

# Chromosomenstudien und andere Erhebungen an Equidenkreuzungen

Gerald Stranzinger<sup>1</sup>, Josef Achermann<sup>2</sup>, Fengtang Yang<sup>3</sup> und Dominik Burger<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ETHZ und Vetsuisse Zürich, 8092 Zürich

<sup>2</sup>Genetica AG, 8001 Zürich

<sup>3</sup>The Wellcome Trust-Sanger Institute., Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK

<sup>4</sup>Schweizerisches Nationalgestüt ALP-Haras, 1580 Avenches

Auskünfte: Gerald Stranzinger, Im Grund 27, 8123 Ebmatingen



Alpha (Kreuzungstute) mit Betafohlen Trolle (Vater Begase).

## Einleitung

Die Familie der Equiden umfasst die Chromosomenzahl von  $2n = 32$  (*E. zebra hartmannae*) bis  $2n = 66$  (*E. przewalskii*), (Ryder, Epel und Benirschke 1978). Das Hauspferd (*E. caballus*) mit der Chromosomenzahl  $2n = 64$  stammt nicht vom Przewalskipferd ab, sondern die evolutionäre Trennung erfolgte vor ca. zwei Millionen Jah-

ren (Oakenfull *et al.* 2000, Graphodatsky und Yang 2008) und die direkten Vorfahren unserer Hauspferde sind ausgestorben. Bei den heute noch lebenden Equiden-species ist die Fruchtbarkeit der Kreuzungsprodukte sehr stark eingeschränkt, mit Ausnahme zwischen Hauspferd und Przewalski. Maultiere und Maulesel ( $2n = 63$ ) als Kreuzungen zwischen Pferd und Esel sind fast zu 100 % unfruchtbar und die Gonadenentwicklung zwischen den

Geschlechtern ist sehr unterschiedlich ausgeprägt. Weibliche Maultiere und Maulesel zeigen eine fast vollständige Ovarienentwicklung mit einer Oozytenreifung und Ovulation. Die männlichen Maultiere und Maulesel entwickeln eine degenerative Spermatogenese bis zur Geschlechtsreife und haben kaum Spermien im Ejakulat (Allen and Short, 1997). Auch wurde die X-Chromosomeninaktivierung (Lyons Hypothese, Lyon 1961) bei weiblichen Maultieren untersucht und eine bevorzugte Inaktivierung des Esel-X-Chromosoms beobachtet, wobei mit dem Alter eines Individuums eine Selektion gegen die Zellen mit dem aktiven Esel-X auftreten kann, sodass die Zellen mit dem aktiven Pferde-X dominieren. Pferde-X und Esel-X-Chromosomen unterscheiden sich auch morphologisch, indem das Pferde-X metazentrisch und das Esel-X-Chromosom akrozentrisch ist. Zwischen den autosomen Esel und Pferdechromosomen bestehen mehrere strukturelle Unterschiede, die mit Bänderungsfärbungen z.T. dargestellt werden können (Yang *et al.* 2003, Tifonov *et al.* 2008). Bei Hauspferd und Przewalski sind die X Chromosomen morphologisch identisch und nur eine Robertson'sche Fusion zwischen den Chromosomen 23 und 24 reduzieren die Chromosomenzahl beim Hauspferd auf  $2n = 64$ , wobei daraus das typische Pferde Chromosom Nr. 5 entstanden ist. Genzuweisungen konnten diesen Tatbestand dokumentieren (Ahrens, 2004) helfen. Die fast ausgestorbenen Przewalski Pferde konnten in Zoos in den letzten 50 Jahren derart gut vermehrt werden, dass heute Auswilderungsprogramme in die Mongolei möglich wurden. Dabei treten natürlich neue Fragen auf, die mit genetischen Analysen, Verhaltensstudien und weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen beantwortet werden können (Feh und Munkhtuya 2008). Vergleichende Chromosomenkarten und Genanalysen haben wesentlich dazu beigetragen, dass die Abgrenzung der Equiden möglich wurde, besonders haben sich dabei auch die Bänderungsfärbungen, *in situ* Hybridisierungen und Genomscananalysen an den Chromosomen als sehr hilfreich erwiesen (Ansari *et al.* 1988, Bowling *et al.* 1997, Yang *et al.* 2003; Trifonov *et al.* 2008). Kreuzungsversuche zwischen Equidenarten können aus rechtlichen und biologischen Gründen nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden, obwohl daraus sehr wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden können, wie dies aus den folgenden Ausführungen dargestellt werden kann.

