

Institut für Tierzucht
Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
Prof.-Dürrwaechter-Platz 1,
85586 Poing

und

Institut für Tierzucht
Lehrstuhl für Tierzucht und
Allgemeine Landwirtschaftslehre
Ludwig-Maximilians-Universität München
Veterinärstr. 13
80539 München

***Modellhafte Entwicklung und Erprobung eines neuen
Zuchtprogramms für die Rasse Murnau-Werdenfelser
auf der Grundlage molekulargenetischer Charakterisierung***
(MuD Projekt 05BM015)

Abschlussbericht

im Auftrag der
Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

Berichtszeitraum: 01.06.2006 – 29.02.2008

Bearbeiter: LD Bernhard Luntz und Dr. Ivica Medugorac

Zusammenarbeit:

- LD Dr. H.-D. Link , Weilheimer Zuchtverbände e. V., Weilheim,
- Dipl. Ing. H. Zuchriegel, Zweckverband II für künstliche Besamung der Haustiere, Greifenberg,
- Dipl. Ing. O. Hausegger, Tiroler Grauviehzuchtverband, Innsbruck, Österreich
- Dipl. Ing. F. Pirker, Verein der Murbodnerzüchter, Rinderzucht Steiermark, Leoben, Österreich,
- Dr. P. Taberlet; Université Joseph Fourier, Grenoble, Frankreich

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	4
2. Material und Methoden	4
2.1 Tiere und Marker	4
2.1.1 Stichproben	4
2.1.2 Gewebeproben und DNA	6
2.1.3 Molekulargenetische Marker	7
2.1.4 Gelelektrophoretische Typisierung fluoreszenzmarkierter Mikrosatelliten	8
2.1.5 Plausibilitätskontrolle der Genotypen	9
2.2 Biometrische und statistische Methoden	9
2.2.1 Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb der Rassen	9
2.2.2 Schätzung des genetischen Flusses (Migration) zwischen den Rassen	9
2.2.3 Schätzung der genetischen Variabilität zwischen der Rassen	10
2.2.4 Bestimmung der individuellen Distanz	10
2.2.5 Grafische Darstellung der genetischen Verwandtschaften	10
2.2.5.1 Clusteranalysen und eindimensionale Darstellungen (1-DD) der genetischen Distanzen	10
2.2.5.2 Zweidimensionale Darstellung (2-DD) der genetischen Distanzen	11
2.2.6 Genetische Struktur-Analyse	12
2.2.7 Rassenzuordnung- und Immigrant-Test von allen untersuchten Rindern	12
2.2.8 Additivgenetische Verwandtschaft und Inzuchtkoeffizient der untersuchten Murnau-Werdenfelser Tiere	12
3 Ergebnisse	
3.1 Tiere, Gewebeproben und DNA	13
3.2 Molekulargenetische Marker	14
3.3 Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb der Rassen	15
3.4 Schätzung des genetischen Flusses (Migration) zwischen den Rassen	16
3.5 Schätzung der genetischen Distanzen zwischen Teilpopulationen	19
3.6 Bestimmung der individuellen Allel-Sharing Distanzen als Maßstab für die genetische Variabilität innerhalb und zwischen Teilpopulationen	19
3.7 Graphische Darstellung der genetischen Verwandtschaften	20

3.8	Zweidimensionale Darstellung der individuellen Distanzen	23
3.9	Rassenzuordnungs- bzw. Immigranten-Test	26
3.10	Genetische Strukturanalyse	27
3.11	Additivgenetische Verwandtschaft und Inzuchtkoeffizient	29
3.12	Vorschläge für ein überdachtes Zuchtprogramm	29
3.12.1	Mögliche Zusammenarbeit zwischen Teilpopulationen	29
3.12.2	Mögliche Erweiterung der Zuchtpopulation bei Murnau-Werdenfelser	30
3.12.3	Neugestaltung der gezielten Paarung	31
3.12.4	Wirtschaftliche Aspekte der Rassehaltung	32
3.13	Abschließende Bewertung	33
3.14	Kurzfassung der Ergebnisse	34
3.15	Abstract	35
4.	Literaturverzeichnis	36

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Ziel dieses Projektes ist es, die Verwandtschaft zwischen der Rasse Murnau-Werdenfelser und anderen phänotypisch ähnlichen Rassen zu untersuchen, um anschließend modellhaft einen Vorschlag des rasseübergreifenden Zuchtprogramms für verwandte Populationen zu entwickeln, wodurch die Problematik des geringen Populationsumfanges mit ansteigenden Inzuchtgraden bei den einzelnen verwandten Rassen entschärft werden kann, ohne den Verlust wertvoller Gene in Kauf nehmen zu müssen. Die objektive Beurteilung der genetischen Diversität ist nur im Rahmen einer Vergleichsstudie möglich. In einer solchen Studie sind die Nachbarpopulationen wegen des genetischen Flusses sowie einige geografisch und genetisch „entfernte“ Rassen als Ankerpunkte wichtig. Diese Rassen sollen auf möglichst gleiche selektionsneutrale und standardisierbare genetische Marker (Mikrosatelliten) untersucht werden.

Im zweiten Projektteil dieses Vorhabens soll anhand der phylogenetischen Ergebnisse ein wirksames Zuchtprogramm zur Erhaltung der Rasse Murnau-Werdenfelser vorgeschlagen werden. Dabei wird untersucht, mit welchen ggf. nahe verwandten Populationen zusammengearbeitet werden kann, um Inzuchtdepressionen zu vermeiden. Darüber hinaus soll modellhaft geprüft werden, verwandte Rassen ggf. länderübergreifend in einem Genpool zusammenzufassen und hierfür ein gemeinsames Zuchtprogramm zu erarbeiten.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Marker

2.1.1 Stichproben

Alle hier untersuchten Proben wurden aus Eigenmitteln vom Antragsteller, wissenschaftlicher Betreuer und den Kooperationspartnern gesammelt und zur molekulargenetischen Analysen kostenfrei zur Verfügung gestellt. In Tabelle 1 sind Angaben über die für dieses Projekt gesammelten Proben zusammengefasst. Für jede hier untersuchte Rasse (Tabelle 1 und Tabelle 2) wurde eine repräsentative Stichprobe gesammelt, d.h. es wurden Maßnahmen getroffen um möglichst unverwandte Tiere zu beproben. Für einzelne Rassen wurden mehr Proben

gesammelt als untersucht (s. Tabelle 1 und Tabelle 2). Dabei wurde auf die Untersuchung einiger verwandter Tiere verzichtet.

Tabelle 1: Für dieses Projekt gesammelte Proben: Rinderrasse, Abkürzung (Abk.), Anzahl der gesammelten (nS) und untersuchten (nU) Tiere sowie Ursprung der Stichprobe.

Rasse	Abk.	nS	nU	Gesammelt und kostenfrei zur Verfügung gestellt von
Murnau-Werdenfelsern	MWF	67	53	Herr E. Rosenberger (LfL) und Dr. H-D Link, Amt für Landwirtschaft und Forsten, Weilheim
Tiroler Grauvieh	TGV	48	48	Ing. O. Hausegger, Tiroler Grauviehzuchtverband, Innsbruck, Österreich
Murbodnern	AMB	64	48	Dr. F. Fischerleitner, Institut für Biologische Landwirtschaft und Nutztierbiodiversität, Thalheim, Österreich
Braunvieh alter Zuchtrichtung	OBV	50	48	Dr. W. Kustermann, Institut für Tierzucht, TUM München, Dr. I. Medugorac, Institut für Tierzucht, LMU München und Bayerische Genreserve, LfL, Grub
Tarentaise	TAR	43	43	Dr. Pierre Taberlet; Université Joseph Fourier, Grenoble, Frankreich.

In Tabelle 2 sind neun weitere hier analysierte Vergleichsrassen dargestellt. Die Proben für diese Rassen wurden außerhalb dieses Projekts gesammelt und großteils auch genotypisiert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den molekulargenetischen Ergebnissen dieses Projekts (Tabelle 1) und den Ergebnissen aus vorherigen bzw. laufenden Projekten (Tabelle 2) zu erzielen wurde hier eine Standardisierung der Genotypen durch externe Standards (Standardproben aus dem EU-Projekt RESGEN) durchgeführt. Es wurden ebenfalls einzelne Stichproben mit zusätzlichen Tieren ergänzt und/oder mit zusätzlichen Marker genotypisiert. Die hier ausgewählten Vergleichsrassen sind zum Teil räumlich weit entfernt (von Anatolien bis Norddeutschland) und stehen unter einem unterschiedlichen Selektionsdruck. Die Vergleichsrassen aus Anatolien (ASV) und dem Balkan (ILR, ATR, MBU, NRV und BGV) unterliegen keiner organisierten Selektion (kein Zuchtprogramm), die

Vergleichsrassen aus den Alpen- und Voralpengebieten (FGV und DFV) sind typische Doppelnutzungsrinderrassen (Milch, Fleisch) und Rotbunte bzw. Red-Holstein (RH) repräsentieren auf hohe Milchleistung selektierte Rassen. Diese Rassen dienen als ein externer Standard zur Messung der genetischen Variabilität innerhalb und zwischen den beantragten Rinderrassen.

Tabelle 2: Vergleichsrassen: Name der Rasse, Abkürzung (Abk.), Anzahl der gesammelten (nS) und untersuchten (nU) Tiere sowie Ursprung der Stichprobe.

Rasse	Abk.	nS	nU	Gesammelt und kostenfrei zur Verfügung gestellt von
Anatolisches Schwarzvieh	ASV	50	49	Dr. A. Medugorac, Institut für Tierzucht, TUM München
Ilirisches Rind	ILR	45	45	DVM. H. Mix Henry Mix, Naturschutz. International e.V., Berlin
Albanisches Tiefelandrind	ATR	30	30	DVM. H. Mix Henry Mix, Naturschutz. International e.V., Berlin
Mazedonische Busa	MBU	77	35	Dr. I. Medugorac, Institut für Tierzucht, LMU München
Metochisches Rotvieh	MRV	189	45	Dr. I. Medugorac, Institut für Tierzucht, LMU München
Bosnisches Grauvieh	BGV	180	44	Dr. I. Medugorac, Institut für Tierzucht LMU München
Gelbvieh	FGV	66	48	Dr. I. Medugorac, Institut für Tierzucht LMU und Bayerische Genreserve, LfL, Grub
Rotbunte (Red-Holstein)	RH	50	50	Dr. J. Dr. Potthast, Rinder-Union West eG, Münster
Deutsches Fleckvieh	DFV	75	56	Dr. I. Medugorac, Institut für Tierzucht LMU, und Bayerische Genreserve, LfL, Grub

2.1.2 Gewebeproben und DNA

Für die Gewinnung von genomischer DNA wurden für die oben genannten Stichproben verschiedene Probenarten gesammelt: Blut, Sperma, Hautgewebe,

Haarwurzeln, Leukozytenlysate, Serum und Milch. Die genomische DNA der älteren Proben wurden nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989) und bei den neueren Proben mit dem QIAamp Blood -Kit (Qiagen) präpariert.

2.1.3 Molekulargenetische Marker

Die objektive Beurteilung der genetischen Diversität sollte auf möglichst selektionsneutralen und standardisierbaren genetischen Markern abgewickelt werden. Hier wurden die Mikrosatelliten als dafür geeignete Markern ausgewählt. Basierend auf dem FAO Panel und von diversen Arbeitsgruppen genutzten Markern für die bovine Diversität wurde in Utrecht (Niederlanden 1996) eine Liste von 30 Mikrosatellitenmarker zusammengestellt und für weitere Analysen der bovinen Diversität vorgeschlagen (<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>). Diese sog. Utrecht-Liste diente als Ausgangsbasis für den hier genutzten Markersatz. Alle Markerprimer wurden erneut anhand neuester Rindergenomdaten optimiert und in eigens entworfenen Markersätzen kombiniert. Da sich einige Marker der Utrecht-Liste schlecht miteinander, aber gut mit Markern die sich nicht auf dieser Liste befinden kombinieren lassen, wurden drei Markersätze zusammengestellt. Wie in Tabelle 3 gezeigt, beinhalten diese drei Markersätze alle 30 Marker von der Utrecht-Liste sowie 16 weitere Marker, die diese Liste ergänzen. Alle Tiere aus den Tabellen 1 und 2 wurden anhand der 46 Marker aus Tabelle 3 genotypisiert. Die meisten Rassen aus Tabelle 2 wurden vor diesem Projekt für 27 Marker genotypisiert. Hier wurden diese Genotypen standardisiert und weitere Marker bzw. Tiere ergänzend genotypisiert.

