

Aus dem Institut für Tierzucht Mariensee

Steffen Weigend

**Molekulare Marker zur Bewertung genetischer Vielfalt
bei Geflügel**

Manuskript, zu finden in www.fal.de

Published in: Forschungsreport Verbraucherschutz, Ernährung,
Landwirtschaft (2002)2, pp. 34-37

**Braunschweig
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)
2002**

Molekulare Marker zur Bewertung genetischer Vielfalt bei Geflügel

Steffen Weigend (Mariensee)

Die genetische Vielfalt bei Nutztieren ist ein wichtiger Baustein für eine nachhaltige landwirtschaftliche Produktion. Auch aus umweltpolitischer Sicht und unter wissenschaftlichen, ökonomischen und kulturellen Aspekten gewinnt sie zunehmend an Bedeutung. Bei der Zucht von Haustieren hat es der Mensch darauf angelegt, die Tiere an unterschiedliche Erfordernisse hinsichtlich Verwendung, Umwelt und Haltungsbedingungen anzupassen. Durch diese Selektion sind Rassen entstanden, die sich in ihren erblichen Merkmalen und Eigenschaften zum Teil deutlich unterscheiden. Diese Unterschiede können unmittelbare Bedeutung erlangen, wenn sich die Anforderungen der Verbraucher an tierische Produkte oder an die Haltungsbedingungen von Nutztieren ändern. Rassen stellen daher wichtige Ressourcenpopulationen dar. Um sie zu erhalten und im Rahmen einer nachhaltigen Landwirtschaft zu nutzen, müssen ihre Merkmale identifiziert und charakterisiert werden. Moderne molekulargenetische Untersuchungsmethoden bieten dazu erste erfolgversprechende Ansätze.

Die heutige Landwirtschaft wird von unterschiedlichen Produktionsweisen geprägt. Dabei lassen moderne Produktionsverfahren, in denen die effiziente Erzeugung hochwertiger Nahrungsgüter im

Vordergrund steht, wenig Platz für Romantik. Dennoch haben wir oftmals ein Bild bunter Vielfalt auf dem Bauernhof vor Augen, wenn wir an ländliche Idylle denken.

Einschränkung der Rassenvielfalt

Genetische Vielfalt innerhalb einer Art spiegelt sich wider in Unterschieden zwischen den einzelnen Rassen, Populationen und Individuen. Bei allen Nutztierarten lässt sich ein zunehmender Verlust von Rassen und damit von innerartlicher Variabilität beobachten. Als besonders gefährdet gilt der Geflügelbereich, da hier die Spezialisierung und Industrialisierung der Produktion wie bei keiner anderen Nutztierart vorangeschritten ist.

Während von Hobbyzüchtern eine Vielzahl von Geflügelrassen gepflegt wird, beschränkt sich die kommerzielle Geflügelzucht auf wenige, wirtschaftlich genutzte Zuchtlinien. Beim Huhn ist darüber hinaus eine Spezialisierung in Mast- und Legerichtung erfolgt. In der Legehennenzucht gibt es drei Zuchtunternehmensgruppen (mit 1 bis 3 individuellen Zuchtunternehmen), die den gesamten Weltmarkt mit Legehybriden weiß- und braunschaliger Eier abdecken. Eines dieser Unternehmen ist in Deutschland angesiedelt. In der Mastrichtung sind es ebenfalls drei Unternehmen, die 90 % des Weltmarktes abdecken. Auch bei Puten wird die Zucht von nur drei weltweit operierenden Unternehmen betrieben. Beim Wassergeflügel existieren etwa 20 Zuchtunternehmen, von denen weniger als fünf den weitaus größten Teil aller Elternlinien bereitstellen.

Den Geflügelzuchtprogrammen liegt eine hierarchische Struktur zugrunde. Die



Molekulargenetische Methoden helfen bei der Charakterisierung von Nutztierassen





Box 1: Eigenschaften der Mikrosatelliten

▷ Molekulare Struktur [Beispiel (CA)_n-Repeat]

```
5'.....TCTTGTGATCGGCAACACACAACACAAAAACAACAGC.....3'
3'.....AGAACACTACGCCGTGCTGTGTGTGCTGTTTTTGTGTCG.....5
```

▷ Genetische Eigenschaften

- Co-dominante Vererbung
- Locus-Spezifität
- Über das gesamte Genom verteilt
- Hoch variabel

