, C.T. (1994): Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *American J Hum Genet* 55, 190-195

Archibald, A.L., Haley, C.S., Brown, J.F. (1995): The PiGMAP consortium phospholipase A2 locus (PPLA2). *Anim Genet* 21, 93

Binns, M.M., Holmes, N.G., Holliman, A., Scott, A.M. (1995): The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *British Vet J* 151, 9-15

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davies, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314-331

Bowling, A.T., Egglestone, M.L., Byrns, G., Clark, R.S., De Leanis, S., Wictum, E. (1997): Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet* 28, 247-252

Chen, Y. (1994): Darstellung und Anwendung von VNTRs beim Schwein. Dissertation, Universität Stuttgart

Coppierters, W., Van de Weghe, A., Peelman, L., Depicker, A., Van Zeveren, A., Bouquet T. (1993): Characterization of porcine polymorphic microsatellite loci. *Anim Genet* 24, 163-170

Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T., Chakraborty, R. (1992): Genetic variation at five trimetric and tetrametric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12, 241-253

Ellengren, H. (1995): Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mamm Genome* 6, 376-377

Ellengren, H., Chowdhary, B., Johansson, M., Marklund, L., Fredholm, M., Gustavsson, I., Andersson, L. (1994): A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics* 137, 1089-1100

Fredholm, M., Wintero, A.K. (1996): Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim Genet* 26, 19-23

Fredholm, M., Wintero, A.K., Christensen, K., Kristensen, B., Nielsen P.B., Fries R., Eggen A., Stranzinger G. (1993): The Bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics* 8, 403-406

Glodek, P., Meyer, J. N., Brundt, H., Pfeiffer, H. (1993): Die genetische Distanz zwischen ost- und westdeutschen Schweinerassen. 1. Mitteilung: Die Kreuzungseignung zwischen den Rassen. *Archiv für Tierzucht* 36, 621-630

Glowatzki-Mullis, M.L., Gaillard, C., Wigger, G., Fries, R. (1995): Microsatellite based parentage control in cattle. *Anim Genet* 26, 7-12

Heyen, D.W., Beever, J.E., Da, Y., Evert, R.E., Green, C., Bates, S.R.E., Ziegler, J.S., Lewin, H.A. (1997): Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim Genet* 28, 21-27

Hohenhörst, J., Fries, R., Vögeli, P., Stranzinger, G. (1994): Use microsatellites or parentage control in pigs. *Anim Genet* 25, 33

Hussein, A.A., Schmoll, F., Führer, F., Brem, G., Schellander, K. (1996): Evaluation of 7 microsatellite loci for use in simmental cattle parentage control. *J Vet Med* 43, 1-8

Juneja, R.K., Vögeli, P. (1998): Biochemical genetics. In: *The Genetics of the Pig*. Ed. Rotschild MF and A Ruvinsky, CAB International, New York

