

Prof. Dr. Georg Erhardt
Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Tierzucht und Haustiergenetik
Ludwigstraße 21b
35390 Gießen

Abschlussbericht

Förderkennzeichen: Az.: 514-06.01-07BM037

Thema:

Genetische Charakterisierung der gefährdeten Schafrasse Rouge du Roussillon und Erstellung eines Erhaltungszuchtprogramms

Laufzeit: 01.10.2008 - 31.03.2010

Berichtszeitraum: 01.10.2008 - 31.03.2010

Bearbeitet durch TÄ Karen Hils

In Zusammenarbeit mit:

Dr. Thomas Fixemer
Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik

Dr. Katrin Baumgartner
Tiergarten Nürnberg

Coralie Danchin-Burge und Isabelle Palhier
Genetic Resources
Institut de l'Elevage
Frankreich

Dr. Henrik Wagner
GEH e.V.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Aufgabenstellung und Ziel des Vorhabens	8
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde	9
3. Planung und Ablauf	11
3.1. Arbeitsplan laut Projektbeschreibung	11
3.2. Tatsächlich durchgeführte Arbeitsschritte und erreichte Ziele	13
4. Methode und Verfahren	16
4.1. Probenmaterial	16
4.2. Molekularbiologische Methoden	18
4.2.1. Gewinnung von Leukozyten aus Vollblut	18
4.2.2. Isolation von DNA aus Leukozyten	18
4.2.3. Bestimmung der DNA-Konzentration	18
4.2.4. Aufarbeitung der Proben für die Kryokonservierung	18
4.2.5. Polymerasekettenreaktion	20
4.2.5.1. Mikrosatellitenmarker	20
4.2.5.2. PCR-Bedingungen	20
4.2.5.3. Überprüfung des PCR-Erfolges durch Agarosegelelektrophorese	21
4.2.5.4. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese am DNA- Sequencer	21
4.3. Statistische Methoden	21
4.3.1. Deskriptive Statistik	21
4.3.2. Diversitätsanalysen	22
4.3.2.1. Analyse von Populationsstrukturen	22
5. Ergebnisse und Diskussion	25
5.1. Phänotypische Daten	25
5.2. Pedigreedaten	26
5.3. Genetische Daten	27
5.3.1. Mikrosatelliten	27
5.3.1.1. Allelzahl und PIC-Werte	27
5.3.1.2. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	29
5.3.1.3. Private Allele	29
5.3.2. Genetische Variabilität innerhalb der Populationen	30
5.3.3. Genetische Differenzierung zwischen den Populationen und F-Statistik	30
5.3.3.1. Genetische Distanzen zwischen den Populationen	30
5.3.3.2. F-Statistik	32
5.3.4. Einordnung der Rassen in einen europäischen Kontext	33
5.3.4.1. Hauptkomponentenanalyse	34
5.3.4.2. Neighbour-Joining- Bäume	35
5.3.4.3. Bayesian model-based Clustering-Analyse	38
5.3.5. Zuordnung von Individuen zu ihrer Ursprungspopulation	43
5.4. Zuchtplanung für die deutsche Population des Rouge du Roussillon-Schafes	44
6. Weiterführende Erkenntnisse des Projekts	46
7. Konsequenzen für ein sich anschließendes weiteres Vorhaben	47
8. Erfolgskontrolle über die Einhaltung des Finanzierungs-, Zeit- und Arbeitsplans	48
9. Zusammenfassung	48
10. Literatur	50
11. Kurzfassung	52
12. Englische Kurzfassung	53

13.	Anhang	55
13.1.	Rassebeschreibung Rouge du Roussillon- Schaf	55
13.2.	Tabelle A	56
13.3.	Abbildungen A-E	57

Abbildungsverzeichnis:

	Seite
Abbildung 1: Probe nach Dichtegradientenzentrifugation. Schichtung: Plasma; Buffy Coat mit regenerativen Zellen; Ficoll; Erythrozyten; Granulozyten	19
Abbildung 2: Streudiagramm der ersten beiden Hauptkomponenten der Allelfrequenzen von 61 Rassen auf der Basis von 11 Mikrosatellitenmarkern	34
Abbildung 3: Ungewurzelter Konsensusbaum nach der Neighbor-Joining-Methode der in dieser Studie untersuchten Populationen rekonstruiert mit Reynolds genetischer Distanz D_{REY} (1983) auf der Basis von 15 Mikrosatelliten	36
Abbildung 4: Gemeinsamer ungewurzelter Konsensusbaum nach der Neighbor-Joining-Methode der in dieser Studie untersuchten Populationen und der im ECONOGENE-Projekt untersuchten Populationen rekonstruiert mit Reynolds genetischer Distanz D_{REY} (1983) auf der Basis von 11 Mikrosatelliten	37
Abbildung 5 : Barplot der untersuchten Populationen bei Annahme von $k=2$ Populationen	38
Abbildung 6: Geographische Verteilung der Rassen des ECONOGENE-Projektes nach Peter (2005) bei Annahme von $k=2$ Populationen	41
Abbildung 7: Geographische Verteilung der Rassen dieser Studie und der Rassen des ECONOGENE-Projektes bei Annahme von $k=2$ Populationen	41
Abbildung 8: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=6$ Populationen am Beispiel eines Laufes	42

Anhang:

Abbildung A: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=3$ Populationen am Beispiel eines Laufes für die in dieser Studie untersuchten Rassen sowie 57 Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt	57
Abbildung B: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=4$ Populationen am Beispiel eines Laufes für die in dieser Studie untersuchten Rassen sowie 57 Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt	58
Abbildung C: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=5$ Populationen am Beispiel eines Laufes für die in dieser Studie untersuchten Rassen sowie 57 Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt	59
Abbildung D: Ungewurzelter Neighbor-Joining-Baum rekonstruiert mit Reynolds genetischer Distanz D_{REY} (1983) auf der Basis von 15 Mikrosatelliten bei Einbeziehungen zweier zusätzlich untersuchter Rassen	60
Abbildung E: Barplot bei Annahme von $k=6$ Populationen bei Einbeziehungen zweier zusätzlich untersuchter Rassen	60

Tabellenverzeichnis:

	Seite
Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl der beprobten Tiere, Halter und Rasse und die im folgenden verwendeten Abkürzungen	17
Tabelle 2: Schafrassen des ECONOGENE- Projektes mit Abkürzungen, Anzahl untersuchter Proben (N) und Herkunftsland nach Peter (2005)	22
Tabelle 3: Einfluss der Population auf die Widerristhöhe	25
Tabelle 4: Einfluss der Population auf das Gewicht	26
Tabelle 5: Mittelwerte von Gewicht und Größe in der deutschen Population des Rouge du Roussillon- Schafes	26
Tabelle 6: Inzuchtkoeffizient und Vollständigkeitsindex nach Schmidt (2002) für die deutsche Population des Rouge du Roussillon- Schafes bei Betrachtung aller Tiere	27
Tabelle 7: Beobachtete Allelzahl der einzelnen Populationen, Gesamtanzahl der Allele über alle Populationen, Mittelwert und Standardabweichung für die einzelnen Populationen	28
Tabelle 8: Beobachtete (H_O) und erwartete (H_E) Heterozygotie und Anzahl privater Allele (N_{privat}) je Population	30
Tabelle 9: Nei's „unbiased measure“ für genetische Identität (I) (über Diagonale) und genetische Standarddistanz (D_A) (unter Diagonale) (Nei, 1972)	31
Tabelle 10: Genetische Distanzen nach Reynolds (D_{REY}) (1983) (über Diagonale) und Cavalli-Sforza (D_C) (1967) (unter Diagonale)	31
Tabelle 11: F_{IT} , F_{ST} und F_{IS} nach Weir und Cockerham (1984) je Locus über alle Populationen gemittelt	32
Tabelle 12: Zuordnung von 10.000 simulierten Individuen zu ihrer Ursprungspopulation nach verschiedenen Methoden: genetische Distanzen (D_A , D_S , D_C), Allelfrequenzen nach Paetkau et al. (1995) und Bayes Theorem nach Rannala und Mountain (1997)	43
Tabelle 13: Direkte Zuordnung der untersuchten Individuen zu ihrer Ursprungspopulation nach verschiedenen Methoden: genetische Distanzen (D_A , D_S , D_C), Allelfrequenzen nach Paetkau et al. (1995) und Bayes Theorem nach Rannala und Mountain (1997)	44
Tabelle 14: Durchschnittliche Inzucht der Nachkommen und Vollständigkeitsindex für die Anpaarung verschiedener Böcke mit den weiblichen Tiere einer Zuchtgruppe am Beispiel von 10 Böcken bei Berücksichtigung von 5 Ahnengenerationen	45
Anhang:	
Tabelle A: Nei's „unbiased measure“ für genetische Identität (I) (über Diagonale) und genetische Standarddistanz (D_A) (unter Diagonale)(Nei, 1972) bei Einbeziehung zweier zusätzlich untersuchter Rassen	56

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.: Abbildung
bp: Basenpaare
°C: Grad Celsius
ca.: circa
cm: Zentimeter
Cy5: Indodicarbocyanin
D_A: Genetische Distanz nach Nei (1983)
D_C: Genetische Distanz nach Cavalli-Sforza (1967)
d. h.: das heißt
DMSO: Dimethylsulfoxid
DNA: Desoxyribonukleinsäure
DREY: Genetische Distanz nach Reynolds (1983)
D_S: Nei's Standard Distanz (1972)
D_{ST}: Anteil an Diversität zwischen den Rassen
EDTA: Ethylendiaminotetraessigsäure
EG: Elterngeneration
F: Inzuchtkoeffizient
ΔF: Inzuchtzuwachs
FAO: Food and Agriculture Organisation der Vereinten Nationen
FCS: Fetales Kälberserum
FIS: Heterozygoten-Defizit innerhalb von Populationen
F_{IT}: gesamtes Heterozygoten-Defizit aller untersuchten Populationen
F_{ST}: Heterozygoten-Defizit zwischen Populationen
g: Gramm
GEH: Gesellschaft zur Erhaltung alter und bedrohter Haustierrassen e.V.
ggr.: geringgradig
G_{ST}: Gendifferenzierungskoeffizient nach Nei (1973)
h: Stunde
H_E: erwartete Heterozygotie
H_O: beobachtete Heterozygotie
H₂O: Wasser
H_S: Anteil Diversität innerhalb der Rassen
H_T: erwartete Heterozygotie einer Population
k: Anzahl angenommener Subpopulationen
kg: Kilogramm
m: männlich
mg: Milligramm
MgCl₂: Magnesiumchlorid
min: Minute
ml: Milliliter
mM: millimolar
mm: Millimeter
μl: Mikroliter
N: Anzahl der Individuen
N_e: effektive Populationsgröße
N_f: Anzahl paarungsfähiger weiblicher Tiere
N_m: Anzahl paarungsfähiger männlicher Tiere
N_{privat}: Anzahl privater Allele
OAR: ovines Chromosom

PAA: Polyacrylamid
PIC: Polymorphism Information Content
PCR: Polymerasekettenreaktion
rpm: Umdrehungen pro Minute
s: Sekunde
Std.abweichung: Standardabweichung
Tab.: Tabelle
v/v: Volumenprozent
w: weiblich
w/v: Gewichtsprozent
z. B.: zum Beispiel

1. Aufgabenstellung und Ziel des Vorhabens

Ziel des Projektes war es, die drei existierenden Populationen der stark gefährdeten Schafrasse Rouge du Roussillon aufgrund phänotypischer und genotypischer Merkmale zu charakterisieren, als eigenständige Rasse zu konsolidieren und von Referenzrassen abzugrenzen. Diese Populationen finden sich in Deutschland und Frankreich. Mit den gewonnenen Daten sollten Zuchtpläne für eine Erhaltungszucht erstellt werden, um die Bewahrung der tiergenetischen Ressourcen dieser Rasse zu ermöglichen. Zudem sollten regenerative Zellen aus dem Blut der Tiere durch Konservierung in der Kryobank des Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik (IBTM) als genetische Reserve erhalten werden, wodurch *in-situ* und *ex-situ* Ansätze zur Erhaltung kombiniert wurden. Damit ist, im Falle auftauchender Probleme der *in-situ* Erhaltung (wie Seuchenausbrüchen oder ähnlichen Katastrophen) gewährleistet, dass auf die kryokonservierten Proben als Reserve zurückgegriffen werden kann.

Außerdem sollte eine Rassebeschreibung für die Rasse erstellt und bei der Vereinigung Deutscher Landesschafzuchtverbände (VDL) eingereicht werden, um den Aufbau eines nationalen Zuchtbuches für die Rasse zu ermöglichen.

Die Tiere sollten mithilfe von etablierten Mikrosatellitenmarkern genetisch charakterisiert werden, wobei diese Marker bereits in einem europäischen Projekt verwendet wurden und auch die Basis für die FAO- Empfehlungen zur genetischen Charakterisierung von Schafen bilden.

Aus den gewonnenen Daten sollten Erhaltungszuchtpläne für die deutsche Population der Rasse erstellt werden. Diese sollen mithilfe der Züchter umgesetzt werden, um damit einen Beitrag zum Erhalt von tiergenetischen Ressourcen und Biodiversität in Deutschland zu leisten. Weiterhin sollte ein Internetforum zur Vernetzung der Züchter, mit Informationen und der Möglichkeit Anpaarungsvorschläge für die eigenen Zuchttiere zu erhalten, eingerichtet werden.

2. Vorraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Die Zucht der Rouge du Roussillon- Schafe existiert seit 1981 in Deutschland. Damals waren die Tierzahlen der französischen Population extrem abgesunken und eine der letzten größeren Herden wurde von einem Zusammenschluss verschiedener deutscher Wissenschaftler und Artenschützer aufgekauft. Von dieser Herde wurden 2 männliche und 12 weibliche Tiere nach Deutschland in den Tiergarten Nürnberg verbracht. Der Rest der Herde verblieb in Frankreich (Steger, 1994). Von den 14 nach Deutschland verbrachten Tieren entstammt die gesamte heutige deutsche Population von ca. 80 Tieren. Im Tiergarten Nürnberg wurden die Tiere durchgehend reinrassig gezüchtet. Die Selektionsentscheidungen wurden nach rein äußerlichen Merkmalen getroffen. Tiere ohne weiße Abzeichen an Kopf und Gliedmaßen wurden bevorzugt. Bei einigen Tieren traten Kurzbeinigkeit und Senkrücken auf. Diese Merkmale wurden auf Inzucht zurückgeführt und die Tiere von der Zucht ausgeschlossen. Regelmäßig wurden vom Tiergarten Nürnberg kleine Zuchtgruppen an private Züchter oder Institutionen abgegeben. Von diesen Gruppen existieren noch 5 Zuchtgruppen außerhalb von Nürnberg, in denen zwischen 6 und 14 Tieren gehalten werden.

Ob in diesen diversen Zuchtgruppen außerhalb des Tiergarten Nürnbergs die Tiere auch reinrassig verpaart wurden, ist nicht gesichert.

Über die Tiergruppe im Tiergarten Nürnberg sind seit 1987 detaillierte Aufzeichnungen über die Tiere mit Angabe von Mutter- und Vatertieren, Geburtsdatum, Abgangsdatum, Züchter, Besitzer und Abgangsursache vorhanden.

Es existieren auch weiterführende Angaben bis zu den Ursprungstieren, welche 1981 nach Nürnberg verbracht wurden. Die Aufzeichnungen der anderen Züchter sind von unterschiedlicher Qualität.

Was seit 1981 mit dem Teil der Herde, der in Frankreich verblieben ist, geschehen ist, ist unklar. Es existieren drei Züchter, die Tiere halten, die nach eigenen Angaben auf diese Herde zurückgehen („Rouge du Roussillon souche Marty“, benannt nach dem letzten Halter vor der Verbringungsaktion nach Deutschland). Die Züchter sind nicht vernetzt und betreiben die Zuchtplanung ausschließlich innerhalb ihrer eigenen Herde.

Weiterhin existiert seit 1993 eine regionale Zuchtorganisation für die Rassen Raïole, Caussenarde und Rouge du Roussillon (Association des éleveurs de brebis de races Raïole, Caussenarde et Rouge du Roussillon). Diese Züchter züchten einen neuen französischen Typ der Rasse. Dieser ist aus Rouge du Roussillon- Mutterschafen und Böcken anderer Rassen

aufgebaut worden (Association des éleveurs de brebis de races Raïole, Caussearde et Rouge du Roussillon, 2006). Nach eigenen Angaben der Zuchtorganisation wurden am Anfang des Zuchtprogramms keine reinrassigen Rouge du Roussillon- Böcke eingesetzt. Die Züchter haben eine Gebrauchszucht und primär eine kommerzielle Nutzung in den Fokus ihrer Zucht gestellt und den Bestand des neuen Typs der Rasse in wenigen Jahren auf 3500 Zuchttiere anheben können. Im Rahmen der Zuchtorganisation wird vom Zuchtleiter jährlich ein Bockaustausch organisiert. Es gibt jedoch keine Zuchtbücher oder andere Aufzeichnungen der Züchter. Diese Tiere unterscheiden sich phänotypisch deutlich von den deutschen Tieren sowie vom alten französischen Schlag durch eine ausgeprägte Bemuskelung, eine dunklere Rotfärbung und vermehrt auftretende schwarze Abzeichen an Gliedmaßen und Kopf. Zudem ist die Population phänotypisch sehr inhomogen. Weitere Einkreuzungen um eine verbesserte kommerzielle Nutzung der Rasse zu ermöglichen, können vermutet werden.

