

Aus dem Institut für Tierzucht und Genetik  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
(Vorstand: O. Univ. Prof. Dr. Mathias Müller)

UNTERSUCHUNGEN ZUR GENETISCHEN VARIABILITÄT DER  
KÄRNTNER BRILLENSCHAFE IN ÖSTERREICH

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung der Würde einer  
**DOCTORA MEDICINAE VETERINARIAE**  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von  
Diplom-Tierärztin Katharina Schwend

Wien, im Oktober 2001

1. Begutachter: O. Univ. Prof. Dipl. Ing. Dr. habil. Dr. hc. Gottfried Brem  
Institut für Tierzucht und Genetik  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Betreuer: Dr. Roland Achmann  
Ludwig Boltzmann Institut für immuno-, zyto- und  
molekulargenetische Forschung  
an der Veterinärmedizinischen Universität Wien

2. Begutachter: Prof. Dr. Josef Troxler  
Institut für Tierhaltung und Tierschutz  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1999 bis Oktober 2001 erstellt.

Herrn Prof. Dipl. Ing. Dr. habil. Dr. hc. Gottfried Brem danke ich für die Überlassung dieses Projektes und die Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Mathias Müller bedanke ich mich für das Durchlesen meiner Dissertation und die konstruktiven Hinweise.

Für die gute Betreuung danke ich Herrn Dr. Roland Achmann ganz herzlich. Er führte mich in die molekulargenetischen Arbeitsweisen ein und nahm sich stets die nötige Zeit, um Probleme zu lösen und Fragen zu beantworten. Durch ihn lernte ich das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten.

Bei meinem zweiten Begutachter Herrn Prof. Dr. Josef Troxler bedanke ich mich für die rasche Durchsicht meiner Dissertation und das große Interesse, das er dieser und den Kärntner Brillenschafem entgegengebracht hat.

Herrn Friedhelm Jasbinschek, dem Obmann des „Vereins der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria“, danke ich ganz besonders für die ausgesprochen gute und freundschaftliche Zusammenarbeit. Er hat mir mit großer Begeisterung die Welt der Kärntner Brillenschafe nahe gebracht und durch seine interessanten Erzählungen meinen Enthusiasmus für dieses Thema geweckt.

Der Fielmann AG, Hamburg, Deutschland, sei für die großzügige finanzielle Unterstützung des „Vereins der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria“ gedankt, durch die dieses Projekt ermöglicht wurde.

Allen nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen, Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Tierzucht und Genetik danke ich für die nette und meist unkomplizierte Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich aber Barbara und Pamela danken, die sich alle meine Sorgen geduldig anhörten und immer bereit waren, zu helfen. Sie sind mehr als Kolleginnen, sie sind mir als gute Freundinnen in dieser Zeit sehr ans Herz gewachsen.

Meinen Freundinnen und Freunden in der Ferne danke ich für ihre treue Unterstützung, per e-mail, am Telefon, über den Postweg oder durch ihren persönlichen Besuch hier in Wien.

Last but not least möchte ich mich ganz, ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung, aber auch für die Gewissheit, dass sie bei allem, was ich mache, hinter mir stehen. Meinen Geschwistern danke ich, weil ich sie rund um die Uhr mit Problemen behelligen darf und durch ihren Glauben an mich und ihren Stolz auf ihre Schwester zusätzlich motiviert war. Auch meine liebe Mutti hat immer wieder an mich gedacht und mich aufgemuntert. Sie hat nun endlich eine echte Frau Doktor in ihrer großen Familie. Ihr und meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen.

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Kärntner Brillenschaf damals - heute und in Zukunft?</b>	3
1.1.1	Die Geschichte des Kärntner Brillenschafes	3
1.1.2	Das Kärntner Brillenschaf heute	9
1.1.3	Warum gerade Kärntner Brillenschafe für die Zukunft?	10
1.2	<b>DNA-Mikrosatelliten</b>	12
1.2.1	Abstammungsüberprüfung mit Hilfe von DNA-Mikrosatelliten	13
1.2.2	Mikrosatelliten für populationsgenetische Fragestellungen	15
1.3	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	17
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>18</b>
2.1	<b>Untersuchte Tiere</b>	18
2.2	<b>Probenentnahme</b>	18
2.3	<b>Molekulargenetische Methoden und Arbeitsprotokolle</b>	18
2.3.1	Isolierung der DNA aus TypiFix <sup>®</sup> -Proben	18
2.3.1.1	Methode NucleoSpin Multi96 Tissue/ MACHEREY-NAGEL	19
2.3.1.2	Methode Extraktion mit NaClO <sub>4</sub> /Chloroform	20
2.3.2	DNA-Quantifizierung mittels Photometer	21
2.3.3	Agarosegel-Elektrophorese	21
2.3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
2.3.5	Kapillarelektrophorese	25
2.4	<b>Auswertung der Daten</b>	25
2.4.1	Auswertung der Typisierungen	25
2.4.2	Genetische Diversität	26
2.4.3	Abstammungsüberprüfung	26
2.4.4	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Nullallele	27
2.4.5	F-Statistik	27
2.4.6	Populationsdifferenzierung	28
2.5	Verwendete Chemikalien, Geräte, Hilfsmittel, Enzyme und Softwareprogramme	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	<b>DNA-Isolierung</b>	34
3.2	<b>Typisierung</b>	34
3.3	<b>Genetische Diversität der Kärntner Brillenschafpopulation</b>	35
3.4	<b>Abstammungsüberprüfung der Kärntner Brillenschafe</b>	36
3.5	<b>Nullallele</b>	38