▷ Technische Eigenschaften

- Einfache und akkurate Analysierbarkeit
- Hoher Probendurchsatz
 - automatisierbar
 - Parallele Mehrfachbestimmung
 - Nichtradioaktive Analyseverfahren

Zuchtlinien werden in den Basiszuchten gehalten und züchterisch bearbeitet. Zwischengeschaltete Vermehrungsbetriebe erzeugen Produktionstiere als 3- oder 4-Linien-Kreuzungsprodukte der in den Basiszuchtunternehmen selektierten Zuchtlinien. Das bedeutet, dass die Zuchtbasis nahezu aller weltweit wirtschaftlich genutzten Produktionstiere ausschließlich bei einer geringen Anzahl multinationaler Basiszüchter konzentriert ist, die wenige, hoch spezialisierte Zuchtlinien entwickelt haben.

Genetische Unterschiede müssen quantifizierbar sein

Die Wirtschaftsgeflügelzucht verzichtet derzeit darauf, das breite Spektrum der wirtschaftlich nicht genutzten Geflügelrassen aus dem Hobbyzuchtbereich in kommerzielle Zuchtprogramme einzubeziehen. Doch für eine zukünftige Geflügelproduktion könnte das genetische Potenzial dieser Rassen von Nutzen sein. Welchen Beitrag allerdings einzelne Rassen leisten können, lässt sich gegenwärtig nicht abschätzen. Zu ungenau sind die Informationen über die Verwandtschaft der Rassen, ihre Eigenschaften und das Leistungsvermögen.

Die überwiegende Zahl der verschiedenen Hühnerrassen, die in Deutschland verbreitet waren, werden heute von Hob-

byzüchtern gehalten und entsprechend dem Rassestandard selektiert. In der organisierten Hobbygeflügelzucht gibt es jedoch kaum eine Herdbuchzucht mit systematischer Aufzeichnung der Abstammung wie bei Großtieren. Selektiert wird vorwiegend auf formale äußerliche Merkmale. Eine systematische Erfassung der Leistung unter definierten Umweltbedingungen existiert für diese Rassen in Deutschland nicht mehr.

In einer vom Bund Deutscher Rassegeflügelzüchter (BDRG) im Jahr 2000 durchgeführten Bestandsrecherche wurden allein 95 Hühnerrassen (ohne Zwerghuhnrasen) erfasst. Dabei ist noch keine Aufteilung nach Farbschlägen erfolgt, die die Anzahl der Gruppen noch weit erhöhen würde. Angesichts der Vielzahl der Rassen und Farbschläge beim Geflügel ist es praktisch unmöglich, alle Eigenschaften dieser Tiere anhand experimenteller Prüfungen zu beschreiben. Folglich wird eine Alternative für die Bewertung genetischer Ressourcenpopulationen benötigt.

Molekulare Marker

Nach allgemein akzeptierter Auffassung sind Rassen als erhaltenswert einzuordnen, wenn sie eine hohe genetische Distanz (Unverwandtschaft) zu anderen Rassen aufweisen und eine eigenständige Entwicklungsgeschichte haben. Um die genetische Distanz zu beschreiben, werden Merkmale benötigt, die die Unterschiede zwischen den Rassen beschreiben, also zwischen den Rassen variieren. Das können Merkmale sein, die äußerlich sichtbar sind wie die Gefiederfarbe, die Ausprägung des Kammes oder das Kör-

pergewicht. Aber auch biochemische oder molekulare Merkmale oder Marker können zur Rassenunterscheidung herangezogen werden.

Molekulare Marker sind Abschnitte in der DNS (Desoxyribonukleinsäure), dem Träger der Erbinformation, die zwischen Individuen variabel sind. Die beachtlichen Fortschritte in der Molekulargenetik eröffnen heute

völlig neue Möglichkeiten, solche Unterschiede zwischen Individuen, Populationen, Rassen und Arten zu charakterisieren. Während der letzten zwei Jahrzehnte sind eine Reihe unterschiedlicher Arten von molekularen Markern identifiziert geworden. Mit Hilfe einer Gruppe, den sogenannten „Variable Number of Tandem Repeat“ (VNTR) Markern, zu denen auch Mikrosatelliten gehören, ließ sich bei Nutztieren die genetische Verwandtschaft zwischen Rassen erfolgreich studieren. Diese molekularen Marker sollen im Folgenden näher besprochen werden.