Zu Beginn des Vorhabens gab es keine einheitliche Rassebeschreibung für die Rasse Rouge du Roussillon. Die Züchter waren schlecht bzw. gar nicht vernetzt und der Kontakt zu den französischen Züchtern war sehr sporadisch und ausschließlich durch die GEH initiiert. In den 1990er Jahren wurden einmalig zwei deutsche Zuchtböcke zu einem französischen Züchter gebracht. Die Zuchtplanung wurde von den einzelnen Züchtern für ihre Tiere jeweils separat und nach unterschiedlichen Kriterien durchgeführt.

Die Struktur der französischen Population war weitgehend unklar. Weder der genetische Status der einzelnen Populationen in Deutschland und Frankreich war bekannt, noch existierten Kryoreserven für diese Schafrasse

Im August 2006 fand erstmals ein Treffen der deutschen Züchter, initiiert von der GEH e.V. und dem Tiergarten Nürnberg, statt, wo die Idee zu diesem Forschungsprojekt entworfen wurde.

Die AG Erhardt des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU Gießen hat im Rahmen eines EU-Projektes (ECONOGENE) 57 Schafrassen Europas und des Nahen Ostens molekulargenetisch charakterisiert. Auf diese Daten konnte für das Projekt zugegriffen werden, so dass die Einordnung der Rasse in einen europäischen Kontext möglich wurde.

3. Planung und Ablauf

3.1. Arbeitsplan laut Projektbeschreibung

Oktober 2008 - Dezember 2008

I. Sammeln von ca. 70 Blutproben aller lebender Tiere der Rasse Rouge du Roussillon in Deutschland und Österreich für genetische Analysen und eine Kryokonservierung von regenerativen Zellen. Erfassung von phänotypischen Daten der Tiere.

II. Sammeln von ca. 70 Blutproben bei 5 Züchtern des Coburger Fuchsschafes in Deutschland.

III. Sammeln von ca. 150 Proben der Rasse Rouge du Roussillon in Frankreich und Erfassung der phänotypischen Daten der Tiere. Dort sollen 8 - 10 Herden beprobt werden. 4 - 5 Herden von Züchtern, die bekanntermaßen seit langer Zeit versuchen, die Rasse reinrassig zu züchten und 4 - 5 Herden von hauptberuflichen Schäfern, bei denen über den genetischen Status der Tiere Unklarheit herrscht. Die beprobten Tiere sollten, soweit nachvollziehbar, nicht miteinander verwandt sein. Von jeder Herde sollten ca. 15 Tiere beprobt werden. Auch von diesen Tieren sollten Blutproben für die Kryokonservierung sowie für genetische Analysen genommen werden.

IV. Literaturrecherche mit Aufarbeitung der Zuchtgeschichte und Einarbeitung in die molekulargenetischen Methoden.

Januar 2009 - Juni 2009

V. Isolation der DNA aus dem Buffy Coat der Blutproben mit der Aussalzmethode nach Montgomery und Sise (1990)

VI. Erfassung der DNA- Konzentration und - Qualität im Spektralphotometer.

VII. Etablierung von Multiplexreaktionen für die unten gelisteten Mikrosatelliten.

VIII. Typisierung der individuellen DNA mit folgenden Mikrosatelliten: *MAF214*, *OarJMP29*, *BM1329*, *OarVH72*, *ILSTS11*, *BM8125*, *OarJMP58*, *ILSTS28*, *OarFCB128*, *INRA063*, *MAF33*, *MAF65*, *MAF70*, *OarFCB20*, *OarFCB226*.

IX. Die Mikrosatellitendaten werden in einer Datenbank organisiert und mit verschiedenen Programmen wie POPGENE (Yeh, 1997), CERVUS (Marshall, 1998) und PHYLIP (Felsenstein, 1989) werden Allelfrequenzen, Anzahl der Allele, Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, PIC-Werte und genetische Distanzen berechnet.

X. Verarbeitung der phänotypischen Daten in einer Rassebeschreibung.

Juli 2009 – Dezember 2009

XI. Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen mit den Programmen NEIGHBOR und CONSENSE aus dem Programmpaket PHYLIP (Felsenstein, 1989). Einordnung der Rasse im Kontext der europäischen Schafrassen im Vergleich mit den Daten, welche im ECONOGENE- Projekt erhoben wurden und unter Zuhilfenahme der genannten Programme.

XII. Erstellung des Erhaltungszuchtprogramms und der Anpaarungspläne mit dem Programm OPTIMATE (Schmidt, 2002).

XIII. Transport von drei Zuchtböcken aus der deutschen Population zu einem Züchter des alten französischen Typs nach Puynormand (Frankreich) und Transport von 50 Mutterschafen und deren Nachzucht aus Revél (Frankreich) nach Deutschland.

Januar 2010 - März 2010

XIV. Diskussion der Ergebnisse im Kontext der Zuchtgeschichte und des Rasseerhalts.

XV. Einrichtung einer Internetplattform für Züchter mit der Möglichkeit zur Erstellung von konkreten Anpaarungsvorschlägen.

XVI. Erstellen des Abschlussberichtes und Publikation der Ergebnisse.

3.2. Tatsächlich durchgeführte Arbeitsschritte und erreichte Ziele

zu I. Es wurden alle lebenden 87 Rouge du Roussillon- Schafe der deutschen Population beprobt. Die Tiere stammen von insgesamt 6 deutschen Haltern. Der österreichische Halter hält keine Rouge du Roussillon- Schafe mehr. Dafür konnte ein weiterer deutscher Halter aufgefunden werden (siehe Tabelle 1).

Von den Tieren wurden Blutproben für die genetische Charakterisierung gewonnen und der Phänotyp fotografisch festgehalten. Zusätzlich wurden die Tiere vermessen (Widerristhöhe) und das Gewicht von immer derselben Person geschätzt. In wenigen Fällen wurden die Tiere gewogen.

zu I. und III. Von 226 der 239 beprobten Rouge du Roussillon- Schafen aus Deutschland und Frankreich wurden regenerative Zellen in der Kryobank („Fraunhofer Bioarchiv“) des Fraunhofer Instituts für Biomedizinische Technik (IBMT) in Sulzbach-Saar kryokonserviert..

zu II. Von der Rasse Coburger Fuchsschaf wurden 63 Tiere aus 5 Herden beprobt. Von diesen Tieren wurden Blutproben entnommen. Soweit möglich wurden unverwandte Tiere beprobt.

zu III. Bei den französischen Tieren musste das Probensammelschema abgeändert werden, da neue Informationen zur Populationsstruktur vorlagen. Im Rahmen des Projektes wurden nunmehr 70 Blutproben von Tieren aus den 3 Herden des alten französischen Typs gewonnen und 82 Proben aus insgesamt 7 Herden des neuen Typs. Auch diese Tiere wurden fotografiert, gemessen und das Gewicht geschätzt.

zu IV. Im Rahmen der Probennahmen und weiterer Recherchen in Frankreich wurden zahlreiche französische Quellen zur Zuchtgeschichte und Belege der Bemühungen zur Arterhaltung und zur züchterischen Verbesserung der Rasse in den letzten 30 Jahren gesammelt und übersetzt. Eine umgehende Einarbeitung in die molekulargenetischen Methoden erfolgte.

zu V & VI. Die gewonnenen Blutproben wurden ihrer weiteren Bestimmung entsprechend aufgearbeitet.

zu VII. Für die 15 Mikrosatelliten, die für das Projekt aus der Liste der empfohlenen Mikrosatelliten der FAO ausgewählt wurden (Hoffmann et al., 2004), wurden 1 Multiplex-, 3 Duplex- und 5 Einzelreaktionsprotokolle entwickelt und etabliert.

zu VIII. Die insgesamt 302 gewonnenen Proben (sowie 7 Referenzproben aus dem ECONOGENE- Projekt) wurden mit den genannten 15 Mikrosatelliten typisiert und mithilfe von Standardproben standardisiert.

zu IX. Die vorhandenen Daten wurden in einer Datenbank, in der die Proben nach Populationen geordnet und mit den ermittelten Genotypen verknüpft sind, zusammengefasst. Die statistische Auswertung wurde wie geplant durchgeführt.

zu X. Die phänotypischen Werte der 3 Rouge du Roussillon- Populationen wurden tabellarisch erfasst und mit dem Computerprogramm SAS statistisch ausgewertet. Der Einfluss von Alter, Geschlecht und Zugehörigkeit zu einer der 3 Populationen wurden untersucht. Zusätzlich wurden Pedigreedaten von 233 Individuen der deutschen Population, welche aus Aufzeichnungen des Tiergarten Nürnbergs und Angaben der anderen Züchter bestehen, in einer Datenbank organisiert und in das Programm OPTIMATE (Schmidt, 2002) eingespeist.

Weiterhin wurden die Schurgewichte der Schafe protokolliert um die Daten für die Rassebeschreibung zu vervollständigen. Eine Rassebeschreibung wurde erarbeitet und bei der Vereinigung Deutscher Landesschafzuchtverbände (VDL) zur offiziellen Anerkennung eingereicht (siehe Anhang).

zu XI. Für die untersuchten Populationen wurden phylogenetische Stammbäume erstellt. Diese wurden in einem Konsensusbaum zusammengefasst. Dieser Schritt erfolgte zum einen für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rassen, zum anderen für die Gesamtheit aus den hier untersuchten Rassen und den Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt. Um eine weitere Einordnung der Rassen in den europäischen Kontext zu realisieren, wurde eine Hauptkomponentenanalyse und eine Bayesian Model-based Clustering Analyse durchgeführt.

zu XII. Mithilfe von OPTIMATE (Schmidt, 2002) wurden Anpaarungspläne für die deutsche Population erstellt.

zu XIII. Es wurden zwei Zuchtböcke zu D. Massoubre in Puynormand (Frankreich) verbracht und sind dort im Zuchteinsatz. Der dritte Bock erfüllte die Transportbedingungen nicht und konnte deshalb nicht mitgenommen werden.

Der Transport der Mutterschafherde gestaltete sich schwierig, da die französische Halterin während der Verhandlungen wiederholt für längere Zeiträume die Kommunikation abbrach. Die Herde wurde unterdessen an einen anderen französischen Halter verkauft. Mit diesem gibt es aktuelle Verhandlungen, Zuchttiere nach Deutschland zu bringen. Da die Schafe sich momentan in der Ablammperiode befinden, konnte der Transport nicht mehr vor Ablauf der Projektdauer realisiert werden.

zu XV. Eine Internetplattform mit Informationen und der Möglichkeit konkrete Anpaarungsvorschläge anzufordern wurde unter der Domain www.rouge-du-roussillon.de eingerichtet und ist abrufbar.

zu XIV. & XVI. Die Ergebnisse wurden diskutiert und in diesem Abschlussbericht zusammengefasst.

4. Methode und Verfahren

4.1. Probenmaterial

Insgesamt wurden Blutproben von 302 Schafen untersucht. Davon stammten 87 von Rouge du Roussillon- Schafe aus 6 Herden der deutschen Population. Von den französischen Tieren der Rasse Rouge du Roussillon wurden 70 Blutproben aus den 3 Herden des alten französischen Schlags verwendet und 82 Proben aus 7 Herden des neuen Schlags (siehe Tabelle 1). Weiterhin wurden Tiere der Rasse Coburger Fuchsschaf als Referenzrasse beprobt. Es wurden 63 Proben von Tieren aus 6 Herden untersucht. Von allen beprobten Tieren wurden mit dem Gerinnungshemmer Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) versetzte Vollblutproben für die genetische Charakterisierung gewonnen. Die Tiere der Rasse Rouge du Roussillon wurden zudem gemessen (Widerristhöhe), von 3 Seiten fotografiert und das Gewicht von immer derselben Person geschätzt. Weiterhin wurde von dieser Rasse Vollblutproben genommen, die mit dem Gerinnungshemmer CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) versetzt und für die Kryokonservierung genutzt wurden.

Weiterhin lagen Pedigreedaten aus den Jahren 1981 - 2009 von 243 Individuen der deutschen Population des Rouge du Roussillon- Schafes vor, welche aus Aufzeichnungen des Tiergarten Nürnbergs und Angaben der anderen deutschen Züchter bestehen. In diesem Rahmen sind Daten zu Mutter- und Vatertieren, Geburtsdatum, Abgangsdatum, Züchter, Besitzer und Abgangsursache bekannt. Die Angaben reichen lückenhaft bis zur Ursprungsherde 1981 zurück. Weiterhin wurden die Schurgewichte von 23 weiblichen und 9 männlichen Tieren protokolliert um die Daten zu vervollständigen.

Tabelle 1: Übersicht über die Anzahl der beprobten Tiere, Halter und Rasse und die im folgenden verwendeten Abkürzungen

Besitzer	Rasse	verwendete Abkürzung	Anzahl beprobter Tiere
Tiergarten Nürnberg	Rouge du Roussillon- deutsche Population	RdR-D	42
Steiner	Rouge du Roussillon- deutsche Population	RdR-D	14
Faber	Rouge du Roussillon- deutsche Population	RdR-D	4
Arche Warder	Rouge du Roussillon- deutsche Population	RdR-D	11
Pfennig	Rouge du Roussillon- deutsche Population-	RdR-D	10
Tierpark Berlin	Rouge du Roussillon deutsche Population	RdR-D	6
Massoubre	Rouge du Roussillon- alter französischer Typ	RdR-AF	24
Garde	Rouge du Roussillon- alter französischer Typ	RdR-AF	25
Grosfort	Rouge du Roussillon- alter französischer Typ	RdR-AF	21
Trifault	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	11
Sanz	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	14
Peytavi	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	10
Coutarel	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	10
Rouve	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	10
Galzin	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	10
Germain	Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ	RdR-NF	17
Marder	Coburger Fuchsschaf	CF	11
Treiber	Coburger Fuchsschaf	CF	8
Mardorf	Coburger Fuchsschaf	CF	16
Staade	Coburger Fuchsschaf	CF	19
Buchenauer	Coburger Fuchsschaf	CF	9

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Gewinnung von Leukozyten aus Vollblut

Zur Gewinnung der Leukozyten aus Vollblut wurden die mit etwa 9 ml Vollblut gefüllten EDTA- Monovetten für 20 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Buffy Coat wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde er bei -20°C eingefroren.

4.2.2. Isolation von DNA aus Leukozyten

Zur Isolierung der DNA aus Leukozyten wurde die modifizierte Aussalzmethode nach Montgomery und Sise (1990) verwendet. Es erfolgten einige Modifikationen bezüglich Zentrifugierzeit und -geschwindigkeit. Die Zentrifugierzeit betrug bei der Lyse der Zellen statt 2000 rpm 4200 rpm; beim Waschen der Zellen statt 1000 rpm für 3 min, 3000 rpm für 5 min .

4.2.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Überprüfung der DNA-Konzentration erfolgte am Spektralphotometer nach Sambrook et al. (1989).

4.2.4. Aufarbeitung der Proben für die Kryokonservierung

Die Proben für die Kryokonservierung wurden unverzüglich nach den jeweiligen Probenahmen zentrifugiert (2000 rpm, 20 min, 20°C), und das Plasma in barcodierte Röhrchen überführt. Für die anschließende Ficoll Dichtezentrifugation wurde 2ml Ficoll (Firma Amersham) in ein 15ml Zentrifugationsgefäß (Falcon-Röhrchen) vorgelegt. Das Restblut wurde 1:2 in PBS verdünnt und in das Röhrchen mit dem vorgelegten Ficoll überschichtet. Anschließend erfolgt die Dichte-Zentrifugation bei 20°C für 20min bei 1000 x g (siehe Abbildung 1). Der als weisliche Scheibe sichtbare Buffy-Coat wurde abgehoben und in ein neues 15ml Zentrifugationsgefäß überführt. Nach Zugabe von 2ml PBS erfolgte zum Entfernen des Ficolls eine weitere Zentrifugation (10 min, 20°C, 500 x g). Das erhaltene Zellpellet wurde zweimal in PBS (1 ml) gewaschen (5 min, 20°C, 250 x g). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 1ml frisch zubereitetem Kryomedium bestehend aus 10% DMSO, 10% FCS, 80% RPMI1640 versetzt. Die mit einem Barcode gekennzeichneten Proben wurden entweder im rechnergesteuerten Freezer (Firma Sylab) mit einem Gradienten von -1°C / min auf -80°C abgekühlt oder mit der Einfrierbox

„MR.Frosty“ (Firma Nalge) nach Anweisung des Herstellers eingefroren. Die Proben wurden dann in einer gekühlten Transportbox (zum Schutz vor erneutem Erwärmen) zu den Kryokontainern gebracht und in der Gasphase des Stickstoffs bei $<-140^{\circ}\text{C}$ in der Kryobank des Fraunhofer Instituts für Biomedizinische Technik (IBMT) eingelagert. Die Dokumentation der eingelagerten Proben erfolgt in einer vom Fraunhofer Institut eigens entwickelten Datenbank.