## Material und Methoden

Der Przewalski Hengst (EPR) stammt aus dem Tierpark der Stadt Zürich (Langenberg), wo eine Przewalskiherde und Sammeltiere für den Aussetzungsversuch in die Mongolei

### Zusammenfassung

Kreuzungen zwischen Pferd und Esel treten in der Natur auf und sie werden als Maultiere und Maulesel in der Landwirtschaft verwendet. Andere Kreuzungstypen sind selten und wenig erforscht. Systematische Kreuzungsversuche werden nur mit Ausnahmeregelungen erlaubt, sind sehr zeit- und kostenaufwendig und werden daher selten durchgeführt. In dieser Arbeit werden Kreuzungstiere aus der Kombination Hauspferd, Przewalski und Esel zytogenetisch und histologisch untersucht und deren Verhalten in speziellen Fortpflanzungseigenschaften beschrieben. Alle Tiere zeigten einen normalen Chromosomensatz bei entsprechender Segregation der möglichen Kombinationen. Die zytogenetischen Ergebnisse konnten mit einem partiellen Genomscan an den Geschlechtschromosomen und den EPR 23 und 24 bestätigt werden. Die Auswirkungen in der evolutiven Entwicklung werden diskutiert.

gehalten werden. Ein Junghengst wurde aus einer Dreiergruppe isoliert (Betäubung mittels Narkosegewehr-Teleinject-France, wiederverwendbare 3 ml Spritze S300V) und in einer speziellen Umzäunung mit einer Haflingerstute (ECA) (Abb. 1 a) zur Paarung zusammengebracht. Der Paarungs-Trächtigkeits- und Geburtsverlauf wurde per Videokamera festgehalten. Auch die Aufzucht des Fohlens Alpha (Abb. 1 b), dessen Entwicklung, Besamung mit Eselsperma (EAS) des Hengstes Babalu (Abb. 1 c) und Begase (Abb. 1 d) und die Geburt der vier Fohlen (Beta Jojo, Beta Lars, Beta Jasmin – Vater Babalu - und Beta Trolle – Vater Begase -) (Abb. 1 e, f, g, h) wurden genau erfasst und dokumentiert. Von allen Tieren wurden Blut- und Haarproben entnommen und Kurzzeit-Leukozytenkulturen angefertigt. (Humanchromosomenprotokoll der Genetica) für die Chromosomenanalyse durchgeführt. Ausserdem wurden bei den Foundertieren Muskelbiopsien entnommen und Fibroblastenkulturen angelegt (Ahrens 2004). Die Q.gebänderten Chromosomenpräparate wurden mit dem Zeiss Analysensystem ausgewertet und von den Elterntieren und Alpha Karyogramme erstellt. Zusätzlich wurden einige Tiere auf deren Testosteron Gehalt untersucht (Tab. 2). Vom Kreuzungstier Alpha wurde bei der ersten Geburt des Fohlens Beta Jojo auch eine histologische Untersuchung der Plazenta (Abb. 2 a), wie auch vom männlichen Fohlen Beta Lars eine hodenhistologische Untersuchung (Abb. 2 b) durchgeführt. Die meiotischen Untersuchungen beim männlichen Kreu- ➤