- Kleinwächter, T. (2001): Analyse des Heterozygotiestatus in einer nordrhein-westfälischen Zuchtsauenpopulation mit Hilfe molekularer Marker. Diplomarbeit, Universität Bonn
- Landsteiner, K. (1991): Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien klin Wschr* 14, 1132-1134
- Laval, G., Iannuccelli, N., Legault, C., Milan, D., Groenen, M.A.M., Giuffra, E., Andersson, L., Nissen, P.H., Jorgensen, C.B., Beeckmann, P., Geldermann, H., Foulley, J.L., Chevalet, C., Ollivier, L. (2000): Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet Sel Evol* 32, 187-203
- Lewis, P.O., Zaykin, D. (2001): GDA. Statistical Genetics Summer Institute. North Carolina State University
- Litt, M., Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44, 397-401
- Marklund, S., Ellengren, H., Erikson, S., Sandberg, K., Anderson, L. (1994): Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet* 25, 19-23
- Martinez, A.M., Delgado, J.V., Rodero, A., Vega-Pla, J.L. (2000): Genetic structure of the Iberian Pig breed using microsatellites. *Anim Genet* 31, 295-301
- Medjugorac, I. (1998): Molekulargenetische Charakterisierung europäischer und vorderasiatischer Rinderrassen. Dissertation, Universität Berlin
- Moran, C. (1993): Microsatellite Repeats in Pig (*Sus domestica*) and Chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J Hered* 84, 274-280
- Nei, M. (1978): Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590
- Peelman, L.J., Mortiaux, F., Van Zeveren, A., Dansercoer, A., Mommens, G., Coopman, F., Bouquet, Y., Burny, A., Renavitte, R., Portetelle, D. (1998): Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim Genet* 29, 161-167
- Raymond, M., Rousett, F. (1994): GENEPOP (version 1.2). Population genetics software for exact test und ecumenicism. *J of Hered* 86, 248-249
- Riquet, J., Milan, D., Woloszyn, N., Schmitz, A., Pitel, F., Frelat, G., Gellin, J. (1995): A linkage map with microsatellites isolated from swine flow-sorted Chromosome 11. *Mamm Genome* 6, 623-628
- Robic, M., Woloszyn, N., Milan, D., Riquet, J., Gellin, J. (1994): Isolation of 28 new porcine microsatellites revealing polymorphism. *Mamm Genome* 5, 580-583

Rohrer, G.A., Alexander, L.J., Keele, J.W., Smith, T.P., Beattie, C.W. (1994): A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136, 231-245

Ron, M., Lewin, H., Da, Y., Band, M., Yanai, A., Blank, Y., Feldmesser, E., Weller, J.I. (1995): Prediction of informativeness for microsatellite markers among progeny of sires used for detection of economic trait loci in dairy cattle. *Anim Genet* 26, 439-441

Roßnagel, I. (1999): Untersuchungen zur Biodiversität verschiedener Kaltblut- und Primitivpferderassen. Dissertation, Universität München

Ruyter, D., Verstege, A.J.M., van der Poel, J.J., Groenen, M.A.M. (1994): Five polymorphic microsatellite markers. *Anim Genet* 25, 53

Spitzer, S. (2000): Genetische Charakterisierung wirtschaftlich genutzter Schweinerassen. Dissertation, Universität München

Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471

Tolle, A. (1960): Die Blutgruppen des Rindes. Verlag Schaper, Hannover

Vögeli, P. (1990): Blutgruppen des Schweines – serologische und genetische Studien. Habilitationsschrift. ETH-Zürich

Weber, J.L., May, P.E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J of Hum Genet* 44, 388-396

Weir, B. (1996): Genetic data analysis II. 2nd Edition, Sinauer Associates, Inc.

Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F., Hardge, T., Hatzipanagiotou, A., Weber, J., Wostmann, S., Olek, K., Schellander, K. (1998): Effizienz von Mikrosatellitenmarkern des internationalen Standards zur Abstammungsbegutachtung in deutschen Pferdepopulationen. *Züchtungskunde* 70, 233-241