3.6	<b>Genetische Diversität der Villnöber Schafe</b>	39
3.7	<b>Genetische Diversität verschiedener Schafrassen im Vergleich</b>	41
3.8	<b>Genetische Differenzierung zwischen Rassen, bzw. Populationen</b>	45
3.8.1	Private Allele	45
3.8.2	Populationsdifferenzierung	46
3.8.3	F-Statistik	47
3.8.4	Genetische Variation innerhalb und zwischen den Rassen	48
3.8.5	Genetische Distanzen	49
3.8.6	Hauptfaktorenanalyse (Principal Components Analysis, PCA)	53
3.8.7	Rassezuordnung von Einzeltieren („breed assignment“)	54
3.9	<b>Untersuchung auf Hybride</b>	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	<b>Genetische Diversität</b>	58
4.2	<b>Abstammungsüberprüfung der Kärntner Brillenschafe</b>	60
4.3	<b>Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Nullallele</b>	61
4.4	<b>Genetische Differenzierung verschiedener Schafrassen</b>	62
4.4.1	Private Allele	62
4.4.2	Populationsdifferenzierung	63
4.4.3	F-Statistik	63
4.4.4	Genetische Distanzen	64
4.4.5	Hauptfaktorenanalyse (Principal Components Analysis, PCA)	66
4.4.6	Rassezuordnung von Einzeltieren („breed assignment“)	66
4.5	<b>Untersuchung auf Hybride</b>	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>86</b>
Tab.1a-11a:	Allelfrequenzen aller 11 Marker der Kärntner Brillenschafe (N = 746) und der Villnöber Schafe (N = 160)	1a
Tab.12a-22a und Abb.1a-11a:	Allelfrequenzen aller 11 Marker der vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf (N = 50), Bergschaf (N = 50), Villnöber Schaf (N = 50), Texelschaf (N = 36)	3a
Tab.23a:	Probennummern der Tiere mit fehlerhafter Abstammung	9a

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Erwarteter und beobachteter Heterozygotiegrad der 11 Mikrosatellitenmarker für die Kärntner Schafe	35
Abb. 2:	Beispiel des erfolgreichen Nachweises eines Nullallels	39
Abb. 3:	Erwarteter und beobachteter Heterozygotiegrad der 11 Mikrosatellitenmarker für die Villnößer Schafe	40
Abb. 4:	Anzahl an Allelen pro Locus	42
Abb. 5:	Erwartete und beobachtete Heterozygotieraten	44
Abb. 6 und Abb. 7:	Genetische Diversität innerhalb (HS) und zwischen Subpopulationen (DST) sowie Anteil der Diversität zwischen Subpopulationen an der genetischen Diversität der Gesamtpopulation (GST) für die untersuchten Mikrosatellitenmarker	49
Abb. 8:	Rekonstruierter phylogenetischer Baum für die vier Schafrassen auf der Basis einer durchschnittlichen Distanzmatrix aus 100 Bootstrap-Samples mit Reynolds' distance unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode	50
Abb. 9:	Individuenbaum basierend auf den „allele-sharing distances“ zwischen 186 Individuen der vier Schafrassen unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode	52
Abb. 10:	Hauptfaktorenanalyse der untersuchten Schafrassen (50 Bergschafe, 50 Kärntner Brillenschafe, 50 Villnößer Schafe und 36 Texelschafe)	53
Abb. 11:	Individuenbaum basierend auf den „allele-sharing distances“ zwischen 101 Individuen unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode	55
Abb. 12:	Hauptfaktorenanalyse von 147 Individuen (50 Kärntner Brillenschafe, 50 Bergschafe, 11 Brillenschafe aus Bayern und 36 Texelschafe)	56
Abb. 13:	Schafrassen, die an der Entstehung der Kärntner Schafe, sowie der Bergschafe beteiligt waren	69

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Untersuchte DNA-Mikrosatellitenmarker	23
Tab. 2:	Multiplex 1 (6plex)	23
Tab. 3:	Multiplex 2 (5plex)	24
Tab. 4:	PCR-Ansätze der zwei Multiplex-Reaktionen (6plex und 5plex)	24
Tab. 5:	PCR-Profile der beiden Multiplex-Reaktionen	24
Tab. 6:	Farbstoffmarkierung und Allellängen der 11 Mikrosatellitenmarker	25
Tab. 7:	Auflistung der wichtigsten Laborchemikalien und ihrer Bezugsquellen	31
Tab. 8:	Auflistung der wichtigsten Geräte und ihrer Hersteller bzw. Bezugsquelle	31
Tab. 9:	Auflistung der wichtigsten Hilfsmittel	32
Tab. 10:	Auflistung der wichtigsten Enzyme und molekularbiologischen Kits	32
Tab. 11:	Auflistung der verwendeten Softwareprogramme	33

Tab. 12:	Beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotieraten sowie die Anzahl der Allele der Kärntner Brillenschafpopulation (N=746) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker	35
Tab. 13:	Fis-Werte (nach Weir & Cockerham) der Kärntner Brillenschafpopulation (N=746) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker	36
Tab. 14:	Ausschlusswahrscheinlichkeiten der 11 Mikrosatellitenmarker für die Kärntner Brillenschafpopulation (N=767)	37
Tab. 15:	Geschätzte Nullallelfrequenzen	38
Tab. 16:	Beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotieraten sowie die Anzahl der Allele der Villnöber Schafe (N=160) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker	40
Tab. 17:	Fis- Werte (nach Weir & Cockerham) der Villnöber Schafpopulation (N=160) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker	41
Tab. 18:	Anzahl sowie mittlere Anzahl an Allelen pro Locus der vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf, N=50; Bergschaf, N=50; Villnöber Schaf, N=50; Texelschaf, N=36 für alle 11 Mikrosatelliten-Marker	42
Tab. 19:	Beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotieraten der vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf, N=50, Bergschaf, N=50, Villnöber Schaf, N=50, Texelschaf, N=36 für alle 11 Mikrosatelliten-Marker	43
Tab. 20:	Private Allele in den vier Schafrassen und ihre Frequenzen	45
Tab. 21:	Anzahl der paarweisen privaten Allele in den vier Schafrassen	46
Tab. 22:	F-Statistik nach Weir and Cockerham (1984) für die vier untersuchten Schafrassen	47
Tab. 23:	Paarweiser Vergleich der $F_{st}$ -Werte zwischen den Schafrassen	48
Tab. 24:	Nei's Schätzwerte zur genetischen Diversität innerhalb ( $H_S$ ) und zwischen Subpopulationen ( $D_{ST}$ ), sowie der Gesamtpopulation (vier Rassen) ( $H_T$ ) und dem Anteil der Diversität zwischen Teilpopulationen an der genetischen Diversität der Gesamtpopulation ( $G_{ST}$ ) für alle 11 Marker	48
Tab. 25:	Paarweise genetische Distanzen für die vier Schafrassen nach den Distanzmaßen Nei's standard genetic distance, Nei's corrected genetic distance, Nei's minimum distance, Reynolds' distance und Distanz nach Cavalli- Sforza & Edwards	49
Tab. 26:	Korrelationsmatrix der verwendeten Distanzmaße	50
Tab. 27:	Anteile und Anzahl korrekter Zuordnungen von insgesamt 186 Schafen der vier untersuchten Rassen	54
Tab. 28:	Rassezuordnung der insgesamt 186 Individuen zu den vier Schafrassen nach der „Frequenz-Methode“	54