Tabelle 3: Liste der untersuchten Marker mit Angaben über Markername, Chromosom (BTA), relative Position auf dem Chromosom, Auswahlbegründung und Zuordnung zum Markersatz.

Nr	Marker	BTA	Rel. Pos.	Markerliste	Markersatz
1	CSSM19	01	122,094	Ergänzung	BoBiDi02
2	BM1824	01	122,391	Utrecht-Liste	BoBiDi01
3	ILSTS030	02	38,901	Ergänzung	BoBiDi01
4	BM2113	02	115,437	Utrecht-Liste	BoBiDi01
5	INRA023	03	65,000	Utrecht-Liste	BoBiDi01
6	RM067	04	51,928	Ergänzung	BoBiDi03
7	ETH10	05	71,764	Utrecht-Liste	BoBiDi02
8	ETH152	05	121,749	Utrecht-Liste	BoBiDi01

9	BM143	06	53,724	Ergänzung	BoBiDi03
10	BM2320	06	127,264	Ergänzung	BoBiDi03
11	ILSTS006	07	116,629	Utrecht-Liste	BoBiDi01
12	HEL9	08	84,844	Utrecht-Liste	BoBiDi02
13	ETH225	09	12,754	Utrecht-Liste	BoBiDi02
14	MM12	09	84,258	Utrecht-Liste	BoBiDi02
15	CSRM60	10	77,816	Utrecht-Liste	BoBiDi01
16	INRA037	10	79,007	Utrecht-Liste	BoBiDi01
17	ILSTS005	10	107,964	Utrecht-Liste	BoBiDi02
18	INRA032	11	68,679	Utrecht-Liste	BoBiDi03
19	HEL13	11	122,370	Utrecht-Liste	BoBiDi02
20	INRA005	12	86,853	Utrecht-Liste	BoBiDi01
21	RM327	13	73,638	Ergänzung	BoBiDi03
22	AGLA232	13	91,379	Ergänzung	BoBiDi03
23	CSSM66	14	5,125	Utrecht-Liste	BoBiDi01
24	ILSTS011	14	25,708	Ergänzung	BoBiDi01
25	NCAM	15	22,088	Ergänzung	BoBiDi02
26	HEL1	15	37,962	Utrecht-Liste	BoBiDi01
27	TGLA53	16	38,547	Utrecht-Liste	BoBiDi03
28	INRA035	16	89,000	Utrecht-Liste	BoBiDi02
29	ETH185	17	54,709	Utrecht-Liste	BoBiDi02
30	INRA063	18	47,953	Utrecht-Liste	BoBiDi01
31	TGLA227	18	84,087	Utrecht-Liste	BoBiDi03
32	ETH3	19	90,043	Utrecht-Liste	BoBiDi01
33	TGLA126	20	31,866	Utrecht-Liste	BoBiDi01
34	HEL5	21	13,520	Utrecht-Liste	BoBiDi02
35	TGLA122	21	62,685	Utrecht-Liste	BoBiDi03
36	ILSTS054	21	65,845	Ergänzung	BoBiDi02
37	HAUT24	22	66,102	Utrecht-Liste	BoBiDi02
38	BM1818	23	58,195	Utrecht-Liste	BoBiDi02
39	BM7151	24	8,152	Ergänzung	BoBiDi03
40	DIK2706	24	68,466	Ergänzung	BoBiDi03
41	ILSTS102	25	7,199	Ergänzung	BoBiDi03
42	AF5	25	61,669	Ergänzung	BoBiDi03
43	HAUT27	26	35,189	Utrecht-Liste	BoBiDi02
44	BM3507	27	0,000	Ergänzung	BoBiDi03
45	CSSM36	27	43,002	Ergänzung	BoBiDi03
46	IDVGA43	28	34,999	Ergänzung	BoBiDi03

2.1.4 Gelelektrophoretische Typisierung fluoreszenzmarkierter Mikrosatelliten

Für die Genotypisierung der PCR-Produkte von genomischer DNA wurden der Kapillarsequenzierer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer sowie der Gelsequenzierer ABI PRISM 377 Genetic Analyzer von PE Applied Biosystems verwendet. Die Größe der Fragmente wurde über einen internen, Tamra markierten Standard mit definierten Fragmentlängen bestimmt. Die Proben wurden nach

Anleitung des Herstellers zur Elektrophorese vorbereitet und verdünnt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software GeneScan, die Bestimmung der Allele mit der Software GenoTyper.

2.1.5 Plausibilitätskontrolle der Genotypen

Mit der Software GenoTyper festgelegte Genotypen wurden in eine Datenbank importiert. Da es sich hier um unverwandte Tiere handelt, wird die Genotypenqualität nur durch die Wiederholbarkeit festgestellt. Daher wurden alle hier verwendete Genotypen durch eine zweifache Typisierung kontrolliert. Die hier verwendeten Datenbank Anwendungen kontrollieren alle neuimportierten Genotypen auf Wiederholungskonflikte. Die Rohdaten der fraglichen Genotypen wurden erneut kontrolliert und die entsprechenden Tiere bei Bedarf wiederholt genotypisiert.

2.2 Biometrische und statistische Methoden

2.2.1 Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb der Rassen

Die Allelfrequenzen wurden durch direktes Auszählen ermittelt. Ob sich die Genotypenfrequenzen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) befinden wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests und des direkten Fisher Test (Programm GenePop) geprüft. Die Allelfrequenzen sowie die Anzahl der Allele je Marker wurden über alle Teilpopulationen und auch innerhalb der Population ermittelt. Die Variabilität innerhalb von Populationen wurde mit Hilfe des Heterozygotiegrades (h) nach dem Infinitiv-Allel-Modell berechnet. Es wurde sowohl der erwartete (h_e) als auch der beobachtete (h_o) Heterozygotiegrad geschätzt (Nei 1987).

2.2.2 Schätzung des genetischen Flusses (Migration) zwischen den Rassen

Die effektive Migrationsrate (Nm) zwischen Teilpopulationen wurde mittels F_{ST} - bzw. G_{ST} -Werte nach Nei (1973) sowie Slatkin und Barton (1989) geschätzt. Die F_{ST} -Werte schätzen das Verhältnis zwischen der genetischen Variabilität, erklärt durch Unterschiede zwischen Teilpopulationen gegenüber der genetischen Variabilität innerhalb Teilpopulationen. Weiterhin Markerweise geschätzte F_{ST} - Werte

geben eine Auskunft über den möglichen Selektionsdruck auf Gene die sich in unmittelbare Nachbarschaft der untersuchten Marker befinden (Slatkin 1987).

2.2.3 Schätzung der genetischen Variabilität zwischen der Rassen

Die genetischen Distanzen repräsentieren die Variabilität zwischen Populationen und zeigen das Ausmaß der genetischen Differenzierung zwischen Populationen oder Arten. Hier wurde die genetische Distanzmatrix D_A nach Nei et al. (1983) berechnet. Nei's D_A -Distanz ist für phylogenetische Studien von relativ eng verwandten Teilpopulationen geeignet. Dieses Distanzmaß wurde für das Infinitiv-Allel-Modell (IAM) entwickelt, ist aber ebenfalls für das Stepwise-Mutationsmodell (SMM) geeignet (Nei et al. 1983). Um die Stabilität der genetischen Distanzen und der daraus folgenden Gruppierungen zu überprüfen, wurde das Bootstrapping über Loci (Felsenstein 1985) verwendet.

2.2.4 Bestimmung der individuellen Distanz

Um die individuelle Distanz zwischen zwei Tiere zu berechnen, wurde eine Methode verwendet, die Bowcock et al. (1994) für humane Populationen entwickelten. Zunächst wurde der Anteil P_S der Allele bestimmt, die zwei Tiere durchschnittlich über alle Loci gemeinsam haben. Das Distanzmaß (Allele-Sharing Distanz) zwischen zwei Individuen wird dann als $D_{PS} = -\ln(P_S)$ (Bowcock *et al.* 1994) bezeichnet. Die Individuelle Distanz wurde für alle Tier-Paare berechnet und die aus diesen paarweisen Distanzen entstandene Distanzmatrix wurde in eine zweidimensionale Darstellung umgewandelt (Veit-Kensch et al., 2007).

2.2.5 Grafische Darstellung der genetischen Verwandtschaften

2.2.5.1 Clusteranalysen und eindimensionale Darstellungen (1-DD) der genetischen Distanzen

Die genetische Distanz ist das beste objektive Maß der genetischen Variabilität zwischen Rassen oder Populationen (Barker et al. 1993). Um diese Variabilität zwischen Rassen grafisch darzustellen, wurden die Distanzwerte einer

agglomerativen, hierarchischen Gruppenanalyse untergezogen. Clusteranalysen liefern als Ergebnis nicht nur eine, sondern eine ganze Hierarchie von Gruppierungen, die graphisch als Dendrogramm dargestellt werden können. Die UPGMA (Uweighted Pair Group Method Average; Sokal & Sneath 1963) und NJ-Methode (Neighbour-Joining Methode Saitou & Nei, 1987) sind die am weitesten verbreiteten agglomerativen Verfahren und wurden auch in dieser Arbeit verwendet. Die UPGMA Methode wird vor allem für ein Datenmaterial verwendet, wenn die Evolutionsrate fast gleich für alle Populationen ist (Nei 1987), während die NJ-Methode sich flexibel für die Variation der Evolutionsrate (Nei 1987) zeigt. Die beiden Methoden sind Bestandteil mehrerer Programmpakete (z.B. PHILIP, TreeView, etc.). Hier wurden die Programme TreeView (Page 1996) und TreeSplit verwendet.

Die genetische Variabilität innerhalb und zwischen 14 Rinderrassen wurde in dieser Arbeit anhand der Allelfrequenzen an 46 MS-Loci präsentiert. Das sind mehr oder weniger zufällige Loci des Rindergenoms. Es stellt sich die Frage, ob mit anderen zufälligen 46 Loci ein ähnliches phylogenetisches Ergebnis ermittelt werden kann, bzw. wie stabil die hier gewonnenen Ergebnisse sind. Antwort auf diese Frage gibt Bootstrapping über Loci (Felsenstein 1985). Dazu wurden 1000 Distanzmatrizes über Loci Resampling (Ziehen mit Zurücklegen) hergestellt. Der resultierende Konsensusbaum wurde durch das Programm CONSENSUS aus dem Programmpaket PHYLIP (Felsenstein 1993) generiert.

2.2.5.2 Zweidimensionale Darstellung (2-DD) der genetischen Distanzen

Neben der eindimensionalen (Dendrogramm) wurden hier auch zweidimensionale Darstellungen sowohl der Individuellen als auch der Rassendistanzen verwendet. Mit diesen 2-DD der genetischen Distanzmatrix wurde versucht, den Informationsverlust bei der Abbildung der Distanzenmatrix klein zu halten und eine leichtere Interpretation der Zusammenhänge zu ermöglichen. Für 2-DD der genetischen Distanzmatrix bietet sich neben anderen (Hauptkomponentenanalyse, Nonlinear mapping und Biplot) ein einfaches und effektives heuristisches Abbildungsverfahren an (Veit-Kensch et al., 2007).

Ziel dieser heuristischen Verfahren ist es, die einzelnen Beobachtungen (hier Rinderpopulationen D_A oder einzelne Tiere D_{PS}) so in der Ebene zu verteilen,

dass deren tatsächliche Struktur im mehrdimensionalen Raum möglichst gut wiedergegeben wird.

2.2.6 Genetische Struktur-Analyse

Um weitere Einblicke in die genetische Verwandtschaft zwischen den hier untersuchten Teilpopulationen zu gewinnen, wurde eine modellbasierte Clusteranalysen mit dem Programm *Structure* (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) durchgeführt. Zur Clusteranalysen nutzt das Programm *Structure* multi-loci Genotypen anstatt Distanzen. Dies ist der wesentliche Vorteil von des Programms *Structure*, da die Distanz einen Durchschnittswert über Loci und Individuen einer Teilpopulation präsentiert und somit mit relativ hohem Informationsverlust geschätzt wird. Wir haben gezeigt (Veit-Kensch et al., 2007), dass eine 2-DD von individuellen, D_{PS} , Distanzen eine bessere Interpretation der Strukturergebnisse ermöglicht. Daher werden diese Methoden auch hier parallel dargestellt.