Mikrosatelliten als molekulare Marker

Mikrosatelliten sind Abschnitte in der DNS eines Individuums, die im Gegensatz zu Genen keine Bauanleitungen für Proteine enthalten. Diese DNS-Abschnitte bestehen aus kleinen, sich wiederholenden Unterabschnitten, das heißt Sequenzen mit sehr kurzer Basenfolge (z.B. [CA]_n, siehe Box 1). Die Funktion von Mikrosatelliten ist nicht bekannt. Ihre Eigenschaften jedoch, insbesondere ihre zwischen Individuen variierende Länge (Allele), lassen Mikrosatelliten als bevorzugte Marker für verwandtschaftliche Untersuchungen zwischen Rassen oder anderen Gruppen von Individuen erscheinen.

Mikrosatelliten werden co-dominant vererbt: Unterscheiden sich die elterlichen DNS-Abschnitte, können beide Allele nachgewiesen werden. Weiterhin ist es gelungen, jedem Mikrosatelliten eine bestimmte Position in der genetischen Karte, dem Bauplan der Erbanlagen der je-



Abb. 1: Bild einer elektrophoretischen Auftrennung von DNS-Abschnitten unterschiedlicher Länge (Allele) des Mikrosatelliten MCW0216 beim Haushuhn

Äußere Spuren: Standardallele unterschiedlicher Länge (141bp, 143bp, 144bp, 145bp, 147bp, 149bp) zur Justierung der Allelgrößenbestimmung
 Innere Spuren: 22 Individuelle Proben, die nach Vervielfältigung in der Polymerase-Ketten-Reaktion gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden

weiligen Art, zuzuweisen. Dadurch ist es möglich, von den zahlreichen bekannten Mikrosatelliten solche für die Untersuchung auszusuchen, die gleichmäßig und unabhängig voneinander über das gesamte Genom verteilt sind. Auf diese Weise kann man mit einer begrenzten Anzahl von Markern repräsentative Informationen über Unterschiede zwischen Individuen auf der molekularen Ebene erhalten.

Mikrosatelliten sind für Biodiversitätsstudien nicht zuletzt deshalb so beliebt, weil sie sich gut technisch handhaben lassen. Ausgangspunkt sind spezifische, zum Beispiel aus einer Blutprobe gewonnene DNS-Abschnitte, die mit einem biochemischen Verfahren, der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), in großen Mengen vervielfältigt werden. Dadurch steht genügend Material zur Verfügung, um die Längenausprägung des für das jeweilige Individuum charakteristischen DNS-Abschnitts analysieren zu können. Die Längenunterschiede der DNS-Kopien lassen sich auf einem geeigneten Träger (Polyacrylamid-Gel) in einem elektrischen Feld auftrennen und darstellen (Abb. 1). Aufbauend auf diesem Prinzip wurden Methoden entwickelt, die einen hohen Probendurchsatz bei akkurater Analysierbarkeit erlauben. Mit Hilfe spezieller Computerprogramme können DNS-Profile zahlreicher Individuen unterschiedlicher Rassen

verglichen und ihre Ähnlichkeiten analysiert werden.

Biodiversitätsstudien mit Mikrosatelliten

Die Charakterisierung mit Hilfe von Mikrosatelliten ist in den vergangenen

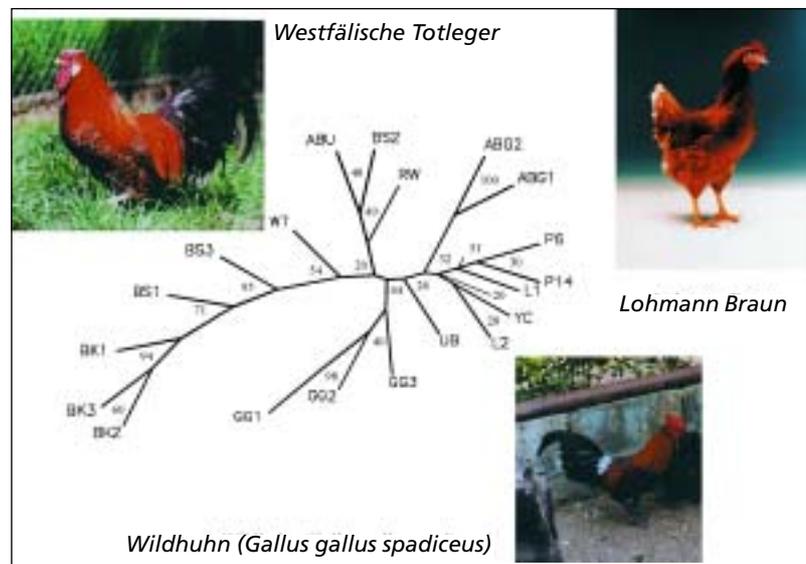
Jahren bei allen wichtigen Nutztierarten erfolgt. Damit haben wir Einblicke in die Variabilität innerhalb der Rassen und zwischen Rassen gewinnen können.

