

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Entstehung und Bedeutung genetischer Variabilität

Genetische Variabilität bildet die Basis für natürliche und künstliche Selektion und stellt damit eine wichtige Voraussetzung für das Überleben von Populationen dar. Die Ziele populationsgenetischer Untersuchungen bestehen deshalb hauptsächlich in der Bestimmung der Höhe der genetischen Variabilität und in der Charakterisierung von Mechanismen zur Erhaltung dieser Variabilität als Basis für den Zuchtfortschritt. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, genetische Variabilität zu erfassen.

Unterschiedliche morphologische Strukturen, wie z.B. Fell- und Gefiederfärbungen oder bestimmte Körperformen und Leistungen, sind Merkmale, die ebenso, wie z.B. Blutzell-Antigene und Enzyme, der phänotypischen Variabilität zuzuordnen sind und überwiegend auf der Wirkung verschiedener Genorte beruhen. Die Untersuchung dieser Merkmale wird oft erst möglich, wenn ein Individuum ein bestimmtes Entwicklungsstadium erreicht hat, in dem z.B. ein Allel exprimiert wird. Biochemische und immunologische Analysen erfordern spezifisches Gewebematerial von hoher Qualität, so daß eine Untersuchung *in vivo* selten möglich ist.

Diese Einschränkungen können umgangen werden, wenn genetische Variabilität direkt auf dem Niveau der DNA untersucht wird. Diese Verschiedenartigkeit entsteht durch Mutation und Rekombination (bei sexueller Fortpflanzung). Doch nicht jede Veränderung des genetischen Materials (Mutation) führt zu einer Veränderung der exprimierten Aminosäuresequenz, weil der genetische Code degeneriert ist und vor allem Änderungen des dritten Nucleotids im Gegensatz zu Mutationen beim ersten oder zweiten Nucleotid des Codes seltener zur Expression einer anderen Aminosäure führen (Nei, 1987). Dabei kann eine neue Aminosäurezusammensetzung eines Proteins einen Selektionsvorteil bei gegebenen Umweltbedingungen bedeuten, sich neutral auswirken oder aber einen Nachteil darstellen. Da sich also nicht alle Mutationen auf die Expression von Aminosäuresequenzen auswirken und diese sich nicht in jedem Fall durchsetzen können, ist auf der Ebene der DNA eine größere genetische Variabilität vorhanden als bei der Untersuchung phänotypischer

Merkmale erkennbar ist. Hinzu kommt, daß der größte Teil der genomischen DNA neben diesen kodierenden Bereichen aus nichtkodierenden Sequenzen besteht, deren Mutationen, soweit heute bekannt ist, keine Wirkung auf den Phänotyp ausüben. Außerdem sind innerhalb von Genen die ursächlichen Mutationen oft noch nicht bekannt, so daß die Variabilität nichtkodierender Bereiche in Form von molekulargenetischen Markern als Informationsquelle genutzt wird. Untersuchungen mit verschiedenen Markersystemen z.B. bei Mensch (Bowcock et al., 1994), Ratte (Russel et al., 1993), Esel (Jordana et al., 1999), Pferd (Hamanová et al., 1999), asiatischem Wasserbüffel (Barker et al., 1997), Lachs (Reilly et al., 1998) und Hering (Shaw et al., 1999) bestätigen die geringere Variabilität auf dem Niveau der Proteine im Vergleich zur DNA.

Deshalb sind insbesondere molekulargenetische Marker zur Identifizierung der genetischen Variabilität von Einzeltieren geeignet. Bevor jedoch ausgewählte Markersysteme mit ihren Eigenschaften und Anwendungsbereichen am Beispiel des Geflügels dargestellt werden, ist es notwendig, auf einige Besonderheiten der Struktur des Vogelgenoms einzugehen.

2.1.1 Genomaufbau beim Geflügel

Im Zellkern repräsentiert das Genom die Gesamtheit der Erbanlagen eines Organismus. Diese werden in bestimmten Phasen der Kernteilung in Form von Chromosomen sichtbar. Die strukturellen Besonderheiten der Chromosomen bei Vögeln erschwerten über rund 40 Jahre die genaue Bestimmung ihrer Anzahl.

2.1.1.1 Struktur der Chromosomen

Die ersten Angaben über die Anzahl der Chromosomen beim Huhn stammen aus dem Jahr 1906, als Loyez (rev. Yamashina, 1944) über 6 Chromosomenpaare in einer Oocyte des Haushuhns berichtete. In den darauf folgenden Jahren variierten die Angaben über die Chromosomenanzahl zwischen 8 und 18 Chromosomen im diploiden Genom (rev. Brant, 1952). Erst die Arbeiten von Hance in den Jahren 1923-1926 (rev. Yamashina, 1944) lieferten die Ursache für dieses Spektrum: weder die Hühnerrasse, noch Rassenkreuzungen, noch das Untersuchungsmaterial waren für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich, sondern die Tatsache, daß das Genom des Huhnes aus großen, sogenannten Makrochromosomen, und kleinen, sogenannten Mikrochromosomen, besteht. Doch Mikrochromosomen

sind nicht nur für Vogelgenome charakteristisch. Auch bei Reptilien (Beçak et al. 1971) und Füchsen (Parkányi et al., 1992) wurden sie nachgewiesen.

Über die endgültige Festlegung der Chromosomenanzahl von $2n=78$ beim Huhn gibt es widersprüchliche Angaben. Der Pionier Yamashina wird als der Erstbeschreiber der 39 Chromosomenpaare von Cheng (1997) im Jahr 1944 bzw. von Yadav (1995) im Jahr 1946 angegeben. Vögel haben generell eine hohe Anzahl an Chromosomen (bis zu 126 Chromosomen, rev. Fridolfsson, 1999). Davon können gewöhnlich die größten 5 bis 10 als Makrochromosomen im Lichtmikroskop erkannt werden. Eine Ausnahme bildet der Eisvogel mit nur einem Makrochromosom (rev. Rodionov, 1996).

Eine diploide Zelle beim Huhn mit 78 Chromosomen enthält rund 2,5 pg DNA (Bloom, 1981, Stevens 1986). Die resultierende Genomgröße von $2,4 \times 10^9$ bp entspricht damit rund einem Drittel (37%) des menschlichen Genoms mit 23 Chromosomen (Bloom et al., 1993). Aufgrund der Größe enthalten die Chromosomenpaare 1 - 5 rund 55%, die intermediären Chromosomen (Paare 6 - 10) etwa 20% und die Mikrochromosomenpaare 11 - 39 rund 25% der genomischen DNA (Bloom et al., 1993). Aus Untersuchungen von Smith und Burt (1998) geht hervor, daß dieses Verhältnis zugunsten der 10 größten Chromosomen einschließlich der Geschlechtschromosomen verschoben ist, denen nun 82% der genomischen DNA zugeordnet werden. Die Längenangaben der einzelnen Chromosomen variieren von $7\mu\text{m}$ bis zu kleinen Punkten (Bloom, 1981) bzw. für die Mikrochromosomen zwischen 1,0 und $0,2\mu\text{m}$ mit 23 – 7 Mb (Bloom et al., 1993). Die Arbeitsgruppe um Pradhan (1995) veröffentlichte für die ersten 8 Makrochromosomenpaare mittlere Längen von 5,99 - $1,10\mu\text{m}$ und beschrieb das Z-Chromosom mit $2,65\mu\text{m}$ und das W-Chromosom mit $1,35\mu\text{m}$ Länge. Damit entsprechen die größten 6 Chromosomenpaare des Huhnes den 6 kleinsten des Menschen. Die kleinsten Mikrochromosomen entsprechen mit 2,5 Mb der Größe von Hefechromosomen (Rodionov, 1996).

2.1.1.2 Molekulare Strukturen des Genoms

Die Unterschiede in der Größe der Chromosomen setzen sich auch im molekularen Bereich fort. Während die Makrochromosomen aufgrund ihrer Anfärbbarkeit in der Lichtmikroskopie hell (euchromatinreich), weniger kompakt und transkriptionsaktiv erscheinen, sind die Mikrochromosomen dunkel (heterochromatinreich), kompakt und erschienen bisher weniger an der

Proteinbiosynthese beteiligt (Bloom, 1981, Stevens 1986). Wenigstens für einen Teil der Mikrochromosomen schien diese Beschreibung zuzutreffen, denn bei Rodionov (1996) ist neben einer genetischen Bedeutung der Mikrochromosomen die Hypothese zu finden, daß sie sich als heterochromatinreiche Strukturen mit bisher unbekannter Funktion fakultativ in der Meiose mit vervielfältigen können. Für diese Hypothese spricht, daß in Mitosestadien meist nur etwa 65% der Mikrochromosomen sichtbar gemacht werden können.

Doch immer mehr Untersuchungen deuten darauf hin, daß die Mikrochromosomen transkriptionsaktiver - sogar genreicher - sind als die Makrochromosomen. Bereits 1990 konnte die Arbeitsgruppe um Dominguez-Steglich das Gen der Muskeldystrophie einem Mikrochromosom zuordnen. Ihre Beobachtung einer sehr früh einsetzenden Replikation bei Mikrochromosomen im Vergleich zu Makrochromosomen wurde von McQueen et al. (1996) bestätigt. Einen weiteren Beweis für den Genreichtum der Mikrochromosomen lieferten McQueen und Mitarbeiter 1998, indem sie für die Proteinbiosynthese spezifische (hyperacetylierte) Bereiche mittels Immunfluoreszenz vor allem auf den Mikrochromosomen nachweisen konnten. Außerdem wurden sogenannte CG-reiche Inseln, die am Ende von Genen auftreten, bei Mikrochromosomen 6 mal häufiger gefunden als bei Makrochromosomen. Smith et al. (2000a) werteten diese Erkenntnisse aufgrund der verwendeten indirekten Methode als Überschätzung und gaben auf der Basis eines direkten Ansatzes eine 1,5 bis 3,5fache Gendichte auf den Mikrochromosomen im Vergleich zu den Makrochromosomen an. Die Mikrochromosomen der Vögel weisen so vermutlich die höchste Gendichte unter Vertebratenchromosomen auf (McQueen et al., 1996). Diese Ergebnisse auf der Basis hoch entwickelter Untersuchungstechniken unterstreichen die Bedeutung der kleinsten Chromosomen im Genom des Huhnes, die noch von Newcomer (1957) aufgrund ihrer (technisch bedingt) variablen Anzahl als "nebensächlich", "überzählig" und "Reserve für die Replikation der Makrochromosomen" angesehen und wegen ihrer "nichtchromosomalen Natur" als "Chromosomide" bezeichnet wurden.

Basierend auf den physikalischen Längenangaben einzelner Chromosomen (Smith and Burt, 1998) schätzen Smith et al. (2000a), daß Gene im Abstand von etwa 17 kb auf Mikrochromosomen und im Abstand von etwa 22 kb auf Makrochromosomen auftreten. Die gesamte Anzahl an vermuteten Genen im Genom des Huhnes geben diese Autoren mit 59000 Genen

(Makrochromosomen: 38000 Gene, Mikrochromosomen: 21000 Gene) als vergleichbar mit anderen Vertebraten an. Dabei bleibt zu berücksichtigen, daß nur etwa 2-3% der genomischen DNA tatsächlich Proteine kodiert (rev. Hardge, 1999) und insgesamt nur etwa 10% eines Säugetiergenoms aus funktioneller DNA besteht (einschließlich regulativer Sequenzen). Damit besteht der größte Teil eines Genoms aus DNA, deren biologische Funktion bis heute nicht erklärt werden kann. Dieser Genom-Bereich unterscheidet sich auch in seinem molekularen Aufbau von der Struktur kodierender Abschnitte. Vor allem in nichtkodierenden DNA-Regionen tritt gehäuft repetitive DNA auf, die bis maximal 30% genomischer DNA ausmacht (Stevens, 1986, Wimmers, 1994). Repetitive DNA erscheint "eingestreut" oder als Tandemwiederholung bestimmter Motive im Genom (Abbildung 2.1).

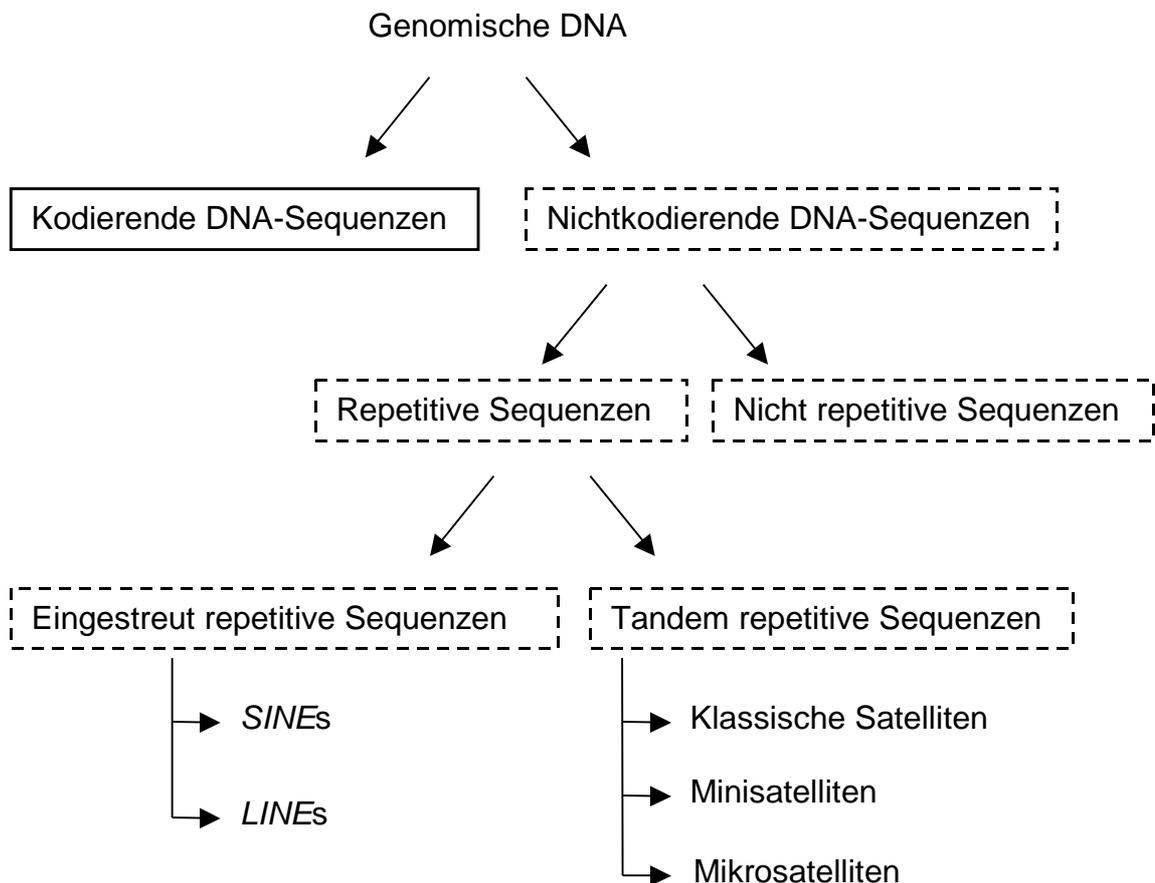


Abbildung 2.1:

Einteilung der Sequenzabschnitte eukaryotischer Genome aufgrund ihrer Funktion, Struktur und Wiederholungsrate (nach Wimmers, 1994)

Die eingestreute repetitive DNA ist über das ganze Genom verteilt und besteht aus

- (I) kurzen Nucleotidwiederholungen (*SINEs*, "short interspersed nucleotide elements") und
- (II) langen Nucleotidwiederholungen (*LINES*, "long interspersed nucleotide elements").

