

ALAIN C. FRANTZ, ADY KRIER, Sheffield und Luxemburg

Weitere Nachweise für illegale Aussetzungen von Rotwild (*Cervus elaphus*) in Luxemburg

Schlagworte: Exclusions-Teste, Wildtier-Forensik, Wildtier-Genetik, Rotwild, *Cervus elaphus*, Luxemburg

1. Einleitung

Auswilderungen sind in Luxemburg nicht nur gesetzlich verboten (ANONYM 1956), sie bergen auch das Risiko der Einschleppung von Krankheiten (KAHN et al. 2004, FEVRE et al. 2006). In einer früheren Studie wurden, per Genetik, Beweise erbracht, dass Rotwild im Nordwesten Luxemburgs nicht der autochthonen Population angehörte (FRANTZ et al. 2006). Die genetischen Profile der verdächtigen Tiere, erstellt anhand von Mikrosatelliten, unterschieden sich wesentlich von Referenzprofilen einheimischer Tiere. Es konnte somit, mit hoher Sicherheit, ausgeschlossen werden, dass diese Tiere aus lokalen Populationen stammten. Ziel der Luxemburger Forstverwaltung war es, einwandfrei illegale Auswilderung nachzuweisen, um dadurch von weiteren Auswilderungen abzuschrecken.

Ein Problem der vorangegangenen Untersuchung war es, dass keine hochwertigen Gewebeproben von den verdächtigen Tieren zur Verfügung standen, sondern dass DNS aus Wurzeln von ausgefallenen Haaren gewonnen werden musste (FRANTZ et al. 2006). Es ist bekannt, dass sich dieses Material eher schlecht zur Genotypisierung mit Mikrosatelliten eignet, da die DNS teilweise degeneriert ist (z.B. MORIN et al. 2001). Es war daher nötig, spe-

zielle Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen, um verlässliche Genotypen zu erstellen (FRANTZ et al. 2006). Insgesamt wurden vier verschiedene genetische Profile identifiziert, d.h. Haare von vier verschiedenen Tieren wurden gesammelt. Alle Profile wurden wenigstens zweimal genotypisiert, um sicherzustellen, dass die Resultate verlässlich waren. Jedes der vier Profile wies jedoch wenigstens eine Ausprägung (Allel) eines Mikrosatelliten auf, die nicht in der Referenzpopulation vorkam. Die Echtheit dieser sogenannten privaten Allele konnte nur bei einem verdächtigen Tiere einwandfrei belegt werden, da mehrere Haare von diesem Tier gesammelt wurden und die entsprechenden genetischen Profile dieses private Allel aufwiesen. In den drei anderen Fällen bestand die theoretische Möglichkeit, dass die privaten Allele ein Probespezifisches Artefakt waren, das durch schlechte Qualität des DNS Extraktes entstand.

In Luxemburg herrscht Meldepflicht für erlegte Hirsche. In den Jahren 2005 und 2006 waren Beamte der Luxemburger Forstverwaltung bei einem erlegten und einem totgefahrenen Hirschen auf Ohrmarkenspuren aufmerksam geworden. Diese zwei verdächtigen Tiere ermöglichten es daher, genetische Profile aus hochwertigen Gewebeproben zu erstellen und, ähnlich wie in FRANTZ et al. (2006), die Wahr-

scheinlichkeit ihrer Zugehörigkeit zu der lokalen Population zu errechnen.

Ziel der hier vorgestellten Untersuchung war es, anhand von hochwertigen Gewebeproben erstellten genetischen Profilen, weitere Beweise für illegale Aussetzungen von Rotwild in Luxemburg zu finden. Sollten die beiden verdächtigen Tiere mit hoher Wahrscheinlichkeit als nicht autochthon eingestuft werden, dürfte ein letzter, schwer angreifbarer, Beweis erbracht worden sein, dass Hirsche in Luxemburg ausgewildert wurden.