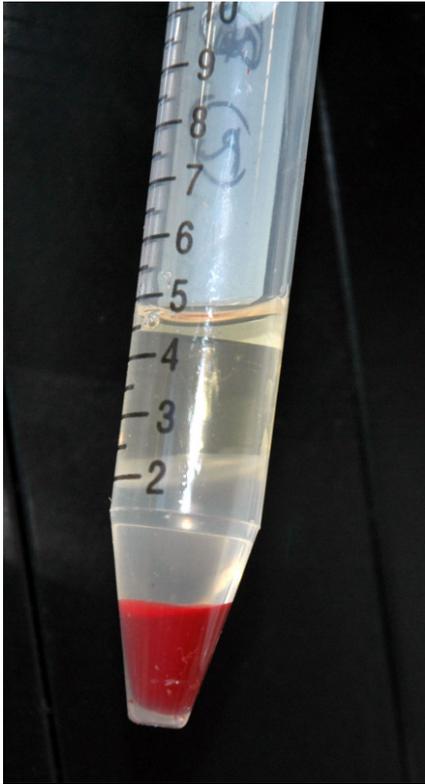


Abbildung 1: Probe nach Dichtegradientenzentrifugation. Schichtung: Plasma; Buffy Coat mit regenerativen Zellen; Ficoll; Erythrozyten; Granulozyten

4.2.5. Polymerasekettenreaktion

4.2.5.1. Mikrosatellitenmarker

Insgesamt wurden für diese Arbeit 15 von der FAO (Hoffmann et al., 2004) empfohlene Mikrosatelliten verwendet. Diese Marker sind sowohl ovinen als auch bovinen Ursprungs und liegen auf 11 verschiedenen Chromosomen des Schafgenoms. Primersequenzen und Allellängen sind bei Peter (2005) beschrieben. Zur Detektion der Fragmente durch den ALFexpress DNA Sequencer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) wurde je ein Oligonukleotid pro Primerpaar mit Indodicarbocyanin (Cy5) am 5'Ende markiert.

Zur Detektion im ABI Prism® 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt) wurden die Oligonukleotide mit 6-FAM, VIC, HEX oder NED markiert. Um die Auswertbarkeit zu erhöhen, wurden zwei der Vorwärtsprimer (*MAF65* und *MAF70*), welche so genannte Stotterbanden oder „Plus-A-Veränderungen“ aufwiesen, ein PIGtail angehängt. Dieser besteht aus den sieben Basen „GTTTCTT“ und wurde ans 5'Ende des Vorwärtsprimers angefügt (Brownstein, 1996).

4.2.5.2. PCR-Bedingungen

Für die 15 verwendeten Mikrosatelliten wurden 1 Multiplex-, 3 Duplex- und 5 Einzelreaktionsprotokolle eingesetzt.

Die Bedingungen für den Marker *BMI329* und die Duplexreaktion der Marker *MAF214* und *OarJMP029* wurden, wie bei Peter (2005) beschrieben, übernommen. Für die restlichen Marker wurden neue Protokolle ausgetestet und etabliert.

Die PCR-Bedingungen der verschiedenen Marker wurden durch Variation der Annealingtemperatur mit Hilfe eines Gradientencyclers (iCycler, Bio-Rad, München), Variation des Magnesiumgehalts (1,5 bis 3,0 mM), durch Verwendung unterschiedlicher Puffer (5x Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega, Madison WI, USA), QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden), Absolute Q-PCR-Mix® (Thermo scientific, Waltham MA, USA) bzw. Taq Buffer advanced, 10x (5Prime GmbH, Hamburg)) optimiert. Außerdem wurden verschiedene Elongationszeiten ausgetestet.

4.2.5.3 Überprüfung des PCR-Erfolges durch Agarosegelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR Reaktion zu überprüfen wurden die PCR-Produkte wie bei Peter (2005) beschrieben auf ein 2%iges Agarosegel geladen. Die Produkte wurden dann bei 120 V in einer Elektrophorese aufgetrennt und anschließend im Ethidiumbromidbad für 15 min gefärbt. Unter UV- Licht konnte nun festgestellt werden ob ein Amplifikat vorhanden war. Die Resultate wurden per Videodokumentation festgehalten.

4.2.5.3. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese am DNA- Sequencer

Die Bestimmung der Fragmentlängen der PCR-Produkte erfolgte durch eine lasergestützte Auswertung der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAA- Gelelektrophorese) mit den halbautomatischen Sequenziersystemen ALFexpress (Amersham Biosciences, Freiburg) und ABI Prism® 377 (Applied Biosystems, Darmstadt).

Die Daten wurden im Anschluss mit Hilfe der GeneScan Analysis Software ausgewertet. Die PAA- Gelelektrophorese am ABI Prism® 377 erfolgte wie bei Peter (2005), die am ALFexpress wie von Weimann (2000) beschrieben.

Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden bei jedem Lauf 2 bis 3 Standardproben mittypisiert, durch die alle Ergebnisse miteinander verknüpft und abgeglichen werden konnten. Weiterhin wurde bei jedem Lauf eine Negativkontrolle mitgeladen, um die Qualität der Laborarbeit sicherzustellen.

4.3. Statistische Methoden

4.3.1. Deskriptive Statistik

Die erhobenen Daten zu Größe und geschätztem Gewicht der Tiere wurden Altersgruppen, Population und Geschlechtern zugeordnet. Anschließend wurden mithilfe des Programms SAS 9.1 die LSQ- Mittelwerte für Größe und Gewicht nach Population ermittelt.

Der Inzuchtkoeffizient und der Vollständigkeitsindex für die deutsche Population des Rouge du Roussillon- Schafes wurden mithilfe des Programms OPTIMATE (Schmidt, 2002) aus den vorliegenden Pedigreedaten berechnet. Der Vollständigkeitsindex ermöglicht, dass die durch Lücken im Pedigree entstehende Ungenauigkeit in der Schätzung des Inzuchtkoeffizienten quantifiziert werden kann. Dadurch werden lückenhafte Pedigrees besser vergleichbar. Berücksichtigt werden bei der Berechnung alle unbekanntes Ahnen, ihre Position im Pedigree,

sowie die Verteilung der bekannten männlichen und weiblichen Vorfahren über Vater- und Mutterseite der Pedigrees.

Weiterhin wurde die effektive Populationsgröße (N_e) berechnet. Die wichtigsten Ahnen und Stammeltern der Population wurden mit dem Programm ermittelt. Anpaarungsvorschläge für die bestehenden Gruppen weiblicher Tiere mit den vorhandenen Böcken wurden aufgrund der zu erwartenden durchschnittlichen Inzucht der Nachkommen und unter Berücksichtigung des Vollständigkeitsindex erstellt.

4.3.2. Diversitätsanalysen

Für die in dieser Arbeit untersuchten Rassen wurden die Parameter Allelfrequenz, erwartete und beobachtete Heterozygotie, beobachtete und effektive Allelzahl, die genetischen Distanzen der Populationen zueinander nach Nei (1978) und Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit dem Programm POPGENE 1.32 (Yeh, 1997) geschätzt.

Zur Berechnung der PIC-Werte (Polymorphism information content) (Botstein, 1980) für die verwendeten Mikrosatellitenmarker wurde das Programm CERVUS 3.0 (Kalinowski, 2007) genutzt.

Die Parameter der F-Statistik nach Nei (1972) und Weir und Cockerham (1984) sowie Nei's G_{st} (1973) wurden mit dem Programm FSTAT (Goudet, 1995) berechnet. Da mehr als 4 Genorte bzw. Populationen in die Berechnung eingingen, wurde sowohl ein Bootstrapping als auch ein Jackknifing (Felsenstein, 1985) über alle Genorte durchgeführt.

4.3.2.1. Analyse von Populationsstrukturen

Um eine Einordnung der untersuchten Rassen in den Kontext der im ECONOGENE- Projekt untersuchten 57 Schafrassen Europas und des Nahen Ostens (Peter, 2005) (siehe Tabelle 2) zu ermöglichen, wurden die ermittelten Typisierungsergebnisse mit denen der ECONOGENE-Datenbank mithilfe gemeinsam verwendeter Standardproben abgeglichen. Dabei gab es bei 4 Mikrosatelliten (*ILSTS11*, *MAF33*, *MAF70*, *OarFCB226*) Schwierigkeiten, da diese in der ECONOGENE- Datenbank Ein-Basenpaar-Abstände aufwiesen, die bei unseren Untersuchungen nicht auftraten. Um Ungenauigkeiten auszuschließen, wurden die Typisierungsergebnisse dieser Marker nicht mit in die gemeinsamen Untersuchungen aller Rassen ein-

bezogen und die Analysen somit mit 11 Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Die folgenden Methoden wurden immer zum einen für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rassen durchgeführt, zum anderen für die Gesamtheit aus den hier untersuchten Rassen und den Rassen aus dem ECONOGENE- Projekt.

Tabelle 2: Schafrassen des ECONOGENE- Projektes mit Abkürzungen, Anzahl untersuchter Proben (N) und Herkunftsland nach Peter (2005)

Rasse	Abkürzung	n	Herkunftsland
Akkamaran	AKK	17	Türkei
Altamura	ALT	31	Italien
Anogeiano	ANO	31	Griechenland
Bardhoka	BAR	31	Albanien
Bergamasca	BER	31	Italien
Braunes/Weißes Bergschaf	BBS	31	Deutschland
Churro (Bragancana)	CHU	30	Portugal
Cikta	CIK	31	Ungarn
Colmenareña	CLM	31	Spanien
Dagliç	DAG	31	Türkei
Delle Lange	LAN	31	Italien
Exmoor Horn	EXH	31	Großbritannien
Gentile di Puglia	GDP	31	Italien
Graue gehörnte Heidschnucke	GGH	31	Deutschland
Heri	HER	29	Saudi-Arabien
Kalarritiko	KAL	31	Griechenland
Kamieniec	KAM	31	Polen
Karagouniko	KAG	31	Griechenland
Karayaka	KRY	31	Türkei
Kefallinias	KEF	31	Griechenland
Kymi	KIM	31	Griechenland
Laticauda	LAT	31	Italien
Lesvos	LES	31	Griechenland
Manchega	MCG	31	Spanien
Merinolandschaf	MLS	31	Deutschland
Morkamaran	MOR	31	Türkei
Naemi	NAE	29	Saudi-Arabien
Najdi	NAJ	31	Saudi-Arabien
Orino	ORI	31	Griechenland
Ossimi	OSS	31	Ägypten
Pilioritiko	PIL	31	Griechenland
Polnisches Bergschaf (Gorska)	GOR	31	Polen
Polnische Heidschnucke (Wrzosowka)	WRZ	31	Polen
Polnisches Merino	PME	31	Polen
Pomorska	POM	31	Polen
Racka	RAC	31	Ungarn
Rhönschaf	RHO	31	Deutschland
Rubio del Molar	RBM	31	Spanien
Ruda	RUD	31	Albanien

Rasse	Abkürzung	n	Herkunftsland
Schwarzes Karakul	KAR	31	Rumänien
Scottish Blackface	SBF	31	Großbritannien
Segureña	SGR	31	Spanien
Sfakia	SFA	31	Griechenland
Shkodrane	SHK	31	Albanien
Skopelos	SKO	31	Griechenland
Spanisches Merino I	MRS	31	Spanien
Spanisches Merino II	REF	32	Spanien
Swaledale	SDL	31	Großbritannien
Thône et Marthod	THM	31	Frankreich
Transsilvanisches Merino	RME	31	Rumänien
Rumänisches Tsigai	RTS	31	Rumänien
Ungarisches Tsigai	UTS	29	Ungarn
Ungarisches Merino	UME	31	Ungarn
Turcana	TUR	31	Rumänien
Welsh Mountain	WMT	31	Großbritannien
Zelazna	ZEL	31	Polen
Zyprisches Fettschwanzschaf	FTS	32	Zypern

Auf Basis der Allelfrequenzen wurde eine Hauptkomponentenanalyse mit dem Programm SAS 9.1 durchgeführt und anschließend die erste und zweite Hauptkomponente in ein Streudiagramm gemäß Ammermann und Cavalli-Sforza (1984) im Programm SPSS 15.0 gegeneinander aufgetragen und graphisch dargestellt.

Genetische Distanzen nach Nei (D_A) (1972), Cavalli-Sforza (D_C) (1967) und Reynolds et al. (D_{REY})(1983) wurden mit dem Programm GENDIST aus dem Programmpaket PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 1989) berechnet und mithilfe der Programmkomponente SEQBOOT ein Bootstrapping mit 1000 simulierten Individuen durchgeführt. Die Programmkomponente NEIGHBOR desselben Programmpaketes erstellte die ungewurzelten Phylogramme nach der Neighbor-Joining-Methode. Das Programm CONSENSE errechnete aus den 1000 simulierten Bäumen den wahrscheinlichsten Konsensusbaum. Zur graphischen Darstellung der Bäume wurde das Programm TREEVIEW (Page, 1996) genutzt.

Das Programm STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard, 2000) wurde genutzt, um eine Bayesian Model-based Clustering Analyse durchzuführen.

Dabei wurden, wie von Glowatzki-Mullis et al. (2006) empfohlen, die Anzahl der Subpopulationen (k) zwischen $k=2$ und $k=8$ variiert und für jeden k -Wert fünf unabhängige Läufe mit einer „burnin-period“ von 50.000 und einer „period of data collection“ von 100.000 durchgeführt. Im Anschluss wurde die wahrscheinlichste Anzahl von Subpopulationen anhand der ermittelten Verteilungen festgelegt.

Zur graphischen Aufarbeitung der Ergebnisse des Programm STRUCTURE wurde das Programm DISTRUCT (Rosenberg, 2004) verwendet.

Mit dem Programm GENECLASS V 2.0. (Piry et al., 2004) wurden die Wahrscheinlichkeiten ermittelt, dass einzelne Individuen ihrer Ursprungspopulation zugehören. Dafür wurden Methoden basierend auf verschiedenen genetischen Distanzen (D_S , D_A , D_C), Allelfrequenzen nach Paetkau et al. (1995) und der bayesische Ansatz nach Rannala und Mountain (1997) verwendet. Die Individuen wurden zum einen direkt zugeordnet und zum anderen wurden jeweils 10.000 Individuen simuliert, die dann den Populationen zugeordnet wurden.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Phänotypische Daten

Während der Probennahmen konnten unterschiedliche phänotypische Erhebungen gemacht werden. Die deutsche Population der Rouge du Roussillon-Schafe ähnelt dem alten französischen Typ in vielen Merkmalen. Der neue französische Schlag ist phänotypisch sehr heterogen und zeigt große Abweichungen sowohl vom deutschen als auch vom alten französischen Schlag.

In der statistischen Auswertung konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Der Einfluss der Population bei Größe, gemessen am Widerrist, und Gewicht war hoch signifikant. Die alte französische und die deutsche Population sind mit 63,87 resp. 63,38 cm annähernd gleich groß, die neue französische Population ist – mit im Mittel 67,85 cm – etwa 4 cm größer (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Einfluss der Population auf die Widerristhöhe

Population	Mittelwert Größe (in cm)	Standardfehler
RdR-AF	63,87	0,661
RdR-D	63,38	0,612
RdR-NF	67,85	0,834

RdR-AF = alter französischer Schlag Rouge du Roussillon; RdR-D = deutsche Population;

RdR-NF = neuer französischer Schlag

Auch das geschätzte Gewicht ist bei der deutschen und der alten französischen Population deutlich geringer als beim neuen französischen Schlag. Bei diesem Parameter unterscheiden sich jedoch auch die deutsche und die alte französische Population deutlich voneinander, wobei die alte französische im Durchschnitt leichter ist (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Einfluss der Population auf das Gewicht

Population	Mittelwert Gewicht (in kg)	Standardfehler
RdR-AF	45,69	1,523
RdR-D	51,09	1,369
RdR-NF	68,00	1,879

RdR-AF = alter französischer Schlag Rouge du Roussillon; RdR-D = deutsche Population;

RdR-NF = neuer französischer Schlag

Weiterhin haben Alter und Geschlecht hochsignifikante Einflüsse auf die Widerristhöhe der Tiere. Erst ab dem dritten Lebensjahr sind die Tiere ausgewachsen.

In der deutschen Population liegt das mittlere Gewicht der Böcke mit einem Lebensalter > 1 Jahr bei 52,8 kg, das weiblicher Tiere bei 44,3 kg. Die männlichen Tiere sind im Mittel 65,7 cm hoch, die Mutterschafe 60,1 cm (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Mittelwerte von Gewicht und Größe von Tieren mit einem Lebensalter von >1 Jahr in der deutschen Population des Rouge du Roussillon-Schafes

Variable	Geschlecht	N	Mittelwert	Std.abweichung
Gewicht in kg	m	23	52,8	15,87
Gewicht in kg	w	46	44,3	13,42
Größe in cm	m	23	65,7	5,61
Größe in cm	w	46	60,1	5,19

m = männlich, w = weiblich, N = Anzahl der Individuen, Std.abweichung = Standardabweichung

Die Schurgewichte des leicht gereinigten Vlieses lagen im Mittel bei 3264 g bei weiblichen Tieren (Standardabweichung: 621 g) und 3831 g (Standardabweichung: 914 g) bei Böcken.