Während die *SINEs* aus Sequenzfamilien von wenigen hundert Basenpaaren (0,2-0,4 kb) und Abschnitten nichtrepetitiver DNA von 0,9 oder 3,5 kb Länge bestehen, werden die Wiederholungen der *LINES* aus mehreren tausend Basenpaaren (etwa 5,6 kb) gebildet und von nichtrepetitiven Abschnitten im Bereich von 13 kb unterbrochen (rev. Wimmers, 1994). Die Entstehung der Variabilität und die Ausbreitung beider Gruppen wird bei Wimmers (1994) auf die Integration transkribierter RNA (Retroposition) bzw. Rekombination zurückgeführt. Im Gegensatz zu Säugetieren, bei denen *SINEs* oft mit kurzen repetitiven Sequenzen wie z.B. (AC)_n oder (GT)_n assoziiert sind (Buchanan et al. 1993, Wilke et al. 1994), konnte Primmer (1997) bei Vögeln keine direkte Assoziation zu den bei diesen Vertebraten am häufigsten auftretenden *SINEs* der "CR1"-Familie nachweisen. *LINES* kommen häufiger in kleinen Genomen, wie z.B. dem Vogelgenom, vor und bedeuten einen höheren Grad an Spezialisierung zu Lasten phylogenetischer Flexibilität. Die Entstehung der *LINES* aus den kurzen *SINEs* wird bei Wimmers (1994) in Betracht gezogen.

Eine größere Bedeutung für die Analyse genomischer Variabilität hat jedoch die tandem repetitive DNA. Sie wird auch als "Satelliten-DNA" bezeichnet, weil bei der Gradientenzentrifugation neben der Hauptbande aus genomischer DNA spezifische Satellitenbanden sichtbar werden. Je nach Länge der wiederholten Sequenzen wird sie in klassische Satelliten, Minisatelliten und Mikrosatelliten eingeteilt.

Die *Satelliten-DNA* kommt hauptsächlich in der Zentromer-Region der Chromosomen vor und besteht aus einer Gesamtlänge repetitiver Sequenzen $>5 \times 10^5$ bp. Einfache Sequenzmotive (bis etwa 30 bp) können zu komplexen Repetitionen zusammengesetzt werden, die dann mit einer Länge von 100 bis 300 bp eine Grundeinheit der Satelliten-DNA darstellen. Eine mögliche Bedeutung der Satelliten-DNA bei der Chromosomenpaarung und bei Rekombinationsprozessen wird bei Hardge (1999) diskutiert.

Minisatelliten-DNA tritt gehäuft in Clustern an Chromosomenenden auf. Die repetitiven Sequenzmotive sind zwischen 10 und 64 bp lang und liegen in bis zu hunderten von Kopien in heterochromatinreichen DNA-Abschnitten vor. Dabei variieren die Minisatelliten um ein Grundmotiv (Konsensussequenz), so daß die Wiederholungseinheiten insgesamt ähnlich, aber nicht identisch sind (rev. Wimmers, 1994). Die Ursachen dieser Variabilität werden von Ryskov (1999) ausführlich dargestellt. Der Autor beschreibt Veränderungen bezogen auf die Anzahl der Wiederholungseinheiten und hinsichtlich der Verteilung im Cluster, die sich in Fragmentlängenpolymorphismen manifestieren und durch Fehler in der DNA-Replikation oder ungleiches Crossing over entstehen. Eine Kombination verschiedener umfangreicher Mechanismen deutet Ryskov als wahrscheinlich an, zumal die Minisatelliten-Variabilität fundamentale Unterschiede abhängig von ihrem Typ, ihrer Lokalisation im Genom und ihrer Spezifität bei verschiedenen Spezies aufweisen kann. Charakteristische Abschnitte der Minisatelliten (sogenannte Core-Sequenzen) werden als Sonde zum Nachweis individualspezifischer DNA-Fragmente (DNA-Fingerprinting) genutzt, die nach Behandlung der DNA mit einem Restriktionsenzym in der Regel zu über einer Million entstehen. Haberfeld et al. (1991) geben einen Überblick hinsichtlich verschiedener Sonden, die aus DNA von Menschen, Rindern, Schweinen und Bacteriophagen erstellt wurden und speziesabhängig bei Mensch, Rind, Schaf und Huhn unterschiedliche Fingerprintbanden liefern. Die Variabilität der Minisatelliten erlaubt es, über den individuellen DNA-Fingerprint Abstammungsverhältnisse und Populationsstrukturen zu analysieren (rev. Burke et al., 1996) sowie die Genomkartierung zu forcieren (Hillel et al., 1993).

Mikrosatelliten-DNA kommt auch in allen eukaryotischen Genomen in Form von Clustern vor (Tautz, 1989, Weber and May, 1989) und ist durch kurze Repetitionseinheiten aus 1 bis 6 bp charakterisiert, die in etwa 10-50 Kopien je Locus auftreten. Mikrosatelliten werden in reine, zusammengesetzte und unterbrochene Repetitionen eingeteilt (Abbildung 2.2).

1. Reiner, perfekter Repeat	CACACACACACACACACACA
2. Zusammengesetzter Repeat	CACACACACAGAGAGAGAGA
3. Unterbrochener, imperfekter Repeat	CACATTCACACATTCATTCA

Abbildung 2.2:

Klassifikation der Mikrosatelliten-DNA am Beispiel einer 10fachen Dinucleotidwiederholung (nach Jarne and Lagoda, 1996)

Zusätzlich ist jede Kombination dieser Wiederholungsarten möglich, woraus eine vor allem bei perfekten Repeats hohe Variabilität resultiert (Goldstein and Clark, 1995, rev. Primmer 1997). Die ursächlichen Mutationen beruhen auf ungleichem Crossing over und Fehlern bei der Replikation oder der Reparatur der DNA (Replikationsschlupf), wie in den Abbildungen 2.3 und 2.4 dargestellt. Die Mutationen resultieren in langen bzw. entsprechend der Wiederholungseinheit kurzen Fragmentlängenvariationen. Obwohl die Mutationsrate von Mikrosatelliten im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-6} liegt und damit geringer ist als bei Minisatelliten mit einer Rate von etwa 10^{-2} (rev. Bruford et al., 1996), zählen sie trotzdem zu den Loci mit einer der höchsten Mutationsraten (Goldstein and Pollock, 1997).

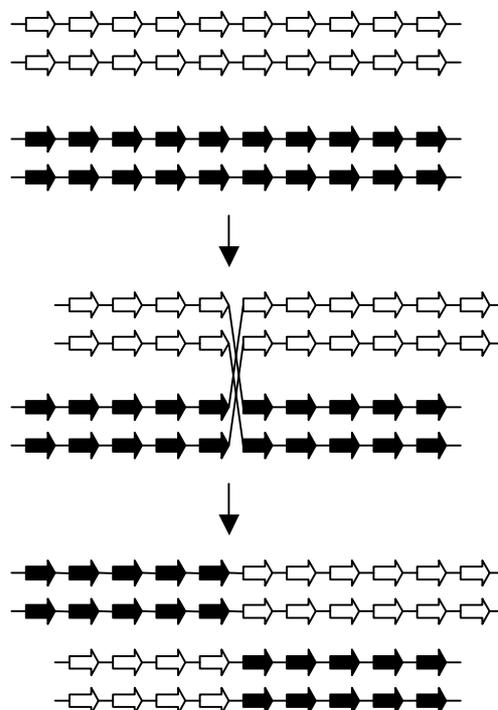


Abbildung 2.3:

Mutationsform bei Mikrosatelliten: Ungleiches Crossing over während der Meiose in der Repeat-Region (Pfeile) homologer Chromosomen (schwarz und weiß) führen zu Repeatlängen-Änderung (nach Primmer, 1997).

Die Verteilung der Mikrosatelliten im Genom scheint außer bei häufig in proteinkodierenden Sequenzen liegenden Trinucleotiden zufällig zu sein (Stallings et al., 1991, Winterø et al., 1992, Dib et al., 1996, Dietrich et al., 1996). Dabei treten kurze (2-5fache) Repetitionen einfacher Motive häufiger auf als lange (> 20fache) Wiederholungen dieser Motive (rev. Primmer, 1997). Auch eine Speziesabhängigkeit in der Häufigkeit verschiedener Motive ist

vorhanden. Stallings und Mitarbeiter (1991) beschreiben z.B. das Auftreten von $(GT)_n$ -Repeats mit einem Abstand von 28 kb beim Menschen, 18 kb bei der Maus und 21 kb bei der Ratte. Im Vergleich der Repeatklassen von Schwein und Huhn fand Moran (1993) weniger Dinucleotidrepeats beim Huhn (12%) als beim Schwein (30% der detektierten Repeats). Primmer (1997) bestätigt diese Erkenntnis mit Untersuchungen zur Häufigkeit von Di-, Tri- und Tetranucleotiden und gab Mikrosatellitendichten von 1 Mikrosatellit pro 39 kb beim Huhn im Vergleich zum Menschen mit 1 Mikrosatellit je 6 kb (Beckmann and Weber, 1992) an. Im Vogelgenom gibt es nach Schätzungen von Primmer und Mitarbeitern (2000) zwischen 30000 und 70000 Mikrosatelliten, die länger als 20 bp sind und wegen des Genreichtums der Mikrochromosomen hauptsächlich auf dem Makrochromosomen lokalisiert sind mit Ausnahme der Centromer- und Telomerbereiche. Von Smith und Mitarbeitern (2000a) konnte inzwischen allerdings mit einer anderen Technik nachgewiesen werden, daß Mikrochromosomen mehr Mikrosatelliten (43%) enthalten als auf ihren DNA-Gehalt bezogen (maximal 30%) zu erwarten wäre.

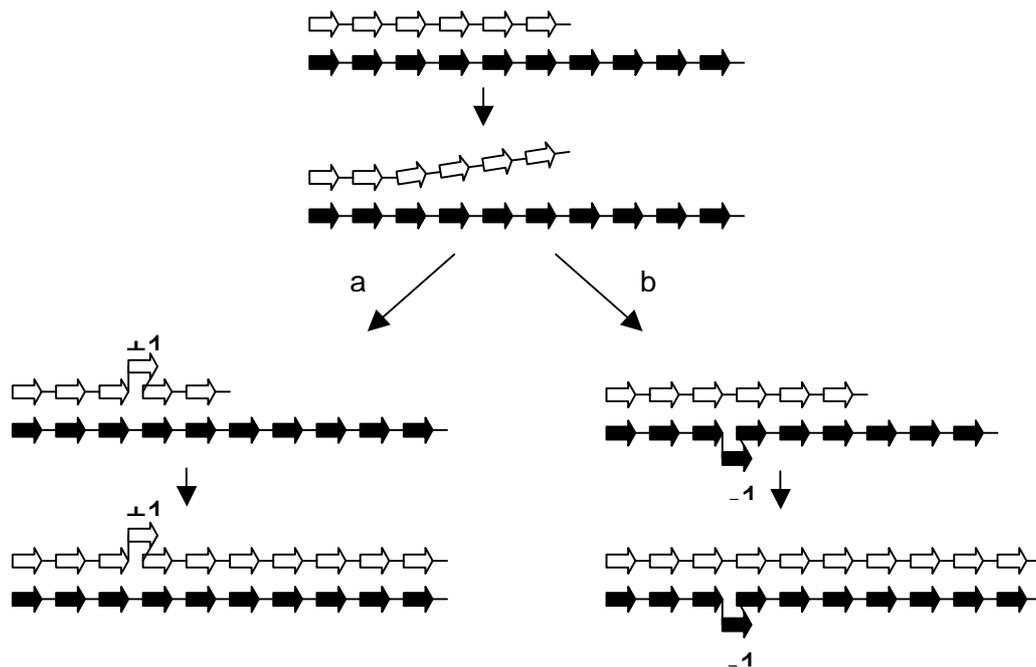


Abbildung 2.4:

Mutationsform bei Mikrosatelliten (nach Primmer, 1997): intrahelicaler "Replikationsschlupf" (slipped strand mispairing) in der Repeat-Region (Pfeile) führt zur

a - Insertion einer Wiederholungseinheit im neu synthetisierten Strang (weiß)

b - Deletion einer Wiederholungseinheit in der Matrize (schwarz)

Aufgrund der weiten Verbreitung der Mikrosatelliten und ihres häufigen Auftretens selbst in kleinen Genomen, ihrer großen Variabilität und der maximal etwa 50 repetitiven Untereinheiten, die wenig aufwendig mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht werden können, entwickelten sich Mikrosatelliten zu den am häufigsten genutzten genetischen Markern, die bisher gefunden wurden (Jarne and Lagoda, 1996). Mikrosatelliten werden heute als stabil genug erachtet, um genetische Diversität innerhalb und zwischen wildlebenden und domestizierten Populationen zu untersuchen und zu überwachen (Tautz, 1989, Weber, 1990, Bruford et al., 1996, Ryskov, 1999, Hardge, 1999). Außerdem nimmt ihre Bedeutung für die Genomkartierung (z.B. Dodgson et al. 1997) ebenso zu wie für das Verständnis evolutionärer Entwicklungen. Bei Tieren und Menschen bilden Mikrosatellitenanalysen die Grundlage für Identitäts- und Abstammungsnachweise und wurden so in der Forensik und der humangenetischen Beratung wertvolle Hilfsmittel.