2.2.7 Rassenzuordnung- und Immigrant-Test von allen untersuchten Rindern

Ein Rassenzuordnung- bzw. Immigrant-Test wurde mittels dem Programm *Doh* (Brzustowski 2002) durchgeführt. Das Programm *Doh* berechnet anhand Multi-Lokus Genotypen einen Zugehörigkeitsindex für jedes Individuum. Der verwendete Zugehörigkeitsindex wurde zuerst durch Paetkau et al. (1995) beschrieben. Alle Individuen, die der falschen Teilpopulation zugeordnet werden können als mögliche Immigranten betrachtet werden.

2.2.8 Additivgenetische Verwandtschaft und Inzuchtkoeffizient der untersuchten Murnau-Werdenfelser Tiere

Die additivgenetische Verwandtschaftsmatrix (**A**) wurde anhand von Abstammungsdaten nach der Methode von Henderson (1976) berechnet. Die additivgenetische Distanzmatrix wurde als $\mathbf{D}_{ADD} = \mathbf{1} - \mathbf{A}$ berechnet und mit D_{PS} verglichen. Der Inzuchtkoeffizient für einzelne Tiere (F_i) kann anhand zugehöriger Diagonalelemente der Matrix **A** berechnet werden $F_i = a_{ii} - 1$. Der Inzuchtkoeffizient wurde mit dem beobachteten Homozygotiegrad der einzelnen Tiere verglichen.

Da die additivgenetische Verwandtschaft sowie die Inzuchtkoeffizienten nur Erwartungswerte, die deutlich von realisierten Werten abweichen können, präsentieren, wird hier die Möglichkeit geprüft diese durch molekulargenetisch geschätzte Parameter zu ersetzen. Bei ausreichender Zahl der Marker wird P_S (Allele-Sharing) die realisierte Verwandtschaft zwischen einzelne Tiere wiedergeben. Vergleichsweise spiegelt der beobachtete Homozygotiegrad den tatsächlichen Inzuchtkoeffizienten wieder. Die Kenntnis der realisierten Verwandtschaft und des Inzuchtkoeffizienten würde eine Zuchtplanung und das Management von kleinen Populationen deutlich erleichtern. Deswegen werden hier beispielhafte Berechnungen für die Rinderrasse Murnau-Werdenfelser durchgeführt und nachfolgend die Vorschläge für die Zucht erarbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Tiere, Gewebeproben und DNA

Es wurden 272 Proben speziell für dieses Projekt gesammelt (Tabelle 1) und davon 240 molekulargenetisch untersucht. 32 Proben wurden gesammelt aber wegen der engen Verwandtschaft zu einer anderen einbezogenen Probe nicht untersucht. Eine Zielzahl von 48 (halbe Mikrotiterplatte) unverwandter Tiere je Teilpopulation bzw. Rasse wurde in den meisten Fällen erreicht. Für die Rinderrasse Tarentaise (TAR) erhielten wir Leukozytenlysate von 43 Tieren aus Frankreich. Für die meisten ausgewählten Proben wurde eine ausreichende DNA Menge und Qualität für dieses Projekt erreicht.

Für neun Vergleichsrassen (Tabelle 2) standen die Gewebeproben bzw. DNA aus anderen Projekten zur Verfügung. Für einige dieser Teilpopulationen standen nur etwa 30 DNA Proben und eine größere Zahl von Serumproben aus früheren Projekten zur Verfügung. Trotz beachtlicher Anstrengungen war es uns möglich nur aus einer geringen Zahl der Serumproben genomische DNA in ausreichender Menge und Qualität zu gewinnen. Somit wurden diese Teilpopulationen (MBU, MRV und BGV) mit nur 35 bis 45 Tiere repräsentiert. Für zwei wichtige Teilpopulationen aus Albanien (ATR und ILR) standen aus früheren Projekten nur 30 bzw. 45 Blutproben zur Verfügung.

Es wurden hiermit insgesamt 642 Proben aus 14 Teilpopulationen, die aus Gegenden von Anatolien bis zur Nordsee stammen, in die molekular- und phylogenetischen Analysen einbezogen.

3.2 Molekulargenetische Marker

In Tabelle 4 sind die Informationen der genetischen Variabilität, berechnet über alle untersuchten Teilpopulationen, dargestellt. Die Tabelle 4 ist nach der Anzahl der beobachteten Allele sortiert. Es wurden insgesamt 642 Tiere analysiert. Einzelne Marker wurden mit verschiedener Erfolgsquote genotypisiert. Die durchschnittliche Erfolgsquote war 97.5% (628 Tiere je Marker). In der Regel werden für phylogenetische Studien sehr informative (d.h. polymorphe) Marker ausgewählt. Hier ausgewählte Marker zeigen im Durchschnitt 12.4 Allele (4 - 26), einen erwarteten Heterozygotiegrad von 0.744 (0.371 - 0.885), einen beobachteten Heterozygotiegrad von 0.691 (0.305-0.857), einen Heterozygotiemangel von 0.054 (-0.003 - 0.240). Zwei Marker zeigen einen deutlich überdurchschnittlichen Überschuss an homozygoten Tieren: IDVGA43 (0,240) und INRA037 (0.212). Dies ist ein indirekter Hinweis auf so genannte Nullallele. Solche Marker sind für Populationsvergleiche nicht geeignet somit wurden Genotypen von IDVGA43 und INRA037 in weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Tabelle 4: Allgemeine Parameter berechnet für alle Marker über alle Teilpopulationen: Markername, Anzahl von genotypisierten Tieren (nGen), absolute Zahl der beobachtete Allel (nA), erwarteter Heterozygotiegrad (H_E), beobachteter Heterozygotiegrad (H_O) und Heterozygotiemangel (HomoExc). Die Marker sind nach nA sortiert.

Nr.	Marker	nGen	nA	H_E	H_O	HomoExc
1	IDVGA43	594	4	0,544	0,305	0,240
2	ILSTS030	638	6	0,651	0,643	0,008
3	INRA005	642	6	0,654	0,576	0,078
4	ILSTS005	629	7	0,441	0,401	0,040
5	RM067	629	8	0,781	0,733	0,048
6	HEL13	626	8	0,680	0,597	0,082
7	ILSTS011	626	8	0,609	0,589	0,020
8	BM1824	641	9	0,771	0,749	0,022
9	ETH10	626	9	0,735	0,704	0,030
10	ILSTS054	622	9	0,781	0,765	0,016
11	ETH152	631	10	0,756	0,759	-0,003
12	ETH225	621	10	0,778	0,717	0,062

13	HEL1	628	10	0,699	0,656	0,043
14	INRA063	631	10	0,648	0,650	-0,002
15	TGLA126	629	10	0,707	0,655	0,052
16	NCAM	630	11	0,635	0,570	0,065
17	INRA035	635	11	0,371	0,339	0,032
18	ETH3	618	11	0,702	0,668	0,034
19	BM1818	635	11	0,705	0,663	0,042
20	CSSM19	641	12	0,756	0,682	0,075
21	RM327	628	12	0,787	0,742	0,045
22	HEL5	624	12	0,796	0,736	0,061
23	HAUT27	621	12	0,796	0,697	0,099
24	ILSTS006	628	13	0,790	0,709	0,082
25	CSRM60	642	13	0,747	0,704	0,043
26	CSSM66	631	13	0,814	0,731	0,084
27	ILSTS102	612	13	0,816	0,775	0,042
28	CSSM36	621	13	0,775	0,758	0,016
29	BM2113	636	14	0,858	0,802	0,056
30	INRA023	635	14	0,819	0,764	0,055
31	BM143	603	14	0,796	0,740	0,056
32	BM2320	631	14	0,750	0,691	0,059
33	HEL9	633	14	0,772	0,728	0,043
34	MM12	636	15	0,797	0,777	0,020
35	TGLA227	636	15	0,873	0,857	0,016
36	HAUT24	623	15	0,797	0,754	0,042
37	DIK2706	632	15	0,837	0,835	0,002
38	AF5	639	15	0,809	0,762	0,047
39	INRA032	633	16	0,688	0,646	0,042
40	ETH185	623	16	0,792	0,743	0,049
41	BM7151	634	16	0,831	0,774	0,057
42	BM3507	635	16	0,838	0,715	0,123
43	AGLA232	632	17	0,881	0,835	0,045
44	INRA037	631	19	0,680	0,468	0,212
45	TGLA53	615	19	0,885	0,831	0,054
46	TGLA122	610	26	0,817	0,790	0,027
Durchschnitt		628,2	12,4	0,744	0,691	0,054

3.3 Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb der Rassen

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich dass zwei Populationen (ASV und MRV), die kaum eine streng organisierte künstliche Selektion erfahren haben, einen deutlich höheren Heterozygotiegrad und eine höhere Allelenzahl zeigen. Zwischen allen 14 Rassen zeigen die MWF-Rinder die kleinste durchschnittliche Anzahl der Allele (6.02). Die MWF-Rinder zeigen im Durchschnitt je Locus 4.07 Allele (40.3%) weniger als die ASV-Rinder. Natürlich ist dies nicht nur das Ergebnis der künstlichen Selektion, sondern auch das Ergebnis der Populationsstruktur und des genetischen Drift unter der Bedingung des genetischen Flaschenhals-Prinzips. Vergleichbares gilt auch für die NTG- und TAR-Populationen. Unter fünf Alpenrassen zeigen die MWF-

Rinder die kleinste Allelzahl trotz eines relativ hohen erwarteten und beobachteten Heterozygotiegrades. Populationen, die einen signifikanten genetischen Flaschenhals hinter sich haben, erfahren eine Reduktion in der Allelzahl und im Heterozygotiegrad. Allerdings manifestiert sich diese Reduktion der genetischen Vielfalt zuerst stärker bei der Allelzahl als bei dem Heterozygotiegrad (Cornuet and Luikart, 1996). Dieser Unterschied dient als Grundlage für einen sog. Bottleneck-Test. Der Bottleneck-Test zeigte bei 42 von 44 Marker einen Überschuss der Heterozygotie und somit gibt es einen hoch signifikanten ($P < 0.00001$) Hinweis für einen rezenten genetischen Flaschenhals in der MWF Stichprobe.

Tabelle 5: Der erwartete (H_E) und beobachtete (H_O) Heterozygotiegrad, die durchschnittliche Allelzahl (n_A) und der Heterozygotiemangel (HomExc) innerhalb der Teilpopulation. Die Teilpopulationen sind nach n_A sortiert.

Rasse	n_A	H_E	H_O	HomoExc
MWF	6,02	0,692	0,702	-0,010
TAR	6,11	0,684	0,655	0,029
NTG	6,14	0,671	0,660	0,011
FGV	6,27	0,667	0,664	0,003
AMB	6,45	0,700	0,723	-0,024
RH	6,48	0,675	0,662	0,013
OBV	6,70	0,684	0,689	-0,004
FV	7,00	0,680	0,671	0,009
BGV	7,61	0,728	0,662	0,066
AT	7,70	0,755	0,686	0,069
IL	8,05	0,757	0,731	0,026
MBU	8,09	0,760	0,647	0,114
MRV	8,86	0,764	0,739	0,025
ASV	10,09	0,793	0,737	0,056
Durchschnitt	7,26	0,715	0,687	0,028

3.4 Schätzung des genetischen Flusses (Migration) zwischen den Rassen

Die Analyse der genetischen Unterteilung der untersuchten Rinderpopulationen wurde mit Hilfe von G_{ST} - und N_m -Werten (Tabelle 6)

durchgeführt. G_{ST} - und Nm -Werten schätzen das Verhältnis zwischen der genetischen Variabilität innerhalb und zwischen Teilpopulationen (G_{ST}) sowie die effektive Migrationrate zwischen Teilpopulationen (Nm). Der Nm -Wert schätzt indirekt das Verhältnis von Genfluß und Gendrift zwischen untersuchten Teilpopulationen einer Spezies (Slatkin und Barton, 1989). Die Analyse der G_{ST} - und Nm -Werte kann Informationen über das Verhältnis und die Rolle von Mutation, Gendrift und Genfluß bei der Evolution der untersuchten Spezies geben (Slatkin, 1987). Unter räumlicher Isolation (d.h. es findet nur Zufallsdrift und begrenzter, lokaler diffuser Genfluß statt) sollten alle G_{ST} -Werte gleich sein. Die in dieser Arbeit untersuchten Mikrosatelliten-Loci zeigen im Durchschnitt G_{ST} -Werte von 0.0604. Die durchschnittlich kleineren G_{ST} -Werte zeigen, dass nur 6.04% der gesamten genetischen Variabilität durch Rassenunterschiede zustande kommt. Andererseits beruhen 93.96% der gesamten genetischen Variabilität auf Unterschieden zwischen den Individuen. Für die meisten domestizierten Tierarten (eine Ausnahme macht der Hund) bewegen sich die geschätzten G_{ST} -Werte von 0.05 bis 0.10.