5.2. Pedigreedaten

Zur Berechnung des Inzuchtkoeffizienten wurden ausschließlich Tiere verwendet, bei denen Angaben zu Mutter und Vater vorhanden waren. Der Inzuchtkoeffizient (F) der deutschen Herde beträgt 4,32. Der Vollständigkeitsindex für diesen Wert beträgt in der 2. Elterngeneration (EG) 56,74%, in der 3. Elterngeneration nur noch 38,98% (Tabelle 6). Die effektive Populationsgröße der deutschen Population liegt bei 37,33 Tieren. Der erwartete Inzuchtzuwachs (ΔF) bei 1,39 % pro Generation. Da die effektive Populationsgröße der Rasse unter 50 Tieren liegt, fällt sie laut Nationalem Fachprogramm in die Kategorie „Phänotypische Erhaltungszuchtpopulation“ (PERH). Es wird eine Sicherung des

Genbestandes durch Kryokonservierung empfohlen. Die Chance der langfristigen Erhaltung der Rasse als Lebendpopulation wird als gering angesehen (BMELV, 2008). Bei dieser Einstufung wird als einziger Parameter die effektive Populationsgröße herangezogen. Diese würde jedoch höher ausfallen, wenn es gelingt, Tiere der französischen Population in die Zucht zu integrieren. Den Parameter der effektiven Populationsgröße mittelfristig zu erhöhen, sollte daher ein wichtiges Anliegen der weiteren Zuchtplanung sein.

Tabelle 6: Inzuchtkoeffizient und Vollständigkeitsindex nach Schmidt (2002) für die deutsche Population des Rouge du Roussillon- Schafes bei Betrachtung aller Tiere

	N	Mittelwert	Std.abweichung	Minimum	Maximum
Inzuchtkoeffizient F	152	4,32	6,829	0,000	31,250
Vollständigkeitsindex 2. Elterngeneration	152	56,74%	31,250	0,000	100,00
Vollständigkeitsindex 3. Elterngeneration	152	38,98%	23,636	0,000	81,300
Vollständigkeitsindex 4. Elterngeneration	152	26,96%	18,595	0,000	64,800
Vollständigkeitsindex 5. Elterngeneration	152	17,85%	14,030	0,000	47,200

N = Anzahl der Individuen, Std.abweichung = Standardabweichung

5.3. Genetische Daten

5.3.1. Mikrosatelliten

5.3.1.1. Allelzahl und PIC-Werte

Die hier genutzten Marker gehören zu den von der FAO empfohlenen Markern für genetische Untersuchungen bei Schafen. Wie von der FAO (1998) für solche Marker gefordert, sind ihre Primersequenzen im Internet zugänglich (www.dad.fao.org), sie sind kartiert und werden nach den Mendelschen Regeln vererbt. Auch die Forderungen nach der speziesübergreifenden Anwendungsmöglichkeit und der einfachen und zuverlässigen Typisierung erfüllen die Marker.

Wie in Tabelle 7 ersichtlich, weisen alle genutzten Mikrosatelliten weiterhin eine Allelzahl von mindestens fünf Allelen auf, bei einzelnen Populationen trifft dieses Kriterium jedoch nicht zu. Besonders häufig unterschreitet die beobachtete Allelzahl diesen Wert bei der

Population der deutschen Rouge du Roussillon- Schafe. Die Mikrosatellitenmarker *OarFCB128* und *OarJMP29* weisen in der deutschen Population des Rouge du Roussillon-Schafes nur je 2 Allele auf. Insgesamt finden sich in dieser Population im Durchschnitt deutlich weniger Allele (4,8) als in den anderen untersuchten Populationen, wo die Werte zwischen 7,6 (Coburger Fuchsschaf) und 9,93 (neuer französischer Typ Rouge du Roussillon-Schaf) lagen. Im Mittel konnten 7,65 Allele pro Population dargestellt werden.

Dies ist mit der Zuchtgeschichte der deutschen Population zu erklären. Die Gesamtheit von ca. 90 Tieren ist aus einer Gruppe von ursprünglich 14 Gründertieren (12 Mutterschafe, 2 Böcke) entstanden (Steger, 1984). Bei einer so engen genetischen Basis kommt es zu einem dramatischen Anstieg der Inzucht und dadurch zu einer Verringerung der genetischen Diversität in der Population. Die PIC-Werte lagen bei 12 der 15 genutzten Mikrosatellitenmarker bei den von der FAO geforderten Werten von $> 0,6$. Die Marker *BM8125*, *MAF214* und *OarFCB128* lagen mit Werten von 0,460; 0,401 resp. 0,582 jedoch unter diesem Wert. Da diese Marker in anderen Studien bei Schafen (Peter, 2007, Hoda, 2009, Ivanković, 2005) genutzt wurden und dort PIC-Werte über 0,6 erreichten, muss davon ausgegangen werden, dass die Ursache für die niedrigen Werte in der durch die Inzucht verursachten geringen Allelzahl in einzelnen Populationen liegt.

Tabelle 7: Beobachtete Allelzahl der einzelnen Populationen, Gesamtanzahl der Allele über alle Populationen, Mittelwert und Standardabweichung für die einzelnen Populationen

Marker	CF	RdR-AF	RdR-D	RdR-NF	gesamt
BM1329	5	6	3	6	9
BM8125	6	4	3	6	7
ILSTS11	5	7	3	7	8
ILSTS28	11	11	5	13	14
INRA063	10	11	6	15	16
MAF214	3	5	6	9	10
MAF33	7	9	8	9	11
MAF65	5	8	5	9	10
MAF70	13	13	9	15	20
OarFCB128	6	6	2	5	7
OarFCB20	9	10	9	12	14
OarFCB226	10	6	5	9	11
OarJMP29	10	12	2	15	18
OarJMP58	7	8	3	11	12
OarVH72	7	8	3	8	9
Mittelwert	7,60	8,27	4,80	9,93	11,73
Standardabweichung	2,77	2,69	2,40	3,41	3,94

CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

5.3.1.2. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

In allen untersuchten Populationen wurden die 15 Mikrosatelliten mithilfe des Chi-Quadrat – Tests und des Likelihood Ratio-Tests (Yeh, 1997) auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts getestet. Bei Werten von $p < 0,05$ wurden die Abweichungen als signifikant betrachtet. Vier der Marker zeigten in keiner Population signifikante Abweichungen (*OarVH72*, *INRA063*, *OarFCB226*, *MAF214*). Alle anderen Marker zeigten in mindestens einer Population Abweichungen in einem oder beiden der genutzten Berechnungswege. Besonders oft (8 von 15 Mikrosatelliten) kam es in der Population der deutschen Rouge du Roussillon-Schafe zu Abweichungen der Marker vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Der Marker *OarJMP29* zeigt in allen Populationen außer der deutschen Population des Rouge du Roussillon- Schafes signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Das könnte für das Vorliegen eines Nullalleles sprechen. Das Auftreten von Nullallelen könnte am einfachsten durch die Sequenzierung der flankierenden Regionen der Mikrosatellitenmarker nachgewiesen werden (Callen, 1993).

Die Abweichungen bei allen restlichen Markern treten vereinzelt in unterschiedlichen Populationen und am häufigsten in der deutschen Population des Rouge du Roussillon-Schafes auf. Damit Populationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sind, müssen mehrere Annahmen erfüllt sein: zufällige Paarung (Panmixie), unendlich große Population, vernachlässigbare Migration, nichtüberlappende Generationen, keine Selektion oder Mutation.

Keine der Annahmen ist bei dieser Population erfüllt. Des Weiteren besteht eine bedeutende Inzuchtproblematik in dieser Tiergruppe, da sie auf wenigen Gründertieren basiert.

Daher sind diese Abweichungen am wahrscheinlichsten auf die Inzuchtproblematik zurückzuführen. Jedoch kann auch der Wahlund-Effekt nicht komplett ausgeschlossen werden.

5.3.1.3. Private Allele

In den 4 untersuchten Populationen konnten an 12 Genorten insgesamt 16 private Allele identifiziert werden (siehe Tabelle 8). Von diesen 16 privaten Allelen zeigten jedoch nur die Allele *OarFCB20*¹¹³ und *OarFCB226*¹³⁶ in der Rasse Coburger Fuchsschaf Allelfrequenzen von mehr als 5%. Die Frequenzen der anderen privaten Allele betragen zwischen 0,6% und 4,8%. Die Marker *MAF65*, *BM1329* und *ILSTS11* wiesen keine privaten Allele auf.

Die meisten privaten Allele wies der neue französische Schlag der Rouge du Roussillon (9) auf. Die restlichen untersuchten Populationen zeigten zwischen 1 (deutsche Population des Rouge du Roussillon- Schafes) bis 4 (Coburger Fuchsschaf) rassespezifische Allele in dieser Studie. Aufgrund der geringen Frequenzen der privaten Allele sind die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren.

5.3.2. Genetische Variabilität innerhalb der Populationen

Die beobachtete Heterozygotie (H_O) lag zwischen 0,526 (deutsche Population des Rouge du Roussillon- Schafs) und 0,692 (Neuer französischer Typ der Rouge du Roussillon-Schafe), wobei im Mittel Werte von 0,628 gefunden wurden (Tabelle 8).

Auch die durchschnittliche erwartete Heterozygotie (H_E) unter Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts reichte von sehr niedrigen Werten bei der deutschen Population des Rouge du Roussillon- Schafs (0,536) bis zu Werten im oberen Bereich (0,722) beim neuen französischer Typ des Rouge du Roussillon- Schafes. Das Mittel betrug hier 0,715. In allen Populationen lagen die Werte der beobachteten Heterozygotie (H_O) unter denen der erwarteten Heterozygotie (H_E). Dies ist ein Hinweis auf ein Heterozygotendefizit.

Tabelle 8: Beobachtete (H_O) und erwartete (H_E) Heterozygotie und Anzahl privater Allele (N_{privat}) je Population

Population	H_O	H_E	N_{privat}
CF	0,691	0,706	4
RdR-AF	0,620	0,673	2
RdR-D	0,526	0,536	1
RdR-NF	0,692	0,722	9
Mittelwert	0.628	0.715	4

CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

5.3.3. Genetische Differenzierung zwischen den Populationen und F-Statistik

5.3.3.1. Genetische Distanzen zwischen den Populationen

In dieser Studie wurden die genetischen Distanzen nach Nei (D_A) (Nei, 1972), nach Reynolds (D_{REY}) (1983) und nach Cavalli-Sforza (D_C) (1967) berechnet und zeigten bei der Auswertung grundsätzlich dieselben Strukturen auf (siehe Tabelle 9 und 10). Die Distanzen zwischen der deutschen Population des Rouge du Roussillon-Schafes und der Referenzrasse (CF) hatten hohe Werte, der neue Typ der französischen Rouge du Roussillon- Population war mit den Coburger Fuchsschafen nah verwandt. Die genetischen Distanzen dieser Population zum alten

Typ der französischen Population waren gering, nur bei der Berechnung nach Reynolds wies der neue französische Typ eine noch geringere Distanz zur Rasse Coburger Fuchsschaf auf. Die deutsche Population wies durchgängig eine sehr geringe genetische Distanz zum alten französischen Typ auf, jedoch eine hohe genetische Distanz zum neuen Typ.

Es lässt sich eine klare Unterteilung der drei Subtypen der Rasse feststellen. Der deutsche und der alte französische Typ zeigen aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs aus derselben Herde noch immer eine geringe genetische Distanz. Auch der alte und der neue französische Typ sind genetisch noch eng verwandt. Die Distanz zwischen diesen beiden Typen ist innerhalb der letzten 17 Jahre nach Aufspaltung der beiden französischen Typen entstanden und zeigt Werte in sehr ähnlichen Bereichen wie die Distanzen zwischen der deutschen und der alten französischen Population, welche seit 30 Jahren separiert sind.

Dies spricht für Einkreuzungen in den neuen französischen Typ. Unterstützt wird diese Vermutung noch durch die hohen genetischen Distanzen zwischen dem nachweislich reinrassig gezüchteten deutschen Typ und dem neuen französischen Typ.

Tabelle 9: Nei's „unbiased measure“ für genetische Identität (I) (über Diagonale) und genetische Standarddistanz (D_A) (unter Diagonale) (Nei, 1972)

	CF	RdR-AF	RdR-D	RdR-NF
CF	****	0.6904	0.6372	0.8101
RdR-AF	0.3705	****	0.8499	0.8255
RdR-D	0.4507	0.1626	****	0.7546
RdR-NF	0.2106	0.1917	0.2816	****

CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

Tabelle 10: Genetische Distanzen nach Reynolds (D_{REY}) (1983) (über Diagonale) und Cavalli-Sforza (D_C) (1967) (unter Diagonale)

	CF	RdR-AF	RdR-D	RdR-NF
CF	****	0.1259	0.1907	0.0726
RdR-AF	0.0798	****	0.0977	0.0732
RdR-D	0.1143	0.0455	****	0.1388
RdR-NF	0.0511	0.0424	0.0804	****

CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

5.3.3.2. F-Statistik

In unserer Studie zeigte sich im Mittel ein ggr. Heterozygotendefizit gemessen als F_{IS} -Wert von 0,04 über alle Rassen bzw. Subtypen von Rassen und Genorte, welches über die gesamte Population (F_{IT}) 0,147 betrug (Tabelle 11). Der F_{IS} -Wert reichte von -0,057 im Marker *BM8125* bis 0,459 im Marker *OarJMP29*, während der F_{IT} -Wert zwischen -0,037 (*MAF214*) und 0,549 (*OarJMP29*) betrug.

Die acht Marker *BM8125*, *ILSTS11*, *ILSTS28*, *INRA063*, *MAF70*, *MAF214*, *OarJMP58* und *OarVH72* wiesen negative F_{IS} -Werte auf und zeigen somit einen Heterozygotenüberschuss an. Die restlichen Marker trugen in Übereinstimmung mit dem HWG zum Heterozygotendefizit bei. Einen besonders hohen Beitrag leistet der Marker *OarJMP29* mit einem F_{IS} -Wert von über 0,200.

Tabelle 11: F_{IT} , F_{ST} und F_{IS} nach Weir und Cockerham (1984) je Locus über alle Populationen gemittelt

Locus	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
BM1329	0.144	0.090	0.060
BM8125	0.082	0.131	-0.057
ILSTS11	0.023	0.040	-0.018
ILSTS28	0.023	0.043	-0.021
INRA063	0.083	0.099	-0.017
MAF214	-0.037	0.055	-0.097
MAF33	0.257	0.169	0.105
MAF65	0.116	0.055	0.064
MAF70	0.057	0.073	-0.018
OarFCB128	0.226	0.203	0.030
OarFCB20	0.207	0.156	0.061
OarFCB226	0.141	0.136	0.006
OarJMP29	0.549	0.166	0.459
OarJMP58	0.093	0.115	-0.025
OarVH72	0.102	0.107	-0.006
Mittelwert	0.147	0.111	0.040

Die genetische Differenzierung zwischen den Populationen, gemessen anhand der F_{ST} -Werte, betrug im Mittel 0,11. Die Werte reichten von 0,04 (*ILSTS11*) bis 0,203 (*OarFCB128*).

Die hier erhobenen Werte sprechen nach der Einteilung von Hartl und Clark (2007) für eine moderate genetische Differenzierung zwischen den Populationen.

5.3.4. Einordnung der Rassen in einen europäischen Kontext

Um die untersuchten Populationen in einen europäischen Kontext einordnen zu können, wurde aufgrund der Allelfrequenzen von 11 Mikrosatelliten, die genetische Distanz nach Reynolds zu 57 Schafrassen Europas und des Nahen Ostens (siehe Tabelle 2) geschätzt. Mit diesen Daten wurde eine Hauptkomponentenanalyse und eine Bayesian Model-based Clustering Analyse durchgeführt. Weiterhin wurde ein ungewurzelter Konsensusbaum erstellt.