Die Funktion von Mikrosatelliten ist aber weiterhin umstritten. Von den meisten Mikrosatelliten-Sequenzen ist die Replikation bekannt, vermutlich mit Platzhalter-, Pack- oder Kondensierungsfunktion (Stevens, 1986, Stallings et al., 1991). Dabei könnte ein im Verhältnis zum Genom großer Anteil repetitiver Sequenzen eine energetische Belastung bei der Vervielfältigung des Genoms bedeuten, woraus möglicherweise über eine längere Meiose und Entwicklung von Individuen lange Generationsintervalle resultieren (Wimmers, 1994). Mikrosatelliten wird hier auch eine evolutionäre Bedeutung beigemessen, weil sie durch die Möglichkeit der Neuorganisation von Genomabschnitten die Grundlage für phylogenetische Entwicklung bilden. Strukturell sind spezifische Sequenzen (z.B. $(GT)_n$ und $(GA)_n$) in der Lage, eine von der regulär rechtsdrehenden DNA-Helix abweichende, linksdrehende sogenannte Z-DNA auszubilden, die nur in besonders energiereichen Perioden, wie z.B. der Transkription, entstehen kann (rev. Primmer, 1997). Mit der Beschreibung der möglichen Funktion von Z-DNA (und damit dieser spezifischen Sequenzen) hauptsächlich bei der Transkription (Hemmung) und der Rekombination (Förderung) unterstreicht Primmer (1997) die von Stallings et al. (1991) aufgestellte Vermutung einer "funktionellen Rolle von repetitiven $(GT)_n$ -Sequenzen bei der genetischen Rekombination oder der Modulation der Transkriptionsaktivität". Einige Mikrosatelliten dienen außerdem zur Proteinbindung und scheinen wegen ihrer Lage in Promotorbereichen wichtig bei der Förderung oder Hemmung der Genexpression zu sein (Primmer, 1997). Eine kleine Gruppe spezifischer Trinucleotide ist ursächlich für

Erbkrankheiten verantwortlich und hat eine große Bedeutung bei ihrer Diagnostik, insbesondere beim Menschen, erlangt (rev. Primmer, 1997).

2.1.2 Molekulargenetische Marker

Aus den Erkenntnissen über den Aufbau des Genoms, insbesondere der Variabilität kodierender und nichtkodierender DNA-Bereiche, ließ sich eine neue Klasse genetischer Marker ableiten (Jeffreys et al., 1985, Weber and May, 1989). Die sogenannten molekulargenetischen Marker sind dadurch gekennzeichnet, daß sich ihre Polymorphismen mit molekulargenetischen Methoden auf dem Niveau der DNA darstellen lassen (Hardge, 1999). Im Gegensatz zu biochemischen und immunologischen Markern bieten sie eine Reihe von Vorteilen. Prinzipiell kann aus nahezu jedem Gewebe unabhängig von der Konservierung, dem Alter des Individuums oder seinem Geschlecht auch nichtinvasiv (z.B. aus Haaren oder Federn) DNA isoliert werden. Wegen der weiten Verteilung über das Genom, vor allem von Mini- und Mikrosatelliten-DNA, und nicht zuletzt aufgrund der hohen Polymorphie molekulargenetischer Marker, sind sie den "klassischen" Markern, insbesondere in Populationsstudien, überlegen (z.B. Hedrick and Miller, 1992, Russel et al., 1993, Van Zeveren et al., 1995, Magoulas, 1998). Dabei gilt ein Marker als genetisch polymorph, wenn in einer Population mindestens 2 seiner Allele auftreten, wobei das seltenste Allel mit einer Häufigkeit nicht unter 1% vertreten sein sollte (Hardge, 1999). Die Einteilung molekulargenetischer Marker erfolgt in Anlehnung an O'Brien (1991): Typ I Marker sind in der Regel mit einem Gen bekannter Funktion assoziiert, während sich Typ II Marker in nichtkodierenden DNA-Bereichen befinden und eine im Vergleich mit Typ I Markern höhere Polymorphie aufweisen.

2.1.2.1 Marker in kodierenden DNA-Bereichen

Von den Typ I Markern haben sogenannte Restriktionslängenpolymorphismen (RFLPs) die größte Bedeutung erlangt. Das Prinzip dieser Analyse besteht in einer Fragmentierung eines bestimmten DNA-Abschnitts mit spezifischen, DNA spaltenden Enzymen (Restriktionsendonucleasen), gelelektrophoretischer Auftrennung der entstehenden Fragmente und ihrer Darstellung auf Trägermembranen. Da diese Fragmente optisch nicht voneinander zu differenzieren sind, werden sie mit radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Nucleotidsequenzen (Gensonden) hybridisiert. Die markierten Fragmente können dann entsprechend ihrer Größe analysiert

werden. Mit dieser Technik können lokale Basensequenzveränderungen durch Substitutionen, aber auch durch Insertionen, Deletionen oder Umlagerungen von DNA-Bereichen ermittelt werden. Aufgrund der veränderten Basenabfolge tritt entweder eine Schnittstelle hinzu oder verschwindet, so daß verkürzte oder verlängerte Fragmente entstehen und zu einer Veränderung des Fragmentmusters führen. RFLPs stellen in der Diagnostik von Erbkrankheiten auch in Kombination mit anderen Methoden, wie z.B. der Polymerasekettenreaktion (PCR), die Methode der Wahl dar. Oft ist dabei das für die Krankheit verantwortliche, mutierte Gen nicht bekannt. In diesem Fall können Polymorphismen, die in den von der Erbkrankheit betroffenen Familien mit dem auslösenden Gen zusammen vererbt werden (Kopplung), als indirekte Marker verwendet werden (z.B. Asmussen and Clegg, 1985). Auf der Basis dieser Erkenntnis entwickelte Botstein (1980) das Konzept der genetischen Kopplungskarte, auf der in Abhängigkeit von der Frequenz der Neukombinationen nach Crossing-over-Ereignissen (Rekombinationshäufigkeit) die Positionen von veränderten Restriktionsschnittstellen kartiert sind. Beim Huhn wurde dieses Konzept mit einer Kopplungskarte von rund 100 RFLP im Rahmen der Kartierung von Resistenzgenen gegen Salmonellose erstmals von Bumstead und Palyga (1992) umgesetzt.

2.1.2.2 Marker in nichtkodierenden DNA-Bereichen

Eine andere Anwendung von Restriktionsenzymen besteht in der Zerlegung der gesamten genomischen DNA und anschließender Hybridisierung der Fragmente mit Minisatelliten- oder Oligonucleotidsonden, die zwischen 30 und 70 unterscheidbare Banden je Individuum liefern. Diese Banden sind Bestandteile genetischer Fingerprints (Multilocus-Fingerprints) und stellen einen individuellen Identitätsnachweis auf DNA-Basis dar. Je nach Restriktionsenzym und Sonde erhält man speziesabhängig unterschiedlich viele Banden (Hillel et al., 1989, Haberfeld et al., 1991).

Neben Minisatelliten gehören Mikrosatelliten und die sogenannte "random amplified polymorphic DNA" (RAPD) zu den wichtigsten Typ II Markern in nichtkodierenden Bereichen, wobei Mikrosatelliten, die innerhalb von Genen liegen, auch als Typ-I-Marker bezeichnet werden. Die Analyse von Mikrosatelliten und RAPDs beruht auf der Polymerasekettenreaktion (PCR).

Bei Mikrosatelliten wird das repetitive Sequenzmotiv von kurzen Nucleotidsequenzen (20-24 bp) flankiert, die einmalig im haploiden Genom

auftreten und als sogenannte Primersequenzen Beginn und Ende des anzureichernden Fragments für das Enzym Polymerase kennzeichnen (Abbildung 2.5). Nach Hitzedenaturierung lagern sich die Primer an die entsprechende, komplementäre DNA der Matrize an und ermöglichen der Polymerase, das interessierende Fragment zu synthetisieren. Nach rund 30 Zyklen Denaturierung, Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese ist das Fragment soweit angereichert, daß sein Längenpolymorphismus von oft nur wenigen bp mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht werden kann. Dabei können an polymorphen Loci zwischen 2 und 50 Allele (Jarne and Lagoda, 1996) auftreten, wobei Mikrosatelliten vor allem bei Fischen hochpolymorph in Erscheinung treten (30 Allele bei Brassen: Magoulas, 1998, 33 Allele bei Tilapia: Pouyaud et al. 1999). Untersuchungen hinsichtlich der Sozialstruktur bei Walen lieferten sogar 54 Allele an einem Mikrosatelliten-Locus (rev. Bruford and Wayne, 1993).

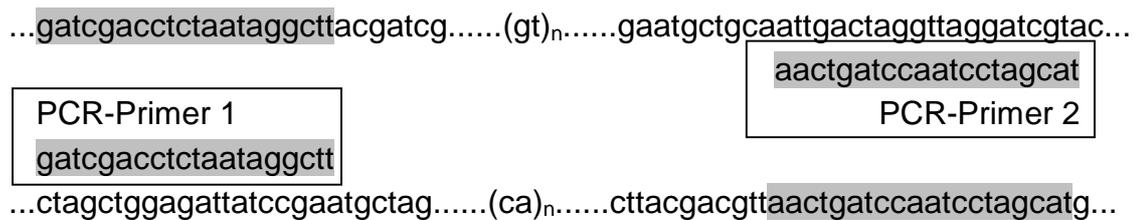


Abbildung 2.5:
Schematische Darstellung eines Mikrosatelliten mit seinen Primersequenzen

Die Amplifizierung der RAPDs erfolgt auch mittels PCR, allerdings werden hier kurze Oligonucleotide (rund 10 bp) als Primer eingesetzt, die "zufällig" an verschiedenen komplementären DNA-Abschnitten binden und ein Spektrum von ca. 10 Fragmenten anreichern (Cheng, 1997). Einzelne Fragmente sind dabei polymorph, wenn z.B. ein Basenaustausch an der Primerbindungsstelle stattgefunden hat (Dodgson et al. 1997).

2.1.2.3 Eigenschaften ausgewählter molekulargenetischer Marker

Im Vergleich einzelner molekulargenetischer Markersysteme werden verschiedene Eigenschaften deutlich, die bei der Bearbeitung bestimmter Fragestellungen nützlich, aber auch hinderlich sein können (Tabelle 2.1).

Bevor die PCR entwickelt wurde, standen von den hier ausgewählten Markern RFLPs und Multilocus-DFPs für molekulargenetische Untersuchungen im Bereich der Genomkartierung, der Populationsgenetik sowie der Identitätsprüfung zur Verfügung. Beide Methoden benötigen große Mengen nicht degradiertes DNA als Ausgangsmaterial und sind arbeits-, zeit- und kostenintensiv im Vergleich zu Methoden auf PCR-Basis (Crawford et al., 1991, Wimmers, 1994).

Tabelle 2.1:

Eigenschaften ausgewählter molekulargenetischer Marker am Beispiel des Huhns

	RFLP	Multilocus-DFP	Mikrosatellit	RAPD
Verteilung im Genom ¹	ubiquitär	Heterochromatin	ubiquitär	ubiquitär
geschätzte Anzahl im Genom ¹	>100000	unbekannt	>10000	>100000
Anzahl kartierter Marker ²	244	40	801	65
Anzahl bekannter Marker ³	271	40	1276	88
Marker-Typ ⁴	I und II	II	II>I	II
Vererbungsmodus ¹	kodominant	dominant	kodominant	dominant
Sequenzanalyse Voraussetzung ¹	ja	nein	ja	nein
Typische Anzahl Allele je Locus ¹	2	2	2-10 ¹ (-50 ⁵)	2
Informationsgehalt ⁶	niedrig	hoch	hoch	niedrig
Analysetempo ¹	langsam	langsam	schnell	schnell
Reproduzierbarkeit, Interpretation ⁷	einfach	schwierig	einfach	schwierig

¹ Dodgson et al., 1997

² Chicken Map 2000, Groenen et al., 2000

(<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/chickmap/chickgbase/chickgbase.html>)

³ Stand der Genomkartierung beim Huhn (April 2001)

(<http://www.genome.iastate.edu/chickmap/>)

⁴ O'Brien, 1991

⁵ Jarne and Lagoda, 1996

⁶ Weber, 1990, Wimmers, 1994

⁷ Magoulas, 1998, Weigend, 1999

Wesentliche Unterschiede zwischen RFLPs und DFPs liegen in der Anzahl der untersuchten Loci, dem Vererbungsmodus der Marker und in dem zu erwartenden Informationsgehalt. Zwar erlauben RFLPs eine individuelle Genotypisierung aufgrund ihres zumeist codominanten Vererbungsmodus, jedoch resultiert die Beschreibung eines Genortes (in überwiegend kodierenden Bereichen) mit nur 2 Allelen in einem geringeren Informationsgehalt gegenüber den auf der Analyse vieler Loci basierenden DFPs. Die geringere Polymorphie von RFLPs ist auf die große Sequenzkonservierung in kodierenden Bereichen zurückzuführen (Cheng, 1997). Nicht zuletzt wegen ihrer weiten Verbreitung im Genom bildeten sie jedoch die Grundlage für Genomkartierungsprojekte (Weber, 1990) insbesondere beim Huhn (Tixier-Boichard, 1993).

Abstammungsnachweise oder populationsgenetischen Studien erfordern die Anwendung von Methoden mit einem hohen Informationsgehalt, wie sie z.B. mit DFPs aufgrund der hohen Polymorphie der Loci erreicht wird (Cheng, 1997). Allerdings ist bei den Multilocus-DNA-Fingerprints zu berücksichtigen, daß aufgrund des dominanten Vererbungsmodus Allele nur mit aufwendigen Segregationsanalysen nachgewiesen werden können (Wimmers, 1994), so daß zwischen Individuen Bandenhäufigkeiten und Unterschiede von Bandenprofilen ausgewertet werden. Die Bandenmuster sind jedoch komplex und erschweren die Beurteilung (Magoulas, 1998, Weigend, 1999). Der hohe Laboraufwand begrenzt zudem die Anzahl der zur Untersuchung vorgesehenen Individuen.