8. Anhang

Tab. 21: Allelfrequenzen an den 25 Mikrosatellitenloci bei 3 Schweinerassen

No.	CGA	Allele	DE Frequenz	N	DL Frequenz	N	Pi Frequenz	N	alle Frequenz	N
1		263	0,03	2	0,03	2	0,00	0	0,04	4
2		266	0,08	3	0,00	0	0,00	0	0,03	3
3		271	0,28	12	0,10	4	0,00	0	0,15	16
4		273	0,06	2	0,02	1	0,00	0	0,03	3
5		275	0,09	4	0,00	0	0,00	0	0,04	4
6		278	0,03	2	0,17	8	0,00	0	0,09	10
7		282	0,05	2	0,00	0	0,00	0	0,02	2
8		284	0,08	3	0,16	7	0,00	0	0,09	10
9		286	0,06	3	0,03	2	0,00	0	0,05	5
10		289	0,05	2	0,15	7	0,73	11	0,19	20
11		291	0,14	6	0,11	5	0,00	0	0,10	10
12		293	0,06	3	0,01	1	0,20	3	0,07	7
13		296	0,00	0	0,09	4	0,07	1	0,05	5
14		300	0,00	0	0,03	1	0,00	0	0,01	1
15		304	0,00	0	0,02	1	0,00	0	0,01	1
16		318	0,00	0	0,09	4	0,00	0	0,04	4
			1,00	44	1,00	47	1,00	15	1,00	106
	S0155	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		134	0,00	0	0,27	13	0,00	0	0,11	13
2		143	0,00	0	0,31	15	0,00	0	0,12	15
3		147	0,08	3	0,15	7	0,14	4	0,11	14
4		151	0,00	0	0,00	0	0,04	1	0,01	1
5		153	0,03	2	0,06	3	0,50	14	0,15	19
6		157	0,42	20	0,00	0	0,00	0	0,16	20
7		159	0,41	19	0,18	9	0,02	1	0,23	29
8		161	0,05	2	0,03	2	0,29	8	0,10	12
9		164	0,00	0	0,00	0	0,02	1	0,01	1
			1,00	46	1,00	49	1,00	28	1,00	123

Fortsetzung Tabelle 21

No.	SW240	Allele	DE		DL		Pi		alle	
1		89	0,02	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
2		91	0,04	1	0,00	0	0,04	2	0,02	3
3		93	0,13	6	0,04	2	0,04	2	0,07	8
4		95	0,00	0	0,01	1	0,32	16	0,12	17
5		97	0,54	22	0,29	14	0,05	3	0,27	39
6		99	0,00	0	0,00	0	0,10	5	0,04	5
7		101	0,02	1	0,01	1	0,18	9	0,08	11
8		103	0,00	0	0,16	7	0,00	0	0,05	7
9		105	0,00	0	0,22	10	0,01	1	0,08	11
10		107	0,04	2	0,05	2	0,01	1	0,04	5
11		111	0,09	3	0,00	0	0,11	6	0,07	9
12		115	0,05	2	0,18	8	0,09	5	0,11	15
13		117	0,07	3	0,02	1	0,05	3	0,05	7
			1,00	41	1,00	46	1,00	50	1,00	137
	S0226	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		178	0,01	1	0,11	5	0,00	0	0,05	6
2		181	0,43	19	0,34	16	0,79	20	0,47	55
3		183	0,00	0	0,01	1	0,00	0	0,01	1
4		186	0,00	0	0,23	10	0,00	0	0,09	10
5		191	0,00	0	0,03	1	0,00	0	0,01	1
6		193	0,00	0	0,04	2	0,00	0	0,02	2
7		195	0,53	23	0,24	11	0,00	0	0,29	34
8		201	0,02	1	0,00	0	0,21	6	0,06	7
			1,00	44	1,00	46	1,00	26	1,00	116

Fortsetzung Tabelle 21

No.	SW72	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	Alle	N
1		93	0,33	15	0,00	0	0,00	0	0,11	15
2		95	0,18	8	0,00	0	0,00	0	0,06	8
3		100	0,02	1	0,35	17	0,72	31	0,35	49
4		102	0,00	0	0,30	15	0,00	0	0,11	15
5		104	0,00	0	0,11	6	0,00	0	0,04	6
6		108	0,24	11	0,00	0	0,08	4	0,11	15
7		110	0,22	10	0,00	0	0,00	0	0,07	10
8		112	0,01	1	0,10	5	0,14	6	0,09	12
9		114	0,00	0	0,02	1	0,06	3	0,03	4
10		116	0,00	0	0,04	2	0,00	0	0,01	2
11		118	0,00	0	0,08	4	0,00	0	0,03	4
			1,00	46	1,00	49	1,00	43	1,00	138
No.	S0002	Allele	DE		DL		Pi		alle	
1		169	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,02	1
2		173	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,02	1
3		181	0,00	0	0,20	8	0,03	1	0,07	9
4		187	0,00	0	0,01	1	0,15	6	0,06	7
5		193	0,00	0	0,17	7	0,10	4	0,09	11
6		197	0,23	10	0,15	6	0,27	10	0,21	26
7		200	0,07	3	0,00	0	0,04	1	0,03	4
8		202	0,20	9	0,00	0	0,03	1	0,08	10
9		206	0,08	3	0,29	12	0,13	5	0,16	20
10		208	0,03	2	0,07	3	0,21	8	0,10	13
11		210	0,21	9	0,00	0	0,03	1	0,08	10
12		213	0,03	2	0,11	5	0,01	0	0,06	7
13		216	0,12	5	0,00	0	0,01	0	0,04	5
			1,00	45	1,00	42	1,00	39	1,00	126