Ein Maß für die Variabilität innerhalb einer Rasse ist der Heterozygotiegrad. Dieses Maß beschreibt den Anteil von Individuen, die in einzelnen Mikrosatelliten unterschiedliche Allele (unterschiedliche Länge des jeweiligen DNS-Abschnittes) von Mutter und Vater tragen. Dieser Anteil wird relativ zur Gesamtanzahl untersuchter Individuen bestimmt und für jede Rasse über alle Mikrosatelliten gemittelt.

In einem vor kurzem durchgeführten EU-weiten Forschungsprojekt (AVIAN-DIV), an dem das Institut für Tierzucht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) federführend beteiligt war, wurden mehr als 50 verschiedene Hühnerrassen mit Hilfe von 25 Mikrosatelliten untersucht. Der durchschnittliche Heterozygotiegrad lag bei 47 %.

Interessanterweise zeigten die untersuchten Linien aus der Wirtschaftsgeflügelzucht eine mittlere bis hohe Variabilität in den untersuchten Markern – für einzelne Masthuhnlinien lag sie nahezu so hoch wie bei Wildhühnern. Offensichtlich wird in der Wirtschaftsgeflügelzucht intensiv darauf geachtet, Verpaarungen eng verwandter Tiere zu vermeiden, die zu einer

Abb. 2: Dendrogramm der verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen 20 Hühnerpopulationen basierend auf der Allelanalyse von 14 Mikrosatelliten-loci. Zahlenwerte an den Verzweigungen des Stammbaumes zeigen die Wiederholbarkeit der jeweiligen Gruppierung (in Prozent) bei 1000 Wiederholungen an (Bootstrapping).



Abnahme des Heterozygotiegrades und einer Zunahme der Inzucht führen würde.

Im Vergleich zu anderen Arten scheint der durchschnittliche Heterozygotiegrad bei Hühnern jedoch geringer zu sein. Bei anderen landwirtschaftlichen Nutztieren wie dem Schwein (68 %) oder Rind (60 %), aber auch beim Menschen (70–80 %) wurden höhere Heterozygotiegrade festgestellt. Sollte sich dieses Ergebnis in weiteren Untersuchungen bestätigen, wäre dies ein Hinweis, dass die genetische Vielfalt bei Hühnern mehr als bei anderen Nutztierarten gefährdet ist.

Ausgehend von Unterschieden in der Häufigkeit des Auftretens einzelner Mikrosatellitenallele können die genetische Distanzen verschiedener Rassen berechnet werden. Je mehr Individuen zweier Rassen DNS-Abschnitte gleicher Länge aufweisen, umso enger verwandt sind diese Gruppen. Auf diese Weise ist es möglich, die genetische Verwandtschaft zwischen Gruppen zu quantifizieren, dessen Ausdruck die genetische Distanz ist.

Spezielle mathematische Algorithmen erlauben es, die untersuchten Rassen in Stammbäumen (Dendrogrammen) zu gruppieren. Abbildung 2 zeigt ein Dendrogramm von 20 Hühnerpopulationen. Diese Hühnerpopulationen unterschiedlicher Herkunft wurden von uns an 14 Mikrosatellitenorten im Genom untersucht. Der daraus rekonstruierte Stammbaum lässt drei Verwandtschaftsgruppen der untersuchten Hühner erkennen: Rote Kammhühner (Wildhuhn, Vorfahre der Haushühner), Rassen nordwesteuropäischen Ursprungs (zu denen die Westfälischen Totleger gehören) und Rassen asiatischen Ursprungs, die unter anderem die Grundlage für kommerzielle Legelinien braunschaliger Eier bildeten.