Der Nm -Wert ist ein indirekter Schätzwert für die effektive Migrationsrate innerhalb der untersuchten Spezies. Die hier geschätzte Migrationsrate (Nm) ist relativ hoch und für jeden Locus größer als Eins. Nm -Werte kleiner als Eins lassen auf einen starken Drift- und/oder Selektionseinfluß schließen, wodurch verschiedene Allele in verschiedenen Subpopulationen favorisiert wurden. Das ist nicht der Fall für die hier untersuchten Loci.

Die Nm -Werte der 44 MS-Loci schwanken zwischen 2.34 und 6.86 mit einem Mittelwert von 3.89. Nur kleine Nm -Werte (<1) ermöglichen eine Akkumulation der Mutationen und Veränderungen der Allelfrequenzen durch genetischen Drift in Teilpopulationen. Während die größeren Nm -Werte (in dieser Material 3.89) auf einen regen Austausch der Gameten zwischen Teilpopulationen und auf nicht ausreichende Zeit für die Akkumulation der Mutationen innerhalb einzelner Teilpopulationen hinweisen. In diesem Fall wird die echte demographische Struktur vorrangig durch Genfluß und an zweiter Stelle durch Gendrift bestimmt (Slatkin, 1987).

Tabelle 6: Die Parameter der Populationsunterteilung berechnet als G_{ST} -Wert und effektive Migrationrate (Nm). Die Loci sind nach G_{ST} sortiert.

Nr	Marker	G_{ST}	Nm
1	ILSTS006	0,0964	2,34
2	HEL1	0,0931	2,44
3	BM3507	0,0877	2,60
4	ILSTS054	0,0826	2,78
5	ETH10	0,0805	2,85
6	HEL5	0,0782	2,95
7	NCAM	0,0763	3,03
8	ILSTS005	0,0744	3,11
9	HAUT27	0,0740	3,13
10	RM327	0,0738	3,14
11	INRA023	0,0728	3,18
12	BM2113	0,0705	3,30
13	ETH185	0,0694	3,35
14	HEL13	0,0651	3,59
15	CSSM19	0,0648	3,61
16	HAUT24	0,0639	3,66
17	CSSM66	0,0635	3,69
18	BM1824	0,0624	3,75
19	INRA032	0,0618	3,80
20	TGLA53	0,0614	3,82
21	AGLA232	0,0584	4,03
22	BM7151	0,0583	4,04
23	BM143	0,0560	4,22
24	ETH225	0,0559	4,22
25	INRA035	0,0553	4,27
26	ETH152	0,0547	4,32
27	BM2320	0,0538	4,39
28	MM12	0,0533	4,44
29	TGLA122	0,0521	4,55
30	CSSM36	0,0508	4,68
31	RM067	0,0507	4,69
32	CSRM60	0,0495	4,80
33	DIK2706	0,0493	4,82
34	HEL9	0,0484	4,92
35	ETH3	0,0476	5,00
36	ILSTS102	0,0475	5,01
37	INRA005	0,0468	5,09
38	AF5	0,0447	5,35
39	BM1818	0,0436	5,49
40	TGLA227	0,0433	5,53
41	ILSTS011	0,0430	5,57
42	INRA063	0,0408	5,88
43	ILSTS030	0,0358	6,73
44	TGLA126	0,0352	6,86
Über Loci		0,0604	3,89

3.5 Schätzung der genetischen Distanzen zwischen Teilpopulationen

Die Verwandtschaft zwischen den 14 untersuchten Rinderrassen wurde hier anhand der Allelfrequenzen von 44 MS-Loci dargestellt. Hier wurden die Distanzen mittels Nei's D_A nach dem *"Infinitiv-Allel-Modell"* berechnet. Die Nei's D_A -Distanzen sind besonders für unscharf getrennte Teilpopulationen ($Nm=3.89$; Tabelle 6) geeignet (Takezaki & Nei, 1996). In Tabelle 7 sind einige der kleinsten sowie die größten Distanzen hervorgehoben. Somit sind die kleinsten genetischen Distanzen zwischen Rinderrassen mit geografischem Ursprung im Balkan zu finden. Die größten genetischen Unterschiede sind zwischen Red-Holstein und einigen Rassen aus den westlichen [RH-TAR] und nördlichen Alpen [RH-NTG] sowie zwischen den nördlichen und westlichen Alpenrassen [NTG-TAR] zu finden.

Tabelle 7: Genetische Distanzen, Nei's D_A , zwischen 14 Rinderrassen. Die Rassen sind nach geografischem Ursprung von Süd-Osten nach Nord-Westen sortiert.

	ASV	IL	AT	MRV	MBU	BGV	NTG	AMB	MWF	OBV	FGV	FV	TAR	RH
ASV	-	0,09	0,09	0,07	0,08	0,10	0,17	0,17	0,17	0,13	0,17	0,14	0,16	0,16
IL	0,09	-	0,07	0,07	0,08	0,09	0,17	0,14	0,14	0,11	0,15	0,12	0,15	0,14
AT	0,09	0,07	-	0,07	0,08	0,07	0,14	0,12	0,13	0,10	0,13	0,10	0,13	0,14
MRV	0,07	0,07	0,07	-	0,07	0,07	0,14	0,13	0,13	0,10	0,14	0,11	0,12	0,12
MBU	0,08	0,08	0,08	0,07	-	0,07	0,14	0,14	0,14	0,11	0,14	0,11	0,14	0,15
BGV	0,10	0,09	0,07	0,07	0,07	-	0,09	0,12	0,11	0,07	0,12	0,09	0,12	0,13
NTG	0,17	0,17	0,14	0,14	0,14	0,09	-	0,17	0,17	0,11	0,17	0,14	0,18	0,18
AMB	0,17	0,14	0,12	0,13	0,14	0,12	0,17	-	0,15	0,13	0,08	0,10	0,13	0,17
MWF	0,17	0,14	0,13	0,13	0,14	0,11	0,17	0,15	-	0,11	0,15	0,11	0,16	0,16
OBV	0,13	0,11	0,10	0,10	0,11	0,07	0,11	0,13	0,11	-	0,13	0,10	0,12	0,14
FGV	0,17	0,15	0,13	0,14	0,14	0,12	0,17	0,08	0,15	0,13	-	0,09	0,13	0,16
FV	0,14	0,12	0,10	0,11	0,11	0,09	0,14	0,10	0,11	0,10	0,09	-	0,10	0,15
TAR	0,16	0,15	0,13	0,12	0,14	0,12	0,18	0,13	0,16	0,12	0,13	0,10	-	0,19
RH	0,16	0,14	0,14	0,12	0,15	0,13	0,18	0,17	0,16	0,14	0,16	0,15	0,19	-

3.6 Bestimmung der individuellen Allel-Sharing Distanzen als Maßstab für die genetische Variabilität innerhalb und zwischen Teilpopulationen.

Die individuellen Distanzen, Rassenzuordnungstest und Strukturanalyse basieren auf multilocus Genotypen und nicht auf Allelfrequenzen. Deswegen ist es wichtig für diese Analysen nur Tieren, die für Mehrheit der verwendeten Marker genotypisiert wurden, anzuwenden. Von insgesamt 642 genotypisierten Tieren

wurden 628 (97.8%) für 36 und mehr (>80%) Marker genotypisiert. Nur diese Tiere wurden für die Schätzung der individuellen Distanzen einbezogen.

Die geschätzten Distanzen variieren von 0.3 bis 2.0. Die niedrigsten Distanzen wurden zwischen Tiere innerhalb effektiv kleinen und von Aussterben bedrohten Rassen beobachtet. Zum Beispiel zwischen neun OBV Paaren, sechs AMB Paaren, sechs FGV Paaren und zwei MWF Paaren. Die höchsten Distanzen wurden zwischen Tiere aus den geografisch weit entfernten Rassen beobachtet. Es wurden zum Beispiel 52 Distanzen >1.8 beobachtet, davon entfallen 40 (77%) auf Paare zwischen ASV und europäischen Rindern, 10 (19%) auf Tierpaare zwischen Balkan und Alpen Rindern und nur 2 (4%) auf Tierpaare zwischen RH und Alpen Rindern. Es wurde nur selten $D_{PS} > 1.4$ zwischen Tieren aus der gleichen Teilpopulation beobachtet. Von insgesamt 184 solchen Paaren entfallen 136 (74%) auf Tierpaare innerhalb ASV und 48 (26%) auf Tierpaare innerhalb der balkanischen Teilpopulation. Keine solche hohe Distanz wurde beobachtet zwischen Tieren innerhalb der Alpenrassen oder RH. Die höchsten D_{PS} Distanzen innerhalb RH oder den Alpenrassen von 1.3 bis 1.4 wurden nur in acht Tierpaaren beobachtet.

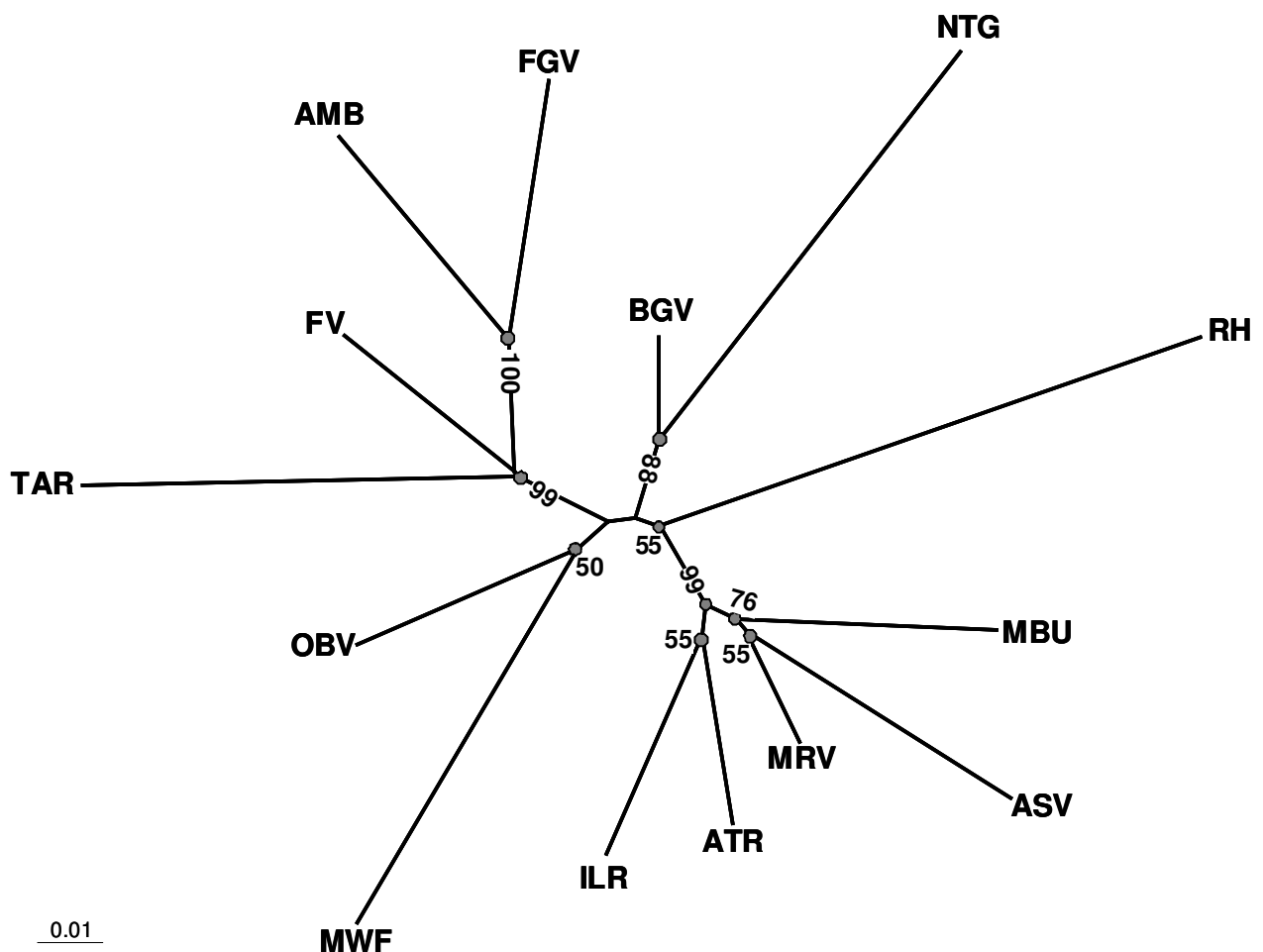
Die Durchschnittliche D_{PS} Distanz innerhalb ASV liegt bei 1.19 bei balkanischen Teilpopulationen etwa über 1.0 und bei alle restlichen Rassen zwischen 0.82 (FGV, RH, NTG) und 0.845 (OBV, MWF, FV, AMB, TAR). Es ist veranschaulichend zu erwähnen, dass die D_{PS} Distanzen zwischen [FGV-AMB] oder [FGV-FV] oder [FV-AMB] oder [FV-OBV] oder [MWF-OBV] kleiner sind als Distanzen zwischen Tiere innerhalb balkanischen Teilpopulationen und besonders innerhalb ASV.