Fortsetzung Tabelle 21

	S0227	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		227	0,23	10	0,55	21	0,28	9	0,34	40
2		230	0,07	3	0,00	0	0,37	13	0,14	16
3		233	0,62	27	0,22	8	0,35	12	0,40	47
4		237	0,08	4	0,09	4	0,00	0	0,07	8
5		246	0,00	0	0,09	4	0,00	0	0,04	4
6		250	0,00	0	0,05	2	0,00	0	0,02	2
			1,00	43	1,00	39	1,00	34	1,00	117
	S0005	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		202	0,00	0	0,00	0	0,05	2	0,02	2
2		214	0,00	0	0,27	11	0,10	3	0,12	14
3		220	0,00	0	0,00	0	0,07	2	0,02	2
4		224	0,00	0	0,02	1	0,00	0	0,01	1
5		228	0,01	1	0,00	0	0,08	2	0,03	3
6		230	0,24	9	0,17	7	0,12	4	0,17	20
7		232	0,10	4	0,00	0	0,07	2	0,05	6
8		234	0,31	13	0,17	7	0,40	12	0,28	32
9		236	0,25	10	0,00	0	0,02	1	0,10	11
10		238	0,06	2	0,16	6	0,03	1	0,09	9
11		240	0,03	1	0,00	0	0,05	2	0,03	3
12		243	0,00	0	0,21	9	0,02	1	0,09	10
			1,00	40	1,00	41	1,00	30	1,00	111

Fortsetzung Tabelle 21

	IGF1	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		222	0,00	0	0,02	1	0,00	0	0,01	1
2		225	0,00	0	0,08	4	0,00	0	0,03	4
3		227	0,18	8	0,15	6	0,36	12	0,22	26
4		230	0,34	15	0,17	7	0,13	4	0,21	26
5		232	0,18	8	0,31	13	0,03	1	0,18	22
6		235	0,03	2	0,20	8	0,03	1	0,09	11
7		237	0,00	0	0,06	3	0,10	4	0,06	7
8		241	0,14	6	0,00	0	0,29	10	0,13	16
9		244	0,13	5	0,00	0	0,07	3	0,07	8
			1,00	44	1,00	43	1,00	35	1,00	122
	SW122	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		95	0,00	0	0,07	3	0,00	0	0,03	3
2		101	0,00	0	0,11	5	0,00	0	0,04	5
3		103	0,01	1	0,33	14	0,00	0	0,13	15
4		107	0,01	1	0,21	10	0,20	5	0,14	16
5		110	0,33	15	0,00	0	0,20	5	0,17	20
6		112	0,45	20	0,29	14	0,10	3	0,31	37
7		115	0,04	2	0,00	0	0,04	1	0,03	3
8		117	0,16	7	0,00	0	0,34	9	0,14	16
9		119	0,00	0	0,00	0	0,12	3	0,03	3
			1,00	46	1,00	46	1,00	25	1,00	117