**Abb. 1** | Kreuzungsfamilie zwischen Pferd, Przewalski und Esel – a) Haflinger Stute und Przewalski Hengst; b) Haflinger Stute mit F1 Fohlen Alpha; c) Eselhengst Babalu; d) Eselhengst Begase; e) Alpha mit Beta Jojo; f) Beta Lars; g) Beta Jasmin; h) Alpha mit Beta Trolle (in Klammer = 2n Chromosomenzahl).

zungstier wurden sowohl mit der konventionellen Präparationsmethode für die Darstellung von Diakinesen als auch durch eine synaptonemale Complex Untersuchung erfasst. Alle speziellen Verhaltenserscheinungen wurden dokumentiert.

## Resultate

### Zytogenetische Untersuchungen

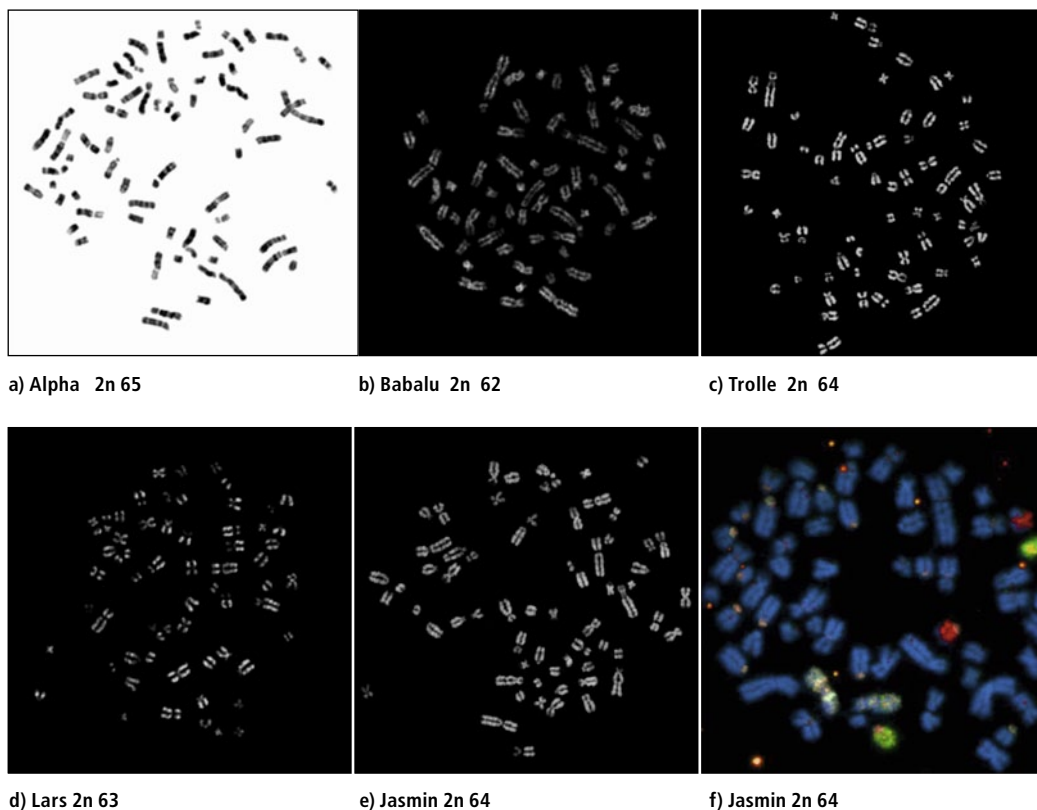
In der Tabelle 1 werden die chromosomalen Ergebnisse aller untersuchten Tiere der Kreuzungsfamilie zusammengestellt ( Tab. 1 ). Die Darstellung der Karyogramme erfolgte nur bei den Foundern und der Alpha Stute, wobei die Reihenfolge der Chromosomen in den Karyogrammen nach Hsu und