Erst die Entwicklung der PCR ermöglichte es, durch geringen labortechnischen Aufwand eine Vielzahl von Individuen zu untersuchen. Zusätzlich werden an das Probenmaterial geringere Anforderungen gestellt als bei RFLPs und DFPs. Unterschiede bei den ausgewählten Methoden auf PCR-Basis (Mikrosatelliten und RAPDs) bestehen weniger in der Anzahl der untersuchten Loci als im Vererbungsmodus, im Informationsgehalt und in der Interpretation und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Mikrosatelliten sind codominante, hypervariable und damit hochinformativ Marker, die sich fast doppelt so schnell wie RFLPs (Weber, 1990) und gut reproduzierbar analysieren lassen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Automatisierung des Analysevorgangs mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Primersequenzen. Demgegenüber kann bei RAPD-Analysen nicht zwischen homozygoten und heterozygoten Individuen unterschieden werden, sie haben im Vergleich zu DFPs eine geringere Polymorphie (Plotsky et al., 1995) und reagieren extrem

empfindlich bezogen auf die Reaktionsbedingungen, so daß die Ergebnisse schlecht zu reproduzieren sind (Cheng, 1997, Magoulas, 1998). Gegenüber Mikrosatelliten ist bei den RAPDs keine Kenntnis der Primersequenzen erforderlich, die die Entwicklung der Mikrosatelliten aufgrund von Identifikation, Sequenzierung, Primererstellung, Polymorphismusdetektion und Kartierung (Cheng, 1997) laborintensiv und teuer gestaltet. Allerdings können Mikrosatelliten auch bei verwandten Spezies eingesetzt werden (z.B. Huhn→Pute: Levin et al. 1995, Huhn→Wachtel: Pang et al. 1999, Rind→Schaf: Crawford et al., 1995, Rind und Schaf→ Ziege: Yang et al. 1999, Rind→ Bison: Mommens et al. 1998, Pferd→ Esel: Jordana et al., 1999), was diesen Nachteil wieder relativiert. Ein weitere Vorteil bei RAPDs besteht in der Ableitung hochpolymorpher Marker (Plotsky et al., 1995) vor allem bei Tierarten, bei denen keine Primerinformationen für Mikrosatellitenanalysen zur Verfügung stehen. Neben der Primerentwicklung bedeuten Artefakte in der Amplifikation während der PCR (Slippage, Weber, 1990) und das Auftreten sogenannter Null-Allele weitere Nachteile für Mikrosatellitenanalysen. Null-Allele erschweren die Interpretation von Abstammungsverhältnissen in der Weise, daß von den Eltern vererbte Allele teilweise nicht bei den Nachkommen auftreten und diese dann als homozygot mißinterpretiert werden (Callen et al. 1993).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich Mikrosatelliten aufgrund ihrer überwiegend vorteilhaften Eigenschaften (hohe Polymorphie, Kodominanz, gleichmäßige Verteilung über das Genom und geringer Laboraufwand) in der Genomkartierung, in Verwandtschafts- und in Populationsstudien bei landwirtschaftlichen Nutztieren, insbesondere beim Geflügel, durchgesetzt haben (Jarne and Lagoda, 1996, Cheng, 1997, Dodgson et al., 1997, Primmer, 1997).

2.1.3 Anwendungen molekulargenetischer Marker beim Geflügel

Die ausgewählten molekulargenetischen Marker finden in Abhängigkeit von ihren Eigenschaften in verschiedenen Bereichen beim Geflügel Anwendung. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.2 zusammengestellt.

Tabelle 2.2:

Anwendungsgebiete ausgewählter molekulargenetischer Markersysteme beim Geflügel

	RFLP	Multilocus-DFP	Mikrosatellit	RAPD
Genomkartierung	x	x	x	x
markergestützte Detektion von QTL	x	x	x	
Abstammungsnachweis/Identifikation		x	x	
Variabilität				
- innerhalb von Populationen, Inzucht	x	x	x	
- zwischen Populationen	x	x	x	x
Schätzung genetischer Distanzen		x	x	

2.1.3.1 Genomkartierung

Die erste genetische Karte beim Huhn stammt aus dem Jahr 1936 und wurde von Hutt anhand phänotypischer Merkmale erarbeitet. Diese Karte enthält 18 Gene qualitativer Merkmale (z.B. Haut- und Gefiederfarbausprägungen, Frizzle oder Nackthalsigkeit) in 5 Kopplungsgruppen, die zu dieser Zeit, als noch über die Anzahl an Chromosomen beim Huhn spekuliert wurde, außer den Geschlechtschromosomen keinem Chromosom zugeordnet werden konnten. Es war jedoch schwierig, eine größere Anzahl an Markern trotz der zusätzlichen Analyse von Blutgruppen und Isoenzymssystemen zu kartieren, da in Kreuzungsversuchen entsprechende Kopplungen nachgewiesen werden mußten (Cheng, 1997). Bis 1990 konnten so insgesamt rund 50 Gene kartiert und neben dem Z-Chromosom den Autosomen 1, 6, 7 und 17 zugeordnet wurden (rev. Bitgood and Somes, 1990).

Erst die Anwendung der vorgestellten molekulargenetischen Techniken (RFLP: Botstein et al., 1980; DFPs: Jeffreys, 1985; Mikrosatelliten: Tautz, 1989, Weber and May, 1989; RAPD: Williams et al., 1990, Welsh and McClelland, 1990, Caetano-Anollés et al., 1991) lieferte "unbegrenzte" Möglichkeiten der Kartierung. Auf der Basis von rund 100 RFLPs wurde von Bumstead und Palyga (1992) die erste markergestützte genetische Karte des

Huhnes veröffentlicht. Auf genetischen oder Kopplungskarten werden die relativen Abstände zwischen den Genorten auf der Basis der Rekombinationshäufigkeit dargestellt. Dabei rekombinieren die Allele von Loci, die weiter voneinander entfernt sind, häufiger als diejenigen mit einem geringen Abstand. Ein Prozent Rekombinationsrate zwischen gekoppelten Genorten entspricht einem Centimorgan - cM. Allerdings steigt mit zunehmendem Abstand (ca. 10 cM) die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Doppel-Crossing-over, so daß der genetische Abstand unterschätzt werden kann (rev. Hardge, 1999). Zur Entwicklung genetischer Karten sind sogenannte Referenzfamilien und eine große Zahl genetischer Marker nötig.

Referenzfamilien werden aus phänotypisch möglichst divergenten Rassen aufgebaut, um eine größtmögliche Heterozygotie bei den Kreuzungsnachkommen zu erreichen. Hinweise zu optimalen Familiendesigns sind bei Da et al. (1998) zu finden. Die erste Referenzfamilie beim Huhn (Bumstead und Palyga, 1992) wurde aus zwei ingezüchteten White-Leghorn-Linien mit unterschiedlicher Empfänglichkeit für Salmonellose und Marek's Disease in Compton (C)/Großbritannien aufgebaut. Eine zweite Referenzfamilie entstand in derselben Zeit aus der Kreuzung White Leghorn x Red Jungle Fowl (Crittenden et al., 1993) an der Michigan State University, East Lansing (EL)/USA aus seit 1988 getesteten Inzuchtlinien (Cheng, 1997). Diese beiden internationalen Referenzfamilien bilden die Grundlage für die Entwicklung genetischer Karten auf der Basis von RFLPs (C-Familie) bzw. auf der Basis von hauptsächlich RFLPs und RAPDs (Levin et al. 1994, Groenen et al. 1998). Da die Familien jedoch Faktoren aufwiesen (geringe Größe/Rückkreuzungen), die sich limitierend auf die Kartierung eng benachbarter Loci auswirken, entwickelten Groenen und Mitarbeiter (1998) in Wageningen (W)/Niederlande eine dritte Referenzfamilie. Diese beruht auf der Kreuzung zweier extremer kommerzieller Broilerlinien (Ursprung White Plymouth Rock), umfaßt 10 Familien mit im Mittel jeweils 46 Nachkommen und wurde mit 430 Mikrosatelliten-Markern untersucht. Im Frühjahr 2000 wurden die Ergebnisse aus allen drei genetischen Karten des Haushuhns in einer einheitlichen "Konsens-Karte" (Chicken Map 2000, Consensus Genetic Linkage Map, Groenen et al., 2000), die 1889 Loci in 50 Kopplungsgruppen enthält, zusammengefaßt, um Kartierungsungenauigkeiten aufgrund von Unterschieden in der Rekombinationsrate zwischen verschiedenen Referenzfamilien zu minimieren.

Das Haushuhn hat mit ca. 3800 cM (Groenen et al., 2000) die längste genetische Karte unter den Haustieren. Eine Übersicht bezüglich der Anzahl kartierter Gene und Marker bei verschiedenen Nutztierarten ist in Tabelle 2.3 zusammengestellt. Bei allen untersuchten Tierarten bilden Mikrosatelliten den Hauptanteil genetisch kartierter Marker, womit ihr Nutzen für die Genomkartierung unterstrichen wird. Die RAPDs erwiesen sich beim Huhn als besonders wertvoll zur Kartierung der Geschlechtschromosomen, und hier vor allem des Z-Chromosoms (Levin et al., 1993). Bei der Pute ist die Genomkartierung im Vergleich zum Huhn erst in den Anfängen. Die notwendigen Voraussetzungen für die Entwicklung einer genetischen Karte bei der Pute in Form einer Referenzfamilie (Kreuzung/Rückkreuzung wildlebender und kommerzieller Puten) und polymorpher Marker sind nach Ansicht von Huang und Mitarbeitern (1999) aber bereits geschaffen.

Tabelle 2.3:

Anzahl kartierter Gene und ausgewählter Marker bei verschiedenen Nutztierarten

	Rind	Huhn	Schwein	Schaf	Pferd	Pute
Gene*	640	605	653	367	102	8
RFLP+PCR-RFLP**	4	271	397	267	12	23
Minisatelliten**	-	30	19	-	4	-
Mikrosatelliten**	1244	1276	1335	1715	627	69
RAPD**	-	88	4	3	-	-
Loci insgesamt*	2558	2345	2133	1464	746	100

* physikalisch und genetisch kartiert (Stand: April 2001)

** genetisch kartierte Marker (Stand: April 2001)

Nutztierdatenbanken: <http://www.ri.bbsrc.ac.uk/cgi-bin/arkdb/browsers/browser.sh>

Für die physikalische Zuordnung der Kopplungsgruppen zu den Makro- und Mikrochromosomen beim Huhn werden hauptsächlich die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH, Morisson et al., 1998), die Technik der Mikrodissektion und Mikroisolation (Shaw et al., 1996) sowie die somatische Zellhybridisierung genutzt (rev. Hardge, 1999). Die genaueste Abstandsbestimmung zwischen zwei Genorten besteht nach wie vor in der Sequenzierung der DNA, einem Verfahren, das dem Genomprojekt des Menschen vorbehalten bleibt. Smith und Burt (1998) konnten nachweisen, daß zwischen der genetischen Länge und dem DNA-Gehalt eines Chromosoms beim Huhn eine lineare Beziehung besteht und geben im Mittel für 1 cM ein Äquivalent von 396 kb an. Doch auch hier erschweren die kaum unterscheidbaren Mikrochromosomen genauere

Schätzungen. Während für die Makrochromosomen und die Geschlechtschromosomen genetische Längenangaben den erwarteten Genomanteilen an DNA prozentual gegenübergestellt werden können, kann der DNA-Gehalt der Mikrochromosomen nur für die diploide Anzahl von 30 Mikrochromosomen insgesamt angegeben werden. Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems der Erkennung einzelner Mikrochromosomen wurde von Fillon und Mitarbeitern (1998) vorgeschlagen. Sie konnten mit einer Zwei-Farb-Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (two color FISH) unter anderem mit Mikrosatellitensequenzen 16 Mikrochromosomen individuell identifizieren und so ein nützliches Instrument für die Integration genetischer und cytogenetischer Karten entwickeln. Auch die Schätzung der genetischen Längen von Mikrochromosomen ist schwierig, weil vermutet wird, daß die Mikrochromosomen häufiger rekombinieren als die Makrochromosomen und unabhängig von ihrer Länge 1 bis 2 Chiasmata pro Meiose zeigen (Rodionov, 1996). Rodionov et al. konnten 1997 mit ihrer Untersuchung der Crossing-over-Häufigkeit auf einzelnen Chromosomen nachweisen, daß die Rekombinationshäufigkeit beim Huhn insgesamt größer ist als beim Menschen und damit ähnliche Längen der genetischen Karten erklären, obwohl das Genom des Huhnes physikalisch gesehen nur etwa einem Drittel des Genoms des Menschen entspricht. Die Diskrepanz in der Länge zwischen genetischen und physikalischen Karten wird dabei hauptsächlich durch die Mikrochromosomen verursacht (Fillon et al., 1998). Im Vergleich zu anderen Nutztierarten nimmt die Integration genetischer und physikalischer Karten beim Huhn aufgrund dieses spezifischen Genomaufbaus mehr Zeit in Anspruch (Morisson et al., 1998). Smith et al. (2000b) gelang es, verschiedene Kopplungsgruppen den Makrochromosomen 1 bis 8 und dem Z-Chromosom zuzuordnen, so daß die Integration für die Chromosomen 1, 2 und 3 wahrscheinlich sowie für das Z-Chromosom annähernd abgeschlossen ist.

Das Ziel der Genomkartierung besteht darin, mit Hilfe molekulargenetischer Marker Gene mit einem Einfluß auf die Variation quantitativer Merkmale, wie z.B. Körpermasse oder Legeleistung, sogenannte "quantitative trait loci" (QTL, Geldermann, 1975), zu identifizieren. Anhand einiger Beispiele in Tabelle 2.4 wird deutlich, daß Multilocus-DNA-Fingerprints in den Hintergrund treten und zunehmend Mikrosatelliten zur Identifikation chromosomaler Regionen mit QTL für ökonomisch bedeutsame Merkmalskomplexe beim Huhn herangezogen werden.