Mikrosatellitenmarker können auch für eine Zuordnung einzelner Individuen zu einer Rasse verwendet werden. Anhand individueller Typisierungen von 27 Mikrosatelliten in einer Untersuchung bei 600 Tieren aus 20 Hühnerpopulationen wurde im Rahmen des AVIANDIV Projektes gezeigt, dass in 98 % der Fälle eine richtige Zuordnung der Individuen anhand der Mikrosatellitenmarker zur jeweiligen Rasse möglich war (Abb. 3). Bei einer Verringerung der Anzahl auf 12–15 hoch variable Marker und 15–20 Indi-

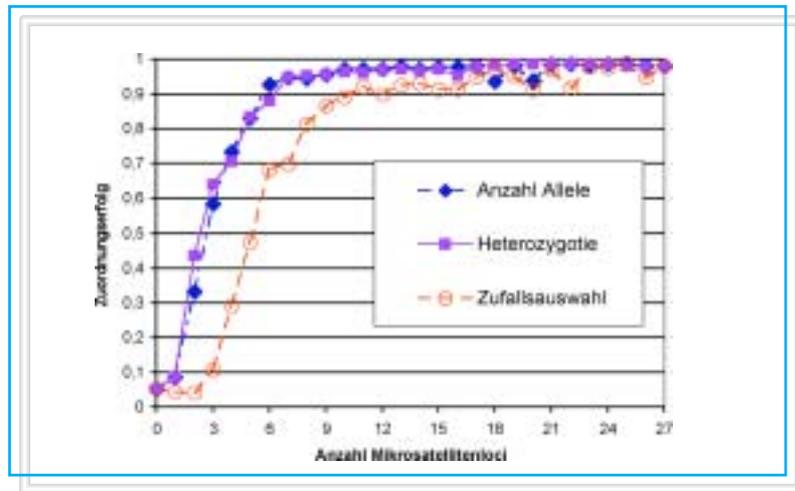


Abb. 3: Erfolgsrate einer korrekten Zuordnung von Individuen zu rassetypischen Clustern bei zunehmender Anzahl Mikrosatellitenloci als Beitrag zur Identifizierung und Erhaltung genetischer Ressourcen beim Haushuhn.

Mit steigender Anzahl Mikrosatelliten verbessert sich der Anteil richtig zugeordneter Tiere zur jeweiligen Rasse. Die Marker besitzen einen unterschiedlichen Informationsgehalt. Die schrittweise Einbeziehung der Marker in die Analyse, beginnend mit dem informativsten Marker, erlaubt eine Reduzierung der notwendigen Anzahl zu typisierender Marker und verringert dadurch den Aufwand. Bereits mit 10–12 hoch variablen Markern ist die Zuordnung der Tiere in mehr als 90 % der Fälle richtig.

duen erfolgte die Zuordnung der Tiere noch in 90 % der Fälle richtig.

Marker der nächsten Generation

Neueste Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekulargenetik werden auch die zukünftige Strategie zur Bewertung genetischer Vielfalt entscheidend beeinflussen. Mikrosatelliten haben ihre Eignung als Marker für Biodiversitätsuntersuchungen bereits unter Beweis gestellt. Doch da sie nicht an der Kodierung von Proteinen, die ja die Merkmalsausprägungen steuern, beteiligt sind, gestatten sie nur indirekt eine Bewertung möglicher Unterschiede zwischen Rassen in speziellen Eigenschaften.

Punktmutationen (Single Point Mutation, SNP) stellen molekulare Marker dar, die überall im Genom auftreten können, also auch in Genen. Die Analyse von Punktmutationen werden daher auch Untersuchungen der molekularen Variabilität im funktionellen Bereich der DNS er-

lauben. In dem bereits erwähntem Forschungsprojekt AVIANDIV wurde geprüft, ob sich SNPs für Biodiversitätsstudien beim Haushuhn potenziell eignen. Dabei zeigte sich, dass Punktmutationen mit großer Häufigkeit im Genom des Huhnes auftreten.

Intensive Forschungen auf diesem Gebiet erweitern ständig unsere Kenntnisse über variable Bereiche im Genom unserer Haustiere. Dadurch wächst das Verständnis, wie sich die genetische Diversität auf molekularer Ebene widerspiegelt. Die Entwicklung effizienter Analysemethoden zum Nachweis von SNPs in merkmalsbeeinflussenden Bereichen des Genoms der Nutztiere wird in künftigen Forschungsarbeiten zweifelsohne eine Schlüsselrolle einnehmen. ■



Dr. Steffen Weigend, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Tierzucht, Höltystraße 10, 31535 Neustadt-Mariensee. E-mail: steffen.weigend@fal.de