Benirschke (1967), (Reading Konf. 1976 in Ford et al. 1980) durchgeführt wurde. Es wurden keine Abweichungen von Literaturangaben festgestellt und in der Dissertation von Ahrens 2004 veröffentlicht Die X-Geschlechtschromosomen zwischen Esel und Pferd können eindeutig durch die Zentromerposition unterschieden werden. Das Pferde-X ist metazentrisch, das Esel-X submentazentrisch bis akrozentrisch. Zwischen Pferde- und Przewalski-X-Chromosomen besteht kein Unterschied, sodass deren Segregation in der Beta. Generation nicht ermittelt werden konnten, da keine Markeruntersuchungen durchgeführt wurden. Bei den weiblichen Beta Nachkommen kann das Esel-X-Chromosom identifiziert werden. Auch im Genomscan ist diese Situation klar erkennbar, d. h. nur die Esel-X-Chromosomen sind identifizierbar., der Rest

**Tab. 1** | Ergebnisse der Chromosomenanalyse und Besonderheiten bei allen untersuchten Tieren

Tier	Geschlecht	Anzahl Untersuchungen	Chromosomenzahl	Besonderheit
Haflinger	weibl	2	64	keine
Przewalski	männl.	1	66	keine
Alpha	weibl.	mehrere	65	Besamung
Beta Jojo	weibl.	mehrere	64	starke Rosse
Beta Lars	männl.	mehrere	63	Kryptorchid
Beta Jasmin	weibl.	mehrere	64	keine
Beta Trolle	männl.	1	64	keine
Esel, 2 Tiere	männl.	mehrere	62	keine

Alpha und Beta - Bezeichnung symbolisiert auch die Generationenfolge.



**Abb. 2** | Darstellung der Metaphasen : a) Alpha Kreuzungstute (inverted G-Band); b) Eselhengst (Q-Band); c) Beta Trolle männlich(Q-Band); d) Beta Lars männlich(Q-Band); e) Beta Jasmin(Q-Band); f) Beta Jasmin - Genom Scan (blau-weiss X Chromosomen, grün EPR 23, rot EPR 24) ECA = Equus caballus; EPR = Equus przewalski; EAS = Equus asinus.

besteht aus den zufällig segregierten ECA und EPR Chromosomen (Abb. 2). In der Abbildung 2 f können in der GenomScan Metaphase von Beta Jasmin auch die Przewalski Chromosomen EPR 23 und 24 klar von den homologen Esel EAS 23 und 24 unterschieden werden, da die EPR keine Translokationselemente (rote Teile) haben. Das ECA 5 hat nur der Hengst Beta Lars (Abb. 1 f und Abb. 2 d) mit der «Anzahl (n) Chromosomenzahl von 63 erhalten, wobei ECA 5q = EAS 16 (metazentrisch) und ECA 5 p = EAS 25 (acrozentrisch) ist; alle anderen Nachkommen von Alpha besitzen die EPR 23 und 24 (Beta Jojo, Beta Jasmin und Beta Trolle). Dies wird auch mit der 2n Chromosomenzahl von 64 dokumentiert.

#### Testosteronbestimmung

Wie in der Tabelle 2 dargestellt wird, liegen die Testosteronwerte bei allen Tieren im Normalbereich, wobei der Eselhengst Begase sehr niedrige Werte (1,31myg/l) und Alpha als weibliches Tier einen relativ hohen Wert (0,19 myg/l) aufweist.