5.3.4.1. Hauptkomponentenanalyse

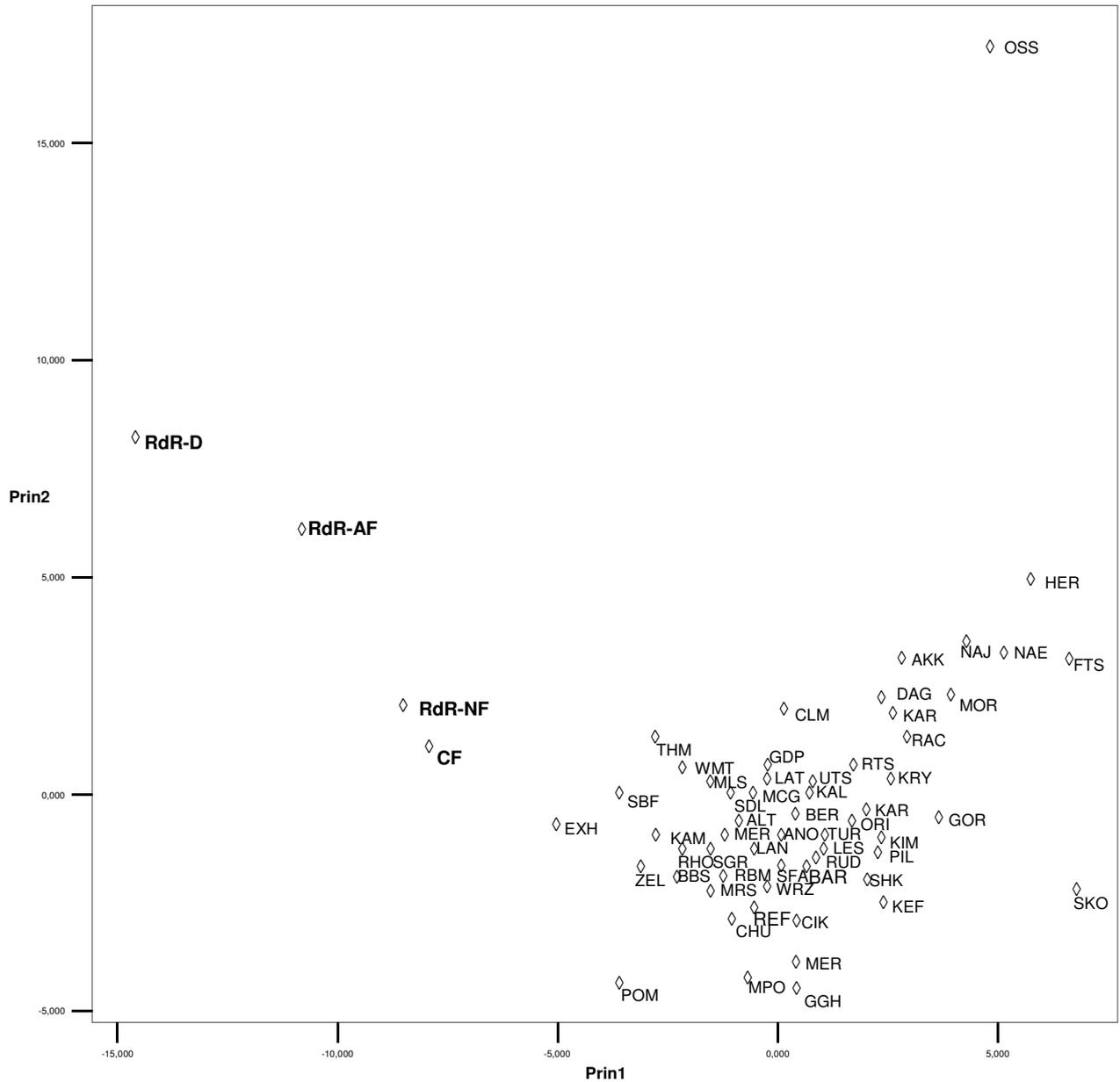


Abbildung 2: Streudiagramm der ersten beiden Hauptkomponenten der Allelfrequenzen von 61 Rassen auf der Basis von 11 Mikrosatellitenmarkern (Prin1= erste Hauptkomponente, Prin2= zweite Hauptkomponente), Abkürzungen siehe Tabellen 1 und 8

Wie man aus Abbildung 2 ersehen kann, separieren sich die deutsche Population der Rouge du Roussillon- Schafe (RdR-D) und der alte Typ der französischen Population (RdR-AF) deutlich von den anderen europäischen Rassen. Die Referenzrasse (CF) dieser Untersuchung bildet mit dem neuen Typ der französischen Population der Rouge du Roussillon- Schafe (RdR-NF) einen gemeinsamen, von den anderen europäischen Rassen klar abgetrennten Cluster.

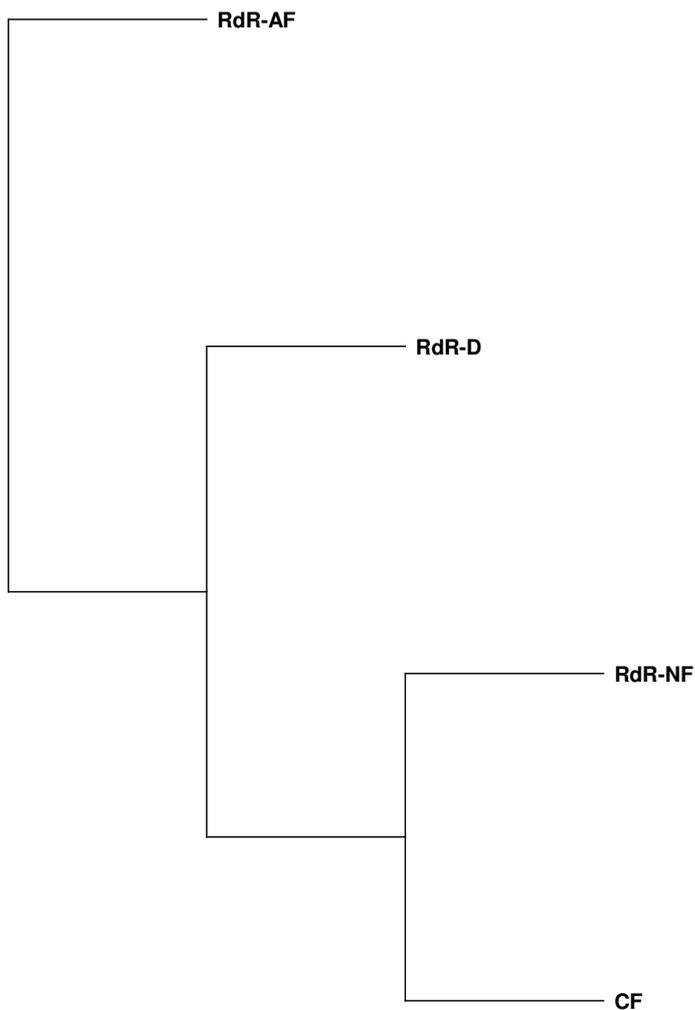
Die deutliche Abgrenzung des neuen Typs der Rouge du Roussillon vom alten Typ und der deutschen Population kann als gesichert angesehen werden, da sich diese Beobachtung in anderen erhobenen Parametern wiederfindet (siehe z. B. genetische Distanzen, Bayesian Model-based Clustering- Methode, phylogenetische Bäume). Auch die deutliche Abgrenzung der Rasse von den übrigen europäischen Schafrassen konnte in anderen Analysen bestätigt werden. Dies spricht für eine genetische Einzigartigkeit kombiniert mit einem hohen Grad der Gefährdung der Rasse. Daher sollte die Rasse einen hohen Stellenwert bei der Priorisierung für Erhaltungsmaßnahmen einnehmen (Gandini, 2003, Oldenbroek, 1999).

5.3.4.2. Neighbour-Joining- Bäume

Zur graphischen Darstellung der genetischen Distanzen zwischen den untersuchten Populationen wurde ein ungewurzelter Konsensusbaum nach der Neighbor-Joining-Methode erstellt (Abb. 3). Bei ungewurzeltten Bäumen wird keine Aussage über das phylogenetische Alter der Populationen getroffen. Die Astlängen geben Auskunft über die genetische Distanz zwischen den Populationen.

Der Baum basiert auf einer Matrix von genetischen Distanzen aus 1000 simulierten Datensätzen. Daraus wurde nach dem „Majority Rule Consensus“- Prinzip diejenigen Knoten gewählt, die bei einer Mehrheit von $> 50\%$ der Simulationen vorhanden sind. Es wurde die genetische Distanz nach Reynolds (1983) für die Analyse verwendet.

Nach demselben Prinzip wurde ein weiterer phylogenetischer Baum mit den kombinierten Daten dieser Studie und der ECONOGENE- Studie (siehe Kapitel 3.6.3.) erstellt (siehe Abbildung 4).



100

Abbildung 3: Ungewurzelter Konsensusbaum nach der Neighbor-Joining-Methode der in dieser Studie untersuchten Populationen rekonstruiert mit Reynolds genetischer Distanz D_{REY} (1983) auf der Basis von 15 Mikrosatelliten
 Abkürzungen: CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

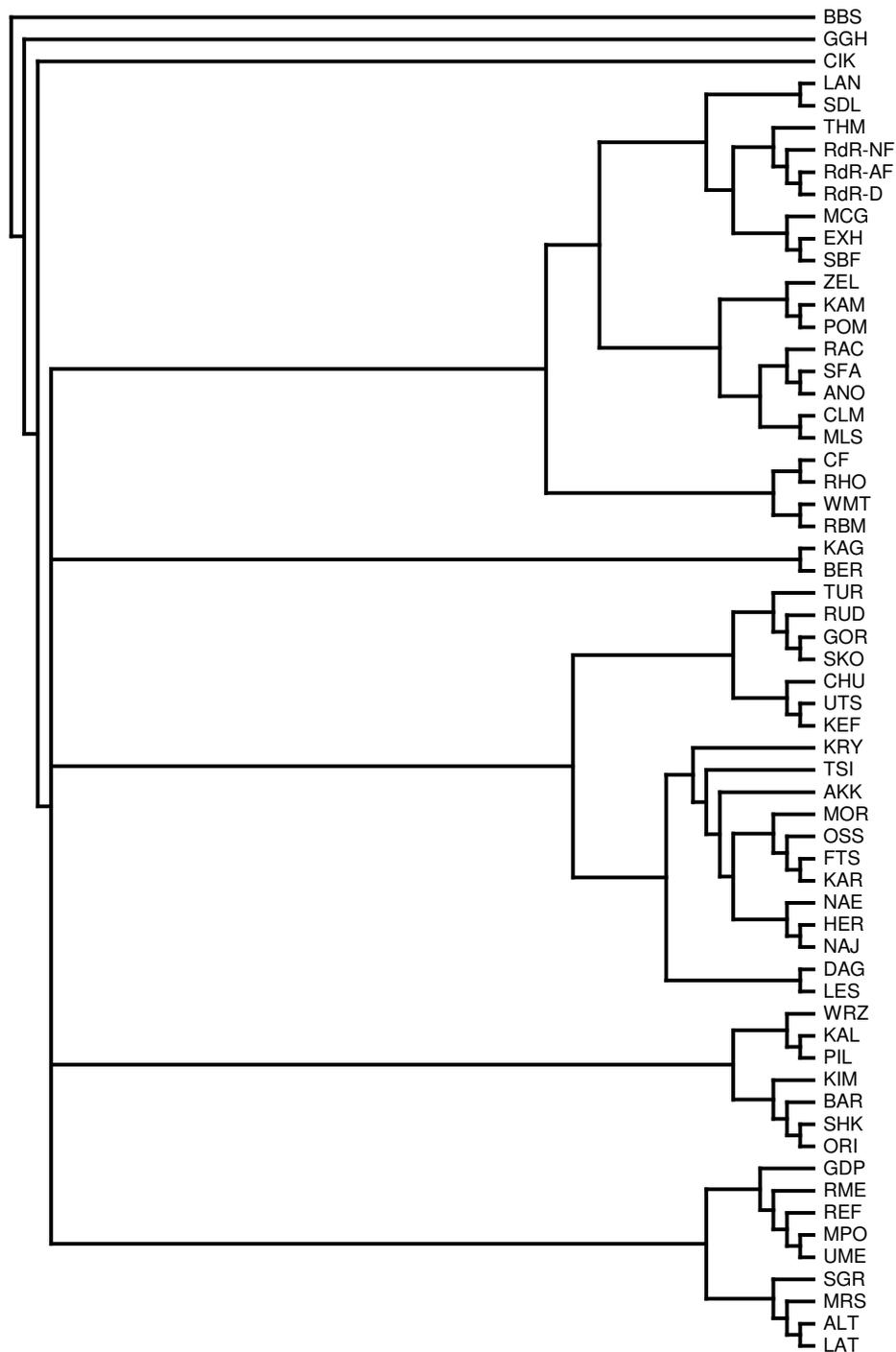


Abbildung 4: Gemeinsamer ungewurzelter Konsensusbaum nach der Neighbor-Joining-Methode der in dieser Studie untersuchten Populationen und der im ECONOGENE-Projekt untersuchten Populationen rekonstruiert mit Reynolds genetischer Distanz D_{REY} (1983) auf der Basis von 11 Mikrosatelliten (Abkürzungen siehe Tabelle 1 und 8)

Die hier untersuchten Populationen (Abb. 3) zeigen im Phylogramm eine größere genetische Nähe zwischen dem neuen französischen Typ und der Referenzrasse (CF) als zu den beiden anderen Populationen der eigenen Rasse. Der Baum war mit Bootstrapping-Werten von 100% hoch robust.

Die Einordnung der hier untersuchten Rassen im gesamteuropäischen Konsensusbaum zeigt deutlich ihre Nähe zu den Rassen ihrer Ursprungsregionen auf. Dieser Baum wies jedoch nur wenige Bootstrapping-Werte über 50% auf und ist daher als nicht sehr robust anzusehen.

Alle Populationen der ursprünglich rein französischen Rouge du Roussillon finden sich in unmittelbarer Nähe zu der einzigen anderen französischen Rasse in dieser Analyse, den Thône et Marthod (THM) wieder. Die kurze Zeit seit 1981 reichte zwar aus um eine Verzweigung zwischen der deutschen Population und dem alten französischen Typ hervorzubringen, die Nähe aufgrund des identischen Ursprungs blieb jedoch erhalten.

Die Referenzrasse Coburger Fuchsschaf wiederum bildet einen gemeinsamen Knoten mit den Rhönschafen- beides deutsche Landschaftsrassen aus dem bayerisch/hessischen Raum. Insgesamt finden sich die untersuchten Rassen eingebettet in den nordeuropäischen Schafrassen wieder.

Die Beziehungen der Rassen des ECONOGENE-Projektes zueinander werden ausführlich bei Peter (2005) diskutiert.

5.3.4.3. Bayesian model-based Clustering-Analyse

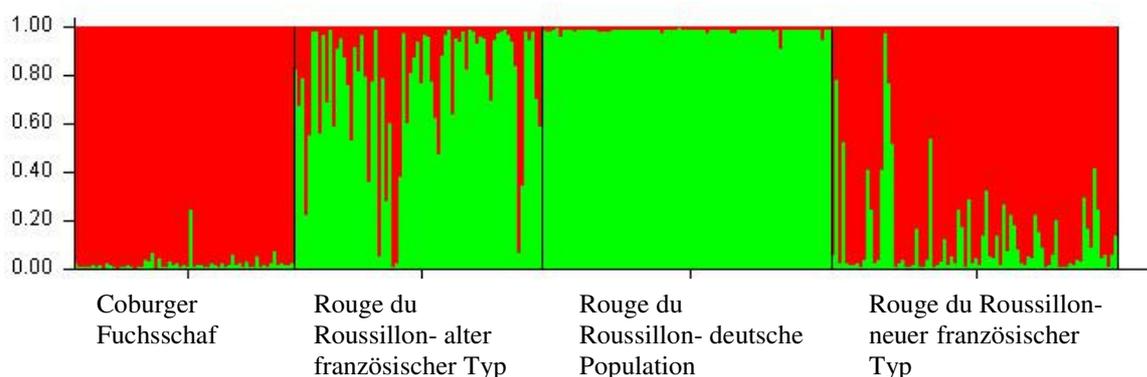


Abbildung 5 : Barplot der untersuchten Populationen bei Annahme von $k=2$ Populationen

Wenn man ausschließlich die in dieser Studie untersuchten Populationen betrachtet, und diese in $k=2$ Gruppen aufteilt, wird wiederum die große genetische Nähe zwischen der deutschen Population und dem alten französischen Typ deutlich. Die beiden Populationen clustern

gemeinsam, während der neue französische Typ mit den Coburger Fuchsschaf zusammen einen Cluster bildet. In beiden französischen Typen wird ersichtlich, dass genetische Einflüsse der jeweils anderen Gruppe vorhanden sind. Die deutsche Population und die Rasse Coburger Fuchsschaf erscheinen deutlich homogener als die beiden anderen Populationen.

Bezieht man die Populationen des ECONOGENE-Projektes in die Analyse mit ein und unterteilt die Gesamtpopulation von insgesamt 63 Rassen (in dieser Arbeit untersuchte Populationen und Populationen des ECONOGENE-Projektes) in $k=2$ Gruppen, so zeigt sich wie schon bei Peter (2005) (Abb. 6) eine Aufteilung der Rassen nach geographischen Merkmalen (siehe Abb. 7). Mit Ausnahme von wenigen Rassen (Ungarische Merino, Graue gehörnte Heidschnucke) trennen sich die Populationen in einen südosteuropäischen und einen nordwesteuropäischen Cluster auf.

Ab einer Populationsanzahl von $k=3$ Gruppen bilden die Populationen Rouge du Roussillon-deutscher Typ (RdR-D) und Rouge du Roussillon- alter französischer Typ (RdR-AF) immer einen eigenständigen Cluster separat von allen anderen Rassen. Die restlichen Rassen teilen sich weiterhin nach geographischen Merkmalen auf (siehe Abb. A im Anhang).

Ab $k=4$ kann man eine Aufteilung der Rassen nach phänotypischen Merkmale feststellen. Die Merinoschafe bilden einen eigenen Cluster und die hier untersuchten Rassen Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ (RdR-NF) und Coburger Fuchsschaf (CF) ordnen sich diesem zu (siehe Abb. B im Anhang). Bei der Annahme von $k=5$ wird diese Aufteilung noch deutlicher (siehe Abb. C im Anhang).