3.7 Grafische Darstellung der genetischen Verwandtschaften

Für die grafische Darstellung der phylogenetische Verwandtschaften zwischen Teilpopulationen, die sich teils mit verschiedener Geschwindigkeit auseinander entwickeln, eignet sich die so genannte Neighbor-Joining (NJ) Methode von Nei und Saitou (1987). Die Teilpopulationen, die durch einen genetischen Flaschenhals gegangen sind oder unter einer gerichteten Selektion stehen, entwickeln sich schneller in eine bestimmte Richtung als effektiv große und unselektierte Teilpopulationen. In dieser Studie wurden sowohl effektiv kleine und selektierte als auch große und unselektierte Teilpopulationen untersucht. Der

Consensus NJ-Baum (Abbildung 1) als auch ein Split-Three Netzwerk (Abbildung 2) verdeutlichen diese unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeit durch unterschiedliche Zweiglängen einzelner Teilpopulationen. Die effektiv große, unselektierte und hochpolymorphe Rinderpopulationen von Balkan und Anatolien zeigen relativ kurze Zweige und bildet einen stabilen (99%-tige Sicherheit) Cluster [(ILR-ATR)-(MBU-MRV-ASV)]. Dies bedeutet, dass sich diese Rassen bei stabil bleibender hoher genetischer Variabilität langsam divergent entwickeln. Die effektiv kleinen und/oder streng selektierten Rassen wie RH, NTG, MWF und TAR zeigen relativ lange Zweige. Dies bedeutet eine schnelle divergente Entwicklung und Einengung der genetischen Variabilität innerhalb dieser Rassen.

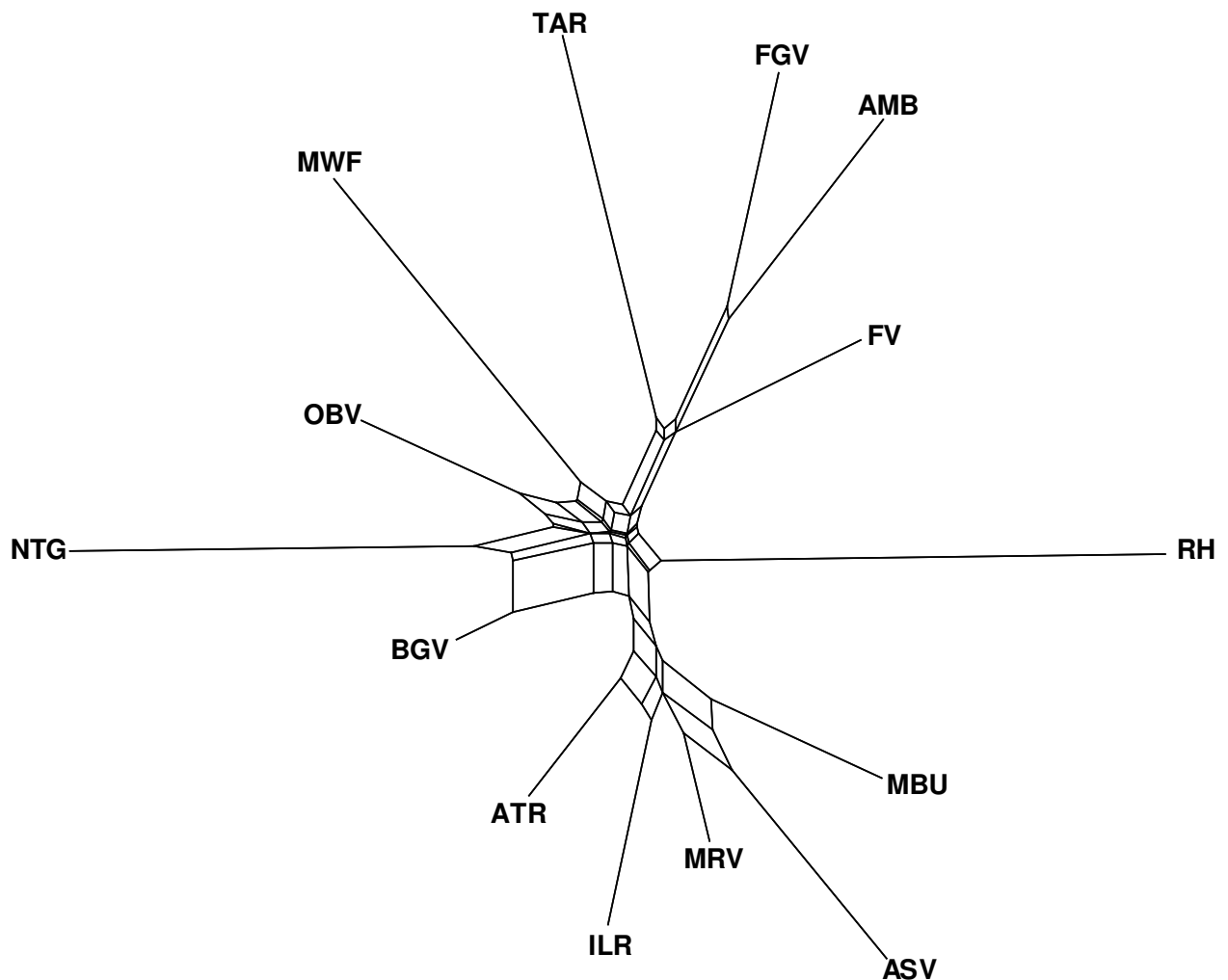
Abbildung 1: Neighbor-Joining Konsensus-Baum der 14 untersuchten Teilpopulationen. Die Rassenabkürzungen sind in Tabelle 1 und 2 beschrieben.



Illustrativ ist der Unterschied zwischen Bosnische (BGV) und Tiroler Grauvieh (NTG). Das BGV wurde seit mehr als hundert Jahre mit NTG veredelt. Das BGV blieb effektiv groß, da in der Regel Natursprungbullen benutzt wurden und

weniger durch Zuchtprogramm abgesprochene Selektion praktiziert wurde. In dem gleichen Zeitraum wurde NTG streng selektiert und eine kleine Zahl an Zuchtbullen über künstliche Besamung eingesetzt wurde. Daher zeigen BGV und NTG eine enge phylogenetische Verwandtschaft (mit 88%-ige Sicherheit) aber mit einem etwa fünfmal längerem Zweig bei NTG.

Abbildung 2: Phylogenetisches Netzwerk nach dem SplitTree Verfahren von Huson und Bryant (2006). Die Rassenabkürzungen sind in Tabelle 1 und 2 beschrieben.



Das Fränkische Gelbvieh (FGV) und die Rasse Murbodner (AMB) zeigen die längste gemeinsame Entwicklung (Abb. 1 und 2) sowie eine vergleichbar schnelle Evolution. In allen 1000 Bootstrapp Iterationen wurden FGV und AMB als am engsten verwandte Rassen geschätzt. Das Murbodnerrind war vom Aussterben bedroht und wurde durch eine Einkreuzung von FGV wieder aufgebaut. Daher können diese beiden Teilpopulationen kaum als getrennten Rassen identifiziert werden.

Das Fleckvieh positioniert sich mit 99%-iger Sicherheit als eine effektiv große Population im [TAR-FV-(FGV-AMB)] Cluster. Und das Murnau-Werdenfelser Rind zeigt die engste phylogenetische Verwandtschaft zu der Nachbarpopulation Braunvieh, allerdings bei einer nur 50%-igen Sicherheit. Die NJ-Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaften zwischen den drei Nachbarpopulation OBV, NTG und MWF ist zum Teil durch die Anwesenheit von der synthetischen Rasse BGV (Kreuzung vom bosnischen Busharind mit NGV) gestört. In einer getrennten Analyse ohne BGV bilden diese drei Nachbarpopulation einen zuverlässigen [(NTG-OBV)-MWF] Cluster. Hier zeigt das phylogenetische Netzwerk von Huson und Bryant (2006) (Abb. 2) einen deutlichen Vorteil. Aus diesem ist, auch ohne ein Ausschluß von BGV, gleichzeitig ersichtlich dass NTG, OBV und MWF eine Gruppe bilden, dass OBV eine Brücke zwischen NTG und MWF bildet und dass BBV stark mit NTG vernetzt ist und erst in zweite Linie mit dem balkanischen Buscharind verwandt ist.

Die Verwandtschaften zwischen den einzelnen Tieren basierend auf D_{PS} Distanzen wurden ausreichend in Abschnitt 3.6 beschrieben und werden aufgrund der Komplexität des phylogenetischen Baums hier nicht grafisch dargestellt. Die D_{PS} Distanzen werden im Folgenden in einer übersichtlicheren zweidimensionalen Darstellung abgebildet.

3.8 Zweidimensionale Darstellung der individuellen Distanzen

Um das Verhältnis zwischen der geschätzten genetischen Variabilität innerhalb und zwischen einzelne Teilpopulationen verständlich zu präsentieren wurden die D_{PS} Distanzen in einer zweidimensionale Darstellung (2-DD, nach Veit-Kensch et al., 2007) abgebildet (Abbildung 3). Die genetische Distanz (D_{PS}) wurde durch den Abstand zwischen zwei Punkten (Tiere) dargestellt. In der Abbildung 3A wurden die Distanzen zwischen allen 624 Tieren, in der Abbildung 3B zwischen hoch polymorphen und kaum selektierten Rindern vom Balkan und aus Anatolien und in der Abbildung 3C zwischen effektiv kleinen und zum Teil streng selektierten Rinderrassen aus der Alpenregion und Norddeutschland dargestellt. Ein visueller Vergleich zwischen Abb. 3B und Abb. 3C relativiert genetische Unterschiede zwischen den einzelnen Alpenrassen und deutet die Möglichkeiten für eine züchterische Zusammenarbeit an.