#### Histologische und zytologische Gonaden- und Placentauntersuchungen

Beta Lars zeigte in den Hodenpräparationen keine Spermatogenese, jedoch degenerative Formen der Sperma-

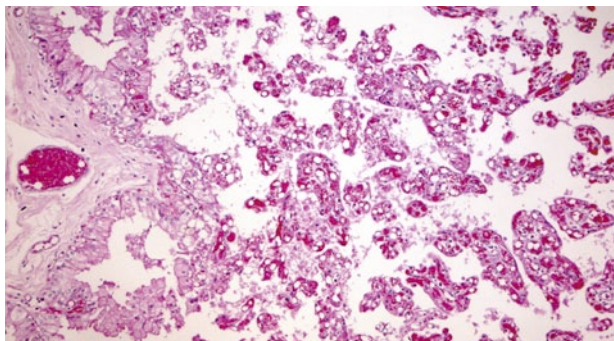
tonogonien (Abb. 3 b), sodass von seiner vollkommenen Sterilität ausgegangen werden kann. Dies wurde auch mit zytologischen Präparationen für Meiosestadien und mit synaptonemalen Complexpräparationen bestätigt. Histologische Präparationen am Uterusgewebe bei Alina (Haflingerstute, Mutter von Alpha) und bei Alpha zeigen keine Unterschiede (Abb. 3 a).

#### Verhaltensbeobachtungen

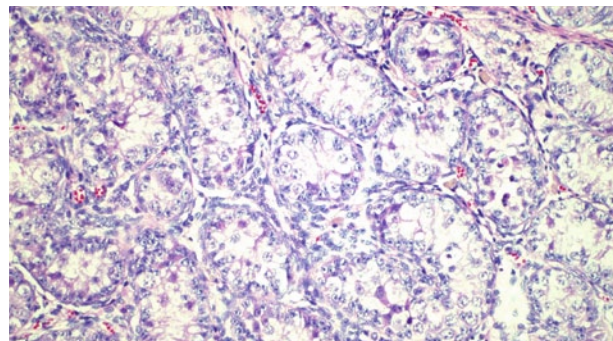
Das Deckverhalten bei Alpha war bei verschiedenen Versuchen besonders auffallend, da mit Pferdehengsten und Eselhengsten keine Deckung möglich war. Die Hengste wurden normalerweise im Gestüt für Paarungen verwendet, sodass deren Deckverhalten bekannt ▶

**Tab. 2** | Testosteronwerte der Versuchstiere

Tierbezeichnung	Testwert	Referenzwert
Eselhengst Babalu	5,31 myg/l	(0,5 - 4,0)
Eselhengst Begase	1,31 myg/l	
Beta Lars (Kryptorchid)	< 0,02 myg/l	(0,1 - 0,3)
Alpha	0,19 myg/l	(0,02)
Beta Jasmin	<0,02 myg/l	



a) Plazenta Alpha



b) Hoden Beta Lars

**Abb. 3** | Histologische Schnitte der a) Plazenta von Alpha und b) Hoden von Beta Lars (präpariert von Prof. Dr. A. Pospischil, Vetsuisse Fak. Univ. Zürich).

war. Alpha zeigte ein derart dominantes Verhalten, dass alle Hengste einen Deckakt verweigerten, von Alpha Abstand nahmen und kein weiteres Interesse mehr zeigten. Alpha konnte nur über eine Besamung zur Trächtigkeit gebracht werden. Besonders erwähnt werden muss, dass Alpha immer nach der ersten Besamung trächtig wurde und vier Fohlen zur Welt brachte. Der Geburtsverlauf war immer normal und ohne Probleme in der Nacht abgelaufen und die Aufzucht der Fohlen verlief immer ohne Krankheiten oder Verletzungen bei sehr guten täglichen Zunahmen. Der Embryonalstatus von Alpha wurde mit Ultraschall ermittelt, die Geburt mit Kameras erfasst und die weitere Entwicklung photographisch festgehalten. Alpha und die Beta-Tiere wurden normal wie andere Fohlen betreut und geführt. Das Verhalten der Beta-Tiere entsprach normalen Maultierfohlen.