## **Bilder**

Bild 1:	Kärntner Schafe um 1950	7
Bild 2:	Kärntner Schafe auf typischer Schafalpe (um 1950)	7
Bild 3:	Kärntner Brillenschafbock im Jahre 2001	8
Bild 4:	Typisches Kärntner Brillenschaf (2001)	8

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BS	Bergschaf
BY	Bayrische Kärntner Brillenschafe
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleinsäure-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
x g	Erdbeschleunigung
H <sub>O</sub>	beobachtete Heterozygotierate
H <sub>E</sub>	erwartete Heterozygotierate
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
ISAG	International Society of Animal Genetics
KB	Kärntner Brillenschaf
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
M	molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MS	Mikrosatellit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
N	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte

ÖNGENE	Österreichische Nationalvereinigung für Genreserven
ÖPUL	Österreichische Programm zur Förderung einer umweltgerechten, extensiven und den natürlichen Lebensraum schützenden Landwirtschaft
OTU	operational taxonomic unit
p	Wahrscheinlichkeitswert
PCA	Principal Components Analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
r	Korrelationskoeffizient
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Texelschaf
U	Unit (Einheit Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UNO	United Nations Organization
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VS	Villnöber Schaf
z.B.	zum Beispiel

*Erst wenn der letzte Baum gefällt,  
der letzte Fisch gefangen,  
der letzte Fluss vergiftet,  
dann werdet ihr merken,  
dass man Geld nicht essen kann.*

*(Weissagung der Cree-Indianer)*

## **1 Einleitung**

Die biologische Vielfalt auf unserem Planeten, die Millionen verschiedener Pflanzen- und Tierspezies sind das Resultat einer Milliarden Jahre dauernden Evolution. Der Mensch ist ein kleiner Bestandteil dieses Lebensnetzes und absolut abhängig davon, denn nur die ihm zur Verfügung stehende Vielfalt an Lebensformen ermöglichte es ihm, sich zu dem zu entwickeln, was er heute ist. Er konnte die Spezies auswählen, die sich für eine Domestikation am Besten eigneten (von 50 000 bekannten Vogel- und Säugetierspezies werden weniger als 30 Spezies für die Landwirtschaft genutzt und weniger als 14 machen über 90 % der weltweiten Nutztierproduktion aus (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 1999). Die dadurch gesicherte Nahrungsquelle ermöglichte es ihm, sesshaft zu werden, was in seiner Entwicklung ein entscheidender Schritt war. Mit der Domestikation der ersten Tiere vor rund 12 000 Jahren begann der Mensch aber auch in zunehmendem Maße, selbst an der Vielfalt auf der Erde zu formen, indem er zahlreiche Kulturpflanzen und die verschiedenen Rassen seiner landwirtschaftlichen Nutztiere schuf. Sie alle waren den unterschiedlichsten klimatischen und geographischen Bedingungen, unter denen sie selektiert wurden, sowie den jeweiligen Produktionsbedingungen optimal angepasst und gaben dem Menschen das Potential, sich auf der ganzen Welt unter teilweise extremsten Bedingungen zu behaupten. Tausende von Jahren war es gerade diese Vielfalt, die dem Menschen das Überleben sicherte, indem er sich den sich ändernden Umweltbedingungen immer wieder anpassen konnte.

Doch mit der Industriellen Revolution der letzten drei Jahrhunderte veränderte sich das Bild unserer Welt so nachhaltig, dass dies auch vor der Landwirtschaft nicht halt machte. Die kommerzielle Produktion von landwirtschaftlichen Produkten forderte mehr Effizienz und Produktivität, was zur Konzentration der Zucht auf einige wenige Leistungsrassen führte. Die neu errungenen Möglichkeiten der Technik wurden dazu genutzt, die Produktionsbedingungen zu vereinheitlichen, und somit konnte die Selektion ausschließlich aufgrund der erbrachten Leistung erfolgen, was zu hochspezialisierten Rassen mit einer ausgesprochen hohen Leistung führte. Diese scheinbar wirtschaftlicheren Leistungsrassen verdrängten in vielen Regionen die alten, herkömmlichen Landrassen, deren Bedeutung keine Beachtung geschenkt wurde. Von den über 5000 Haustierrassen, die der Mensch weltweit hervorgebracht hat, sind nach Schätzungen der FAO (FAO, 1999) bereits 30 % vom Aussterben bedroht und pro Monat gehen etwa sechs Rassen verloren. In Europa ist die Hälfte der Rassen, die Anfang des 20. Jahrhunderts noch existierten, bereits ausgestorben. Von den übriggebliebenen 1500 Rassen laufen 40 % Gefahr, in den nächsten 20 Jahren zu verschwinden. Dieser Trend betrifft aber nicht nur die landwirtschaftlichen Nutztiere und –

pflanzen, es werden weltweit 34 000 Pflanzen- und 5200 Tierspezies als vom Aussterben bedroht angesehen. Und mit ihnen verschwinden ihre Lebensräume, Wälder, Feuchtgebiete, Korallenriffe, um nur einige wenige Beispiele zu nennen, in fortschreitendem Maße durch Ausbeutung, Zerstörung und Verschmutzung. Der Mensch kreiert die größte Auslöschung seit dem natürlichen Untergang der Dinosaurier vor 65 Millionen Jahren (Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2000). Das Problem ist von globalem Ausmaß und die Folgen für die Menschheit sind nicht abzuschätzen. Um diesen Prozess zu stoppen, musste gehandelt werden. Dessen wurde man sich bewusst und die Vereinten Nationen (UNO) bildeten 1989 eine Expertengruppe, die ein „Übereinkommen über die biologische Vielfalt“ („Convention on Biological Diversity“) erarbeitete und 1992 der Umweltkonferenz in Rio de Janeiro vorlegte. Dieses Übereinkommen wurde von 168 Staaten und der Europäischen Union unterzeichnet und seitdem in mehr als 175 Ländern ratifiziert, d.h. in nationales Recht überführt. Eines der Hauptziele dieses Übereinkommens ist es, die biologische Vielfalt auf der Erde zu bewahren und es ist das erste Mal, dass dies als gemeinsames Anliegen der gesamten Menschheit betrachtet wird.