Abbildung 3A: Zweidimensionale Darstellung (2-DD) der genetischen Distanzen zwischen 624 Tiere aus 14 Teilpopulationen, die für 36 bis 44 Marker genotypisiert wurden. Einzelne Tiere wurden in einer 2-DD anhand der D_{PS} - Distanzmatrix als Punkte auf einer Ebene nach Veit-Kensch et al (2007) dargestellt. Die Rassenabkürzungen sind in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

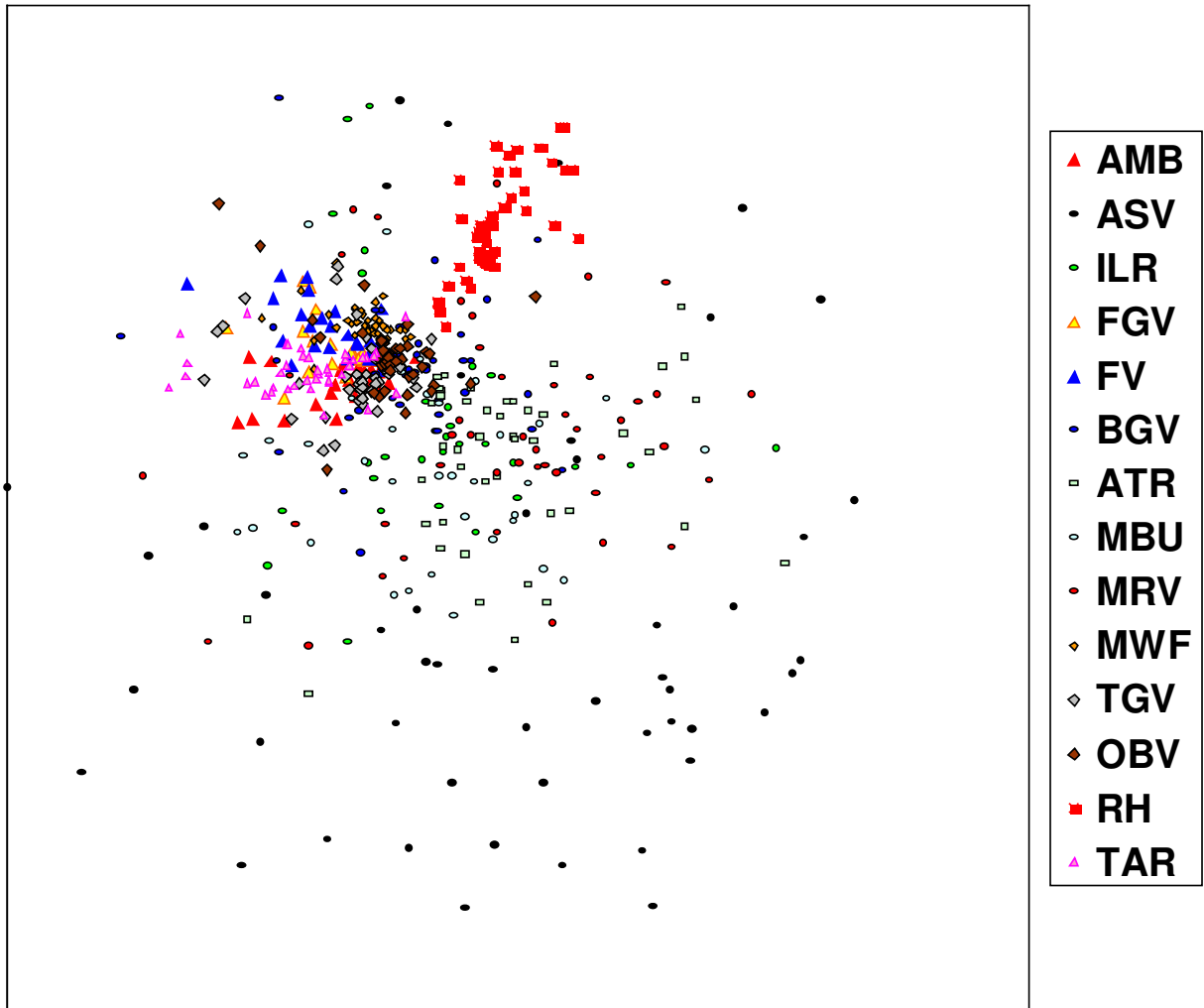


Abbildung 3B: 2-DD der genetischen Distanzen zwischen Tieren aus den sechs unselektierten Teilpopulationen.

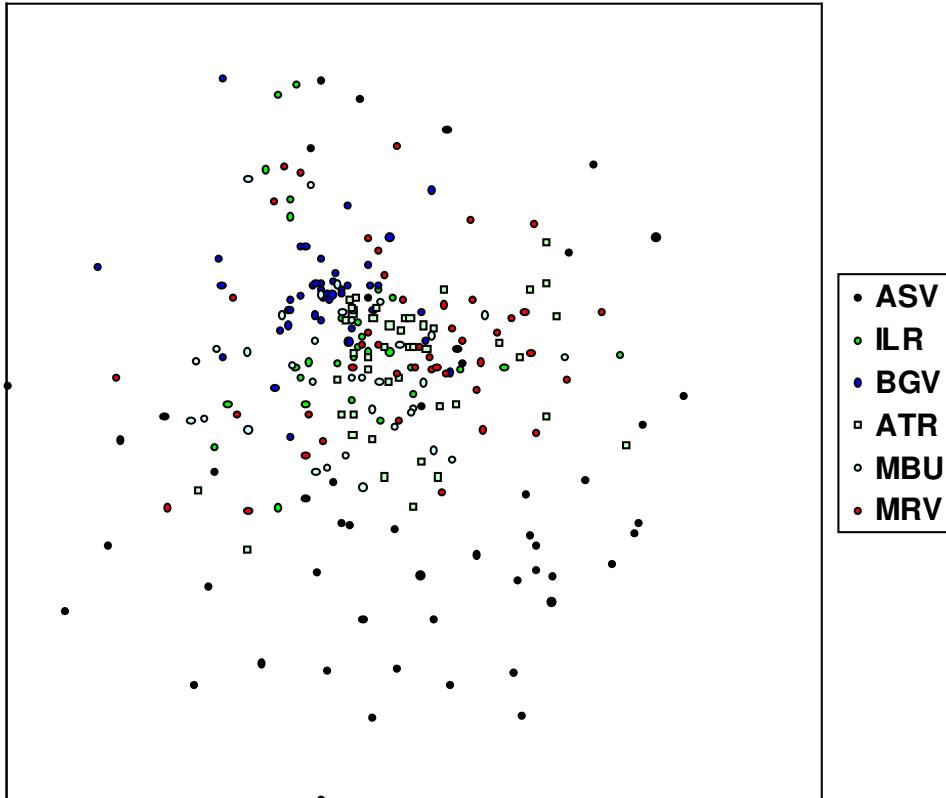
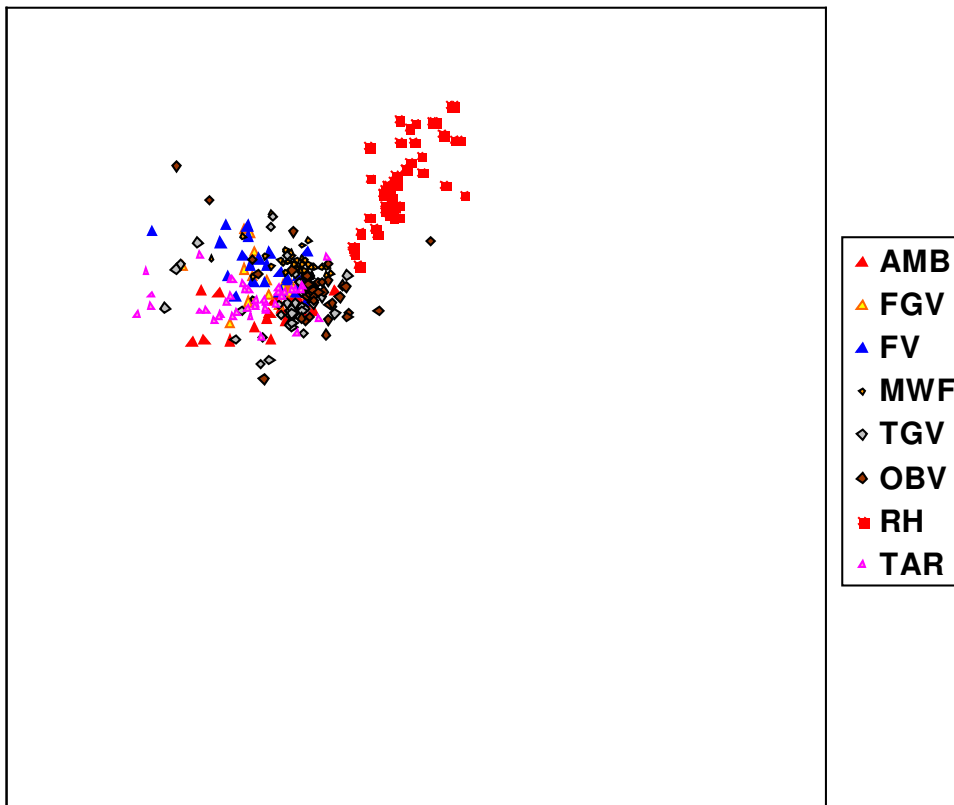
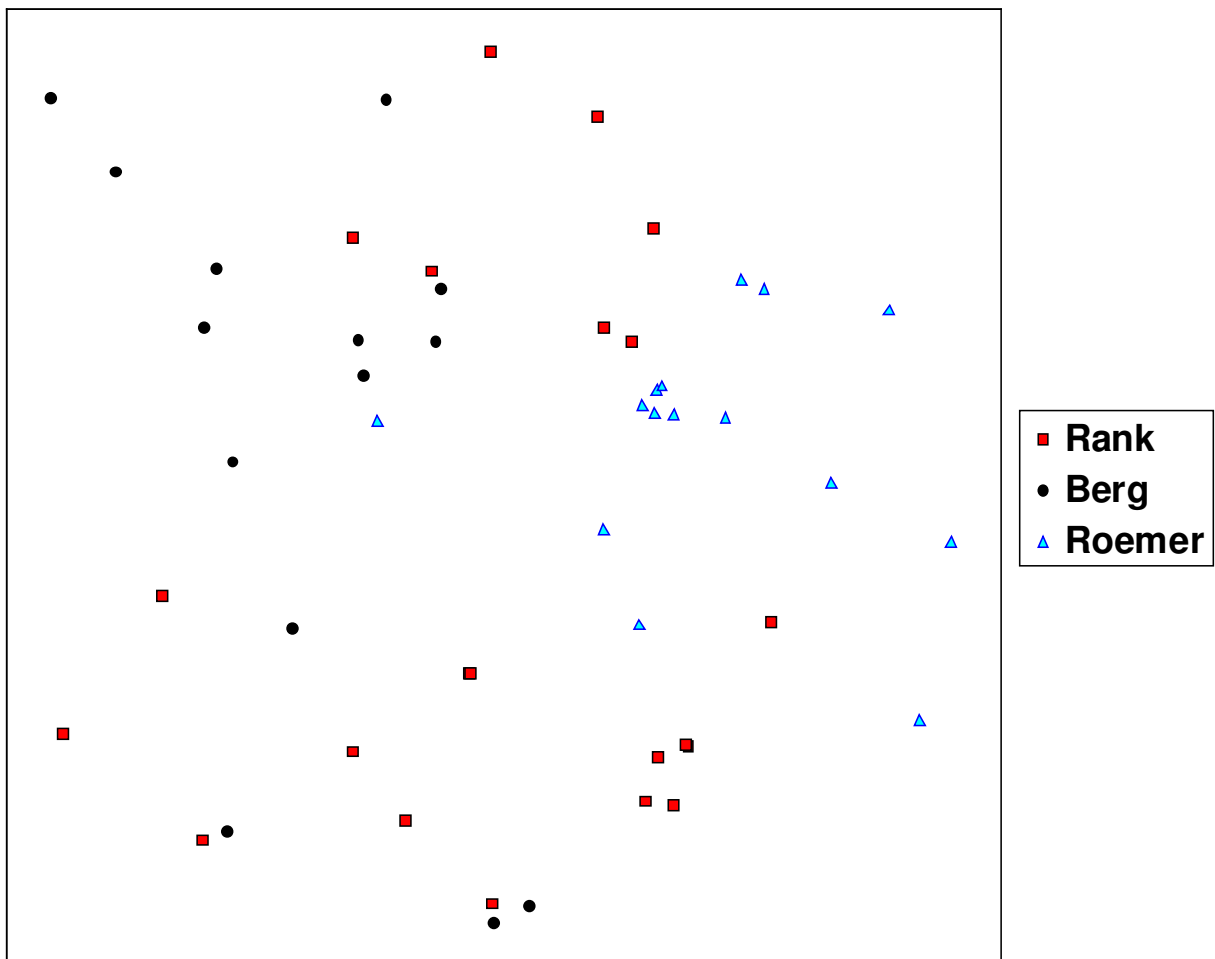


Abbildung 3C: 2-DD der genetischen Distanzen zwischen Tieren aus den acht selektierten Teilpopulationen.



In der Abbildung 4 sind die individuellen Distanzen (D_{PS}) zwischen allen hier untersuchten MWF Tieren dargestellt. Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, dass besonders Tiere aus der Linie L1 (Rank) und L2 (Berg) über das ganze Diagramm streuen und sich genetisch überlappen. Die Tiere aus Linie 3 (Römer) sind z.T. deutlicher von Linie 1 und 2 abgetrennt. Diese Linie wurde wegen zu geringe Wuchs von den Züchtern häufig abgelehnt. Ebenfalls wurde deutlich weniger Spermia von der Römerlinie aus der bayerischen Genreserve ausgelagert. Hier sind sowohl einzelne Tierpaare aus zwei verschiedenen Bullenlinien mit hoher genetische Ähnlichkeit (niedrige Distanz, $D_{PS} < 0.5$) als auch Tierpaare aus gleichen Bullenlinien mit niedriger genetischer Ähnlichkeit (hohe Distanz, $D_{PS} > 0.8$) zu beobachten.