## Diskussion

Die zytogenetischen Untersuchungen haben bei allen Tieren keine Anomalien, weder in der strukturellen, noch in der numerischen Form gezeigt. Die Segregation in den Beta-Tieren scheint den biologischen Gesetzen zu folgen, da beide Formen für das ECA 5 und die Homologen EPR 23 und 24 gefunden wurden. In den Beta-Kreuzungstieren sind durch die Eselschromosomen in mehreren Fällen keine Homologien zu erkennen (DiMeo *et al.* 2009). Da diese in den Bänderungsstrukturen und der Zentromerposition voneinander leicht abweichen und somit nicht nach dem Pferde- oder Eselbänderungsstandard gruppiert werden konnten, wurde auf eine Karyotypenerstellung verzichtet. Die abweichende strukturelle Form der EAS Chromosomen zu den ECA und EPR Chromosomen ist bekannt und trifft auch für die Beta Tiere zu, sodass deren Fruchtbarkeitsstatus den Maultier- oder Mauleselformen entsprechen könnte. Die Diskussion über «reine» Przewalskis und »andere» Przewalskis

ist daher mehr eine emotionale Diskussion ohne Kenntnisse der biologischen Realitäten. In den vorgelegten Studien konnte gezeigt werden, dass die Verhaltenseigenschaften der F1-Tiere zwischen Pferd und Przewalski eine grössere Rolle bei der Fortpflanzung spielen als die biologischen Fakten der Chromosomenunterschiede. Interessant wären *Crossing over*-Studien bei den Beta-Tieren, wobei zwischen ECA und EPR Chromosomen eher mit Crossing over zu rechnen ist als zwischen EPR und EAS Chromosomen. Da der Beta Lars Hengst keine Spermatogenese zeigte, sind die meiotischen Phänomene nicht relevant. Bei den weiblichen Beta-Tieren dürfte nach den Erfahrungen bei weiblichen Maultieren von Zong und Fun (1989) eine Oogenese stattfinden, sodass die meiotischen Abläufe von Interesse wären. Das ECA 5 stellt beim Pferd eine reines Fusionschromosom dar, welches zwar grösstenteils aus den EPR 23 und 24 besteht, jedoch können in allen autosomen Chromosomen Genaustauschphänomene (*Crossing over*) mit typischen Allelen stattfinden, die dann in speziellen Paarungen zum Ausdruck kommen können. Aus dieser Sicht ist die exklusive Paarung innerhalb der Przewalski Tiere für die «Reinerhaltung» der Wildpferde vorteilhaft, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotzdem ECA Allele in der Population vorkommen.

Bei der Aussetzung von Przewalskies in der Mongolei können Kreuzungen mit Pferdestuten vorkommen; der umgekehrte Fall ist jedoch auf Grund unserer Beobachtungen seltener, Kreuzungstuten dürften mit dominanten Przewalski Hengsten Nachkommen erzeugen. Pferdehengste und Kreuzungshengste haben mit Sicherheit gegenüber Przewalski Hengsten einen Verhaltensnachteil. Das älteste weibliche Tier (Beta Jojo) zeigte 2009 sehr starke Rosse, sodass sie mit Hormonpräparaten ruhig gestellt werden musste. Die Betrachtung von Zwangspaarungen und Besamung kann bei Freilandhaltung in grossen Revieren ausgeschlossen werden. ■

## Riassunto

### Studi cromosomici e altre indagini su incroci equini

Incroci tra cavallo e asino si verificano in natura e il risultato di tale incrocio è utilizzato in agricoltura come muli o bardotti. Altri generi di incrocio sono rari e poco studiati. Esperimenti sistematici di incrocio sono autorizzati solo con permessi speciali, sono molto impegnativi in termini di costi e tempo e, pertanto, effettuati raramente. In questo lavoro incroci derivati dalla combinazione tra cavallo domestico, Przewalski e asino sono stati esaminati citogeneticamente e istologicamente, descrivendo pure il loro comportamento in specifiche caratteristiche riproduttive. Tutti gli animali hanno mostrato un normale numero di cromosomi dopo la segregazione delle possibili combinazioni. I risultati citogenetici sono stati confermati con un parziale scan del genoma, in particolare dei cromosomi sessuali e degli EPR 23 e 24. Le conseguenze nello sviluppo evolutivo sono discusse.