Fortsetzung Tabelle 21

	S0101	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		197	0,14	5	0,02	1	0,00	0	0,05	6
2		206	0,00	0	0,11	5	0,00	0	0,05	5
3		208	0,00	0	0,01	1	0,67	16	0,15	17
4		210	0,31	13	0,13	6	0,31	8	0,25	27
5		212	0,20	8	0,48	22	0,02	0	0,27	30
6		214	0,34	14	0,18	8	0,00	0	0,19	22
7		216	0,01	1	0,07	3	0,00	0	0,04	4
			1,00	40	1,00	46	1,00	24	1,00	110
	S0115	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		177	0,00	0	0,02	1	0,00	0	0,01	1
2		191	0,22	10	0,05	2	0,07	2	0,12	14
3		194	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
4		198	0,15	7	0,10	4	0,00	0	0,09	11
5		200	0,01	1	0,42	18	0,11	3	0,20	22
6		202	0,21	9	0,00	0	0,04	1	0,09	10
7		204	0,38	17	0,25	11	0,31	8	0,31	36
8		206	0,00	0	0,00	0	0,33	9	0,08	9
9		208	0,02	1	0,13	5	0,13	4	0,09	10
10		225	0,00	0	0,03	2	0,00	0	0,02	2
			1,00	46	1,00	44	1,00	27	1,00	117

Fortsetzung Tabelle 21

	S0178	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		106	0,00	0	0,12	5	0,48	13	0,16	18
2		108	0,58	26	0,29	12	0,15	4	0,37	42
3		110	0,01	1	0,05	2	0,22	6	0,08	9
4		112	0,03	1	0,20	8	0,15	4	0,12	13
5		114	0,00	0	0,13	5	0,00	0	0,04	5
6		116	0,00	0	0,04	2	0,00	0	0,02	2
7		118	0,04	2	0,17	7	0,00	0	0,08	9
8		120	0,33	15	0,00	0	0,00	0	0,13	15
			1,00	45	1,00	41	1,00	27	1,00	113
	S0225	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		165	0,00	0	0,00	0	0,06	2	0,02	2
2		169	0,20	9	0,00	0	0,00	0	0,07	9
3		171	0,03	1	0,12	6	0,06	2	0,06	9
4		175	0,14	6	0,02	1	0,00	0	0,06	7
5		177	0,01	1	0,04	2	0,00	0	0,02	3
6		179	0,00	0	0,20	9	0,00	0	0,08	9
7		181	0,01	1	0,45	21	0,03	1	0,19	23
8		187	0,60	26	0,17	8	0,85	28	0,50	62
			1,00	44	1,00	47	1,00	33	1,00	124

Fortsetzung Tabelle 21

	SW911	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		147	0,11	4	0,00	0	0,00	0	0,04	4
2		149	0,41	17	0,00	0	0,00	0	0,14	17
3		151	0,01	1	0,01	1	0,00	0	0,02	2
4		153	0,43	18	0,52	24	0,00	0	0,36	41
5		155	0,00	0	0,26	13	0,00	0	0,12	13
6		157	0,00	0	0,03	2	0,00	0	0,02	2
7		159	0,04	2	0,05	2	0,02	0	0,04	4
8		161	0,00	0	0,06	3	0,08	2	0,04	5
9		163	0,00	0	0,06	3	0,13	3	0,05	6
10		166	0,00	0	0,00	0	0,19	5	0,04	5
11		168	0,00	0	0,00	0	0,19	5	0,04	5
12		170	0,00	0	0,00	0	0,10	3	0,03	3
13		172	0,00	0	0,00	0	0,04	1	0,01	1
14		182	0,00	0	0,00	0	0,08	2	0,02	2
15		196	0,00	0	0,00	0	0,17	4	0,04	4
			1,00	41	1,00	48	1,00	24	1,00	114
	SW951	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		120	0,00	0	0,00	0	0,03	2	0,01	2
2		122	0,16	7	0,64	27	0,64	31	0,48	65
3		124	0,34	15	0,24	10	0,23	11	0,27	36
4		126	0,34	15	0,00	0	0,02	1	0,12	16
5		128	0,02	1	0,12	5	0,03	2	0,06	8
6		130	0,00	0	0,00	0	0,05	2	0,01	2
7		132	0,14	6	0,00	0	0,00	0	0,04	6
			1,00	44	1,00	42	1,00	48	1,00	134