Die österreichische Regierung hat das „Übereinkommen über die biologische Vielfalt“ am 13. Juni 1992 unterzeichnet und am 18. August 1994 ratifiziert. Das Übereinkommen ist für die unterzeichnenden Staaten gesetzlich bindend. Somit sind die Länder zu weiteren Maßnahmen verpflichtet. Innerhalb der EU wird die Erhaltung gefährdeter Rassen durch die Verordnung 2078/92 EWG nachhaltig unterstützt, die finanzielle Beihilfen für die Haltung von Tieren der vom Aussterben bedrohten Rassen gewährt. In Österreich selber wurde bereits im Jahre 1982 der Verein ÖNGENE (Österreichische Nationalvereinigung für Genreserven) gegründet, der sich den Schutz und die Bewahrung der Erbanlagen heimischer Nutzierrassen zum Ziel gesetzt hat. In diese Zeit fällt auch der Beginn der Förderung der Generhaltung in Österreich durch das Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft. So ist die Sonderrichtlinie für das Österreichische Programm zur Förderung einer umweltgerechten, extensiven und den natürlichen Lebensraum schützenden Landwirtschaft (ÖPUL-Richtlinie) das umfassendste Förderungsinstrument für die Landwirtschaft in Österreich, die beim Beitritt zur Europäischen Union von dieser auch genehmigt wurde. Die Förderung im Rahmen des ÖPUL-Programmes ist seither auch für die Förderung der Haltung gefährdeter landwirtschaftlicher Nutztiere zum wichtigsten und am meisten in Anspruch genommenen Instrument geworden (WIESBÖCK, 1998).

Das Kärntner Brillenschaf ist eine der 33 gefährdeten Nutzierrassen in Österreich, die auf der Rassenliste der ÖPUL-2000 stehen, d.h. für die eine Förderung möglich ist. Doch das ist an verschiedene Bedingungen geknüpft und eine wichtige Voraussetzung ist die Durchführung eines Generhaltungsprogramms durch eine verantwortliche Zuchtorganisation. Das Kärntner Brillenschaf ist vor rund 150 Jahren in Südkärnten entstanden und hat eine wechselvolle Geschichte hinter sich (siehe Kapitel 1.1.1). Es konnte durch großes Glück und unermüdliches Engagement vor dem Aussterben bewahrt werden. Der im Jahre 1995 gegründete „Verein der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria“ hat sich der Aufgabe gewidmet, die Kärntner Brillenschafpopulation aus der akuten Gefährdung herauszubringen und die Rasse in ihrem angestammten Lebensraum wieder heimisch zu machen, sowie durch die Vermarktung der Produkte, die Schafrasse wieder in die Wirtschaftlichkeit zu führen. Diese Ziele sollten durch eine Untersuchung der gesamten Brillenschafpopulation in Österreich mit DNA-Mikrosatellitenmarkern dahingehend unterstützt werden, als dass auf der Basis der genetischen Daten die vorhandene genetische Variabilität der Kärntner

Brillenschafe bestimmt und beurteilt werden kann, Abstammungsangaben im Herdbuch überprüft werden können und daraufhin durch gezielte Anpaarungsempfehlungen die Inzuchtsteigerung möglichst gering gehalten werden kann. Das stellt wiederum eine unabdingbare Voraussetzung dar, wenn das oberste Ziel der Erhaltungszucht erreicht werden soll, die genetische Variabilität innerhalb der Rasse maximal zu bewahren. Außerdem können genetische Distanzberechnungen zu anderen Schafrassen deutlich machen, ob und wie einzigartig die genetische Ressource der Kärntner Brillenschafe ist und ihre Erhaltung trotz allem Aufwand zusätzlich rechtfertigen. Wenn durch diese Arbeit dazu beigetragen werden kann, das Kärntner Brillenschaf vor dem Verschwinden zu bewahren und damit ein weiterer winziger Baustein der biologischen Vielfalt auf unserer Erde für zukünftige Generationen erhalten bleibt, so hat sie ihren Zweck erfüllt.

## **1.1 Das Kärntner Brillenschaf damals - heute und in Zukunft?**

### **1.1.1 Die Geschichte des Kärntner Brillenschafes**

Die Schafzucht hatte in Kärnten schon seit jeher eine große Bedeutung, da gerade im Süden des Landes viele Weideflächen für das anspruchsvolle und unbeweglichere Rind nicht geeignet sind. Vor allem in den Kalkalpen (Karnische Hauptkette, Steiner Alpen und den Karawanken), wo steile Hänge und aufgrund der Wasserdurchlässigkeit des Kalkes eine eher karge Vegetation vorherrschen (siehe Bild 2, Seite 7), waren die Schafe für die Bevölkerung eine wichtige Einnahmequelle. Sie deckten mit wenigen Tieren ihren Eigenbedarf an Fleisch und Wolle. Der Export zahlreicher Tiere in das benachbarte Italien, sowie in andere Teile Österreichs wie Salzburg, Tirol oder die Steiermark, war für die Kärntner Schafzüchter jedoch der entscheidende Absatzmarkt. So gingen bereits 1504 nicht weniger als 2359 Schafe aus Kärnten nach Italien, 1774 waren es 922 Schafe und 1775 954 Schafe (ANONYM, 1925). Die zu dieser Zeit in Kärnten üblichen Landschaften entsprachen den in vielen Teilen Europas verbreiteten Zaupelschafen. Dies waren kleine, mischwollige Schafe, die robust und genügsam waren, allerdings nur wenig Fleisch und eine grobe Wolle lieferten.