2. Methodik

Um eine Vergleichsbasis zwischen autochthonen und ausgewilderten Tieren zu schaffen, wurden für 412 Gewebeproben aus Frankreich, Luxemburg, Belgien, dem Hunsrück und der Eifel ein aus 13 Mikrosatelliten bestehendes genetisches Profil erstellt. Die Proben mussten über eine re-

lativ große Region gesammelt werden, um die Möglichkeit auszuschliessen, dass die verdächtigen Tiere aus Nachbarregionen zugewandert waren (Abb. 1). Wie in FRANTZ et al. (2006) erklärt, war es notwendig, die genetische Struktur der Referenzpopulation zu untersuchen, da das Verbinden von genetischen Profilen aus verschiedenen genetischen Subpopulationen die Wahrscheinlichkeitsrechnung verfälscht (FAVRE et al. 1997, GOUDET et al. 2002).

Mit Hilfe des Programmes BAPS v.4.1 (CORANDER et al. 2006), identifizierten FRANTZ et al. (2006) drei verschiedene genetische Populationen (Abb. 1): Alle Tiere, die in Luxemburg, Belgien und in Rheinland-Pfalz nördlich der Mosel erlegt wurden, konnten einer Subpopulation zugeordnet werden (Population „Nord“), während die meisten Tiere aus dem Hunsrück südlich der Mosel einer weiteren Subpopulation angehörten (Population „Süd“). Die französischen Hirsche bildeten die dritte Subpopulation (Population „Frankreich“). Es

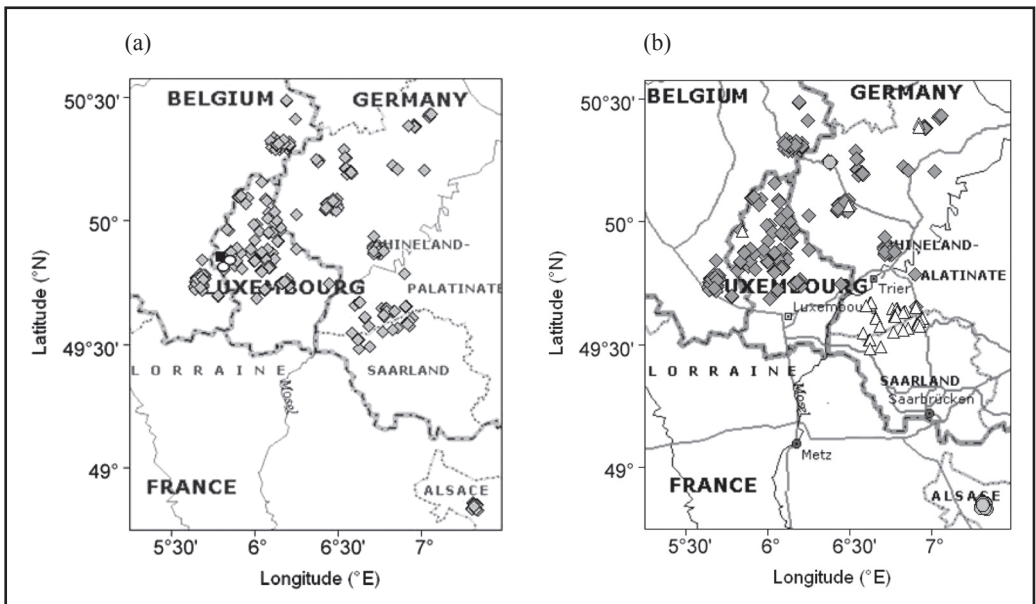


Abb. 1

(a) Verteilung der gesammelten Proben. Scharzes Quadrat: Herkunft der vier verdächtigen Tiere von denen Haarproben gesammelt wurden (siehe Frantz et al. 2006). Weisses Oval: Herkunftsort der zwei verdächtigen Tiere von denen Gewebeproben zur Verfügung standen.

(b) Karte der mit Programm BAPS bestimmten Gruppenzugehörigkeit der Tiere in der Referenzpopulation

konnte nun errechnet werden, dass drei der vier Haarproben, mit einer Sicherheit von mehr als 99,9 % aus keiner der drei genetischen Populationen stammten. Der vierte Hirsch konnte mit ähnlich hoher Sicherheit aus zwei Populationen ausgeschlossen werden, aber mit nicht mehr als 99,6 % aus der Dritten.