Optimal erscheint jedoch eine Aufteilung in $k=6$ Gruppen (siehe Abb. 8). Dabei separieren sich, ähnlich wie bei Peter (2005), die europäischen Rassen in die Gruppe der Zackel- und Ruda-Schafe, die Gruppe der Merino- und polnischen Landschafe, die Fettschwanzschafe und die nordwesteuropäischen Rassen und Rassen der Alpenregionen. Die Tsigaischafassen lassen sich nicht mehr eindeutig einer der Gruppen zuordnen, sondern finden sich in den „Mischpopulationen“ wieder. In dieser Kategorie finden sich auch die Rassen Swaledale, Latacauda, Cikta, Thône et Marthod und Segureña, da diese sich ebenfalls nicht mehrheitlich einer Gruppe zuordnen lassen.

Die Rassen der Alpenregionen und die nordwesteuropäischen Rassen bilden eine gemeinsame Gruppe. Eine neue Gruppe bilden die Farbschafe. In diese Gruppe ordnen sich die Rassen Coburger Fuchsschaf, Rouge du Roussillon- neuer französischer Typ, Rhönschaf, und das braune und weiße Bergschaf gemeinsam ein.

Wie schon erwähnt bilden die Populationen Rouge du Roussillon- deutscher Typ (RdR-D) und Rouge du Roussillon- alter französischer Typ (RdR-AF) eine eigene Gruppe separat von den anderen Rassen.

Ab einer Clusteranzahl von $k=7$ wurde nur ein geringer Anteil der Rassen zu über 40% einem Cluster zugeordnet und daher wurde von einer weiteren Unterteilung abgesehen.

Zur Überprüfung der Wiederholbarkeit der Ergebnisse wurden fünf unabhängige Läufe mit identischen Einstellungen („burnin-period“ = 50.000, „period of data collection“ = 100.000 und $k = 6$) durchgeführt.

Die Gruppen Rouge du Roussillon-Schafe und Merinoschafe clusterten stabil in allen Wiederholungen. Die Rassen Graue gehörnte Heidschnucke und Scottish Blackface wurden in verschiedenen Läufen verschiedenen Gruppen zugeordnet. Alle anderen Rassen wurden immer denselben Gruppen zugeordnet.

Die deutliche Trennung der deutschen Population und des alten französischen Typs der Rouge du Roussillon- Schafe von den anderen Rassen unterstreicht deren genetische Differenzierung von den anderen europäischen Rassen und ihre Einzigartigkeit. Sie zeigt auf, dass besondere Bemühungen um ihre Erhaltung sinnvoll und notwendig sind.



Abbildung 6: Geographische Verteilung der Rassen des ECONOGENE-Projektes nach Peter (2005) bei Annahme von k=2 Populationen

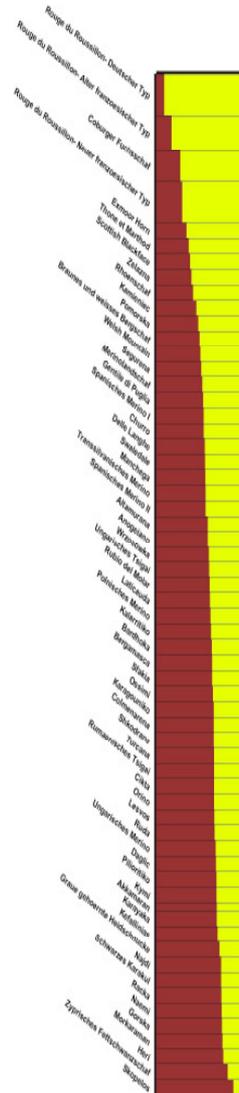


Abbildung 7: Geographische Verteilung der Rassen dieser Studie und der Rassen des ECONOGENE-Projektes bei Annahme von k=2 Populationen

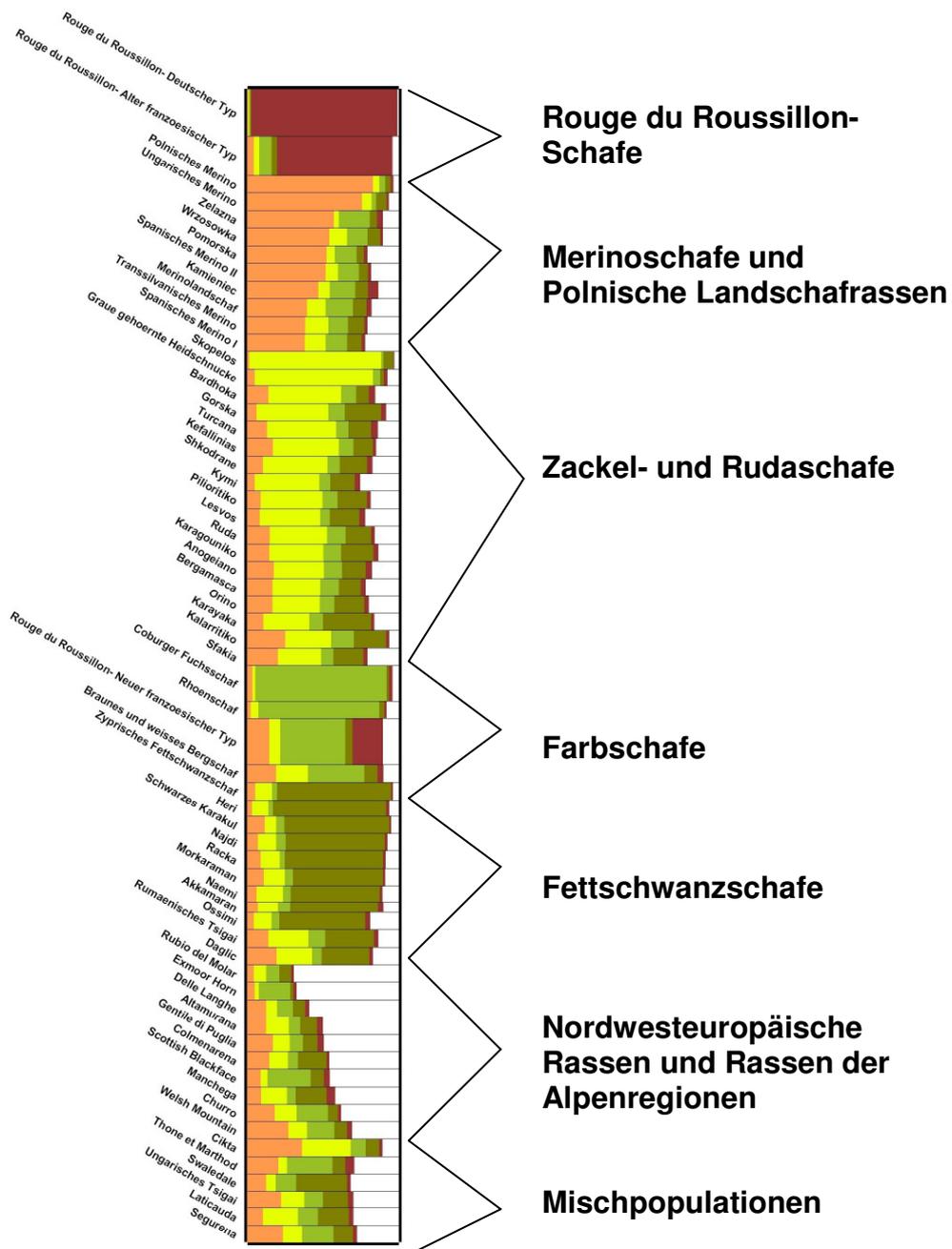


Abbildung 8: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=6$ Populationen am Beispiel eines Laufes. Die Rassen wurden nach der Größe ihres Subpopulationsanteils sortiert. Die Breite der Spalten spiegelt die Anzahl der beprobten Tiere wieder.

5.3.5. Zuordnung von Individuen zu ihrer Ursprungspopulation

Es wurden im Rahmen dieser Untersuchung sowohl auf genetische Distanzen (D_A , D_S , D_C) als auch auf Allelfrequenzen basierende Methoden verwendet. Zusätzlich wurde das Bayes Theorem angewendet und jeweils 10.000 Individuen simuliert. Bei den simulierten Daten wurden nur diejenigen Individuen als korrekt zugeordnet angesehen, bei denen die Wahrscheinlichkeit der Zuordnung bei über 99 % lag.

Der höchste Anteil von korrekten Zuordnungen konnte mit der Methode auf Basis der genetischen Standarddistanz nach Nei (D_S) (17,51%), gefolgt von der Distanz nach Cavalli-Sforza (D_C) (16,16) erreicht werden. Aufgrund der Allelfrequenzen allein konnte kein einziges Individuum korrekt zugeordnet werden (siehe Tabelle 12).

Bei der direkten Zuordnung der Individuen wurden deutlich höhere Werte erreicht. So konnten je nach Methode zwischen 87,68 % (D_C) und 96,27 % (Bayes Theorem) der Individuen korrekt zugeordnet werden (siehe Tabelle 13).

Die Tiere des alten und des neuen französischen Typs wurden oft der jeweils anderen Population zugeordnet. Das ist dadurch erklärbar, dass in den letzten Jahren bekanntermaßen ein Austausch von Zuchttieren stattgefunden hat. Auffällig oft wurden jedoch auch Tiere des neuen französischen Typs der Rouge du Roussillon-Schafe der Rasse Coburger Fuchsschaf zugeordnet. Diese Beobachtung korreliert mit den niedrigen Werten der genetischen Distanzen zwischen diesen beiden Populationen.

In der Population der deutschen Rouge du Roussillon wurden alle Tiere in allen Analysen eindeutig dieser zugeordnet.

Tabelle 12: Zuordnung von 10.000 simulierten Individuen zu ihrer Ursprungspopulation nach verschiedenen Methoden: genetische Distanzen (D_A , D_S , D_C), Allelfrequenzen nach Paetkau et al. (1995) und Bayes Theorem nach Rannala und Mountain (1997).

	D_A %	D_S %	D_C %	Allelfrequenzen %	Bayes Theorem %
CF	12,9	0	9,68	0	12,9
RdR-AF	41,43	0	42,86	0	41,43
RdR-D	13,25	4,82	9,64	0	9,64
RdR-NF	2,47	1,23	2,47	0	2,47
gesamt	17,51	1,51	16,16	0	16,61

CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

Tabelle 13: Direkte Zuordnung der untersuchten Individuen zu ihrer Ursprungspopulation nach verschiedenen Methoden: genetische Distanzen (D_A , D_S , D_C), Allelfrequenzen nach Paetkau et al. (1995) und Bayes Theorem nach Rannala und Mountain (1997).

	DA %	DS %	DC %	Allelfrequenzen %	Bayes Theorem %
CF	98,39	93,55	96,77	100	100
RdR-AF	80,00	88,57	70,00	88,70	90,00
RdR-D	100	100	100	100	100
RdR-NF	87,65	88,89	83,95	95,06	95,06
gesamt	91,51	92,75	87,68	95,94	96,27

CF = Coburger Fuchsschaf, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

5.4. Zuchtplanung für die deutsche Population des Rouge du Roussillon- Schafes

Für die paarungsfähigen weiblichen Tiere der deutschen Population wurden im Programm OPTIMATE aufgrund der bestehenden Gruppierung von Muttertieren (Herden der einzelnen Halter) der Bock aus dem Gesamtbestand der Population ermittelt, der den geringsten durchschnittlichen Inzuchtzuwachs bei den gemeinsamen Nachkommen mit allen weiblichen Tieren der Gruppe hätte. Diese Böcke sollen im Laufe des Jahres zu den entsprechenden Herden gebracht und in der kommenden Decksaison eingesetzt werden. Es werden langfristig Bockzahlen von 30 - 40 Vätern angestrebt, wie vom Nationalen Fachprogramm für Populationen mit Natursprung empfohlen (BMELV, 2008). Derzeit gibt es 19 paarungsfähige Böcke, die jedoch teilweise sehr nah verwandt sind.

An einem Beispiel soll die Vorgehensweise der Bockauswahl erläutert werden. Alle paarungsfähigen Böcke wurden einzeln mit den weiblichen Tieren (N=6) einer Zuchtgruppe im Programm OPTIMATE angepaart. Dabei wurden 5 Ahnengenerationen berücksichtigt. Wie in Tabelle 14 zu ersehen, ergaben sich Werte für die durchschnittliche Inzucht der Nachkommen zwischen F=0 % (Bock 241 und 142) bis F=16,406 % (Bock 219) und Werte für den Vollständigkeitsindex von 5,67 % (Bock 241 und 142) und 63,587 % (Bock 237). Da die geringen Werte von F=0 % Inzucht der Nachkommen bei den Böcken 241 und 142 sehr wahrscheinlich auf die lückenhaften Abstammungsdaten- welche sich in dem geringen Vollständigkeitsindex ausdrücken- zu finden sind, sollten die Böcke 249 und 244 als diejenigen Böcke betrachtet werden, die am besten für den Zuchteinsatz in dieser Herde geeignet sind.

Tabelle 14: Durchschnittliche Inzucht der Nachkommen und Vollständigkeitsindex für die Anpaarung verschiedener Böcke mit den weiblichen Tiere einer Zuchtgruppe am Beispiel von 10 Böcken bei Berücksichtigung von 5 Ahnengenerationen.

Tier-Nummer Böcke	Geburtsjahr	Durchschnittliche Inzucht der Nachkommen	Vollständigkeitsindex
241	unbekannt (alt)	0	5,67
142	2002	0	5,67
249	2008	0,586	56,908
244	2009	0,586	56,908
183	2005	1,497	58,33
237	2008	1,237	63,587
199	2006	2,083	55,697
245	2009	4,362	48,015
68	1997	5,469	46,094
...			
219	2007	16,406	53,984

Welcher der beiden Böcke (249 oder 244) letztendlich in der Herde eingesetzt wird, sollte nach praktischen (Transportstrecke zwischen den Herden, evtl. Zuchteinsatz der Böcke in anderen Herden) und phänotypischen Gesichtspunkten entschieden werden.

Weiterhin werden im Programm die Inzuchtwerte für die einzelnen weiblichen Tiere der Herde angezeigt. Bei beiden der am besten geeigneten Böcke zeigte dasselbe Mutterschaf die höchsten Inzuchtwerte der gemeinsamen Nachkommen. Beim Herausnehmen dieses Schafes aus der Herde kann die durchschnittliche Inzucht der Nachkommen auf einen Wert von 0,234 verringert werden.

Ab 25 Vatertieren kann man bei gleichmäßigem Einsatz Geschwister- und Halbgeschwisterpaarungen weitgehend vermeiden. Diese Anzahl an eingesetzten Böcken sollte bald erreicht werden, wenn möglich auch unter Einbeziehung französischer Böcke vom alten Typ.

Auch Eltern-Nachkommen-Anpaarungen sollen durch regelmäßige Bockaustausche unter den Züchtern möglichst vermieden werden. Weiterhin sollte auf ein langes Generationsintervall geachtet werden. Das erhöht auf lange Sicht auch die Leistungsparameter Fruchtbarkeit, Gesundheit und Langlebigkeit in der Population (BMELV, 2008).

Die Reduktion der Inzucht sollte unabhängig von Leistungsparametern aufgrund der vorliegenden Daten zur Populationsstruktur als ein Hauptziel der Zuchtplanung angesehen werden.

6. Weiterführende Erkenntnisse des Projekts

In einer anderen Studie des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der JLU Gießen wurden zwei weitere französische Schafrassen mit den hier verwendeten Mikrosatellitenmarkern untersucht. Es handelt sich dabei um die Rassen Mourerous (MOU) und Lacaune viande (LV).

Bei der Auswertung der genetischen Daten zeigte sich, dass der neue Typ der französischen Population deutliche Anzeichen einer Einkreuzung mit beiden untersuchten Rassen aufzeigt (siehe Anhang Tabelle B und Abbildung D und E). Dies unterstützt die hier präsentierten Hinweise auf eine genetische Verunreinigung dieser Population. Auch trat die Abgrenzung zwischen dem alten und dem neuen Typ der französischen Population bei Einbeziehung weiterer Rassen noch deutlicher zutage. Daher sollte auf die züchterische Trennung der Subtypen verstärkt geachtet werden. Die enge genetische Ähnlichkeit zwischen dem alten französischen Typ und der deutschen Population konnte in den Analysen bestätigt werden.

Im Rahmen des Projekts konnten 2 deutsche Böcke zu einem Halter des alten Typs in Frankreich (D. Massoubre) gebracht werden, der zwar noch reinrassige Mutterschafe in seinem Bestand hatte, jedoch über keinen Zuchtbock mehr verfügte. Damit konnte zum Erhalt des ebenfalls bedrohten alten Typs der französischen Rouge du Roussillon beigetragen werden. Der Züchter erklärte sich bereit, die reinrassigen Tiere seiner Herde mit den Böcken separat zu halten und Nachkommen aus diesen Anpaarungen mit anderen französischen Züchtern auszutauschen.