Tabelle 2.4:

Ausgewählte molekulargenetische Marker zur Identifizierung von "Quantitative Trait Loci" (QTL) beim Huhn (Beispiele)

Marker	Gen	Chromosom	phänotypisches Merkmal	Autoren
RFLP	IGF-1 ^a	1	Eigewicht, Eischalendicke	Nagaraja et al., 2000
	GHR ^b	Z	Körpergewicht	Feng et al., 1998
	GH ^c	1	Legeleistung	Kuhnlein et al., 1997 Feng et al., 1997
Mini-satelliten-DFP			Körpergewicht, Legeleistung	Cahaner et al., 1996
			Wachstum,	Lamont et al., 1996
			Reproduktion und Eiqualität	Plotsky et al., 1993
			Abdominales Fett	Dunnington et al., 1992
Mikro-satelliten		1, 2	Schlachtkörpermerkmale	Van Kaam et al., 1999b
		1, 2, 4	Futtermverwertung, Wachstum	Van Kaam et al., 1999a
		1, 2, 4, 7, 8	Marek' s Disease-Resistenz	Yonash et al., 1999

^a Insulinähnlicher-Wachstumsfaktor 1

^b Wachstums-Hormon-Rezeptor

^c Wachstums-Hormon

2.1.3.2 Identitäts- und Abstammungsnachweise

Zur Bestimmung der Identität eines Tieres und zur Überprüfung seiner Abstammung werden in neuerer Zeit Multilocus-DNA-Fingerprints und Mikrosatelliten verwendet. Aufgrund der Variabilität der Marker liegt die Wahrscheinlichkeit dafür, daß nicht verwandte Individuen den gleichen Genotyp aufweisen, im Bereich 10^{-9} bis 10^{-17} bzw. bis 10^{-18} bei DFP für Enten, Puten und Hühner (Hillel et al., 1989, Wimmers, 1994) und bei Kombination von 5 Mikrosatelliten-Loci im Bereich 6×10^{-7} (Bruford and Wayne, 1993). Beim Geflügel stellen beide Methoden jedoch hauptsächlich Grundlagen für populationsgenetische Studien dar (DFP: Haberfeld et al., 1991, Hillel et al. 1993, Dunnington et al., 1994, Ponsuksili et al., 1998, Mikrosatelliten: Takahashi et al., 1998, Ponsuksili et al., 1996, 1999).

Der molekulargenetische Abstammungsnachweis dient bei anderen Nutz- und Haustieren der Überprüfung oder Vervollständigung von Stammbäumen und liefert damit wertvolle Hinweise für eine Vermeidung von Inzuchtanpaarungen (Rind: Hussein et al., 1996, Alhussein und Matthes, 2000, Schaf: Crawford et al., 1991, Pferd: Dunner et al., 1998, Cañon et al., 2000, Esel: Jordana et al.,

1999, Honigbiene: Neumann et al., 1999, Hund: Zajc et al., 1994, Koskinen and Bredbacka, 1999).

2.1.3.3 Populationsgenetische Studien

Auf der Basis von Allelfrequenzen und gemeinsamen Allelen (kodominante Marker) bzw. mit Hilfe von Bandenfrequenzen und übereinstimmenden Banden (dominante Marker) kann die genetische Variabilität innerhalb und zwischen Populationen untersucht werden.

Die Charakterisierung einzelner Linien erfolgte beim Geflügel mit RFLPs (Sourdoux et al. 1996, Zhu et al., 1996c), DFPs (Kuhnlein et al., 1989, Wimmers, 1994, Tixier-Boichard, 1996, Zhu et al., 1996b, Ponsuksili et al., 1998) und Mikrosatelliten (Takahashi et al., 1998, Kaiser et al., 2000, Wimmers et al., 2000). Innerhalb der Linien oder Populationen konnten besonders enge verwandtschaftliche Beziehungen mit RFLPs (Bumstead et al., 1987), DFPs (Hillel et al., 1989, Kuhnlein et al., 1990, Grunder et al., 1994, Plotsky et al., 1995, Zhu et al., 1996a) und Mikrosatelliten (Zhou and Lamont, 1999) bei Hühnern, Gänsen, Enten und Puten nachgewiesen werden. Nachweislich nichtverwandte Tiere können dabei im Vergleich ihrer individuellen DFPs in einem Anteil von 21 bis 27% der Banden übereinstimmen (Hillel et al., 1989), während ingezüchtete Tiere in Abhängigkeit ihres Inzuchtgrades bis zu 100% Bandenidentität zeigen (Kuhnlein et al., 1990). Zhou und Lamont (1999) konnten indessen mit Hilfe von 42 Mikrosatelliten beim Huhn in drei Inzuchtlinien nach ca. 100 Generationen Vollgeschwisterverpaarung eine (Rest-) Heterozygotie von 0 bis maximal 2,3% feststellen. Von den genannten Markersystemen bieten vor allem DFPs und Mikrosatelliten zusätzlich die Möglichkeit, die Zucht von Labortieren routinemäßig zu überwachen (genetic monitoring), da Analysen mit biochemischen Markern eine bestimmte Qualität und Menge von Geweben verschiedener Organe voraussetzen, deren Gewinnung in vivo nicht möglich ist (Russel et al., 1993, Otsen et al., 1995).

Für die Untersuchung der genetischen Diversität zwischen Linien oder Rassen werden alle 4 Markersysteme eingesetzt, wobei DFPs und Mikrosatellitenanalysen bei Nutztierarten mit verfügbaren genetischen Karten die größte Bedeutung haben.

Das Prinzip der Analyse genetischer Diversität mittels DFPs beruht auf Schätzungen genetischer Distanzen anhand von Bandenübereinstimmungsgraden und Bandenfrequenzen. Auf dieser Grundlage können genetische Stammbäume konstruiert werden. Die Eignung von DFPs für populationsgenetische Studien konnten Kuhnlein und Mitarbeiter (1989) an 4 definierten Hühnerlinien ihres Forschungszentrums in Ottawa/Canada demonstrieren. Ihre Schätzungen der genetischen Distanzen spiegelten bekannte genetische Beziehungen und die Zuchtgeschichte der Tiere wider. Auch in verschiedenen selektierten Tiergruppen können Unterschiede in der genetischen Variabilität mit DFPs nachgewiesen werden. Dabei bewirkt Selektion eine größere Homogenität in den Bandenmustern innerhalb als zwischen den Gruppen (Dunnington et al., 1990, Ye et al., 1998a). Bei der Kreuzung von zwei verschiedenen selektierten Hühnerrassen fanden Dunnington et al. (1991) den geringsten Anteil gleicher Banden zwischen den Rassen, einen mittleren Anteil zwischen den selektierten Gruppen innerhalb einer Rasse und den höchsten Anteil zwischen selektierten Tiergruppen und ihren F1-Kreuzungen, womit die Sensitivität der DFPs auch zur Analyse unterschiedlicher genetischer Beziehungen bewiesen wurde. Je größer die genetische Distanz zwischen den Elternlinien einer Kreuzung ist, desto größer müsste die Leistungsüberlegenheit der Kreuzungsnachkommen in Relation zu den Elternleistungen sein (Heterosis), wenn bei den Elternlinien verschiedene Allele fixiert sind. Einen Zusammenhang zwischen der Variabilität von Fingerprints genetisch entfernter Elternlinien und Merkmalen vor allem der Legeleistung ihrer Kreuzungsnachkommen fanden neben der Arbeitsgruppe um Meng (1996) auch Gavora und Mitarbeiter (1996).

Die Grundlage für Hybriden mit überdurchschnittlicher Leistung bilden auf ökonomisch wichtige Merkmale selektierte Ausgangslinien. Diese Selektion kann jedoch zu einer Verengung genetischer Variabilität führen (rev. Weigend et al., 1995). Zur Überprüfung des Spektrums genetischer Variabilität haben Dunnington et al. (1994) und Ye et al. (1998b) kommerzielle Hühner- und Putenlinien in den USA mittels DFPs untersucht und noch ein beträchtliches Reservoir an genetischer Variabilität festgestellt. Zur Erhaltung der genetischen Vielfalt beim Geflügel ist es jedoch wichtig, von der Verdrängung bedrohte, bodenständige Rassen, die sich neben der Leistung in anderen Merkmalen von den Leistungszuchten unterscheiden, zu erhalten, um auf wertvolle Eigenschaften zurückgreifen zu können, wenn es z.B. geänderte Haltungsbedingungen oder Verbraucheransprüche erfordern (Weigend et al., 1995).

International wird im Rahmen des Projektes "Entwicklung von Strategie und Anwendung molekulargenetischer Methoden zur Schätzung der Biodiversität bei genetischen Ressourcen des Huhnes" ("Development of Strategy and Application of Molecular Tools to Assess Biodiversity in Chicken Genetic Resources", AVIANDIV) in Kooperation von 8 Laboratorien in 6 europäischen Ländern die genetische Diversität von 50 Hühnerrassen auf verschiedenstem Niveau (geographische Verteilung, Selektion, Management, phänotypische und genetische Variation) untersucht (Tixier-Boichard et al., 1999), um Strategien zur Erhaltung genetischer Diversität beim Haushuhn zu entwickeln (Weigend, 1999). In Deutschland wird ein ähnliches Projekt mit dem Ziel der Evaluierung und Erhaltung von Geflügelrassen durchgeführt, bei denen nach einer bundesweiten Bestandsanalyse unter Einbeziehung molekularer Typ II Marker, wie DFP, Mikrosatelliten und RAPDs, der Gefährdungsgrad eingeschätzt werden soll, um so die Erhaltungswürdigkeit einer Rasse zu charakterisieren und Maßnahmen zur Erhaltung genetisch wertvoller Geflügelrassen treffen zu können (Weigend et al., 1995).

Ponsuksili et al. (1999) haben die Aussagen der in diesem Zusammenhang wichtigsten Markersysteme (DFPs und Mikrosatelliten) innerhalb und zwischen verschiedenen kommerziellen, ingezüchteten und exotischen Rassen verglichen. Dabei waren die Schätzungen des Heterozygotiegrades innerhalb der Tiergruppen von beiden Markersystemen hoch korreliert ($r=0,88$). Bei der Untersuchung der genetischen Variabilität wildlebender grünfüßiger Teichhühner lieferten DFPs und Mikrosatellitenanalysen ebenfalls übereinstimmende Ergebnisse (Van Duyse et al., 1999). Weitere Mikrosatellitenanalysen genetischer Variabilität zwischen verschiedenen Rassen liegen bei einheimischen japanischen Hühnerrassen (Takahashi et al., 1998), bei verschiedenen kommerziellen und einheimischen finnischen Rassen (Vanhala et al., 1998) und im Vergleich afrikanischer, asiatischer und südamerikanischer Lokalrassen (Wimmers et al., 2000) vor.

Im Gegensatz zu DFPs und Mikrosatellitenanalysen, die sich zur Untersuchung genetischer Diversität sowohl innerhalb als auch zwischen Linien einer Spezies eignen, lassen sich RAPDs eher zur Untersuchung der Diversität zwischen Linien oder Rassen nutzen. Zwar konnten Zhang und Mitarbeiter (1995) verschieden selektierte Broilerlinien anhand von RAPD-Profilen unterscheiden, jedoch nicht mit jedem der eingesetzten Primer-Paare. In einer Studie bezüglich der genetischen Diversität von 4 Hühnerrassen und 2 Putenpopulationen variierten die Beziehungen innerhalb und zwischen den

Tiergruppen ebenfalls in Anhängigkeit von den Primerpaaren, was auf die Sensitivität der RAPDs bezogen auf kleinste Veränderungen in den Analysebedingungen zurückgeführt wird (Smith et al., 1996). Aufgrund der erschwerten Reproduzierbarkeit, der Dominanz der RAPDs und der im Vergleich zu DFPs geringeren Polymorphie favorisieren Plotsky und Mitarbeiter (1995) die Methode der DFPs, um die Diversität von 13 Inzuchtlinien verschiedener Hühnerrassen auf dem Niveau der DNA zu determinieren. Trotz allem wird, wie bei den DFPs, innerhalb von Populationen entsprechend der Zuchtgeschichte eine höhere Übereinstimmung der RAPD-Banden beobachtet als zwischen den Populationen (Plotsky et al., 1995, Smith et al., 1996), allerdings auf einem höheren Niveau (und damit geringerer Polymorphie) als bei DFPs (Plotsky et al., 1995). Das Auftreten spezies-spezifischer Banden erlaubt den Einsatz der RAPDs als schnelle und kostengünstige Methode bei der Untersuchung genetischer Diversität verschiedener Spezies (z.B. Pute - Huhn) insbesondere, wenn eine erst beginnende Genomkartierung noch nicht genügend Primerinformationen für Mikrosatellitenanalysen bietet oder DFPs zu aufwendig sind (Smith et al., 1996).

2.2 Einfluß von Inzucht auf die genotypische Variabilität

Eine Population besteht aus einer sich sexuell fortpflanzenden Individuengemeinschaft, die einen gemeinsamen Genpool aufweist und sich damit von anderen Gesamtheiten (Tieren oder Pflanzen) unterscheidet (Schönmath et al., 1986). Bei der Reproduktion werden die Gene an die nächste Generation weitergegeben. Durch die Keimzellbildung bei den Eltern und die damit verbundene Rekombination entstehen bei den Nachkommen neue Genotypen. Im Falle einer idealen Population bestimmen die Genfrequenzen der Eltern die Genotypenfrequenzen der Nachkommen, so daß die Population genetisch konstant bleibt (Hardy-Weinberg-Gesetz). Dabei ist die ideale Population durch Panmixie ohne Selektion, Mutation, Migration oder genetische Drift gekennzeichnet.

Im Gegensatz zu der idealen Population, die eine Abstraktion darstellt, beruht die genetische Variabilität in natürlichen Populationen ursächlich auf Mutationen und Rekombinationen, die vorteilhaft, schädlich oder neutral sein können. Faktoren wie Selektion (natürlich und künstlich), Unterschiede im Paarungssystem (z.B. Panmixie oder Inzucht), Migration und genetische Drift

wirken modifizierend auf die Variabilität und verdeutlichen, daß mehrere Mechanismen für die genetische Variabilität in einer Population verantwortlich sind.

Die Faktoren Selektion, Mutation und/oder Migration bewirken als systematische Prozesse zuerst eine Änderung der Genfrequenzen und daraufhin eine Änderung der Genotypenfrequenzen. Disperse Prozesse führen über genetische Drift ebenfalls zuerst zu einer Änderung der Genfrequenzen.

Demgegenüber bleiben bei von Panmixie abweichenden Paarungssystemen die Genfrequenzen konstant, während sich die Genotypenfrequenzen ändern (Hohenboken, 1985). Diese Abweichungen von der Möglichkeit, daß sich jedes Individuum des einen Geschlechts mit jedem Individuum des anderen Geschlechts paaren könnte, werden in zwei Kategorien eingeteilt: in Verpaarungen mit phänotypischer Ähnlichkeit und in Verwandtschaftspaarungen, die auch als genetisch assortative Paarungen bezeichnet werden.

Die Paarung von Individuen, die enger verwandt sind als der Durchschnitt der Population, ist als Inzucht definiert (Schönmuth et al., 1985). Dabei kann Inzucht sowohl aus der gezielten Anpaarung verwandter Tiere entstehen als auch zufällig, wenn sich Populationen auf eine geringe Anzahl Ahnen zurückführen lassen. Im ersten Fall bedeutet die zunehmende Verwandtschaft eine steigende Übereinstimmung von Genomanteilen. Im zweiten Fall wird von heterozygoten Tieren zufällig ein Allel häufiger vererbt, so daß das genetische Gleichgewicht aufgrund der Veränderung der Genfrequenzen verschoben wird (genetische Drift). In beiden Fällen wird der Anteil homozygoter Tiere erhöht. Dieser Prozeß kann im Extremfall bis hin zur Fixation bzw. zur Elimination eines Allels führen.