DNS wurde mit Hilfe einer Ammonium Azetat Methode isoliert (RICHARDSON et al. 2001). Die Proben wurden mit Hilfe von dreizehn Mikrosatelliten untersucht: *BM1818*, *Cer14*, *CSPS115*, *CSSM14*, *CSSM16*, *CSSM19*, *CSSM22*, *CSSM66*, *ETH225*, *Haut14*, *ILSTS06*, *INRA35*, *MM12* (KUEHN et al. 2003). Genauere Details zur Methodik befinden sich in FRANTZ et al. (2006). Mit einer Ausnahme wurde jeder der 13 Mikrosatelliten, in jeder der beiden Gewebeproben, wenigstens dreimal amplifiziert. Falls in den verdächtigen Profilen ein Allel auftrat, das nicht in der Referenzpopulation vorkam, wurde dessen Echtheit bestätigt, indem der in Frage kommende Mikrosatellit, in einer zweiten, unabhängig extrahierten, DNS Probe ein weiteres Mal amplifiziert wurde.

Ein sogenannter „Exklusions Test“ im Programm GENECLASS2 (PIRY et al. 2004) wurde benutzt, um die Wahrscheinlichkeitswerte zu errechnen für die Hypothese, dass die suspekten Individuen in einer der drei Subpopulationen geboren wurden. Anhand von Allelfrequenzen in den lokalen Populationen werden eine große Anzahl (z.B. 1 000 oder 10 000) genetische Profile simuliert und mit den zu bewertenden Profilen verglichen. Um ein zu bewertendes Profil mit, zum Beispiel, mehr als 99,9 % Sicherheit aus der lokalen Population ausschließen zu können, muss das Profil in weniger als einem aus tausend simulierten genetischen Profilen vorkommen (RANNALA und MOUNTAIN 1997, CORNUET et al. 1999). Wie bereits erwähnt, muss die Wahrscheinlichkeit für jede einzelne Subpopulation errechnet werden. Die bayesischen Kriterien von RANNALA und MOUNTAIN (1997) wurden für die Zugehörigkeitsbestimmung benutzt und die Methode von PAETKAU et al. (2004) für die Wahrscheinlichkeitsrechnung. In den Exklusions Tests wird angenommen, dass alle Mikrosatelliten sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht befinden. Wie zuvor berichtet, war dies nicht der Fall für Mikrosatellit CSSM66 in der nördlichen Population, die Luxemburg, Belgien

und die Eifel umfasste (FRANTZ et al. 2006). Die Auswertung wurde deshalb mit und ohne diesen Locus ausgeführt.

3. Resultate

Die Profile der zwei verdächtigen Tiere sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Mit Ausnahme von Locus *CSSM19* in Probe CM 464, wurden alle Mikrosatelliten wenigstens dreimal amplifiziert. Dabei wurde stets der gleiche Genotyp erhalten. Locus *Haut14* in CM 464 hatte ein Allel (127), das nicht in den Referenzpopulationen vorkam. Dieses Allel wurde auch in der zweiten, unabhängig extrahierten Probe erhalten, so dass es sich hierbei nicht um ein Artefakt handelt.

Die Wahrscheinlichkeit, dass die zwei verdächtigen Tiere den drei einheimischen Populationen angehören, ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Tier CM 464 konnte mit großer Wahrscheinlichkeit von allen drei Subpopulationen ausgeschlossen werden ($P \leq 0.0003$). Die Wahrscheinlichkeit, dass Tier GA 13/06 aus den beiden Populationen im Hauptstudiengebiet (nicht Frankreich) stammte, war höher, lag jedoch noch unter 0,005. Wie zuvor berichtet, war Mikrosatellit *CSSM66* nicht im Hardy-Weinberg Equilibrium in der Population, die Luxemburg, Belgien und die Eifel umfasste. Prinzipiell wurden die gleichen Resultate erzielt, wenn Locus *CSSM66* nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde (Tabelle 2).