Fortsetzung Tabelle 21

	S0386	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		151	0,01	1	0,02	1	0,00	0	0,02	2
2		153	0,00	0	0,21	8	0,04	2	0,08	10
3		155	0,00	0	0,16	7	0,00	0	0,05	7
4		157	0,02	1	0,01	1	0,00	0	0,02	2
5		159	0,06	2	0,00	0	0,12	5	0,05	7
6		161	0,42	18	0,48	20	0,69	31	0,53	69
7		163	0,00	0	0,01	1	0,10	5	0,05	6
8		165	0,02	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
9		167	0,12	5	0,00	0	0,00	0	0,04	5
10		171	0,35	15	0,11	4	0,04	2	0,16	21
			1,00	43	1,00	41	1,00	45	1,00	129
	S0215	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		152	0,27	12	0,47	16	0,29	9	0,34	37
2		154	0,62	28	0,50	17	0,71	22	0,61	67
3		159	0,11	5	0,03	1	0,00	0	0,05	6
			1,00	45	1,00	34	1,00	31	1,00	110

Fortsetzung Tabelle 21

	S0068	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		226	0,00	0	0,10	4	0,00	0	0,03	4
2		228	0,87	40	0,27	13	0,45	14	0,52	67
3		230	0,00	0	0,05	3	0,00	0	0,02	3
4		232	0,00	0	0,03	1	0,00	0	0,01	1
5		234	0,00	0	0,19	9	0,00	0	0,07	9
6		236	0,00	0	0,09	3	0,00	0	0,02	3
7		244	0,00	0	0,07	4	0,21	7	0,09	11
8		248	0,00	0	0,17	7	0,21	7	0,11	14
9		250	0,03	2	0,00	0	0,00	0	0,02	2
10		252	0,02	1	0,01	1	0,00	0	0,02	2
11		256	0,00	0	0,00	0	0,05	2	0,02	2
12		258	0,02	1	0,01	1	0,06	2	0,03	4
13		260	0,05	2	0,01	1	0,02	1	0,03	4
			1,00	46	1	47	1,00	31	1,00	124
No.	SW857	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		138	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
2		141	0,05	2	0,00	0	0,00	0	0,02	2
3		143	0,18	7	0,34	16	0,08	3	0,22	26
4		147	0,01	1	0,00	0	0,06	2	0,03	3
5		149	0,18	7	0,07	3	0,09	3	0,11	13
6		151	0,25	10	0,18	8	0,38	13	0,25	31
7		153	0,09	3	0,18	8	0,27	9	0,17	20
8		155	0,08	3	0,05	3	0,12	4	0,08	10
9		157	0,06	2	0,12	6	0,00	0	0,07	8
10		159	0,01	1	0,05	3	0,00	0	0,03	4
11		161	0,09	3	0,00	0	0,00	0	0,03	3
			1,00	40	1	47	1,00	33	1,00	120

Fortsetzung Tabelle 21

	SW936	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		81	0,00	0	0,00	0	0,08	4	0,03	4
2		85	0,09	4	0,00	0	0,10	5	0,06	9
3		93	0,13	6	0,08	4	0,09	5	0,10	15
4		97	0,30	14	0,34	16	0,11	5	0,24	35
5		102	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
6		106	0,00	0	0,02	1	0,11	5	0,04	6
7		108	0,08	3	0,14	7	0,09	5	0,10	15
8		111	0,36	17	0,33	16	0,28	14	0,33	47
9		113	0,03	1	0,08	4	0,08	4	0,06	9
10		116	0,00	0	0,01	1	0,03	2	0,01	3
			1,00	46	1,00	49	1,00	48	1,00	143
	S0355	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		241	0,00	0	0,00	0	0,01	1	0,01	1
2		243	0,26	12	0,60	30	0,16	6	0,36	48
3		246	0,16	7	0,22	11	0,39	15	0,25	33
4		248	0,00	0	0,00	0	0,03	1	0,01	1
5		250	0,01	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
6		256	0,03	2	0,03	2	0,36	13	0,13	17
7		258	0,13	5	0,02	1	0,01	1	0,05	7
8		261	0,03	1	0,00	0	0,00	0	0,01	1
9		263	0,00	0	0,02	1	0,00	0	0,01	1
10		266	0,10	4	0,00	0	0,00	0	0,03	4
11		268	0,27	12	0,11	5	0,04	1	0,14	18
			1,00	44	1,00	50	1,00	38	1,00	132