Zwischen zwei Individuen bedeutet diese zunehmende Homozygotie mehr als nur *funktionelle Identität* eines Allels oder beider Allele eines Genortes. Die Allele stellen zusätzlich identische Genkopien einer vorausgegangenen Generation dar: sie sind *herkunftsgleich* oder *identisch homozygot* (Falconer and Mackay, 1996).

Mit steigender Inzucht wächst daher die Wahrscheinlichkeit, daß immer mehr Genorte eines Individuums homozygot werden bzw. in der Population der Anteil ähnlicher Individuen wächst. Die genetische Struktur der Population wird

damit durch Inzucht verändert: die steigende Homozygotie führt zu Fixation sowie Allelverlusten und ist mit einer Abnahme der genotypischen Variabilität in der Population verbunden.

Der Homozygotiegrad von Individuen und Populationen kann einerseits über Verwandtschaftsbeziehungen oder die Populationsstruktur geschätzt oder andererseits mit genetischen Markern bestimmt werden.

2.2.1 Schätzung der Homozygotiezunahme anhand des Inzuchtanstiegs

Die Schätzung des individuellen Inzuchtgrades ist nur möglich, wenn ein vollständiges Pedigree Informationen über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Individuen in einer Population liefert. Als Maß für den Inzuchtgrad wurde von Wright (1921) die Korrelation zwischen den additiv genotypischen Werten zweier Gameten, die sich zur Zygote vereinigen und ein neues Individuum hervorbringen, als Inzuchtkoeffizient, F , definiert:

$$(2.1) \quad F_x = \sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{2} \right)^{n_{1_i} + n_{2_i} + 1} (1 + F_{A_i})$$

n_{1_i} Zahl der Generationen vom Vater zum i -ten Ahnen

n_{2_i} Zahl der Generationen von der Mutter zum i -ten Ahnen

F_{A_i} Inzuchtkoeffizient des i -ten Ahnen

Bezogen auf ein Individuum beschreibt F auch die Wahrscheinlichkeit der Herkunftsgleichheit der beiden Allele eines Genortes bzw. den erwarteten Anteil der Genorte eines Individuums mit herkunftsgleichen Allelen. Weitere Interpretationen beziehen sich auf einen bzw. alle Genorte in einer Population. Der Inzuchtkoeffizient spiegelt hier den erwarteten Anteil der Individuen wider, die an diesem Genort herkunftsgleiche Allele aufweisen. Bezogen auf alle Genorte der Population stellt er den erwarteten Anteil der heterozygoten Genorte dar, die aufgrund der Inzucht homozygot geworden sind. Einzelne Tiere können dabei erhebliche Abweichungen vom Erwartungswert zeigen.

Die praktische, computergestützte Berechnung von Inzuchtkoeffizienten aus vollständigen Stammbäumen über viele Generationen erfolgt jedoch mit Hilfe der sogenannten Verwandtschaftsmatrix (Henderson, 1976). Sie basiert auf dem leichter anwendbaren Zusammenhang des individuellen Inzuchtkoeffizienten mit dem Verwandtschaftsgrad der Eltern, der durch den kollateralen Verwandtschaftskoeffizienten, R , ausgedrückt wird (nach Schönmuth et al., 1985):

$$(2.2) \quad R_{YZ} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{2}\right)^{n_{1i} + n_{2i}} (1 + F_{A_i})}{\sqrt{(1 + F_Y)(1 + F_Z)}}$$

n_{1i} Zahl der Generationen zwischen dem Individuum Y und dem i-ten gemeinsamen Ahnen

n_{2i} Zahl der Generationen zwischen dem Individuum Z und dem i-ten gemeinsamen Ahnen

F_{A_i} Inzuchtkoeffizient des gemeinsamen Ahnen

F_Y, F_Z Inzuchtkoeffizienten der Individuen Y und Z

Zwischen dem Inzuchtkoeffizienten eines Nachkommen X und dem Verwandtschaftskoeffizienten R seiner Eltern Y und Z gilt die folgende Beziehung (Schönmuth et al., 1985):

$$(2.3) \quad F_X = \frac{1}{2} R_{YZ} \sqrt{(1 + F_Y)(1 + F_Z)}$$

Der Inzuchtkoeffizient eines Individuums entspricht somit dem halben Verwandtschaftskoeffizienten seiner Eltern unter der Voraussetzung, daß diese nicht ingezüchtet sind ($F_Y=0, F_Z=0$).

Neben der kollateralen wird in der Verwandtschaftsmatrix auch die direkte Verwandtschaft, R_x , eines Individuums mit seinen Vorfahren (nach Künzi und Stranzinger, 1993) berücksichtigt:

$$(2.4) \quad R_x = \left(\frac{1}{2}\right)^n$$

n Zahl der Generationen von X zu dem gemeinsamen Ahnen

Heute stehen für die Berechnung von individuellen Inzuchtkoeffizienten in Populationen mit vollständigen Stammbäumen z.B. das Programm OPTIMATE Version 2.3 (Schmidt et al., 1996, URL1), die INBREED PROCEDURE des Programmpaketes SAS, die Programme Genotype 3.0 (URL2) oder Dogbase 3.0 (URL3) sowie das Programmpaket MTGSAM (Van Tassel und Van Fleck, 1995) zur Verfügung.

Liegen keine Pedigreeinformationen vor, können aus der Zuchtstruktur der Population Rückschlüsse auf ihren mittleren Inzuchtgrad gezogen werden. Die verschiedenen Schätzungen basieren allerdings wie das Hardy-Weinberg-Gesetz auf der abstrakten idealen Population. Eine Verbindung von Theorie und Realität konnte durch das Konzept der effektiven Populationsgröße, N_e , geschaffen werden, denn jede reale Population wird dieselben Veränderungen genetischer Diversität erfahren wie die ideale Population einer bestimmten Größe. Die Größe dieser idealen Population, die aus äquivalenten Anzahlen männlicher und weiblicher Individuen besteht und denselben Inzuchtanstieg wie die beobachtete, reale Population zeigt, wird dann die effektive Populationsgröße der realen Population genannt. Die effektive Populationsgröße ist meist kleiner als die aktuelle Populationsgröße, weil

- die realen Populationen nicht selten aus unterschiedlich vielen männlichen (N_m) und weiblichen (N_w) Individuen bestehen (Wright, 1931):

$$(2.5) \quad \frac{1}{N_e} = \frac{1}{4N_m} + \frac{1}{4N_w}$$

- die Anzahl der Tiere in diskreten, aufeinander folgenden Generationen variiert (Falconer and Mackay, 1996):

$$(2.6) \quad \frac{1}{N_e} \approx \frac{1}{t} \left[\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} + \frac{1}{N_3} + \dots + \frac{1}{N_t} \right]$$

- auch bei Verminderung der Varianz der Familiengröße durch Auswahl eines männlichen Nachkommen je Vater und eines weiblichen Nachkommen je Mutter N_e nach der folgenden Formel (Gowe et al., 1959, Hill, 1972) berechnet wird:

$$(2.7) \quad \frac{1}{N_e} = \frac{3}{16N_m} + \frac{1}{16N_f}$$

Da sich in kleinen Populationen identische Gameten häufiger vereinigen, steht die Inzuchtzunahme ΔF direkt im Zusammenhang mit der effektiven Populationsgröße und wird wie folgt ausgedrückt (Schönmuth et al., 1986):

$$(2.8) \quad \Delta F = \frac{1}{2N_e}$$

Dabei kann die Inzucht nur in Relation zu der noch vorhandenen Heterozygotie ansteigen (Falconer and Mackay, 1996):

$$(2.9) \quad \Delta F = \frac{F_t - F_{t-1}}{1 - F_{t-1}}$$

Die verschiedenen Schätzungen zeigen die direkte Abhängigkeit der Inzucht von der Größe einer Population und ihrem Geschlechterverhältnis. Je größer die Verwandtschaft zwischen den Paarungspartnern vor allem in kleinen Populationen ist, desto größer sind die Inzuchtkoeffizienten der Nachkommen und desto größer wird die Homozygotiezunahme in der Population. In einer ingezüchteten Population weichen die Genotypenfrequenzen deshalb wie folgt von denen in einer idealen Population ab (Tabelle 2.5, Hohenboken, 1985):

Tabelle 2.5:

Effekt der Inzucht auf die Genotypenfrequenzen in einer Population mit 2 Allelen je Genort und dem mittleren Inzuchtkoeffizienten F (Hohenboken, 1985)

Genotyp	Genotypenfrequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	Genotypenfrequenzen in einer ingezüchteten Population
A_1A_1	p^2	$p^2 + pqF = p^2(1-F) + pF$
A_1A_2	$2pq$	$2pq - 2pqF = 2pq(1-F)$
A_2A_2	q^2	$q^2 + pqF = q^2(1-F) + qF$

2.2.2 Nutzung genetischer Marker zur Bestimmung des Homozygotiegrades beim Geflügel

Seit 1970 ist es möglich, den Homozygotiegrad einer Population direkt mit Hilfe von verschiedenen genetischen Markern zu bestimmen. Zuerst wurden kodierende Abschnitte des Genoms genutzt, um sowohl auf der Basis von Proteinen als auch auf dem Niveau der DNA genetische Variabilität gerade in kleinen Populationen mit nur wenigen hundert Individuen zu überwachen (Lande and Barrowclough, 1987). Mit der Entwicklung der DFPs (Jeffreys, 1985) und der Analyse von Mikrosatellitenfragmenten (Tautz, 1989, Weber and May, 1989) konnte die Untersuchung der im Vergleich zu Proteinpolyorphismen größeren Variabilität auf dem Niveau der DNA auch auf nichtkodierende Bereiche ausgedehnt werden.

2.2.2.1 Proteinpolyorphismen

Lösliche Proteine, wie beispielsweise Enzyme, Milcheiweiße oder Blutgruppenantigene, werden zur Bestimmung genetischer Variabilität herangezogen. Jedoch ist der Polymorphiegrad gerade bei Enzymen begrenzt, wenn nicht sogar Fixation festgestellt wird (Magoulas, 1998, Singh and Nordskog, 1981). Vorteilhaft ist bei Proteinpolyorphismen der geringe technische Untersuchungsaufwand, so daß sie gut zum Monitoring kleiner und geographisch isolierter Inselformen geeignet sind (Bryant et al., 1999, Frankham, 1998). Im Vergleich zur Haupt- oder Festlandspopulation konnte Frankham (1998) auf eine mittlere Inzucht wie folgt schließen:

(2.10)

$$F_e = 1 - \frac{H_{Is}}{H_M}$$

- F_e effektiver Inzuchtkoeffizient der Insepopulation
 H_{Is} Heterozygotie der Insepopulation
 H_M Heterozygotie der Festlandspopulation

Während Frankham (1998) gute Übereinstimmung der untersuchten Variabilität mit den Ergebnissen anderer Schätzmethoden beschreibt, sind bei Mina und Mitarbeitern (1991) widersprüchliche Ergebnisse verschiedener experimenteller Studien zu finden. Untersuchungen von Inzuchtlinien beim Huhn zeigten entweder Übereinstimmung der beobachteten Heterozygotie mit der Erwartung oder einen Heterozygotenüberschuß. Für den letzten Fall wurden verschiedene Ursachen diskutiert: die Stichprobengrößen der Experimente, die Einbeziehung unterschiedliche Genorte, Differenzen zwischen den Populationen hinsichtlich Inzuchtraten und genetischer Bürde sowie die Möglichkeit natürlicher Selektion. Mina et al. (1991) fanden bei 24 Hühnerlinien mit einem mittleren Inzuchtgrad von bis zu 97,5% einen Heterozygotenüberschuß im Vergleich mit den Erwartungen ($2pq[1-F]$). Da in jeder Linie nur einmalig 6 Proteinpolymorphismen untersucht wurden, ging der beobachtete Anteil heterozygoter Genotypen in den „effektiven Inzuchtkoeffizienten F_e “ (Sing et al., 1973) wie folgt ein:

(2.11)

$$F_e = 1 - \frac{H_o(N-1)}{2pqN - 0,5H_o}$$

- H_o beobachteter Anteil heterozygoter Individuen
 N Stichprobenumfang
 p, q Genfrequenzen

Aufgrund begrenzter Polymorphie und der Annahme, daß Proteine nicht selektiv neutral sind, sieht Magoulas (1998) für den Bereich Monitoring genetischer Variabilität in der Aquakultur die Analyse von Proteinpolymorphismen nicht als Methode der Wahl an.

2.2.2.2 Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs)

Auf dem Niveau der DNA ist es Bumstead und Mitarbeitern (1987) erstmals gelungen, anhand von RFLPs an endogenen Leukose-Retroviren die genetische Variabilität von Inzuchtlinien beim Huhn direkt zu bestimmen und mit Schätzungen aus Pedigreeinformationen zu vergleichen. Ein bestimmtes Restriktionsenzym schneidet die genomische DNA asymmetrisch an definierten Stellen der endogenen aviären Leukose-Retrovirus-(*ev*-)Loci und liefert so eine detektierbare Bande je Locus. Eine fehlende Bande steht für den homozygot rezessiven Genotyp $ev\bar{ev}$ mit der Frequenz q^2 und liefert die Grundlage zur Schätzung der Genfrequenz p am *ev*-Locus der entsprechenden Linie:

$$(2.12) \quad p = 1 - \sqrt{q^2}$$

Anhand folgender Voraussetzungen am *i*-ten *ev*-Locus

- selektive Neutralität der *ev*-Loci
- Stabilität der *ev*-Loci
- geringer Einfluß geschlechtsgebundener *ev*-Loci auf das Gesamtergebnis
- Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für die *ev*-Loci

kann die Heterozygotie h_i anhand von

$$(2.13) \quad h_i = 2p_i(1 - p_i)$$

bestimmt und der Inzuchtkoeffizient der Linie nach der Definition von Wright (1922) berechnet werden:

$$(2.14) \quad F = 1 - \frac{H_t}{H_o} = 1 - \left[\left(\frac{\sum_{i=1}^n h_i}{n} \right) : H_o \right]$$

- H_t mittlere Heterozygotie zum Zeitpunkt t
 H_o mittlere Heterozygotie in der fremdgezüchteten Ausgangspopulation
 n Anzahl *ev*-Loci

Da die Ausgangsheterozygotie der Linien nicht bekannt war, wurde sie unter der Voraussetzung selektiv neutral segregierender Loci näherungsweise mit 0,5 angenommen. Diese Schätzung ist abhängig von der Anzahl *ev*-Loci und dem Stichprobenumfang. Je mehr Tiere einer Linie die Bande eines *ev*-Locus zeigen, desto größer ist die Variabilität. Je mehr Tiere den Genotyp *ev̄ev̄* zeigen, desto größer wird der Inzuchtkoeffizient. Diese Untersuchung bestätigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen der anhand der Pedigrees geschätzten Inzucht und dem mittels 5 RFLP bestimmten Homozygotiegrad. Die absoluten Abweichungen zwischen den Schätzwerten wurden ursächlich mit den getroffenen Annahmen in Verbindung gebracht.