4. Diskussion

In einer vergangenen Studie wurden Beweise erbracht, dass vier Stück Rotwild illegal in Luxemburg ausgewildert wurden (FRANTZ et al. 2006). Drei der vier Tiere konnten mit mehr als 99,9 % Sicherheit aus allen drei Populationen im Studiengebiet ausgeschlossen werden. Ein Problem dieser vorangegangenen Untersuchung war es, dass die genetischen Profile von DNS erstellt wurden, die aus Wurzeln von ausgefallenen Haaren gewonnen wurde. Obwohl eher unwahrscheinlich, blieb deshalb die Möglichkeit bestehen, dass die Privaten Allele, die in den Profilen der verdächtigen Tiere vorkamen, ein Probe-spezifisches Artefakt waren,

Tabelle 1 Genotypen der zwei verdächtigen Proben, die durch wiederholtes Amplifizieren erhalten wurden. Der Konsens Genotyp wurde für weitere Analysen benutzt.

Das fettgedruckte Allel kam nicht in der Referenzpopulation vor. Im Falle von Probe CM 464 wurde Locus *Haut14* in einer zweiten, unabhängig extrahierten, DNS Probe ein weiteres Mal amplifiziert.

Probe	Allele der Mikrosatelliten											
	<i>BM1818</i>		<i>Cer14</i>		<i>CSPS115</i>		<i>CSSM14</i>		<i>CSSM16</i>		<i>CSSM19</i>	
CM 464	243	252	222	226	246	252	140	140	152	160	149	167
	243	252	222	226	246	252	140	140	152	160	149	167
	243	252	222	226	246	252	140	140	152	160		
	243	252							152	160		
2. Extrakt												
Konsens	243	252	222	226	246	252	140	140	152	160	149	167
GA 13/06	252	260	226	226	246	246	140	142	152	160	154	154
	252	260	226	226	246	246	140	142	152	160	154	154
	252	260	226	226	246	246	140	142	152	160	154	154
	252	260	226	226	246	246	140	142	152	160		
Konsens	252	260	226	226	246	246	140	142	152	160	154	154

Probe	Allele der Mikrosatelliten											
	<i>CSSM22</i>		<i>CSSM66</i>		<i>ETH225</i>		<i>Haut14</i>		<i>ILSTS06</i>		<i>INRA35</i>	
CM 464	214	220	184	186	157	159	125	127	282	296	117	118
	214	220	184	186	157	159	125	127	282	296	117	118
	214	220	184	186	157	159	125	127	282	296	117	118
	214	220	184	186	157	159						
2. Extrakt							125	127				
Konsens	214	220	184	186	157	159	125	127	282	296	117	118
GA 13/06	218	218	186	186	157	157	116	125	288	290	117	118
	218	218	186	186	157	157	116	125	288	290	117	118
	218	218	186	186	157	157	116	125	288	290	117	118
	218	218	186	186			116	125	288	290	117	118
Konsens	218	218	186	186	157	157	116	125	288	290	117	118

Tabelle 2 Mit *GENECLASS 2* errechnete Wahrscheinlichkeit (*P*), dass die im Verdacht von illegaler Einführung stehenden Tiere aus den heimischen Population stammen.

A = Anzahl der ausgewerteten Mikrosatelliten.
Nord = Population in Luxemburg, Belgien und Eifel;
Süd = Population im Hunsrück und Saarland.

Probe		Wahrscheinlichkeit der Populationszugehörigkeit				
		Alle Mikrosatelliten			Ohne CSSM66	
	A	Nord	Süd	Frankreich	A	Nord
CM 464	13	0.0003	< 0.0001	< 0.0001	12	0.0003
GA 13/06	13	0.0034	0.0044	< 0.0001	12	0.0046

das durch schlechte Qualität des DNS Extraktes entstand.