Man machte sich Gedanken zur Veredelung der wenig geltenden inländischen Schafzucht und da die Wolle im 18. Jahrhundert die wichtigste Nutzungsrichtung der Schafzucht war, suchte man nach Schafen mit einer feineren Wolle. Die spanischen Schafe waren in der Feinheit der Wolle die Vollkommensten, jedoch waren aufgrund von Ausfuhrhindernissen spanische Widder nicht in ausreichender Zahl zu bekommen. England war bekannt für edle Schafe, doch der Streit mit Spanien um den Vorrang in der Zucht der edleren Schafe führte zu einem Ausfuhrverbot für edle Schafe. Auch in Schweden sollten zu dieser Zeit „gute feine Schafe“ vorkommen, doch Schweden war zu weit weg. So blieb denn das benachbarte Italien, das in Apulien aber auch im nahegelegenen paduanischen Gebiet „edle Schafe mit einer sehr feinen zu allen Manufakturen tauglichen Wolle“ besaß (ANONYM, 1775). In der folgenden Zeit wurden also immer wieder Paduaner Böcke, die sogenannten „Seidenschafe“, zur Veredlungskreuzung der einheimischen Landschaft nach Kärnten eingeführt. Das führte im Laufe des 18. Jahrhunderts zu einem neuen, sich von den typischen Landschaften deutlich unterscheidendem Schaftyp, der 1844 erstmals beschrieben wird und 1880 zum ersten Mal als „Seeländer Rasse“ benannt wird (SOHNER, 1929). Der Name bezog sich auf das

hauptsächliche Verbreitungsgebiet um das Dorf Seeland, das nach dem ersten Weltkrieg zum damaligen Jugoslawien gehörte, heute auf slowenischem Staatsgebiet liegt. Diese Schafe, „die im südlichen Kalkgebirge und in den daran anstoßenden Ortschaften angetroffen werden, zeichnen sich durch ihr Gewicht, ihre feine Wolle, besondere Stärke und Munterkeit besonders aus“ (LANDESARCHIV KÄRNTEN, 1844). Die Vorzüge dieser neu entstandenen Schafrasse sprachen sich herum und so breitete sich der Seeländer Schlag von den südlichen Kalkalpen ausgehend in ganz Kärnten, der südlichen Steiermark und letztlich in weiten Teilen Österreichs bis hin ins bayrische Voralpenland aus und wurde immer wieder gerne zur Veredelung minderer Landschaften verwendet. Im Unterschied zu den ebenfalls zur Verfeinerung der Wolle eingeführten Merinoschafen, waren diese Kärntner Schafe nämlich abgehärtet und robust und an das rauhe Klima in den Alpen angepasst. Die Merinozucht wurde in Kärnten bald wieder aufgegeben, da die Tiere mit dem kargen Futter nicht auskamen, den extremen Temperaturen nicht gewachsen waren und sich die hohen Niederschlagsmengen negativ auf die Wolle auswirkten. Das Seeländer Schaf besaß aber neben dem Vorzug der feinen Wolle auch noch ein beachtliches Gewicht. Sie erreichten das Doppelte als die gewöhnlichen Landschaften, jedoch nicht das der Bergamasker, den sogenannten Alpenriesenschafen. Die Bergamasker Schafe aus Oberitalien sollen die weitaus größte europäische Schafrasse gewesen sein (SAMBRAUS, 1999). Nichtsdestotrotz waren die Kärntner Schafe als Schlachtware außerordentlich begehrt und sie waren beweglich und robust genug, um von den Alpweiden weg zu Fuß bis nach Paris auf den Markt getrieben zu werden (SOHNER, 1929). So wurden bis ins 20. Jahrhundert hinein jährlich an die 30 000 Kärntner Schafe nach Frankreich und etwa 14 000 in die Schweiz verkauft (<http://www.brillenschafe.org/>). Die Erhöhung der Einfuhrzölle für lebende Schafe gegen Ende des 19. Jahrhunderts erschwerte den Absatz der Weideschafe im Ausland und führte zusammen mit der starken Konkurrenzsituation in der Wollproduktion durch billige Wolle aus Übersee zum großen Rückgang der Schafzucht vom Jahre 1869 bis 1910 (SOHNER, 1929). Man versuchte als Verbesserungsmaßnahmen die Einkreuzung von Original-Bergamasker Riesenschafen, um die Fleischleistung noch zu steigern, doch die dadurch erfolgte Vergrößerung der Wolle war bei den Züchtern nicht erwünscht. Anfang des 20. Jahrhunderts bemühte man sich, durch Prämierungen von Zuchtschafen das Interesse an der Schafzucht wachzuhalten (SAMBRAUS, 1999). Vor allem die Fleischleistung und deren Verbesserung wurde in den Vordergrund gestellt. Dazu führte man britische Fleischschafe ein und versuchte eine Veredelung und Verbesserung der Fleischleistung der einheimischen Schafe durch Kreuzungen zu erreichen. Dieses Vorgehen sollte aber nur lokale Bedeutung erlangen, denn zu dieser Zeit hatte sich das Kärntner Schaf in weiten Teilen Kärntens bereits durchgesetzt und wurde auch außerhalb des Zuchtgebietes zur Verbesserung der Schafzucht herangezogen.

Ab 1911 führte ein erhöhter Fleischbedarf der Bevölkerung zu einer Preissteigerung der Schafe und die Schafhaltung wurde wieder rentabel. Während des Ersten Weltkriegs und in der Zeit danach erfreute sich gerade das Kärntner Schaf in ganz Österreich großer Beliebtheit, weil es gute Wolle lieferte, eine ausgesprochen hohe Schlachtausbeute erzielte und dabei noch fruchtbar und genügsam war. In Kärnten passte man sich dieser Situation mit ihren guten Absatzmöglichkeiten an. Im Jahre 1923 erreichte die Schafhaltung dort ihren Höhepunkt (SOHNER, 1929). Zu dieser Zeit gab es zwar schon einen einheitlichen Typ des Kärntner Schafes, jedoch herrschte eine wirre Vielfalt an Bezeichnungen, die meist nur lokale Bedeutung hatten. So gab es Seeländer, Uggowitzer, Canaltaler, Gurktaler, Bleiburger oder

Petzener, jedes Tal schien seine eigenen Schafe zu haben. Nach dem Ersten Weltkrieg wurde dann der Vorschlag gemacht, alle diese gleichartigen Schafe gemeinsam als „Kärntner“ zu bezeichnen und diesen Namen auch außerhalb Kärntens für Schafe zu verwenden, die die typischen Merkmale besaßen und von diesen abstammten (STAMPFL, 1921). Das typische Kärntner Schaf wird dann im Jahre 1929 von SOHNER wie folgt beschrieben:

Das Kärntner Schaf besitzt einen gut entwickelten, wohlgeformten Körper und erreicht Durchschnittsgewichte bis zu 80 kg für Widder und bis 70 kg für Mutterschafe, der Kopf ist äußerst schmal, hornlos und deutlich geramst, d.h. die Nasenpartie ist stark hervorgewölbt. Ein weiteres wichtiges Rassemerkmal ist das Hängeohr, das relativ lang und breit ist. Die Farbe des Kopfes beschreibt er als gelblichweiß mit eventuell einem Stich ins Rötliche und mehr oder wenig stark ausgeprägten schwarzen Abzeichen, die vielfach allein auf das Auge und die Tränenbeingegegend beschränkt sind und das Auge einrahmen (Brillenzeichnung) oder auch auf den Ohren als einzelne Flecken auftreten, öfters jedoch von der Spitze beginnend, ein bis zwei Drittel des ganzen Ohres einnehmen und schließlich noch schwarze Einfassungen des Males. Schwarze Tiere, die in geringerer Zahl vorkommen, zeigen einen ganz schwarzen Kopf mit weißen Abzeichen (z.B. weißer Schopf). Das Kärntner Schaf ist eine besonders großwüchsige Rasse, die in der Längenentwicklung des Körpers nicht weit hinter den englischen Fleischrassen zurückbleibt. Die Rippen sind gut gewölbt, was er als Zeichen von Mastfähigkeit anspricht. So kommt der Wolle dieser Schafe auch fast keine Bedeutung mehr zu, das Kärntner Schaf wird hier als ausgesprochenes Fleischschaf dargestellt. Hinzu kommen kräftig entwickelte Beine und die Tiere sind ziemlich hochgestellt, was sie zu großen Steigleistungen auf den unwegsamen Schafalpen befähigt (siehe Bilder 1 und 2). SOHNER kommt zu dem Schluss, dass aufgrund des Körperbaues das Kärntner Schaf dem einheimischen langsam gänzlich verschwindenden Landschaft an Leistungsfähigkeit durchaus überlegen ist, ohne selbst viel größere Ansprüche zu stellen als das primitive Landschaft selbst. Die Kärntner Schafe waren robust und widerstandsfähig, wenig krankheitsanfällig und ausgesprochen wetterfest, was sie zu einer vorzüglichen Gebirgsrasse machte und nebenbei produzierten sie ein schmackhaftes, feinfaseriges, zartes Fleisch, das weit über die Grenzen hinaus bekannt war und zu der großen Beliebtheit dieser Rasse beitrug. SOHNER schließt seine „Studien über das Kärntner Schaf“ 1929 mit der Prognose: „Speziell das Kärntner Schaf, das im Gebirge und im einfachen Betrieb allen anderen Rassen durchaus überlegen ist und bei entsprechender Haltung und Fütterung außerordentlich leistungsfähig ist und wertvolle Produkte liefert, dürfte zu den wenigen Rassen gehören, die ihre Daseinsberechtigung noch viele Jahrzehnte hindurch behaupten werden.“

Doch auch er konnte nicht ahnen, was sich in den folgenden Jahrzehnten ereignen sollte. Im Deutschen Reich kam es auch in der Tierzucht zu einer „Rassebereinigung“. Die Vielzahl an Schafrassen wurde als hemmend für den züchterischen Fortschritt angesehen und so wurden 1939 alle Bergschafrassen zum „Deutschen Bergschaf“ zusammengefasst (DIENER, 1939). Als Rasseziel wurde ab sofort der Typ der Bergamasker und Kärntner Schafe angestrebt, die als ein und dasselbe angesprochen wurden, mit dem einzigen Unterschied, dass die Bergamasker „stets reinweiß“ waren. Sie waren nach damaliger Ansicht die wirtschaftlichsten Bergschafe und als Zuchtziel wurde eine schlichte weiße Wolle gefordert, es wurde jedoch vorläufig noch schwarze Wolle gestattet, da sie in der bäuerlichen Selbstverarbeitung dem Garn die gewünschte graue Naturfarbe gab. In Wirklichkeit war das Kärntner Schaf im Rahmen, in der Kopfform, der Zeichnung und der Wollqualität etwas völlig anderes als das Bergschaf, doch typische Kärntner Böcke wurden nun nicht mehr angekört und in den

folgenden Jahren kam es zu einer regelrechten Verdrängungszucht mit reinweißen Bergamaskerwiddern. In Österreich galt die Rasse bald als ausgestorben. Nur gelegentlich meldeten aus Beständen weißer Bergschafe Einzeltiere mit schwarzen Ohrspitzen und „Brillen“ um die Augen heraus (SAMBRAUS, 1999). Hinzu kam, dass die Schafzucht in Kärnten insgesamt stark zurückging. Wurden um 1900 in der Marktgemeinde Eisenkappel-Vellach noch 2730 Schafe gezählt, so waren es im Jahre 1962 nur noch 147 Stück (ANONYM, 1968). Die Gründe dafür waren zum einen ein akuter Arbeitskräftemangel durch die Weltkriege und das Abwandern der jungen Leute in die Städte, eine starke Förderung der Rinderzucht, die dem erhöhten Bedarf an Fleisch schneller nachkam und große Verluste durch Bären, die das Weiden der wenigen verbliebenen Schafe noch unrentabler machten (JASBINSCHKEK, 2001). Bis in die Mitte der 50er Jahre fand auch ein Austausch von Tieren mit den benachbarten Tälern im heutigen Slowenien statt, was durch den „Eisernen Vorhang“ mehr und mehr erschwert bis unmöglich wurde. Somit fiel auch dieser Anreiz weg und bis auf wenige Einzeltiere schien die große Ära des Kärntner Schafes Vergangenheit zu sein. In Bayern geschah die Tilgung mit geringerem Nachdruck. Es wurden auch hier keine Böcke mehr gekört, die nicht dem neuen Rasseziel entsprachen, was im Grunde das Ende der Rasse auch in diesem Teil des Reiches hätte bedeuten müssen (SAMBRAUS, 1999). Doch einige kleine Zuchtinseln hielten sich, denen jedoch prophezeit wurde, dass sie „in absehbarer Zeit ohnedies durch den Bergamasker verdrängt werden“ (DIENER, 1973).