Fortsetzung Tabelle 21

	S0026	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		93	0,00	0	0,00	0	0,01	1	0,01	1
2		95	0,17	8	0,16	7	0,52	24	0,29	39
3		97	0,00	0	0,21	9	0,00	0	0,07	9
4		99	0,00	0	0,43	19	0,11	5	0,18	24
5		101	0,53	24	0,17	7	0,17	8	0,29	39
6		103	0,00	0	0,03	2	0,00	0	0,01	2
7		115	0,30	14	0,00	0	0,18	8	0,16	22
			1,00	45	1,00	45	1,00	46	1,00	136
	SW24	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		92	0,00	0	0,01	1	0,40	12	0,11	13
2		96	0,01	1	0,02	1	0,03	1	0,02	3
3		98	0,00	0	0,00	0	0,07	2	0,02	2
4		100	0,00	0	0,00	0	0,10	3	0,02	3
5		102	0,13	5	0,20	9	0,07	2	0,13	16
6		106	0,15	6	0,17	8	0,07	2	0,13	16
7		108	0,15	6	0,00	0	0,00	0	0,05	6
8		110	0,10	5	0,05	3	0,00	0	0,07	8
9		112	0,13	6	0,18	8	0,00	0	0,12	14
10		114	0,03	2	0,26	12	0,27	8	0,18	22
11		116	0,16	7	0,04	2	0,00	0	0,07	9
12		118	0,15	6	0,06	3	0,00	0	0,07	9
			1,00	44	1,00	47	1,00	30	1,00	121

Fortsetzung Tabelle 21

No.	S0218	Allele	DE	N	DL	N	Pi	N	alle	N
1		143	0,23	10	0,00	0	0,11	4	0,12	14
2		145	0,35	15	0,00	0	0,00	0	0,13	15
3		151	0,03	2	0,00	0	0,00	0	0,02	2
4		155	0,08	3	0,00	0	0,00	0	0,03	3
5		161	0,02	1	0,02	1	0,42	16	0,16	18
6		175	0,00	0	0,06	2	0,00	0	0,02	2
7		177	0,00	0	0,00	0	0,16	6	0,06	6
8		179	0,28	12	0,00	0	0,32	12	0,21	24
9		182	0,00	0	0,22	7	0,00	0	0,06	7
10		184	0,00	0	0,06	2	0,00	0	0,02	2
11		187	0,00	0	0,03	1	0,00	0	0,01	1
12		189	0,00	0	0,06	2	0,00	0	0,02	2
13		199	0,00	0	0,03	1	0,00	0	0,01	1
14		201	0,00	0	0,03	1	0,00	0	0,01	1
15		203	0,00	0	0,48	15	0,00	0	0,13	15
			1,00	44	1,00	32	1,00	38	1,00	114

9. Konsequenzen für evtl. weitere Forschungsaktivitäten

Diese Arbeit zeigt, wie sinnvoll sich DNA-Marker zur Analyse der genetischen Diversität und der Abstammung einsetzen lassen. In Zukunft wird sicherlich eine weitere Steigerung der Effizienz des Analyseverfahrens notwendig sein. Die nächste Generation der Analytik, die DNA-Chips werden auch in der Abstammungskontrolle und Identitätskontrolle eine bedeutende Rolle einnehmen. Voraussetzung dazu ist die Entwicklung von sogenannten SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), die in großer Zahl auf den Chips untersucht werden können.