Für diese Studie standen uns hochwertige Gewebeproben von Hirschen, die mit Ohrmarkenlöchern aufgefunden wurden, zur Verfügung. Mehrmaliges Wiederholen der Genotypisierung ergab jedesmal die selben Resultate. Lokus *Haut14* im Profil CM 464 hatte ein Allel, das nicht in den Referenzpopulationen vorkam. Es wurde auch in der zweiten, unabhängig extrahierten, Probe erhalten. Diese Ergebnisse lassen keinen Zweifel an der Verlässlichkeit der genetischen Profile der verdächtigen Tiere zu. Desweiteren kam das private Allel auch in einer der vier Haarprofile (HP1) aus FRANTZ et al. (2006) vor, was, im Nachhinein, einen Beweis für die Verlässlichkeit dieses Genotyps erbringt.

CORNUET et al. (1999) und MANEL et al. (2002) haben vorgeschlagen, dass in „Kriminalfällen“ Tiere mit mehr als 99,9 % Sicherheit aus einer Population ausgeschlossen werden sollten. In ökologischen Studien begnügt man sich hingegen meistens mit 99 % (z.B., SCHULTE-HOSTEDDE et al. 2001, BURNS et al. 2004, PRUETT und WINKER 2005). Die Wahrscheinlichkeitsrechnung zeigte, dass Probe CM 464 mit mehr als 99,9 % Sicherheit nicht aus den drei Populationen im Studiengebiet stammte. Das zweite Tier konnte mit 99,5 % Sicherheit aus allen drei Gruppen ausgeschlossen werden. Nur drei Tiere, in einer Referenzpopulation von 412 Individuen, konnten mit einer ähnlich großen Wahrscheinlichkeit aus allen Population ausgeschlossen werden (FRANTZ et al. 2006). Da beide Tiere Spuren von Ohrmarken in den Ohren aufwiesen, kann also geschlussfolgert werden, dass beide Tiere aus Gattern ausgewildert wurden.

Zusammenfassung

Auswilderungen sind in Luxemburg gesetzlich verboten. In einer vorangegangenen Studie wurden, per Genetik, Beweise erbracht, dass Rotwild illegal ausgewildert wurde. Ein Problem dieser vorangegangenen Untersuchung war es, dass die genetische Profile von DNS erstellt wurden, die aus Wurzeln von ausgefallenen Haaren gewonnen wurde. Die Möglichkeit, dass die genetischen Profile der verdächtigen Tiere ein Probe-spezifische Artefakt enthielten, konnte nicht absolut ausgeschlossen werden. In diesem Beitrag wurden genetische Profile von zwei toten Hirsche erstellt, die Ohrmarkenspuren aufwiesen. Es standen hochwertige Gewebeproben zur DNS Extrahierung zur Verfügung. Wiederholte Genotypisierung ergab verlässliche genetische Profile. Beide Tiere konnten mit Sicherheit aus den lokalen Populationen ausgeschlossen werden, was einen weiteren Beweis für das illegale Aussetzen von Hirschen in Luxemburg erbrachte.

Summary

Further evidence for illegal translocation of red deer (*Cervus elaphus*) in Luxembourg

In the Grand Duchy of Luxembourg, it is illegal for private individuals to translocate game species. Genetic evidence for the illegal introduction of a group of red deer was presented in a previous study. However, the genetic profiles of the suspect individuals had been generated from DNA extracted from shed hairs. It was not possible to absolutely exclude the possibility

that these profiles contained spurious alleles. Here, we generated genetic profiles from tissue samples of two dead deer that were suspected of clandestine introduction, owing to traces of earmarks. Reliable profiles were generated through replicate genotyping. Both deer could be excluded with high confidence from the three genetic populations in the study area, providing yet further evidence for illegal introduction of red deer into Luxembourg.