Es kam glücklicherweise anders, denn in den 80er Jahren wurde man sich der Bedeutung und der Gefährdung alter Nutzierrassen zunehmend bewusst. In Bayern fand man 1983 noch etwa 150 bis 200 Brillenschafe, die Rasse galt als in Auflösung begriffen (SAMBRAUS, 1999). Auf einer Sonderschau zur „Erhaltung gefährdeter Nutzierrassen“ im Rahmen der Internationalen Grünen Woche in Berlin 1984 fanden diese auffallend gezeichneten Schafe jedoch großen Anklang. In ganz Deutschland fanden sich Interessenten und die Erhaltung dieser Schafe wurde gezielt gefördert. Auch in Österreich wurde man aufmerksam und ging gezielt auf die Suche nach Restbeständen dieser alten Kärntner Rasse. 17 weibliche und 6 männliche Tiere konnten ausfindig gemacht werden und mit ihnen begann man die mühsame Erhaltungszucht. Es wurden mehrfach Tiere aus Deutschland nach Österreich gebracht, um zu starke Inzucht zu vermeiden. Da sich aber die Bayrischen Brillenschafe im Laufe der jahrzehntelangen Isolation von ihren ursprünglichen „Stammeltern“ in Kärnten in eine andere Richtung entwickelt hatten, war man bestrebt, die österreichische Population möglichst nach dem Vorbild des alten „Seeländer Schafes“ mit allen seinen in alten Zeiten so begehrten Vorzügen zu erhalten und ging gezielt im Ursprungsgebiet dieser Rasse, in Seeland, im heutigen Slowenien auf die Suche. Unter den schwierigsten Umständen konnte man wenige Einzeltiere finden und 1990 gelang der erste Import eines Widders, dem 1992 ein weiterer Bock und 5 weibliche Tiere folgten (JASBINSCHKEK, 2001). So wurden 1992 schon wieder 150 Kärntner Brillenschafe in Österreich gezählt und Anfang 2000 waren es bereits 100 Widder aus 7 Linien und etwa 900 weibliche Tiere aus 21 Linien (VEREIN DER KÄRNTNER BRILLENSCHAFZÜCHTER ALPEN-ADRIA, 2000). Die engagierten Züchter haben im Dezember 1995 einen eigenen „Verein der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria“ mit Sitz in Ferlach gegründet und schon seit 1992 wird ein zentrales Herdbuch mit Hilfe der EDV geführt. Sie haben sich zum Ziel gesetzt, das Kärntner Brillenschaf wieder zu einem festen Bestandteil des landwirtschaftlichen Lebens in Kärnten zu machen und mit ihm eine wertvolle Tradition dieser Region zu bewahren.



**Bild 1:** Kärntner Schafe um 1950



**Bild 2:** Kärntner Schafe auf typischer Schafalpe (um 1950)



**Bild 3:** Kärntner Brillenschafbock im Jahre 2001



**Bild 4:** Typisches Kärntner Brillenschaf (2001)



Märkten vertreten sind. Der Verein finanziert seine Aktivitäten ausschließlich durch die Vermarktung der Produkte des Brillenschafes, durch Spenden, Projekte und Patenschaften. Es gibt mittlerweile eine beachtliche Anzahl an „Brillenschaf-Werbeprodukten“, wie T- und Sweat-Shirts, Regenschirme, Mützen, Tragetaschen, Uhren, Schlüsselanhänger und Aufkleber, die das Brillenschaf-Logo tragen und auf diese Weise dafür sorgen, dass das Kärntner Brillenschaf immer bekannter wird. Denn je mehr Leute diese Schafe in ihr Herz schließen, desto mehr Unterstützung gibt es bei der wichtigen Aufgabe, diese Rasse zu erhalten. So hat sich der deutsche Optiker Günther Fielmann, der selber ökologische Landwirtschaft auf seinen mittlerweile vier Höfen in Norddeutschland betreibt, für die Brillenschafe begeistern können und hält eine beachtliche Herde Kärntner Brillenschafe und andere alte Haustierrassen auf seinen Gütern. Er hat dem Verein mit einer großzügigen finanziellen Unterstützung die umfangreiche Genotypenanalyse erst ermöglicht.

### **1.1.3 Warum gerade Kärntner Brillenschafe für die Zukunft?**

Ein erster Erfolg der Brillenschafzüchter ist es, dass die Kärntner Brillenschafe nicht mehr akut vom Aussterben bedroht sind. Sie sollen aber auch in Zukunft ihren berechtigten Platz in der Landwirtschaft einnehmen. Und dafür gibt es mehr Gründe, als nur die Liebhaberei einiger enthusiastischer Züchter. Zum einen genetische, aber auch sozioökonomische, kulturelle und ökologische Aspekte, die nicht unbeachtet bleiben dürfen.

Jede Rasse ist das Produkt von zufälligen genetischen Veränderungen, wie Mutationen und genetischer Drift, genauso wie von Anpassung und Entwicklung unter den verschiedensten Einflüssen, wie Klima, endemischen Parasiten und Krankheiten, verfügbarem Futter und letztlich den Selektionskriterien des Menschen, die oft über viele Jahrhunderte auf sie einwirkten und sie formten. Jede Rasse ist somit eine einzigartige Kombination an Genen (FAO, 1998). Gehen Rassen verloren, so gehen mit ihnen wertvolle Gene verloren, die vielleicht nicht heute, aber in naher Zukunft von großer Bedeutung sein könnten, aber einmal verschwunden, unwiederbringlich sind. Das Potential des Menschen, sich an sich ändernde Marktbedingungen, Verbrauchervünsche oder Umweltbedingungen anzupassen, wird eingeschränkt. Landrassen werden meist, ohne an Produktivität zu verlieren, sehr extensiv gehalten. Sie könnten bald zunehmend an Bedeutung gewinnen, um der immer weiter verbreiteten Forderung der Verbraucher nach artgerechter und ökologischer Nutztierproduktion nachzukommen. Neue Erkenntnisse über die menschliche Ernährung können zu einer veränderten Wertschätzung der tierischen Produkte führen. In der Auseinandersetzung mit Fertigprodukten und Ersatzstoffen der Industrie muss die tierische Produktion stets flexibel sein, um konkurrenzfähig bleiben zu können. Es treten auch immer wieder neue unbekannte Krankheiten auf, gegen die einzelne Rassen verschieden resistent sind. Gerade bei Schafen werden die Landrassen bei gleicher Haltung wesentlich weniger von Parasiten befallen als die Hochleistungsrassen (SAMBRAUS, 1999). Auf der ganzen Welt sind molekulare Genetiker auf der Suche nach Genen, die die Produktivität, die Qualität der Produkte, die Gesundheit und die Reproduktion der Tiere beeinflussen (OLDENBROEK, 1999). Ihnen sollten möglichst viele Rassen als Untersuchungsmaterial auch in Zukunft zur Verfügung stehen. Denn die seltenen Rassen sind im allgemeinen am wenigsten untersucht und sind vielleicht unbekannterweise Träger von Genen oder Genkombinationen, die einmal von entscheidender Bedeutung sein könnten. Das Einkreuzen von genetisch entfernten