2.2.2.3 DNA-Fingerprints (DFPs)

Die bei Multilocus-DNA-Fingerprints entstehenden individuellen Fragmentmuster zeigen um so mehr Übereinstimmung, je ähnlicher die Individuen sind. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Individuen aus verschiedenen Linien einer Rasse mehr identische Banden aufweisen als Individuen verschiedener Rassen (Grunder et al., 1994, Plotsky et al., 1995). Zusätzliche Selektion bewirkt eine Erhöhung der Homogenität innerhalb der Linien (Plotsky et al., 1995, Tixier-Boichard et al., 1996, Ye et al., 1998a, Zhu et al., 1996b). Ebenfalls zu größerer Übereinstimmung der Fragmentmuster führt die Abstammung von gemeinsamen Vorfahren. Bei experimentell erstellten Hühnerlinien mit nahezu 100% Inzucht stellten Kuhnlein et al. (1990) sowie Plotsky et al. (1995) den Extremfall der totalen genetischen Identität der Individuen fest.

Die Bestimmung der DNA-Variabilität mittels DFPs erfolgt entweder über den Bandenübereinstimmungsgrad, *BS*, Jeffreys (1985):

(2.15)

$$BS[\%] = \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B} \cdot 100$$

N_{AB} Anzahl der gemeinsamen Banden der Individuen A und B
 N_A, N_B Anzahl auswertbarer Banden der Individuen A bzw. B

oder basierend auf der Bandenfrequenz anhand des „Uniformitätsindex“, U (Kuhnlein et al., 1990).

$$(2.16) \quad U = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N v_i$$

N Anzahl verschiedener Banden in einer Linie

v_i Frequenz der Bande i in der Linie

Kuhnlein et al. (1990) fanden zwischen der Bandenvariabilität und den aus Herdbüchern geschätzten mittleren Inzuchtkoeffizienten von 7 minimal ($F=2,5\%$) bis maximal ($F>98\%$) ingezüchteten White Leghorn-Linien einen linearen Zusammenhang. Sie entwickelten daraus eine Kalibrierungskurve,

$$(2.17) \quad F = \frac{U - 0,417}{0,556}$$

die es ermöglicht, anhand der mittleren Bandenfrequenz von DFPs in unbekanntem Hühnerpopulationen auf deren Inzuchtgrad zu schließen. In ihren Untersuchungen stieg der BS zwar an, jedoch war kein linearer Zusammenhang festzustellen.

Im Gegensatz dazu fanden Zhu und Mitarbeiter (1996a) bei der Auswertung von DFPs aus 6 geschlossenen Putenlinien, deren mittlerer Inzuchtgrad indirekt anhand der Familiengröße geschätzt wurde und zwischen 2,5 und 44,9% lag, einen linearen Zusammenhang zwischen BS und dem Inzuchtgrad:

$$(2.18) \quad F = \frac{BS - 0,40}{0,48}$$

Unabhängig davon, ob die Bandenvariabilität oder der BS zur Berechnung der mittleren Inzucht herangezogen werden, gibt es zwischen nichtverwandten ($F=0$) Individuen immer eine geringe Bandenübereinstimmung der Fragmentmuster. Bei unverwandten Hühnern von Mast- bzw. Legelinien fanden Hillel und Mitarbeiter (1989) einen mittleren BS von 0,21 bzw. 0,25. Haberfeld et al. (1991) konnten dieses Ergebnis anhand der Untersuchung

von 20 Masthühnern mit 4 verschiedenen Sonden bestätigen und gaben einen mittleren *BS* von 0,25 an. Im Vergleich dazu ist der *BS* von 0,40 bei unverwandten Individuen in der Arbeit von Zhu et al. (1996a) relativ hoch und wurde auf Selektion bei den Puten zurückgeführt.

Im Gegensatz zu der empirisch festgestellten Zunahme des Anteils übereinstimmender Banden mit zunehmendem Inzuchtgrad folgert Groen (1993) aus theoretischen Überlegungen, daß bei einer Inzuchtzunahme per se (unter Annahme konstanter Bandenfrequenzen) der Anteil gleicher Banden abnehmen müßte, denn auch homozygote Genotypen schlagen sich im *BS* in nur einer gleichen Bande nieder. Da sich in kleinen, geschlossenen Populationen jedoch die Genotypenfrequenzen nicht nur aufgrund von Inzucht, sondern auch die Bandenfrequenzen aufgrund von Fixation durch genetische Drift ändern, werden die empirischen Beobachtungen als Folge der kombinierten Wirkung beider Einflüsse, und nicht ausschließlich durch Inzucht allein aufgefaßt.

Welche der beiden Auswertungsmöglichkeiten von DFPs nun zuverlässige Ergebnisse hinsichtlich der Bewertung genetischer Variabilität innerhalb von Populationen liefert, haben Ponsuksili et al. (1998) unter anderem in ihrer Studie über die Berechnung genetischer Variabilität innerhalb und zwischen verschiedenen kommerziellen, lokalen und exotischen Hühnerlinien untersucht. Innerhalb der Linien liefern die Schätzungen unabhängig von ihrer Basis Unterschiede in der genetischen Variabilität, die Rückschlüsse auf die unterschiedliche Zuchtgeschichte erlauben. Letztendlich wird der *BS* jedoch favorisiert, weil er aufgrund der Untersuchungsmethodik einen vereinfachten Fragmentvergleich beinhaltet und die größte Sensitivität zeigt.

2.2.2.4 Mikrosatelliten

Eine Alternative zu den technisch und statistisch begrenzt auswertbaren und laboraufwendigen DFPs bieten die Fragmentlängenvariationen auf der Basis von Mikrosatelliten, wenn für die betreffende Spezies bereits Primerinformationen vorliegen (Ponsuksili et al. 1998). Diese seit 1989 bekannte Markerklasse (Tautz, 1989, Weber and May, 1989) hat gegenüber den DFPs die entscheidenden Vorteile, daß die Anzahl der Loci bei der Untersuchung bekannt ist, daß Allele unter geringerem Aufwand reproduzierbar bestimmt und heterozygote Tiere damit direkt beobachtet werden können (Zhou and Lamont, 1999). Somit entfallen die Probleme der

Untersuchung eines begrenzten Fragmentlängenumfanges ebenso wie die limitierte Differenzierung zwischen Fragmenten unterschiedlicher Länge, die bei der Auswertung von DFPs auftreten (Groen, 1993). Zudem sind Mikrosatelliten weit über das Genom verteilt und weisen eine große Polymorphie auf, die in der folgenden Tabelle 2.6 anhand der Anzahl an Mikrosatellitenallelen in verschiedener Hühnerlinien dargestellt wird. In dieser Tabelle wird die bereits bei den DFPs beschriebene Abnahme genetischer Variabilität mit zunehmender Ähnlichkeit der Tiere entweder durch Selektion (Crooijmans et al., 1996a, Kaiser et al., 2000) oder durch Inzucht (Zhou and Lamont 1999) angedeutet.

Tabelle 2.6:
Polymorphie von Mikrosatelliten in verschiedenen Hühnerlinien

Hühnerlinie	Anzahl Mikrosatelliten	Anzahl Allele je Mikrosatellit	Autor
9 selektierte Broiler- und 6 selektierte Legelinien	17	5,2 (2 - 10) 3,0 (1 - 8)	Crooijmans et al., 1996a
10 Japanische Rassen, 1 White Leghorn	8	5,6 (2 - 10)	Takahashi et al., 1998
8 Linien*	9	8,1 (4 - 13)	Vanhala et al., 1998
23 Inzuchtlinien**	42	3,2 (1 - 6)	Zhou and Lamont, 1999
12 Linien***	15	- (2 - 12)	Ponsuksili et al., 1999
2 kommerzielle Broilerlinien	59	4,4 (-)	Kaiser et al., 2000
22 Lokalrassen der Tropen und Subtropen	22	5,5 (2 - 11)	Wimmers et al., 2000

* bestehend aus White Leghorn- und Broiler-Hybriden, Finn. Landrasse, Rhode Island Red

** entwickelt aus Leghorn, Jungle Fowl, Fayoumi, Spanischen Rassen

*** bestehend aus 1 Inzuchtlinie-, 3 kommerziellen und 8 exotischen Linien

Im direkten Vergleich genetischer Variabilität, die zum einen mit DFPs und zum anderen mit 15 Mikrosatelliten bestimmt wurde, konnten Ponsuksili und Mitarbeiter (1999) eine Korrelation von $r=0,88$ zwischen den ermittelten Heterozygotiegraden zeigen. Die untersuchte Inzuchtlinie wurde mit beiden Methoden durch die niedrigste Heterozygotie (DFP: 5,1%, Mikrosatelliten: 12,1%) charakterisiert. Dabei wurde die beobachtete Heterozygotie, h_i , eines i -ten Locus wie folgt bestimmt (nach Nei, 1987):

(2.19)

$$h_i = 1 - \sum_{j=1}^{n_i} p_{ij}^2$$

p_{ij} Frequenz des j -ten Allels am i -ten Genort

n_j Anzahl der Allele am i -ten Genort

Die mittlere Heterozygotie einer Linie, H , wird dann aus dem arithmetischen Mittel der Heterozygotie der Loci, h_i , gebildet. Die Abnahme genetischer Variabilität durch Inzucht konnte von Zhou und Lamont (1999) bei 17 Hühnerlinien mit einer mittleren Inzucht von 99% mit dem Nachweis einer Restheterozygotie von maximal 8% eindrucksvoll demonstriert werden.

Beide für die Polymorphie eines Markers verantwortlichen Maße, die Anzahl der Allele und ihre Frequenz, vereint der „*Polymorphic Information Content*“, *PIC*, (Botstein et al., 1980):

(2.20)

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

n Anzahl der Allele

p_i, p_j Frequenzen des i -ten und j -ten Allels.

Er wird um so kleiner, je weniger Allele hoher Frequenz in der Population auftreten und nimmt für die Inzuchtlinie in der Untersuchung von Ponsuksili et al. (1999) ebenfalls den geringsten Schätzwert von 0,16 im Vergleich zu den übrigen Linien an.

Nicht nur die Abnahme genetischer Diversität besonders aufgrund von Inzucht sondern auch die Vererbung herkunftsgleicher Allele konnte mit Mikrosatelliten nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Christensen (1996) verfolgte die Vererbung von Allelen eines Ebers bei Vater-Tochter-Paarung anhand von 21 unabhängigen Markern (15 Mikrosatelliten, 1 RFLP, 2 Blutgruppenloci und 3 weiteren Proteinpolymorphismen). Bei den ersten ingezüchteten Nachkommen müssten theoretisch herkunftsgleiche (identisch homozygote) Allele bezogen auf ihren Vater bzw. Großvater mit einer Wahrscheinlichkeit von $F=25\%$ auftreten. Die Berechnung der „realisierten Inzucht“, R_I ,

(2.21)

$$RI = \frac{\sum_{i=1}^N RI_i}{N}$$

RI_i	1	bei identischer Homozygotie am i -ten Genort
	0	sonstige
N		Anzahl informativer Genorte

lag im Mittel bei 25,4% und entsprach damit den Erwartungen. Die Untersuchung zeigte deutlich eine individuelle Variation der realisierten Inzucht von 7 bis 47% bei den Tieren mit demselben Inzuchtkoeffizienten. Der Anteil der Gründerallele des Ebers bei seinen Rückkreuzungsnachkommen lag mit 74,1% nahe der erwarteten Aufspaltung im Verhältnis von 3:1.

In wildlebenden Populationen ist die Probennahme oft nur zu einem Zeitpunkt möglich. Frankham (1998) verglich in einer Literaturstudie Insel- und Festlandpopulationen von Säugetieren, Vögeln, Reptilien, Fischen, Amphibien, Insekten und Pflanzen anhand von Protein- und Mikrosatellitenpolymorphismen unter Anwendung der Formel (2.10), um über die Inzuchtkoeffizienten das Risiko des Aussterbens besser einschätzen zu können.

Wenn von einer kleinen Population im Abstand von einigen Generationen Untersuchungsmaterial vorhanden ist, kann die Heterozygotieabnahme mit Mikrosatelliten bestimmt und mit der Vorhersage über die mittlere Inzuchtzunahme der Population (nach Wright 1931) verglichen werden:

(2.22)

$$H_t = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right) H_{t-1}$$

H_t	Schätzung der Heterozygotie in der Generation t
N_e	effektive Populationsgröße
H_{t-1}	beobachtete Heterozygotie anhand von Mikrosatelliten

Eine größere Polymorphie der Mikrosatelliten im Vergleich zu DFPs bzw. RFLPs stellten sowohl Ponsuksili et al. (1999) als auch Zhou und Lamont (1999) fest. Insgesamt werden diese Marker als genau und zuverlässig (Zhou and Lamont, 1999) und als die zur Zeit beste verfügbare Methode zur Bestimmung genetischer Biodiversität eingeschätzt (Wimmers et al., 2000).