Abbildung 4: 2-DD von alle untersuchten Murnau-Werdenfelser Tiere nach Linien.



3.9 Rassenzuordnungs- bzw. Immigranten-Test

Der Rassenzuordnungs- und Immigranten-Test wurde mittels des Programms *Doh* (Brzustowski, 2002; <http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php>) für alle Tiere (624), die mit 36 und mehr Marker (>80%) genotypisiert

wurden, durchgeführt. Dabei wurde jedes einzelne Tier als Proband mit unbekannter Teilpopulationszugehörigkeit betrachtet und nur anhand der Multilocusgenotypen einer Population zugeordnet. Es wurden 542 Tiere (87%) zu einer eigenen Rasse zugeordnet. Die meisten falsch zugeordneten Tiere (87%) kommen aus hoch polymorphen und unselektierten balkanischen und anatolischen Rinderpopulationen. Eine getrennte Analyse ohne ASV, ATR, ILR, MRV, MBU und BGV zeigte, dass das hier ausgewählte Markersatz eine Rassenzuordnung mit 98% Sicherheit bietet. Von 388 Tieren aus Alpenrassen und RH werden nur acht falsch zugeordnet, davon entfallen vier auf AMB und FGV. Diese beiden Rassen sind engverwandt (Abb. 1 und 2) da die Murbodnerpopulation teils durch eine Einkreuzung von Gelbvieh Bullen wiederbelebt wurde. Dies bestätigen auch unten durchgeführte Strukturanalysen. Neben falsch zugeordneten FGV zu AMB und umgekehrt, wurden ein AMB, ein FGV, ein OBV und zwei TAR den FV zugeordnet und ein RH den OBV. Es wurden keine MWF, FV oder NTG falsch zugeordnet. Wie die oben durchgeführten Analysen der genetischen Variabilität innerhalb und zwischen Populationen es bestätigen, zeigt FV eine relativ breite genetische Variabilität bei einer hohen effektiven Populationsgröße. Daher ist es nicht verwunderlich, dass von acht falschen Zuordnungen sechsmal eine Probe als Fleckvieh erkannt wurde.

Da wir nur reinrassige Tiere gesammelt haben, kann man hier auch über den angewendeten Markersatz schlussfolgern. Dies bedeutet, dass der hier verwendete Markersatz für einen Rassenzugehörigkeitstest mit 98% Sicherheit bei den meisten Alpen- sowie Nord-Westeuropäischen Rinderrassen eingesetzt werden kann.

3.10 Genetische Struktur-Analyse

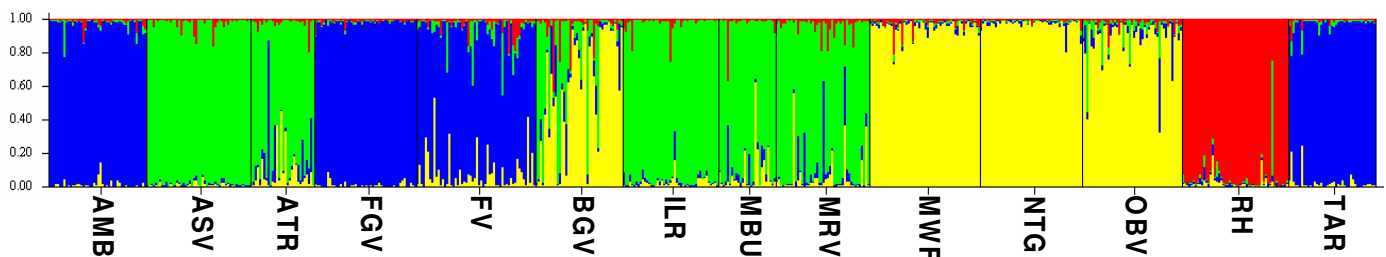
Das Programm *Structure* nutzt Multilocusgenotypen zur Untersuchung der genetischen Struktur der Population. Dabei werden Individuen zu einer vordefinierten Zahl von Gruppen (K) nur anhand der Genotypen zugeordnet. Es wurde eine Serie von *Structure*-Analysen mit K=2 bis 14 durchgeführt. Für jedes K wurden 10 unabhängige Analysen durchgeführt. Die besten Gruppierungen wurden mit K=4 erzielt. Wie in Abbildung 5 dargestellt, bilden drei Nachbarpopulationen NTG, MWF und OBV eine Gruppe mit relativ hohen Zugehörigkeitsindices. Dabei ist zu beobachten, dass NTG und MWF höhere Zugehörigkeitsindices zeigen, während 5-6 OBV Tiere eine relativ unsichere Zuordnung zu dieser Gruppe zeigen. Die

balkanischen Buscharinder (BMU, MRV, ILR und ATR) bilden zusammen mit ASV eine Gruppe. Dabei ist zu beobachten, dass im Vergleich zum Albanischen Bergrind (ILR) das Albanische Tieflandrind (ATR) wahrscheinlich einen höheren Anteil von Fremdgenen zeigt. Wie erwartet zeigt sich das Bosnische Grauvieh als eine synthetische Rasse mit einem hohem Anteil des Grau-Braunen Höhenvieh und einem kleineren Anteil von Buscha Genen. Die dritte Gruppe setzt sich aus FGV, AMB, FV und TAR zusammen. Die Rotbunte bilden für sich allein eine kompakte Gruppe.

Die Strukturanalysen mit höherem K zeigen vor allem das Folgende:

- Zwischen hochpolymorphen und kaum selektierten Rinderrassen vom Balkan und aus Anatolien zeigen ASV und ILR eine höhere Homogenität.
- Von den drei Nachbarpopulationen NTG, MWF und OBV zeigt OBV die höchste Unhomogenität.
- In allen Analysen, auch bei K=14, bleiben FGV und AMB zusammen in einer relativ homogenen Gruppe.

Abbildung 5: Gesetzte genetische Struktur der 14 untersuchten Populationen mit vordefinierter Zahl von vier Gruppen. Einzelne Tiere sind durch einen Balken repräsentiert und dieser ist aus dem Zugehörigkeitsindex zu den einzelnen Gruppen (Farben) zusammengestellt.



3.11 Additivgenetische Verwandtschaft und Inzuchtkoeffizient.

Für die Schätzung der additivgenetischen Verwandtschaften und der Inzuchtkoeffizienten wurden alle bei LKV-Bayern gespeicherten Abstammungsinformationen der hier untersuchten Tiere einbezogen. Da einige unbekannte Abstammungen bereits in der zweiten oder dritten Generation auftreten ist eine unverzerrte Schätzung nicht gewährleistet. Besonders fallen die unbekanntesten Abstammungen einiger Mutters-Mütter sowie zwei Bullen aus den 70-iger Jahren (XERXES und ZEPPELIN) ins Gewicht. Es wurde im Durchschnitt ein Inzuchtkoeffizient von 0.013 mit einer Streubreite von 0.0 bis 0.14 beobachtet. Dabei wurden von 52 analysierten Murnau-Werdenfelser Rindern nur 20 als ingezüchtet geschätzt. Grundlage für diese Aussage ist das 5-Generationenpedigree eines jeden Tieres (falls vorhanden). Es wurde der höchste Inzuchtkoeffizient von 0.14 bei einem Tier festgestellt, das auf Vaters-Vater bzw. Mutters-Vater als ingezüchtet erscheint. Dieses Tier zeigte ebenfalls den höchsten (0.44) Homozygotiegrad.

Der beobachtete Homozygotiegrad schwankt von 0.22 bis 0.44 und zeigt einen Mittelwert bei 0.34. Der Inzuchtkoeffizient stellt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Allele eines Locus abstammungsgleich sind, dar. Es sind nicht alle homozygoten Allele abstammungsgleich, aber die Homozygotie ist eine Voraussetzung für eine Abstammungsgleichheit. Daher stellt der Homozygotiegrad eine gute Schätzung für den Inzuchtkoeffizienten in Populationen mit nur teils bekannten Abstammungen dar. Hier wurden sieben Tiere beobachtet, die einen hohen Homozygotiegrad (>0.39) und keine anhand eines Pedigree erwartete Inzucht zeigen. Sechs dieser Tiere haben eine unvollständige Abstammung ab der zweiten oder dritten und eine ab der vierten Ahnengeneration. Daher könnten diese Tiere tatsächlich ingezüchtet sein.

3.12 Vorschläge für ein überdachtes Zuchtprogramm

3.12.1 Mögliche Zusammenarbeit zwischen Teilpopulationen

Hier wurde die genetische Variabilität innerhalb und zwischen einzelnen Teilpopulationen auf verschiedene Art und Weise analysiert. Verständlicherweise überlappen sich diese Analysen einerseits, andererseits aber bietet jede einzelne

Analyse einen zusätzlichen Aspekt und vervollständigt das Gesamtbild. Dieses Gesamtbild wird hier für zuchtpolitische Beratung benutzt.

Drei Nachbarpopulationen, stammend aus dem relativ engem Alpenraum, zeigen verständlicherweise eine enge phylogenetische Verwandtschaft. Trotz einzelner morphologischer Unterschiede, die meistens durch eine sehr begrenzte Zahl an Genen definiert sind, hatten diese Rassen in der Vergangenheit einen regen Austausch an Genen mit einer geschätzten effektiven Migrationsrate von 4.6 Migranten je Generation. Das lässt uns schlussfolgern, dass die genetische Identität von jeder einzelnen Rasse, wie auch alle drei zusammen am wenigstens gestört wird, wenn sich diese drei Rassen in Erhaltungsmaßnahmen gegenseitig unterstützen. Obwohl sich Tarentaise und Murnau-Werdenfelser farbenmäßig ähneln sind beide geografisch und genetisch weit auseinander distanziert. Daher ist eine Einkreuzung von Tarentaise in Murnau-Werdenfelser nicht als Erhaltungsmaßnahmen im engeren genetischen Sinne zu verstehen.

In dieser Studie wurde eine unübersehbare genetische Vermischung von Gelbvieh und Murbodner Rind beobachtet. Wegen den dokumentierten Einkreuzungen von Gelbvieh zur Erhaltung des Murbodnerrindes kann man über einen einseitigen Genfluß reden. Alle oben angewendete Analysen zeigten große genetische Ähnlichkeit zwischen beide Teilpopulationen. Die Strukturanalyse ist hier die einzige Analyse, die keine Vorkenntnisse über die Tierzuordnung nutzt. Diese Analyse war nicht in der Lage beide Teilpopulationen zu unterscheiden. Die hier erreichten Ergebnisse dürften von großem Interesse für AMB und FGV sein. Da es sich praktisch um die gleiche Rasse handelt, können beide Teilpopulationen bzw. Zuchtorganisationen offener miteinander arbeiten und dadurch teils akute Inzuchtprobleme leichter und besser lösen.

3.12.2 Mögliche Erweiterung der Zuchtpopulation bei Murnau-Werdenfelser

Die Zuchtbasis bei MWF ist soweit eingeeengt, dass über eine Einführung von weiteren Tieren in das Zuchtprogramm ermöglicht werden muss. Zurzeit werden nur Tiere unter Milchleistungskontrolle als MWF Zuchtbasis betrachtet. Neben diesen gibt es mindestens eine ebenso große Zahl an MWF-Tiere die ausschließlich zur Mutterkuhhaltung genutzt werden. Bei diesen Tieren existiert keine Herdbuchführung, wird keine Abstammungskontrolle durchgeführt und daher ist eine Rassenzuordnung nicht dokumentiert. Wir haben oben gezeigt, dass ein Markersatz von 44 Markern eine

98% Rassenzuordnung ermöglicht. Falls man diesen Test mit einem morphologischen Test (Vorselektion) kombiniert, kann eine noch höhere Sicherheit erreicht werden.

Um eine Zuchtbasis für beide Teile der MWF-Population zu vergrößern wird hiermit eine Zusammenarbeit mit Mutterkuhhaltern vorgeschlagen. Es soll eine gemeinsame Herdbuchführung aufgebaut werden. In diese neue Zuchtpopulation sollen nur getestete MWF-Tiere einbezogen werden. Ein Rassenzuordnungstest soll zweistufig ausgeführt werden: 1) morphologischer Zuordnungstest und 2) genetischer Zuordnungstest anhand der hier erzielten Ergebnisse und unter Nutzung der gesamten hier hergestellte Genotypenbasis.