10. Mitteilung über evtl. schützenswerte Nutzungsrechte

keine

11. Liste über Veröffentlichungen

Kleinwächter et al. (2001): Genetische Variationen von Mikrosatellitenloci in nordrhein-westfälischen Schweinepopulationen. Proc. Vortragsstagung der DGfZ und der GfT am 12. und 13. September 2001, München

12. Liste über Vorträge

Kleinwächter, Wimmers (2001): Molekulare Abstammungskontrolle beim Schwein. Workshop Genomanalyse, Gesellschaft zur Förderung der Schweinehaltung, Ascheberg, 5. Juli 2001

Kleinwächter et al. (2001): Genetische Variationen von Mikrosatellitenloci in nordrhein-westfälischen Schweinepopulationen. Vortragstagung der DGfZ und der GfT am 12. und 13. September 2001, München

13. Liste über Pressemitteilungen

keine

14. Liste über Posterpräsentationen, Vorführung und Demonstrationen

Schellander, Wimmers (2001): Beiträge der Tierzucht zur Produktion von hochwertigen Lebensmitteln. Präsentation des Forschungsschwerpunktes „Umweltverträgliche und standortgerechte Landwirtschaft“, Landtag, 29. und 30. März, Düsseldorf und Münsterplatz, 26. Mai 2001, Bonn

15. Kurzfassung

In diesem Forschungsprojekt wurde eine molekulare Verfahren zur Abstammungs- und Identitätskontrolle an den Schweinerassen Deutsche Landrasse, Deutsches Edelschwein und Pietrain aus nordrhein-westfälischen Zuchtgebieten entwickelt. Besonderes Augenmerk wurde auf ein tierschonendes Probeentnahmeverfahren gelegt. Als Gewebequelle erwiesen sich die Haarwurzelzellen von 6 Haaren als geeignet um für die Analysen ausreichend DNA zur Verfügung zu bekommen. Die Haare müssen mit einer Flachzange an ihrer Basis gefasst und ausgezogen werden. Als geeigneter und Probennehmer leicht zugänglicher Ort erwies sich der Widerrist. Die Freisetzung der DNA aus den Follikelzellen wurde durch Inkubation in einem Verdauungspuffer einfach erzielt. Die in diesem Verfahren hergestellte DNA-Menge reicht quantitativ und qualitativ für bis zu 50 PCR-Ansätze aus. Für die Abstammungs- und Identitätskontrolle wurde zunächst die Variabilität von 25 Mikrosatellitenloci in den drei Rassen überprüft. Es zeigte sich, dass generell eine hohe Variabilität mit 3 – 16 Allelen pro Locus, mit einem Durchschnitt von 6 Allelen pro Locus zu finden war. Der durchschnittliche Heterozygotiegrad war mit 0,72 bei DL am höchsten, gefolgt mit 0,67 bei De und 0,62 bei Pi. Die Mikrosatelliten erwiesen sich zum größeren Teil als sehr informativ mit PIC-Werten (Polymorphic Information Content) zwischen 0,42 und 0,87. Die berechneten Ausschlusswahrscheinlichkeiten der Einzelloci waren zwischen 15,1 % und 77,6 %. Wurden die informativsten Loci kombiniert betrachtet, so konnten mit 5, 6 bzw. 7 Loci Ausschlusswahrscheinlichkeiten von 99,4 %, 99,7 % bzw. 99,9 % erreicht werden. Für die routinemäßige Abstammungs- und Identitätskontrolle wurden drei Multiplex-PCR mit jeweils 5 Loci zusammengestellt. Die Kombination der ersten beiden 5 Plex-PCRs ergibt Ausschlusssicherheiten von mehr als 99,9 % über alle Rassen. Für seltene Sonderfälle wurde die

dritte Multiplex-PCR zusätzlich entwickelt um Ausschlüsse mit nur einem einzelnen Locus nach Möglichkeit zu verhindern. Das in diesem Projekt erarbeitete Verfahren basiert auf einer sehr einfachen Probenentnahme, einer vereinfachten DNA-Aufbereitung und auf 2-PCR-Reaktionen um die Variabilität an 10 Mikrosatellitenloci für die Abstammung nachzuweisen. Damit werden sehr hohe Ausschlussicherheiten, wie sie in der Abstammungs- und Identitätskontrolle verlangt werden, erreicht.