Literatur

- ANONYM (1956): Loi du 24 août 1956; ayant pour objet de modifier et de compléter la législation sur la chasse. – Mém. Luxembourg **45**: 983–989.
- BURNS, E.L.; ELDRIDGE, M.D.B.; HOULDEN, B.A. (2004): Microsatellite variation and population structure in a declining Australian Hylid *Litoria aurea*. – Mol. Ecol. **13**: 1745–1757.
- CORANDER, J.; MARTINEN, P.; SIREN, J.; TANG, J. (2006): BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure; Manual v.4.1. – Available at: <http://www.rni.helsinki.fi/~jic/bapspage.html>.
- CORNUET, J.M.; PIRY, S.; LUIKART, G.; ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M. (1999): New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. – Genetics **153**: 1989–2000.
- FAVRE, L.; BALLOUX, F.; GOUDET, J.; PERRIN, N. (1997): Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocodyrus russula*: evidence from field data and microsatellite patterns. – P. Roy. Soc. B. **264**: 127–132.
- FEVRE, E.M.; BRONSVORST, B.M.d.C.; HAMILTON, K.A.; CLEAVELAND, S. (2006): Animal movements and the spread of infectious diseases. – Trends Microbiol. **14**: 125–131.
- FRANTZ, A.C.; TIGEL POURTOIS, J.; HEUERTZ, M.; SCHLEY, L.; FLAMAND, M.C.; KRIER, A.; BERTOUILLE, S.; CHAUMONT, F.; BURKE, T. (2006): Genetic structure and assignment tests demonstrate illegal translocation of red deer (*Cervus elaphus*): into a continuous population. – Mol. Ecol. **15**: 3191–3203.
- GOUDET, J.; PERRIN, N.; WASER, P. (2002): Tests for sex-biased dispersal using bi-parentally inherited genetic markers. – Mol. Ecol. **11**: 1103–1114.
- KAHN, S.; DUBE, C.; BATES, L.; BALACHANDRAN, A. (2004): Chronic wasting disease in Canada: Part 1. – Canadian Vet. J. **45**: 397–404.
- KUEHN, R.; SCHROEDER, W.; PIRCHNER, F.; ROTTMANN, O. (2003): Genetic diversity; gene flow and drift in Bavarian red deer population (*Cervus elaphus*). – Cons. Genet. **4**: 157–166.
- MANEL, S.; BERTHIER, P.; LUIKART, G. (2002): Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multilocus genotypes. – Conserv. Biol. **16**: 650–659.
- MORIN, P.A.; CHAMBERS, K.E.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. (2001): Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). – Mol. Ecol. **10**: 1835–1844.
- PAETKAU, D.; SLADE, R.; BURDEN, M.; ESTOUP, A. (2004): Genetic assignment methods for direct; real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. – Mol. Ecol. **13**: 55–65.
- PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J.M.; PAETKAU, D.; BAUFDOUIN, L.; ESTOUP, A. (2004): GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. – J. Hered. **95**: 536–539.
- PRUETT, C.L.; WINKER, K. (2005): Northwestern song sparrow populations show genetic effects of sequential colonization. – Mol. Ecol. **14**: 1421–1434.
- RANNALA, B.; MOUNTAIN, J.L. (1997): Detecting immigration by using multilocus genotypes. – P. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 9197–9201.
- RICHARDSON, D.S.; JURY, F.L.; BLAAKMEER, K.; KOMDEUR, J.; BURKE, T. (2001): Parentage assignment and extra-group paternity in a cooperative breeder: the Seychelles warbler (*Acrocephalus sechellensis*). – Mol. Ecol. **10**: 2263–2273.
- SCHULTE-HOSTEDDE, A.I.; GIBBS, H.L.; MILLAR, J.S. (2001): Microgeographic genetic structure in the yellow-pine chipmunk (*Tamias amoenus*). – Mol. Ecol. **10**: 1625–1631.

Anschriften der Verfasser:

Dr. ALAIN C. FRANTZ
Department of Animal and Plant Sciences
University of Sheffield
Western Bank
Sheffield
S10 2TN
United Kingdom
Fax: +44 (0)114 222 0002
Tel.: +44 (0)114 222 0115
E-Mail: alainfrantz@yahoo.co.uk

ADY KRIER
Service de la Chasse
Direction des Eaux et Forêts
16 rue Eugène Ruppert
L-2453 Luxembourg
Luxembourg
E-Mail: ady.krier@ef.etat.lu

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Beiträge zur Jagd- und Wildforschung](#)

Jahr/Year: 2007

Band/Volume: [32](#)

Autor(en)/Author(s): Frantz Alain C., Krier Ady

Artikel/Article: [Weitere Nachweise für illegale Aussetzungen von Rotwild \(*Cervus elaphus*\) in Luxemburg 339-344](#)