In Frankreich ist die gesamte Rasse als „bedroht“ eingestuft. Zwischen den beiden Subtypen wird nicht differenziert, obwohl deren Existenz bekannt ist. Der alte französische Typ ist demzufolge derzeit nicht als eigenständiger Subtyp anerkannt. Das nationale Monitoring wird vom Institut de l'Élevage durchgeführt.

Die Zuchtorganisation des neuen Typs der französischen Population ist unter dem Dach der „UPRA Lacaune“ organisiert und führt das offizielle Zuchtprogramm für die Rasse in Frankreich. Dieses besteht aus dem jährlich organisierten Bockaustausch und unregelmäßiger Kryokonservierung von Sperma der Zuchtböcke. Die Züchter der Zuchtorganisation können europäische und nationale Subventionen für die Haltung der Rasse beantragen. Jeder Züchter der beiden Subtypen der französischen Rouge du Roussillon kann Mitglied werden und am Bockaustausch teilnehmen. Die Züchter des alten Typs sind jedoch nicht in dieser Organisation vertreten. Dies ist auch nicht zu empfehlen, da sie dadurch die Reinzucht ihres

Subtyps aufgeben würden. Die Züchter dieses Typs haben derzeit keinerlei administrative oder ehrenamtliche Lobby in Frankreich.

Im Rahmen des jährlichen Züchtertreffens der deutschen Züchter wurde 2009 die Wollexpertin Frau Dr. Kurt eingeladen, um die Wolle des Rouge du Roussillon- Schafes zu analysieren. Es stellte sich heraus, dass es sich um eine feine Schlichtwolle mit gelegentlichen dunkel gefärbten Haarresten und einer deutlichen Kräuselung handelt. Sie ist ungewöhnlich fein für die Wolle einer Landschaftsrasse und eignet sich gut zur Verarbeitung.

Frau Dr. Kurt und der Zuchtverband für Ostpreußische Skudden und Rauhwollige Pommersche Landschaft e. V. (ZVSP) werden gemeinsam mit der GEH e. V. die Wolle ab der Schur 2010 zur Herstellung eines Wollproduktes zu nutzen und damit einen neuen Vermarktungszweig für das deutsche Rouge du Roussillon- Schaf schaffen.

7. Konsequenzen für ein sich anschließendes weiteres Vorhaben

Aufgrund der erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Populationen des deutschen und des alten französischen Typs um eine gemeinsame, genetisch abgegrenzte und einzigartige Schafrasse im europäischen Raum handelt. Die reinrassige Zucht sollte gefördert und ausgeweitet werden. Sie sollten möglichst auch auf politischer Ebene als eine gemeinsame Population erfasst und über Ländergrenzen in einem Zuchtprogramm betreut werden. Es sollte dringend angestrebt werden, weiterhin für genetischen Austausch zwischen der deutschen und der alten französischen Population zu sorgen.

Aufgrund vielfältiger Beobachtungen ist anzunehmen, dass der neue französische Typ Einkreuzungen erfahren hat. Eine gemeinsame Zucht des alten und des neuen französischen Typs ist daher nicht zu empfehlen. Er sollte als Subtyp der Rasse behandelt werden und möglichst keinen Einsatz in der Zucht der beiden anderen Populationen finden.

Der alte französische Typ sollte in Frankreich als eigenständiger Subtyp anerkannt werden und seine Erhaltung verstärkt gefördert werden. Derzeit haben die Züchter keinerlei Zugang zu europäischen oder nationalen Subventionen für die Haltung dieses Typs. Es wird empfohlen, die Position der Züchter des alten Typs in Frankreich zu stärken. Weiterhin wären eine bessere Vernetzung und eine gemeinsame Zuchtplanung mit Maßnahmen zur Verringerung der Inzucht zwischen den Züchtern des alten Typs wünschenswert. Nationale und internationale Organisationen, die sich mit der Erhaltung gefährdeter Haustierrassen beschäftigen (wie zum Beispiel die SAVE- Foundation), sollten auf die Problematik der Rasse in Frankreich hingewiesen werden.

Auch die Vernetzung der Züchter in Deutschland sollte weiter betrieben werden. Bisher durchgeführte Veranstaltungen, wie z. B. die jährlichen Züchtertreffen, wurden sehr positiv aufgenommen. Auch sollte versucht werden, neue Züchter für die Rasse zu gewinnen. Es empfiehlt sich, die Zuchtarbeit in einem noch zu gründenden Verein der Züchter zu organisieren, um die im Rahmen des Projektes entstandenen Kontakte und Netzwerke zu pflegen. Dieser Verein sollte auch die Pflege und Aktualisierung der Homepage übernehmen, um die Nachhaltigkeit des Projektes zu gewährleisten.

8. Erfolgskontrolle über die Einhaltung des Finanzierungs-, Zeit- und Arbeitsplans

Der Finanzierungs- und Zeitplan des Projektes konnte eingehalten werden. Lediglich der Transport der Zuchtherde des alten französischen Typs von Frankreich nach Deutschland konnte nicht realisiert werden.

9. Zusammenfassung

Im Rahmen des Projektes wurden 302 Tiere, der in Frankreich und Deutschland vorkommenden und vom Aussterben bedrohten Schafrasse Rouge du Roussillon und der Referenzrasse Coburger Fuchsschaf untersucht. Die genetische Variabilität innerhalb und zwischen den Populationen und die Populationsstrukturen wurden mithilfe von 15 Mikrosatellitenmarkern analysiert und die Rasse in den Kontext von 57 Schafrassen Europas und des Nahen Ostens eingeordnet. Phänotypische Daten und Pedigreedaten wurden erfasst und ausgewertet, ein Erhaltungszuchtplan für die Rasse Rouge du Roussillon in Deutschland entwickelt und eine Rassebeschreibung erstellt. Weiterhin wurden regenerative Zellen aus dem Blut der Tiere kryokonserviert.

Es zeigte sich geno- als auch phänotypisch eine Aufteilung der Rouge du Roussillon- Schafe in drei Subtypen: eine in Deutschland gehaltene Population und zwei Subtypen der in Frankreich gehaltenen Population, die hier als der neue französische Typ und der alte französische Typ bezeichnet wurden.

Der alte französische Typ ist der kleinste und leichteste der drei Subtypen. Die deutschen Schafe sind im Mittel genauso groß wie der alte französische Typ, aber etwas schwerer. Deutlich schwerer und im Mittel 5 cm größer sind die Tiere des neuen französischen Typs.

Verschiedene Analysen liefern Hinweise auf eine Einkreuzung in diese Population. Sie zeigt eine deutlich höhere Heterozygotie ($H_O = 0,692$, $H_E = 0,722$) als die beiden anderen Subtypen und weist eine durchschnittliche Allelzahl von 9,93 Allelen pro Marker auf. Bei der Bayesian Model-based Clustering Analyse und der Hauptkomponentenanalyse trennt sie sich deutlich von den beiden anderen Populationen. Auch zeigt sie hohe genetische Distanzen zum deutschen Rouge du Roussillon- Schaf und ist auch vom alten französischen Typ trotz einer Trennung der Populationen von nur 17 Jahren deutlich differenziert.

In der deutschen Population des Rouge du Roussillon- Schafes wurden Inzuchteffekte in verschiedenen Parametern festgestellt. Zum einen ergab sich aus der Analyse der Pedigreedaten ein Inzuchtkoeffizient von 4,32 und eine effektive Populationsgröße von 37,33 Tieren bei einer Bestandsgröße von 80 lebenden Tieren, zum anderen zeigte die Population eine geringe Allelzahl von durchschnittlich 4,8 Allelen pro Marker. Auch die beobachtete (H_O) und erwartete (H_E) Heterozygotie lagen mit Werten von 0,526 resp. 0,536 im unteren erwarteten Bereich für europäische Schafrassen. Die Rasse wies zudem keine privaten Allele mit Frequenzen von $> 5\%$ auf. Diese Effekte sind aus der Zuchtgeschichte der Population zu erklären, da diese mit nur 12 weiblichen und 2 männlichen Tieren 1981 gegründet wurde und seither unter Selektion und mit begrenzter Bockanzahl weitergezüchtet wurde.

Bei der Einordnung der Rasse in einen europäischen Kontext zeigt sich eine deutliche Separierung von allen anderen Rassen. Die Rasse ordnet sich geographisch bei den mitteleuropäischen Schafrassen ein, der alte französische Typ und die deutsche Population beziehen jedoch eine Sonderstellung separat von allen anderen Rassen. Dies spricht für die genetische Einzigartigkeit der Rasse und für die Notwendigkeit diese zu erhalten.

Die Referenzrasse Coburger Fuchsschaf ordnet sich nahe dem Rhönschaf ein. Eine Einkreuzung dieser Rasse in den Bestand des deutschen Rouge du Roussillon Schafes konnte nicht nachgewiesen werden.

10. Literatur

- Ammermann, A. und Cavalli-Sforza, L. (1984). "The Neolithic transition and the genetics of populations in Europe". Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Association des éleveurs de brebis de races Raïole, Caussenarde et Rouge du Roussillon (2006) "Le renouveau des races rustiques". Broschüre. Parc naturel régional des Grands Causses.
- BMELV (2008): "Tiergenetische Ressource – Nationales Fachprogramm zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung tiergenetischer Ressourcen in Deutschland". Broschüre, Bonn.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. und Davis, R. W. (1980). "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms". *American Journal of Human Genetics* **32**: 314-331.
- Brownstein, M. J., Carpten, J. D. und Smith, J. R. (1996). "Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping". *Biotechniques* **20**: 1004-1006, 1008-1010.
- Cavalli-Sforza, L. L. und Edwards, A. W. (1967). "Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures". *American Journal of Human Genetics* **19**: 233-257.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. und Sutherland, G. R. (1993). "Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers". *American Journal of Human Genetics* **52**: 922-927.
- FAO (1998): "Secondary Guidelines for Development of National Animal Farm Genetic Resources Management Plans: Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended microsatellite markers". Food and Agriculture Organisation, Rome.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap". *Evolution* **35**: 783-791.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP- Phylogeny Inference Package.
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>, Stand: 20.02.2010.
- Gandini, G. C. und Villa, E. (2003). "Analysis of the cultural value of local livestock breeds: a methodology". *Journal of Animal Breeding and Genetics* **120**: 1-11.
- Glowatzki-Mullis, M. L., Muntwyler, J., Pfister, W., Marti, E., Rieder, S., Poncet, P. A. und Gaillard, C. (2006). "Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-Montagnes breed". *Animal Genetics* **37**: 33-39.
- Goudet, J. (1995). "FSTAT: A Computer Program to Calculate F-Statistics". *Journal of Heredity* **86**: 485-486.
- Hartl, D.L. und Clark, A.G. (2007): "Principles of Population Genetics". 4. Edition.
- Hoda, A., Dobi, P. und Hyka, G. (2009): "Genetic diversity and distances of Albanian local sheep breeds using microsatellite markers". *Livestock Research for Rural Development* 21, Artikel # 93, <http://www.lrrd.org/lrrd21/6/hoda21093.htm>, Stand: 20.02.2010.
- Hoffmann, I., Marsan, P.A., Barker, J.S., Cothran, E.G., Hanotte, O., Lenstra, J.A., Milan, D., Weigend, S. und Simianer, H. (2004). "New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group". <http://dad.fao.org/cgi-bin/getblob.cgi?sid=cec2fed27316f19fae63ff78d540ba54,50005882>, Stand: 20.02.2010.
- Ivanković, A., Dovč, P., Kavari, T., Caput, P., Mioč, B., Pavić, V., Štuhec, V. und Leto, J. (2005). "Genetic characterisation of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data". *Small Ruminant Research* **57**, 167-174.

- Kalinowski, S. T., Taper, M. L. und Marshall, T. C. (2007). "Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment." *Molecular Ecology* **16**: 1099-2006.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. und Pemberton, J. M. (1998). "Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations". *Molecular Ecology* **7**, 639-655.
- Montgomery, G. W. und Sise, J. A. (1990). "Extraction of DNA from sheep white blood cells." *New Zealand Agricultural Research* **33**: 437-441.
- Nei, M. (1972). "Genetic distance between populations". *The American Naturalist* **106**, 283-292.
- Nei, M. (1978). "Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals." *Genetics* **89**: 583-590.
- Nei, M., Tajima, F. und Tateno, Y. (1983). "Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data". *Journal of Molecular Evolution* **19**:153-170.
- Oldenbroek, J. K. (1999). "Introduction" In: "Genebanks and the Conservation of Farm Animal Genetic Resources". J. K. Oldenbroek. Lelystad, Niederlande, Institute for Animal Science and Health: 1-9.
- Paetkau D., Clavert, W, Stirling, I. und Strobeck, C. (1995). "Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears". *Molecular Ecology* **4**: 347-354.
- Page, R. D. M. (1996). "TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers". *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- Peter, C. (2005). "Molekulargenetische Charakterisierung von Schafrassen Europas und des Nahen Ostens auf der Basis von Mikrosatelliten". Dissertation. Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, JLU Gießen.
- Peter, C., Bruford, M., Perez, T., Dalamitra, S., Hewitt und G., Erhardt, G. (2007): "Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds". *Animal Genetics* **38**, 37-44.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L. und Estoup, A. (2004). "GeneClass 2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection". *Journal of Heredity* **95**: 536-539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. und Donnelly, P. (2000). "Inference of population structure using multilocus genotype data". *Genetics* **155**: 945-959.
- Rannala, B. und Mountain, J. L. (1997). "Detecting immigration by using multilocus genotypes". *Proceedings of the National Academy of Science, USA* **94**: 9197-9221.
- Reynolds, J., Weir, B. S. und Cockerham, C. C. (1983). "Estimation of the Coancestry Coefficient: Basis for a Short-Term Genetic Distance". *Genetics* **105**: 767-779.
- Rosenberg, N. A. (2004). "Distruct: a program for the graphical display of population structure". *Molecular Ecology Notes* **4**: 137-138.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning- a laboratory manual". New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, T.A. und Wrede, J. (2002): "OPTI-MATE". Programmbeschreibung.
- Steger, G. (1994). "Bemerkungen zum Phänomen Haustier Schaf". *Tiergarten aktuell* **10** (Sonderheft).
- Weimann, C. (2000). "Entwicklung von DNA-Markern an den Inhibin-/ Aktivin-Genorten bei Schaf, Rind und Ziege". Dissertation. Institut für Tierzucht und Haustiergenetik, JLU Gießen.
- Weir, B. S. und Cockerham, C. (1984). "Estimating F-Statistics for the analysis of population structure". *Evolution* **38**: 1358-1369.
- Yeh, C. Y., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z. H. und Moad, J. (1997). "POPGENE 1.32 - The user-friendly freeware for population genetic analysis". <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>, Stand: 20.02.2010.

11. Kurzfassung

Genetische Charakterisierung der gefährdeten Schafrasse Rouge du Roussillon und Erstellung eines Erhaltungszuchtprogramms

K. Hils, H. Wagner, T. Fixemer, H.R. Brandt, G. Erhardt

Einführung:

Es wurden 302 Tiere der gefährdeten Schafrasse Rouge du Roussillon (RdR), sowie der Referenzrasse Coburger Fuchsschaf genetisch charakterisiert. Die Rasse stammt aus Frankreich und wird seit 1981 auch in Deutschland gezüchtet. In Frankreich existieren zwei Subtypen, die seit 1993 separat gezüchtet werden und hier als alter und neuer französischer Typ bezeichnet werden.

Methode:

Die Tiere wurden mit 15 Mikrosatellitenmarkern typisiert, verschiedene phänotypische Merkmale erhoben und Pedigreedaten ausgewertet.

Die Populationsstruktur der Rasse wurde analysiert und zusätzlich 57 weitere Schafrassen einbezogen um die Rasse in einen europäischen Kontext einzuordnen. Regenerative Zellen der Tiere wurden als Kryoreserve konserviert, eine Rassebeschreibung und ein Erhaltungszuchtplan erstellt.

Ergebnisse:

Die phäno- und genotypischen Daten zeigen deutliche Unterschiede zwischen den drei Subtypen der Rasse. In der deutschen Population konnten verschiedene Parameter erhoben werden, die auf eine geringe genetische Variabilität innerhalb der Population hinweisen. Beim neuen französischen Typ wurden Hinweise für eine Einkreuzung gefunden. Im europäischen Kontext ist Rasse deutlich von den anderen europäischen Rassen abgegrenzt.

Zusammenfassung:

Es wurde eine hohe genetische Nähe der deutschen Population zum alten französischen Typ festgestellt. Beide sollten in einem gemeinsamen Zuchtprogramm erhalten werden. Aufgrund der Hinweise, dass im neuen französischen Typ Einkreuzungen stattgefunden haben, sollten die beiden französischen Typen getrennt weitergezüchtet werden, um eine Reinzucht des alten Typs zu ermöglichen. Eine offizielle Anerkennung des alten französischen Typs wird empfohlen. Bei der Einordnung in einen europäischen Kontext zeigt sich, dass es sich beim RdR um eine eigenständige Rasse handelt, die genetisch einzigartig ist.

Danksagung:

Diese Studie wurde durch Mittel des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, des Tiergartens Nürnberg, des Vereins der Tiergartenfreunde Nürnberg, Greenpeace, der GEH e.V. und der GENUVI e.V. ermöglicht.