2.3 Auswirkungen von Inzucht auf Leistungsmerkmale beim Geflügel

Die zunehmende Ähnlichkeit zwischen ingezüchteten Individuen einer Population aufgrund gemeinsamer Vorfahren beruht auf einer Abnahme genotypischer Variabilität zugunsten der Homozygotie. Die Homozygotiezunahme führt zu einem gehäuften Auftreten homozygot rezessiver Allele, deren Ausprägung zuvor bei größerer Diversität in Kombination mit heterozygot dominanten Allelen modifiziert war. Der Dominanzverlust wirkt sich sowohl qualitativ als auch quantitativ auf die Leistungen der Population aus. Bei Dittmann (1969) ist eine Übersicht von Letalfaktoren zu finden, die homozygot unter anderem zu Kükenataxie, angeborenem Zittern, Flugunfähigkeit, Polydaktylie, Kieferdeformationen, Skelettmißbildungen oder Zwergwuchs beim Geflügel führen. Insgesamt wird die phänotypische Expression verschiedener rezessiver Allele als eine Ursache für einen zu beobachtenden Leistungsrückgang unter Inzucht angesehen (Mitton, 1993). Als weitere Ursache wird ein Heterozygotenvorteil gegenüber dominant homozygoten Tieren (Überdominanz), der aufgrund der Homozygotiezunahme bei Inzucht abnimmt, für die auftretenden Inzuchtdepressionen diskutiert (Charlesworth and Charlesworth, 1987).

Inzuchtdepressionen als Rückgang der mittleren Merkmalsausprägung unter Inzuchteinfluß (Schönmuth et al. (1986) sind abhängig vom Inzuchtgrad, den Genfrequenzen in der Ausgangspopulation und dem Dominanzgrad des Merkmals. Je nach Art und Anzahl der in der Ausgangspopulation vorhandenen Anlagen und je nach ihrer zufälligen Kombination bei der Paarung verwandter Tiere unterliegen vor allem Reproduktions- und Fruchtbarkeitsmerkmale sowie die Vitalität der Tiere der Depression. Beim Geflügel sind besonders die Schlupffähigkeit, die Küken- und Junghennenmortalität und die Legeleistung betroffen (Wilson, 1948a und 1948b, Shoffner, 1948, Kulenkamp et al., 1973, Abplanalp, 1974). Die am stärksten von der Inzucht beeinflussten quantitativen Merkmale zeichnen sich meist durch eine geringe Heritabilität aus (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7:

Schätzwerte für die Heritabilität von verschiedenen Leistungen beim Geflügel

Merkmal	Heritabilität	Autor
Fertilität	0,06-0,10	Wilson 1948a
Schlupf aus befruchteten Eiern	0,02	Wilson 1948b
Schlupf aus allen Eiern	0,15	Brandsch und Büchel, 1967
Alter beim ersten Ei	0,36	Marks and Kinney, 1964
Mortalität	0,10	Brandsch und Büchel, 1967
Embryomortalität	0,01	Wilson 1948b
Kükenmortalität bis 8. Woche	0,05	Wilson 1948b
Eizahl	0,16	Wilson 1948a
	0,16	Lerner and Taylor, 1943
	0,17-0,24	Abplanalp, 1979
	0,22-0,26	Savas et al., 1999
	0,30	Brandsch und Büchel, 1967
	0,32-0,36	Sittmann et al., 1966
	0,34	Shoffner, 1946
	0,39	Marks and Kinney, 1964
Eigewicht	0,36-0,60	Savas et al., 1999
Körpergewicht	0,36	Marks and Kinney, 1964
	0,40	Brandsch und Büchel, 1967
	0,57-0,62	Savas et al., 1999
	0,60	Sittmann et al., 1966

Eine geringe Heritabilität ist gleichbedeutend mit einer niedrigen genotypischen Varianz in der Population vermutlich aufgrund natürlicher Selektion (Schönmath et al., 1986). Unterschiede in der Heritabilität treten nicht nur zwischen verschiedenen Merkmalen sondern auch zwischen gleichen Merkmalen in unterschiedlichen Populationen auf, die sich z.B. in verschiedenen Prüfperioden (Savas et al., 1999), in ihrer genetischen Struktur, ihrem Inzuchtgrad oder in Selektionsmaßnahmen (Wilson, 1948a) unterscheiden.

Die Inzuchtdepressionen sind ebenfalls von Population zu Population unterschiedlich. Jede Linie reagiert dabei anders auf Inzucht, wobei der Grad der Depression nicht vorhersehbar ist (Shoffner, 1948, Abplanalp und Woodard, 1967, Woodard, 1982 und 1983, Wang und Pirchner, 1992). Doch nicht nur die unterschiedliche genetische Konstitution verschiedener Linien,

sondern auch die Einflüsse durch Entstehungsgeschichte, Größe, Inzuchtgrad und -rate und Selektionsintensität werden ursächlich für die unterschiedlichen Manifestationen angeführt (Shoffner, 1948, Cahaner, 1984). Die folgende Tabelle 2.8 spiegelt dies anhand verschiedener Inzuchtdepressionen eines Merkmals in unterschiedlichen Populationen bei einem Anstieg der Inzucht um 10% wider.

Tabelle 2.8:

Inzuchtdepressionen von Reproduktions-, Vitalitäts- und Produktionsmerkmalen bei einem Inzuchtanstieg von 10% bei Huhn, Wachtel und Fasan

Merkmal	Depression		F ³	Autor
	Rate [%] ¹	[Einheiten] ²		
Fertilität [%]	- 1,1	- 0,9	0,12	[2]
	/	- 1,7	0,09	[8]
	/	- 2,4	0,42	[3]
	/	- 11,0	0,50	[7]
	/	- 0,3 bis - 17,6	0,44	[9]
Schlupf aus befruchteten Eiern [%]	/	- 2,1	0,09	[8]
	- 6,2	- 4,4	0,12	[2]
	/	- 4,4	0,65	[6]
	/	- 7,0	0,50	[7]
	/	- 10,0	0,42	[3]
Schlupf aus allen Eiern [%]	/	- 2,5	0,42	[3]
	/	- 2,6	0,09	[8]
	- 7,1	- 4,5	0,12	[2]
	- 8,9	- 7,1	0,50	[1]
	/	- 0,8 bis - 10,9	0,44	[9]
Alter beim ersten Ei [Tage]	+ 0,8 bis 1,1	+ 1	0,16	[5]
	/	+ 1	0,50	[7]
	/	+ 6	0,65	[6]
	+ 3,8	+ 7,2	0,50	[1]
Mortalität [%]		+ 2,0 bis + 4,0	0,50	[7]
Überlebende Tiere bis 7. Woche [%]	- 3,0	- 2,9	0,50	[1]

Tabelle 2.8 (Fortsetzung)

Merkmal	Depression		F ³	Autor
	Rate [%] ¹	[Einheiten] ²		
Eizahl [Anzahl]	/	- 1,5	0,50	[7]
	- 1,3	- 3,7	0,05	[4]
	- 2,0	/	0,09	[8]
	-2,7	- 3,8	0,12	[2]
	- 1,7 bis -2,8	/	0,16	[5]
	-13,8	-7,7	0,50	[1]
	/	- 9,0	0,65	[6]
	/	- 2,8 bis - 9,2	0,44	[9]
	Eigewicht [g]	- 0,8	- 0,4	0,12
0,0 bis - 0,9		/	0,16	[5]
/		- 0,7	0,09	[8]
- 1,7		- 1,0	0,50	[1]
/		- 0,2 bis - 1,1	0,44	[9]
Körpergewicht [g]	/	- 2,0 bis - 4,0	0,50	[7]
	-1,3	- 23,0	0,12	[2]
	/	- 28,0 bis - 31,0	0,09	[8]
	- 4,0	- 65,3 bis - 74,8	0,50	[1]

¹ prozentualer Anteil vom Mittelwert

² naturale Depression

³ Inzuchtniveau

[1] Cahaner, 1984: selektierte, kommerzielle Broilerlinie (White Rock Typ)

[2] Flock et al., 1991: 2 Legelinien (White Leghorn) mit reziproker rekurrenter Selektion (RRS)

[3] Nordskog and Cheng, 1988: experimentelle Leghornlinie zu immunogenetischen Studien

[4] Savas et al., 1999: 2 selektierte, kommerzielle Legelinien (Rhodeländer, White Rock)

[5] Sewalem et al., 1999: 3 selektierte Legelinien (White Leghorn)

[6] Shoffner, 1948: 9 verschiedene experimentelle Hühnerlinien zur Reaktion auf Zuchtsysteme

[7] Sittmann et al., 1966: experimentelle, nichtselektierte Wachtellinie (Reaktion auf hohe Inzuchtrate)

[8] Wang und Pirchner, 1992: Rhode Island, Light Sussex und reziproke Kreuzungen (RRS)

[9] Woodard et al., 1983: 10 experimentelle Fasanlinien (wiederholte Rückkreuzung)

Vor allem die Fruchtbarkeit, die Schlupfraten und die Legeleistung zeigen in der Tabelle 2.8 eine deutliche Reduktion bei steigender Inzucht. Dieselben Merkmale sind in der Literaturstudie von Dittmann (1969) bis zurück zum Jahr 1928 von den größten Leistungsdepressionen betroffen, allerdings spielen hier auch Aufzuchtverluste bis zu 24% in den verschiedenen Untersuchungen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Die Merkmale Eigewicht und Körpergewicht verringern sich, wie aufgrund der höheren Heritabilität erwartet, kaum mit

zunehmender Inzucht. Die Ergebnisse von Cahaner (1984) sind vor dem Hintergrund der Broilerproduktion zu sehen, wo die Tiere innerhalb von 7-8 Wochen rund 2 kg Körpergewicht erreichen.

Die unterschiedliche Ausgangsvariabilität der untersuchten Linien ist nur eine Ursache für die teilweise erheblichen Abweichungen innerhalb eines Merkmals. In den Berechnungen von Sewalem und Mitarbeitern (1999) treten unterschiedliche Depressionen vor allem für Reproduktionsmerkmale auf je nach dem, ob die Inzucht der Henne, des Hahnes oder die Inzucht des Nachkommen in die Regression einbezogen wird. Die Beziehung von Leistungsdepressionen und Inzuchtgrad ist zudem nicht in jedem Fall linear (Shoffner, 1948, Woodard et al., 1983, Cahaner, 1984). Besonders zum Beginn des Inzuchtanstiegs bis ca. 40% ist der Inzuchteinfluß stärker als bei höheren Inzuchtgraden, wobei dann oft eine Stabilisierung zu beobachten ist (Shoffner, 1948, rev. Dittmann, 1969, Abplanalp, 1979). Woodard und Mitarbeiter (1983) stellten bei wiederholten Rückkreuzungen von Fasanen über 4 Generationen fest, daß in der zweiten Rückkreuzungsgeneration bei einer mittleren Inzucht von 25% die Verluste bei der Reproduktionsleistung am größten waren verglichen mit den Ergebnissen der übrigen Generationen.

Doch nicht nur der Inzuchtgrad, sondern auch die Inzuchtrate trägt entscheidend zur Höhe der Leistungsdepression bei. In den Untersuchungen von Narayan (1976) und Trompelt et al. (1982) bei Japanischen Wachteln und von Horn und Meleg (2000) bei Wirtschafts- und Brieftauben führte enge Inzucht (Vollgeschwisterpaarung) zu stärkeren Inzuchtdepressionen als Paarungen zwischen entfernteren Verwandten. Auch bei einer mittleren Inzuchtrate von nur maximal 2,7% je Generation konnten Nordskog und Cheng (1988) bei verschiedenen Leghornlinien beobachten, daß ein höherer Inzuchtzuwachs mit größeren Inzuchtdepressionen verbunden ist. Im Extremfall resultierte die Vollgeschwisterpaarung bzw. wiederholte Rückkreuzung ohne künstliche Selektion bei experimentellen Puten-, Fasan-, Wachtel- und Rebhuhnlinien im Aussterben von teilweise mehr als der Hälfte der eingesetzten Linien wegen der hohen Inzuchtdepressionen bei den Reproduktionsmerkmalen (Abplanalp and Woodard, 1967, Kulenkamp et al., 1973, Sittmann et al., 1966, Woodard et al., 1983 und 1982).

Die Unfruchtbarkeit der ingezüchteten Hähne spielte beim Verlust der Rebhuhnlinien bei Woodard et al. (1982) eine erhebliche Rolle. Eine verminderte Reproduktionsleistung auf der Hahnenseite unter Inzucht bei

Legelinien (Moravia BSL) konnten Machal und Mitarbeiter (1995) nachweisen. In diesen Untersuchungen zeigten sowohl das Ejakulatvolumen als auch die Spermaqualität Depressionen. Unter enger Inzucht ist die Art der Paarung (Vollgeschwister- oder Eltern-Nachkommen-Paarung) von untergeordneter Bedeutung (Trompelt et al., 1982). Die Inzuchtdepressionen traten in dieser Studie merkmalsabhängig auf.

Wenn bei Inzuchtpaarungen künstlich selektiert wird, kann in Abhängigkeit von der Inzuchtrate eine Kompensation des Leistungsabfalls erreicht werden, wenn die Inzuchtrate 5% je Generation nicht übersteigt (Pirchner, 1983). Bei dieser „Reinigung“ ist zu beachten, daß der Inzuchtkoeffizient in diesem Fall die Homozygotiezunahme überschätzt (Pirchner, 1983, Schönmath et al., 1985, Falconer and Mackay, 1996).

Eine durch Selektion auf Legeleistung verminderte genetische Bürde vermutet Abplanalp (1979) als Ursache für die beobachtete Kompensation in der Legeleistung bei einigen seiner Inzuchtlinien. Bei auf Körpergewicht selektierten Broilern stellte Cahaner (1984) eine für die Broilerproduktion zu vernachlässigende Inzuchtdepression beim Körpergewicht fest, denn zur Produktion kommen Hybriden, die nicht ingezüchtet sind. Er vermutet, daß in den selektierten Elternlinien nicht unbedingt die Tiere mit den „besten“ Allelen für Körpergewicht, sondern diejenigen mit dem geringsten Inzuchtniveau ausgewählt werden.

Im Gegenzug fördert Selektion die Inzucht, denn leistungsstarke Familien tragen mit immer mehr Nachkommen zur nächsten Generation bei. Die Kompensation im Selektionskriterium wird dabei überschattet von unerwünschten Depressionen vor allem in den sensiblen Bereichen Reproduktion, Vitalität und Produktion (Ibe et al., 1983, Cahaner, 1984, Wang und Pirchner, 1992, Sewalem et al. 1999).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß Inzuchtdepressionen als Leistungsbeeinträchtigung ingezüchteter Individuen vor allem bei Reproduktions- und Fitneßmerkmalen mit geringer Heritabilität auftreten. Die genetischen Ursachen können vor allem mit der Dominanzhypothese erklärt werden. Die Reaktionen einzelner Linien auf Inzucht sind in der Höhe nicht vorhersehbar und variieren merkmalsabhängig aufgrund von Inzuchtgrad und Inzuchtrate, den Ausgangsgegenfrequenzen, dem Dominanzgrad des betrachteten Merkmals und der Selektionsintensität.