## Literatur

- Ahrens E.J., 2004. Comparative chromosomal studies of *E. caballus* and *E. przewalskii* in a F1 hybrid. Vet. Diss. Zuerich, 1 – 101.
- Allen W.R. & R.V. Short, 1997. Interspecific and Extraspecific Pregnancies in Equids: Anything Goes. *Journal of Heredity* **88**, 384 – 392.
- Ansari H.A., Hediger R., Fries R. & Stranzinger G., 1988. Chromosomal localisation of the major histocompatibility complex of horse (ELA) by in situ hybridisation. *Immunogenetics* **28**, 362 – 364.
- Bowling A.T., Breen M., Chowdhary B.P. et al. (Committee), 1997. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. *Chromosome Res.* **5**, 433 – 443.
- Feh C. & Munkhtuya B., 2008. Male infanticide and paternity analyses in a socially normal herd of Przewalski's horses: Sexual selection. *Behavioural Processes* **78**, 335 – 339.
- Di Meo G.P., Perucatti A., Peretti V., Incarnato D., Ciotola F., Liotta L., Raudsepp T., Di Bernardino D., Chowdhary B. & Ianuzzi L., 2009. The 450-Band Resolution G- and R- Banded Standard Karyotype of the Donkey (*Equus asinus*, 2n = 62). *Cytogenet Genome Res.* **125**, 266 – 271.
- Ford C.E., Pollock D.L. & Gustavsson I., 1980. Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of domestic Animals, Reding, UK, 1976. *Hereditas* **92**, 145 – 162.
- Graphodatsky A.S. & Yang F., 2008. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. *Chromosome Research* **16**, 89 – 107.

## Summary

### Chromosome studies and other investigations on equid crossings

Crossings between horses and donkeys are in nature possible and are used as mules or hinnies in agriculture. Other types of crossings are rare and scarcely investigated. Systematic experiments are only allowed with special agreements and are very time consuming and costly and therefore rare. In this report crossings between horse, Przewalski and donkey are cytogenetically and histologically investigated and their behaviour in special reproductive traits described. All animals have shown a normal chromosome set following the segregation of possible combinations. The cytogenetic results have been confirmed by a genomescan for the sex chromosomes and the EPR 23 and 24. The consequences in the evolutionary development are discussed.

**Key words:** Equid, chromosome, histology, behaviour.

- Hsu T.C. & Benirschke K., 1967. An Atlas of Mammalian Chromosomes. Springer Verlag: Berlin- Heidelberg- New York.
- Koulicher L., & Fechkop S., 1966. Chromosome complement: A fertile hybrid between *Equus przewalskii* and *Equus caballus*. *Science* **151**, 93 – 95.
- Lyon M.F., 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372 – 373.
- Oakenfull E.A., Lim H.N. & Ryder O.A., 2000. A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of *Equus*. *Conservation Genet* **1**, 341 – 355.
- Ryder O.A., N.C. Epel & Benirschke K., 1978. Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenet. Cell Genet* **20**, 323 – 350.
- Trifonov V.A., Stanyon R., Nesterenko A.I., Beiyuan F., Perelman P.L., O'Brien P. C.M., Stone G., Rubtsova N.V., Houck M.L., Robinson T.J., Ferguson-Smith M.A., Dobigny G., Graphodatsky A.S. & Yang F., 2008. Multidirectional cross-species painting illuminates the history of karyotypic evolution in Perissodactyla. *Chromosome Research* **16**, 89 – 107.
- Yang F., Beiyuan F., Patricia C.M., O'Brien, Wenhui N., O. A., Ryder, Malcolm A., & Ferguson-Smith, 2003. Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules. *Chromosome Research* **5**, 433 – 443.
- Zong E. & Fan G., 1989. The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. *Heredity* **62**, 393 – 406.