12. Englische Kurzfassung

Genetic differentiation of three subtypes of the endangered sheep breed Rouge du Roussillon in Germany and France and development of a conservation breeding program

K. Hils, H. Wagner, T. Fixemer, H.R. Brandt, G. Erhardt

Introduction:

302 animals of the highly endangered sheep breed Rouge du Roussillon (RdR) and the reference breed Coburger Fuchsschaf were analysed with 15 microsatellite markers. The breed originates in Southern France and since 1981 there exists a breeding population of about 80 animals in Germany. In France there are 2 subtypes of the breed, which differ phenotypically and genetically and are to be called the Old French Type (about 150 animals) and the New French Type (circa 3500 animals) in this study. The German population originates from the same herd as the Old French type but the populations have been separated for 30 years now. In Germany it was bred pure blood over this period of time. The breeding program for the New French Type was implemented 17 years ago with the focus set on a high meat performance. The Old French Type should be considered as a distinct endangered breed in the FAO classification.

Methods:

Genetic variation and population structure was investigated with a set of 15 microsatellites. Genetic distances, phylogenetic trees, the number of alleles, allele frequencies, heterozygosity, deviations from the Hardy-Weinberg-equilibrium, F-statistics after Nei (1972) and Weir and Cockerham (1984), and Nei's G_{ST} (1973) have been estimated with diverse computer programs. Phenotypic data and pedigree information was collected and analysed. Furthermore the breed was set into context with 57 sheep breeds from Europe and the Middle East examined in another project (ECONOGENE). For this purpose a Principle Component Analysis and a Bayesian Model-based Clustering analysis were performed and individuals were assigned to populations. From the collected data a conservation breeding program was developed and implemented, and a breed description has been developed. Regenerative cells of the animals have been cryo-conserved.

Results:

The phenotypic and genetic data showed the subdivision of the breed in 3 subtypes. The German population showed considerable signs of inbreeding in different parameters. The Old French type and the German population revealed a low genetic distance to each other. The New French type revealed indications of crossbreeding with other breeds. In the European context the Rouge du Roussillon was clearly differentiated from the other European breeds. The analysis of the pedigree data showed an inbreeding coefficient (F) of 4,32 and an effective population size (N_e) of 37,33.

Conclusion:

There are three phenotypical and genotypically separated subtypes of the breed in Germany and France. A low genetic differentiation between the German population and the Old French type suggests that these populations should be conserved as a combined population and included in a conjoint conservation breeding program. Since crossbreeding seems to have appeared in the New French type, it should be bred separately from the Old French type to assure the pure bred breeding of the Old French type. We recommend that an FAO status of endangered sheep breed be given to the Old French Type and measures for its protection to be taken.

As a major goal of the breeding program a decrease of the inbreeding coefficient and an increase of the effective population size should be constituted.

The distinct separation of the breed from the other European breeds indicates that the Rouge du Rousillon sheep is a discreet breed with evident genetic potential, and therefore the effort for its conservation should be continued and even intensified.

Acknowledgement:

The study was financially supported by the Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Germany; Tiergarten Nürnberg; Verein der Tiergartenfreunde Nürnberg; Greenpeace; the Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V. and the Gesellschaft für Internationale Nutztierassen-Vielfalt in Deutschland e.V.

References:

- Nei, M. (1972). "Genetic distance between populations". *The American Naturalist* **106**: 283-292.
- Nei, M. (1973). "Analysis of gene diversity in subdivided populations". *Proceedings of the National Academy of Sciences* **70**: 3321-3323.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. (1984). "Estimating F-Statistics for the analysis of population structure". *Evolution* **38**: 1358-1369.

13. Anhang

13.1. Rassebeschreibung Rouge du Roussillon- Schaf

Rassetypische Merkmale

Das Rouge du Roussillon ist ein mittelgroßes Schaf, das ursprünglich aus den französischen Pyrenäen stammt. Aufgrund der rassetypischen rötlichen Färbung an Kopf und Gliedmaßen wird es zur Gruppe der Fuchsschafe gerechnet. Die Lämmer werden komplett rötlich gefärbt geboren und ab einem Alter von ca. 4-6 Monaten entwickelt sich gelblich-weißes Vlies an Hals, Brust, Rumpf und Schwanz. Die rötliche Färbung an Kopf und Gliedmaßen wird im Alter heller. Weiße Abzeichen an den gefärbten Körperteilen können auftreten. Die Tiere sind an Kopf und Gliedmaßen nicht bewollt, gelegentlich gibt es Tiere mit Schuppenbildung. Der Bauch ist meist unbewollt. Das Vlies ist dicht geschlossen und homogen. Es handelt sich um eine feine Schlichtwolle mit gelegentlichen dunkel gefärbten Haarresten. Die Wolle weist eine deutliche Kräuselung auf.

Das Rouge du Roussillon- Schaf hat einen kurzen, schmalen, keilförmigen bis leicht ramsnasigen Kopf, welcher hornlos ist. Gelegentlich können Hornansätze vorkommen. Rassetypisch sind die ausgeprägten Hautfalten auf der Nase. Das Schaf besitzt große, teilweise bewimperte Augen mit voluminös entwickelten Tränendrüsen. Die Ohren sind an einer breiten Basis aufgehängt. Die Öffnungen der Ohren weisen nach unten und die Spitzen nach vorn. Die Ohren sind 11 – 16 cm lang.

Der Brustkorb ist relativ eng mit einem guten Anschluss an Hals und Rücken. Der Hals ist mittellang, oft mit einem oder zwei Glöckchen versehen und teilweise zeigen die Tiere eine Wamme. Der Rücken weist eine gerade Rückenlinie auf und endet in einer leicht abschüssigen Kruppe. Das Becken ist breit und aufrecht. Oft zeigen die Tiere lange Gliedmaßen, die als Anpassung an die landschaftliche Struktur im Vorgebirge einzuordnen sind. Die Keulen sind mäßig bemuskelt und die Gelenke korrekt gewinkelt und fest. Der Schwanz beginnt in einer breiten Basis mit deutlicher Hautfalte und läuft trichterförmig dünner werdend zu. Er ist lang (30 - 50 cm) und bewollt. Bei den weiblichen Tieren ist das Euter fest und relativ schmal aufgehängt. Die Klauen sind meist pigmentiert und weisen ein hartes Horn auf. Die Tiere zeigen ein gutes Adaptionsvermögen an extreme Temperaturschwankungen im Bereich des mitteleuropäischen Gebirgsklimas. Auch bei kargem Futterangebot werden gute Zunahmen verzeichnet. Sie zeigen gute Marsch- und Muttereigenschaften und sind ruhig und umgänglich im Verhalten.

Ausschlußkriterien:

- größere schwarze Abzeichen
- ausgebildete Hörner
- dichte Bewollung am Bauch

Unerwünschte Merkmale:

- geschecktes Vlies
- zu kurze Beine im Verhältnis zum Körper

Leistungsmerkmale:

- Fruchtbarkeit: ca. 120%, erste Lammung mit ca.12 Monaten, asaisonal
- Mastleistung: keine aktuellen Daten
- Wolleistung: im Mittel Schurgewichte von 3200 g bei weiblichen und 3800 g bei männlichen Tieren, feine Wolle mit deutliche Kräuselung und gelegentlichen dunklen Haarresten

Körpergewichte:

- Altböcke 60 - 80 kg
- Mutterschafe 40 - 60 kg
- Geburtsgewichte: 4 - 5,5 kg

Größe:

- Böcke: 50 - 75cm
- Mutterschafe: 45 - 70 cm

13.2. Tabelle A:

Tabelle A: Nei's „unbiased measure“ für genetische Identität (I) (über Diagonale) und genetische Standarddistanz (D_A) (unter Diagonale)(Nei, 1972) bei Einbeziehungen zweier zusätzlich untersuchter Rassen

	CF	LV	MOU	RdR-AF	RdR-D	RdR-NF
CF	****	0,7939	0,769	0,6904	0,6372	0,8101
LV	0,2308	****	0,7977	0,7474	0,688	0,8788
MOU	0,2626	0,2261	****	0,8188	0,7504	0,8486
RdR-AF	0,3705	0,2912	0,1999	****	0,8499	0,8255
RdR-D	0,4507	0,374	0,2871	0,1626	****	0,7546
RdR-NF	0,2106	0,1291	0,1642	0,1917	0,2816	****

CF = Coburger Fuchsschaf, LV = Lacaune viande, MOU = Mourerous, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

13.3. Abbildungen A-E:

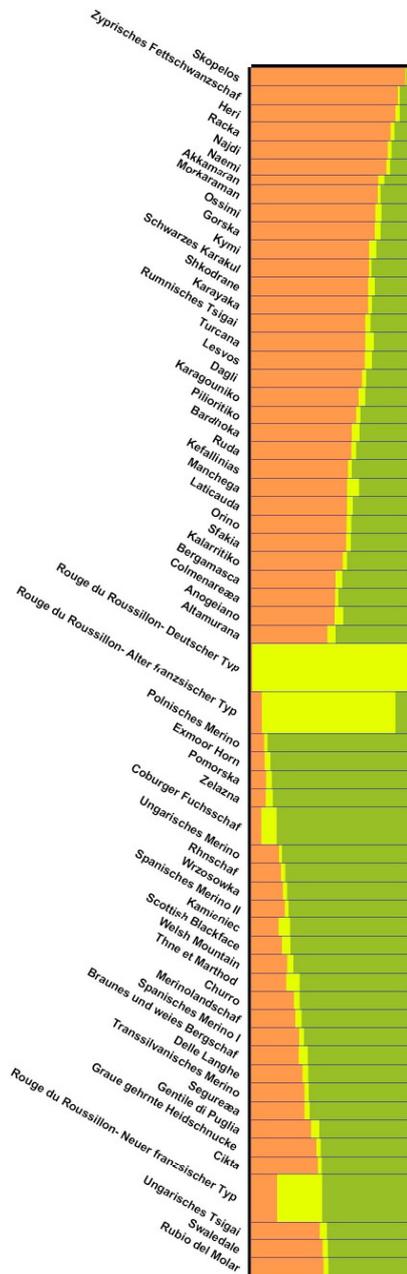


Abbildung A: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=3$ Populationen am Beispiel eines Laufes für die in dieser Studie untersuchten Rassen sowie 57 Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt. Die Rassen wurden nach der Größe ihres Subpopulationsanteils sortiert. Die Breite der Spalten spiegelt die Anzahl der beprobten Tiere wieder.

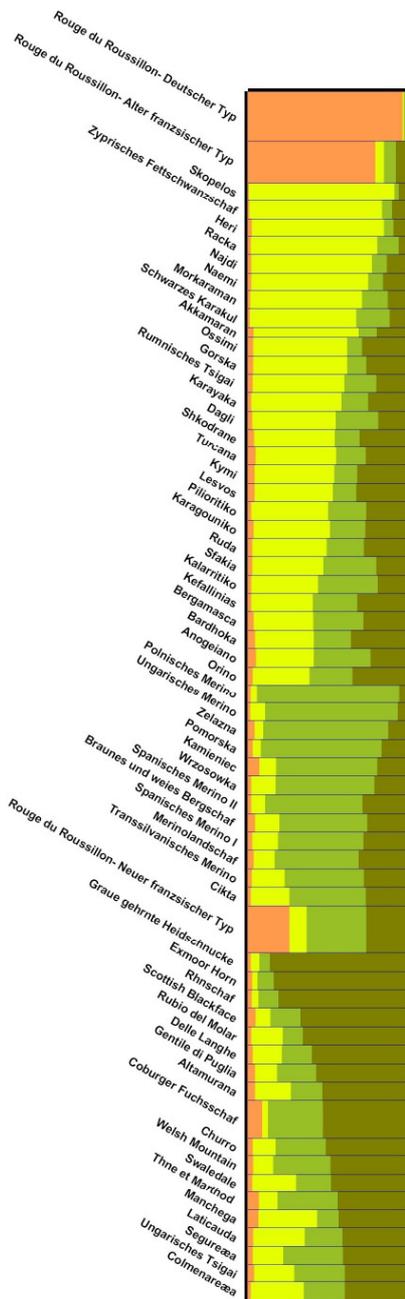


Abbildung B: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=4$ Populationen am Beispiel eines Laufes für die in dieser Studie untersuchten Rassen sowie 57 Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt. Die Rassen wurden nach der Größe ihres Subpopulationsanteils sortiert. Die Breite der Spalten spiegelt die Anzahl der beprobten Tiere wieder.

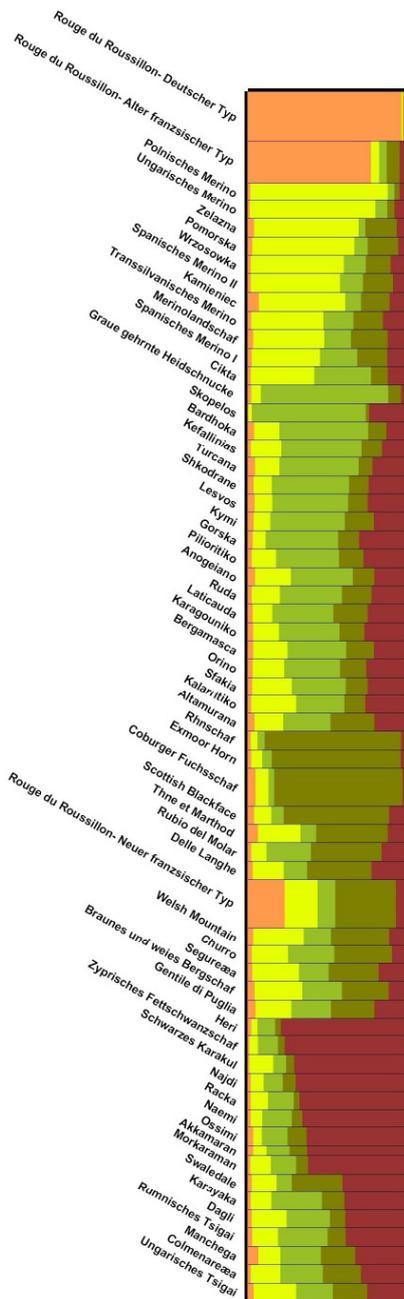


Abbildung C: Graphische Darstellung der jeweiligen Subpopulationsanteile bei Annahme von $k=5$ Populationen am Beispiel eines Laufes für die in dieser Studie untersuchten Rassen sowie 57 Rassen aus dem ECONOGENE-Projekt. Die Rassen wurden nach der Größe ihres Subpopulationsanteils sortiert. Die Breite der Spalten spiegelt die Anzahl der beprobten Tiere wieder.

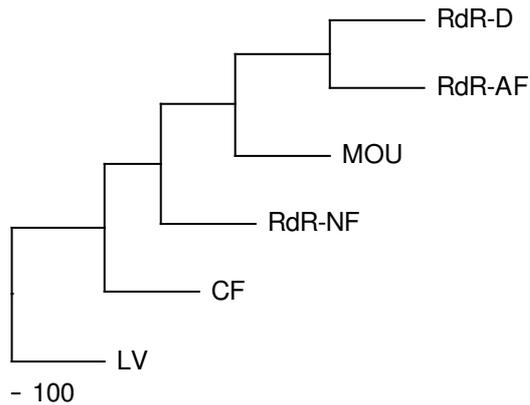


Abbildung D: Ungewurzelter Neighbor-Joining-Baum rekonstruiert mit Reynolds genetischer Distanz D_{REY} (1983) auf der Basis von 15 Mikrosatelliten bei Einbeziehungen zweier zusätzlich untersuchter Rassen.

Abkürzungen: CF = Coburger Fuchsschaf, LV = Lacaune viande, MOU = Mourerous, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ

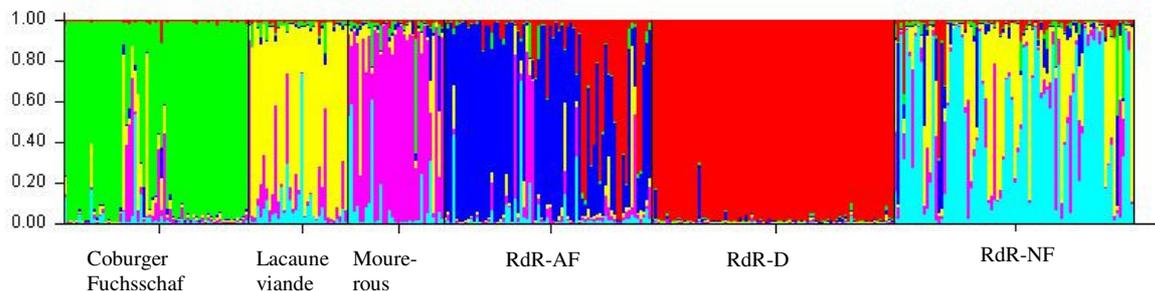


Abbildung E: Barplot bei Annahme von $k=6$ Populationen bei Einbeziehungen zweier zusätzlich untersuchter Rassen.

Abkürzungen: CF = Coburger Fuchsschaf, LV = Lacaune viande, MOU = Mourerous, RdR-AF = Rouge du Roussillon alter französischer Typ, RdR-D = Rouge du Roussillon deutsche Population, RdR-NF = Rouge du Roussillon neuer französischer Typ