3.12.3 Neugestaltung der gezielten Paarung

Allele-sharing Distanzen (D_{PS}) zeigten, dass einzelne Zuchttiere aus verschiedene Bullenlinien zum Teil genetisch sehr ähnlich sind und umgekehrt, dass einzelne Zuchttieren aus gleiche Bullenlinie sehr verschieden sein können. Für alle Tiere die für den hier verwendeten Markersatz genotypisiert sind oder werden ist eine markergestützte gezielte Paarung durchführbar. Diese ist in Kombination mit einer derzeitig praktizierten gezielten Paarung anwendbar. Hier sind zwei extreme Szenarios zu kombinieren: 1) Gezielte Paarung mit alleinigem Ziel die maximale genetische Variabilität zu erhalten und 2) mit alleinigem Ziel den maximalen Selektionserfolg zu erzielen. Nach beiden Strategien erstellte Listen werden dann in einer endgültigen gezielten Paarung zusammengeführt werden. Diese Kompromissliste soll einen hohen erwarteten Selektionserfolg bei kleinem Verlust an genetischer Variabilität gewährleisten. Durch die Verbreiterung der Zuchtbasis (s. Abschnitt 3.12.2) und in Kombination mit der markerunterstützten gezielten Paarung wird einerseits die Bedeutung von Bullenlinien relativiert und andererseits die Anzahl der „Linien“ vergrößert. Da hier die manchmal hilfreiche Linienübersicht verloren geht, soll die neue gezielte Paarung durch eine entsprechende Software unterstützt werden.

Unsere bisherigen Erfahrungen mit einer neuern sogenannten SNP-Chip Technologie zeigen, dass durch diese eine realisierte Rassenzugehörigkeit, sowie der Verwandtschafts- und Inzuchtkoeffizient sehr genau geschätzt werden können.

Diese drei Parameter sind die wichtigsten Komponenten einer erfolgreichen Erhaltung in Kombination mit der Leistungsselektion. Alle oben genannten Werkzeuge für ein neues Zuchtprogramm sind auch mit der SNP-Chip Technologie umsetzbar. Diese Technologie ist zur Zeit nominell teuer, sollte aber wegen der hohen Qualität und der vielseitigen Anwendbarkeit der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

3.12.4. Wirtschaftliche Aspekte der Rassenerhaltung

Im Herdbuch des Zuchtverbandes für Murnau – Werdenfelser Vieh sind aktuell noch 8 Betriebe als ordentliche Mitglieder geführt. Diese Betriebe sind auf ihre Einnahmen aus der Milchproduktion im gleichen Maße abhängig, wie alle anderen Milchviehbetriebe und unterliegen den gleichen ökonomischen Rahmenbedingungen. Zur Motivation der weiteren Rassenerhaltung war es daher notwendig, bereits im Frühjahr 2005 mit der Einkreuzung von Tarantaise neue Impulse zu setzen. Für die Züchter ist dabei vor allem die Farbähnlichkeit sicherlich wichtiger, als die genetische Verwandtschaft zu Original Braunvieh, wobei letzteres zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht bekannt war. Außerdem hat man sich durch den Einsatz von Tarantaise eine deutlich bessere Milchleistung versprochen.

Allerdings wäre eine Hereinnahme von Original Braunvieh in die Mutterkuhbestände ein gangbarer Weg, um die Ergebnisse aus dem Projekt umzusetzen. Hierzu werden im Laufe des Jahres weitere Gespräche stattfinden, sobald die neuen Förderrichtlinien des Freistaates Bayern vorliegen. Ein weiter zu diskutierendes Problem wird die Ausdehnung des räumlichen Tätigkeitsbereiches des Verbandes sein. Rasseerhaltungsprämien können nur an Betriebe ausgezahlt werden, die Mitglied eines Zuchtverbandes sind. Nach aktueller Lage ist die Zuchtorganisation nicht bereit, den sachlichen und räumlichen Tätigkeitsbereich auf ganz Bayern auszudehnen. Grund dafür sind mögliche, außergebietliche Beitrittskandidaten, die zum Verlust der bäuerlichen Prägung des Verbandes führen könnten.

Die wirtschaftliche Situation könnte auch durch den Aufbau einer eigenen Produktschiene verbessert werden. Ansätze dazu sind bereits vorhanden und sollten in weiteren Aktivitäten noch verbessert werden.

3.13 Abschließende Bewertung

Anhand der Ergebnisse der phylogenetischen Analysen wurden Zuchtlösungen für die Rasse Murnau - Werdenfelser und teils für weitere hier untersuchte Rinderrassen aus der Alpenregion vorgeschlagen. Für die meisten Züchter ist eine Rasse durch eine kleine Zahl der morphologischen Merkmale vordefiniert. Diese konservative Haltung beschränkt die praktische Durchführung der historisch und genetisch berechtigten rassenübergreifenden Lösungen stark. Trotzdem sollen noch in diesem Jahr alle möglichen Aspekte diskutiert werden, wie :

- Zusammenarbeit in einem überlappenden Zuchtprogramm zwischen Murnau – Werdenfelser, Grauvieh und Original Braunvieh
- Verbreiterung der Zuchtbasis durch einen kombinierten (morphologisch und markergestützt) Rassenzuordnungstest.
- Markerunterstützte gezielte Paarung zur Vermeidung von weiterer Inzucht unter vordefiniertem genetischen Vorschrift.

Ob Zuchtlösungen als Alleingänge oder als Zusammenarbeit zwischen mehreren Rassen aus einem kleinen geographischen Raum ausfallen, wird von mehreren Faktoren und den vielseitigen Interessen der Züchter abhängen. Da diese Rassen ein Kulturerbe darstellen sollten alle Vorschläge ausreichend diskutiert werden. Dabei darf aber nicht unnötig wertvolle Zeit verloren gehen, da ein mögliches Verschwinden aller drei Rinderrassen verhindert werden soll.

Für die finanzielle Unterstützung zur Durchführung des Projektes ergeht ein herzliches Dankeschön an die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.

3.14 Kurzfassung der Ergebnisse

Das Murnau-Werdenfelser (MWF) Rind belegt zusammen mit dem Original Braunvieh (OBV) und dem Grauvieh (TGV) einen relativ engen Raum in den nördlichen Alpengebieten und ist daran ideal angepasst. Alle drei Rassen sind von Aussterben bedroht und teilen sich eine gemeinsame genetische und kulturelle Geschichte. Die ökonomischen Rahmenbedingungen zwingen MWF Züchter auf eine höhere Milchleistung zu selektieren, was in einer kleinen Population einen langwierigen Prozess darstellt. Daher wurde im Frühjahr 2005 mit der Einkreuzung von Tarantaise (TAR) begonnen. Für die Züchter waren dabei vor allem die Farbähnlichkeit und die deutlich bessere Milchleistung sicherlich wichtiger, als die genetische Entfernung beider Rassen. Die Ziele dieses Projekts waren (i) eine objektive Schätzung der genetischen Variabilität innerhalb MWF, (ii) zwischen MWF und andere Populationen, (ii) ein neues Zuchtprogramm vorzuschlagen und (iv) Folgen von verschiedenen Einkreuzungsszenarien zu untersuchen. Um diese Ziele zu erreichen wurden MWF, OBV, TGV, Murbodnerrind und TAR für 46 Mikrosatelliten-Marker genotypisiert und umfassend phylogenetisch analysiert. Es wurde eine bereits deutlich reduzierte genetische Variabilität bei MWF sowie bei OBV und TGV beobachtet. Diese drei Nachbarrassen zeigen eine hohe genetische Verwandtschaft miteinander und eine große Distanz zu TAR. Somit suggerieren die hier erreichten Ergebnisse, dass aus erhaltungsgenetischer Sicht eine enge Zusammenarbeit zwischen diesen drei Rassen zum minimalen Verlust an genetischer Identität und gleichzeitig zur Lösung akuter Inzuchtprobleme führen könnte. Weiterhin wurde ein kombinierter morphologischer und molekulargenetische Rassenzugehörigkeitstest entwickelt und für die Vergrößerung der Zuchtbasis durch die Einführung von Tieren aus Mutterkuhhaltung in Herdbuch vorgeschlagen. Es wurde eine markergestützte gezielte Paarung für einen maximalen Selektionserfolg unter Berücksichtigung der genetischen Vielfalt vorgeschlagen.

3.15 Abstract

Design and testing of new breeding program for Murnau-Werdenfelser cattle breed based on molecular genetic data.

B. Luntz and I. Medugorac

Introduction: Murnau-Werdenfelser (MWF) is robust dual purpose cattle that adapts easily to heath and marsh terrains. The MWF populate together with Original Braunvieh (OBV) and Tyrolean Grauvieh (TGV) the close geographical region of North Alps. All three breeds are endangered and show similar historical and breeding footprints. There are about 150 females registered in the MWF herdbook. Due to economic competition MWF breeders discussed and partly started upgrading of MWF by Tarentaise (TAR) cattle. TAR is selected for higher milk yield and shows some morphological similarity with MWF but is geographical well distanced (Tarentaise valley in France). The aims of this project were (i) to get objective estimate of genetic variability within MWF, (ii) between MWF and some spatial close and well distanced breeds, (iii) to design a new breeding program using molecular genetic data, (iv) to investigate consequences of different upgrading scenarios.

Methods: Five breeds are genotyped for 46 microsatellite markers. The chosen breeds are MWF, OBV, TGV, Austrian Murnbodner (AMB) and TAR. Additional nine breeds genotyped in other research projects were also included into objective comparison of genetic parameters and breed relationships.

Results: Number of alleles, heterozygosity and genetic bottleneck analyzes confirmed significant loss of genetic variability in MWF population. Similar trends were observed also in OBV and TGV populations. Phylogenetic analyses demonstrate close relationship between the geographical neighbors MWF-OBV-TGV and a large genetic distance to TAR breed. Assignment tests and allele sharing distances demonstrate that here used genetic marker enable safe allocation of individuals to their population of origin and to determine most diverse animal pairs within population.

Conclusion: MWF population is effectively very small and a combination of morphological and molecular genetic assignment tests was proposed for introduction of MWF suckler-cows (without pedigree certificate) into MWF herdbook. This should extend breeding basis of MWF population without loss of genetic and phenotypic identity. Allele sharing distances clearly show that the currently used breeding program based on tree bull-lines waste genetic resources and genetic diversity within

MWF. Here estimated parameters and gathered data suggest a combination of traditional and marker assisted mating for parallel achievement of two important sometimes opposite goals: genetic improvement and maintenance of genetic diversity. Our molecular genetic data clearly prefer close collaboration and mutual upgrading of MWF, OBV und TGV instead using of a far distanced breed such as TAR.

Acknowledgements: The study was financially supported by the Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Germany.

4 Literatur

Barker J.S.F., Breadley D.G., Fries R. Hill W.G., Nei M. & Wayne (1993) An integrated global programme to establish the genetic relationships among breeds of each domestic animal species. Animal Production and Health Division FAO, Rome - Italy.

Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J. Minch E., Kidd J.R. & Cavalli-Sforza L.L. (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368, 455-457.

Brzustowski J., Doh assignment test calculator (2002)
<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/Doh.php> [consulted: 28. September 2006].
Cornuet JM, Luikart G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 144:2001-14.

Falush D., Stephens M., Pritchard J.K., Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics* 164 (2003) 1567-1587.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution* 35, 783-791.
Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Henderson CR (1976) A Simple Method for Computing the Inverse of a Numerator Relationship Matrix Used in Prediction of Breeding Values. *Biometrics*, 32: 69-83

Huson DH and Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254-267

Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70, 3321-3323.

Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, Columbia University Press.

Nei M, Tajima F, Tatenno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *J Mol Evol.* 1983;19(2):153-70.

Page RD (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 12:357-8

Paetkau D., Calvert W., Sterling I., and Strobeck C., (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears, *Mol. Ecol.* 4 347-354.

Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155 945-959.

Saitou N. & Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.

Slatkin M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.

Slatkin M. & Barton N.H. (1989) A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43, 1349-1368.

Sokal R.R. & Sneath P.H.A. (1963) *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco.

Takezaki N, Nei M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics.* 144:389-99.

Veit-Kensch CE, Medugorac I, Jedrzejewski W, Bunevich AN, Foerster M. (2007) A heuristic two-dimensional presentation of microsatellite-based data applied to dogs and wolves. *Genet Sel Evol.* 39:447-63