Landrassen in meist sehr ingezüchtete Leistungsrassen kann schon durch den dadurch erlangten Heterosis-Effekt, die völlig neue Kombination von Genen, zu einer beachtenswerten Leistungssteigerung führen. Die Untersuchung von Krankheitsresistenz und -anfälligkeit verschiedener Rassen hilft oft, die zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen und verbesserte Behandlungsmaßnahmen der Krankheit zu entwickeln (FAO, 1998).

Sozioökonomisch betrachtet sind diese an eine bestimmte Landschaft optimal angepassten Rassen für die dort lebende Bevölkerung meist eine wichtige Einnahmequelle. Die Gegebenheiten der Landschaft machen die Haltung einer Hochleistungsrasse oft unmöglich oder unwirtschaftlich, da ein zu großer Aufwand nötig wäre, um diese Tiere zu erhalten. Ganz spezielle lokale Produkte der Landrassen können bei entsprechender Vermarktung zu einer Spezialität werden und zu einem höheren Preis verkauft werden und so die geringere Produktivität ausgleichen. Das Fleisch der Kärntner Brillenschafe ist als Spezialität beispielsweise so gefragt, dass die Züchter mit der Lämmerproduktion momentan nicht nachkommen (JASBINSCHKEK, 2001).

Neben diesen wirtschaftlichen Gesichtspunkten sind die regionalen Rassen für die Bevölkerung aber auch von kultureller und historischer Bedeutung. Die Menschen identifizieren sich oft über die Tiere, mit denen sie aufgewachsen sind, mit ihrer Heimat. Die Landrassen wurden von den Menschen in diesen Regionen über Jahrhunderte geschaffen, sie haben seit jeher das Leben dieser Menschen bestimmt und sind erhaltenswertes Kulturgut, wie Kunstwerke, Denkmäler oder bedeutende Gebäude. Viele Sitten und Bräuche sind an eine bestimmte Rasse gebunden und oft sind diese Tiere ein zentraler Bestandteil regionaler Feste und Aktivitäten. Doch nicht nur die einheimische Bevölkerung hängt an diesen Traditionen, auch Touristen erwarten in den Landschaften, die sie besuchen, die gewohnten Rassen und ihre Produkte. Gerade Regionen, die auf den Tourismus angewiesen sind, können die oft sehr attraktiven autochthonen Rassen gezielt als Werbemittel einsetzen. Das Kärntner Brillenschaf wirbt bereits für die Region Rosental in zahlreichen Werbeprospekten.

Und so wie diese Landrassen von der Landschaft, in der sie entstanden sind, geprägt wurden, so haben sie im Gegenzuge auch entscheidend an der Entstehung von sogenannten Kulturlandschaften mitgewirkt. Die bei den Touristen so beliebten Almen in den Alpen sind keineswegs natürliche Landschaften. Sie sind in jahrhundertelanger Bewirtschaftung durch die Bergbauern und ihre lokalen Rassen erst entstanden und erhalten worden. In Kärnten sind in den letzten Jahrzehnten viele Almen aufgegeben worden, weil die Bewirtschaftung unrentabel wurde oder es keinen Nachwuchs in der Bauernfamilie gab, der sich dieser Aufgabe widmete. Und innerhalb kürzester Zeit wucherten diese Flächen mit Büschen und Bäumen zu und wurden für die weitere landwirtschaftliche Nutzung unbrauchbar (JASBINSCHKEK, 2001). Die allseits bekannte einmalige Lüneburger Heide in Norddeutschland ist ein weiteres Beispiel für die wichtige Aufgabe der Landschaftsrassen in der Landschaftspflege. Ohne die speziell an diese Bedingungen angepassten Heidschnucken und ihre Fressgewohnheiten, würde diese Landschaft in kürzester Zeit verbuschen und verwalden, und ihr charakteristisches Aussehen verlieren. Damit wäre eine attraktive Einnahmequelle dieser Region durch den Tourismus verloren. Die Erhaltung dieser einzigartigen vom Menschen und seinen Tieren geschaffenen Landschaften gehört genauso zu unserer Verantwortung den nachfolgenden Generationen gegenüber wie die der dazugehörigen Haustierrassen.

Das Kärntner Brillenschaf ist ein Relikt aus alter Zeit, das unseren Kindern und den zukünftigen Generationen unsere Kultur und Traditionen, die jahrhundertlang von unseren

Haustieren geprägt waren, in lebendiger Weise nahe bringt. Zusätzlich kann es auch in heutiger Zeit zum Wirtschaftsfaktor seiner Heimat werden, durch die speziellen Produkte, als Touristenanziehungspunkt und in der Landschaftspflege. Global betrachtet stellt es eine wertvolle Genreserve dar, die als Bestandteil der biologischen Vielfalt auf unserer Erde nicht verloren gehen darf.

## **1.2 DNA-Mikrosatelliten**

Jedes Individuum ist durch sein Genom unverwechselbar charakterisiert, was an der großen Variabilität des Genoms liegt. Keine zwei Individuen (außer eineiige Zwillinge) haben identische Genome. Für Proteine kodierende Bereiche weisen aber nur eine geringe Mutationsrate auf, für die Bewahrung der Funktionalität der lebenswichtigen Proteine ist das eine wichtige Voraussetzung. Für die Variabilität entscheidend sind die nicht kodierenden Bereiche und dort befinden sich auch die meisten der bisher untersuchten DNA-Mikrosatelliten (DNA-MS). DNA-MS, manchmal auch als „short tandem repeat“ (STR) Marker bezeichnet, sind kurze Sequenzabschnitte des Genoms, die aus sich wiederholenden Grundmotiven von zwei bis fünf Basenpaaren (bp), den Wiederholungseinheiten (repeats), bestehen (TAUTZ & RENZ, 1984; LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989). Je nach der Anzahl der bp im Grundmotiv unterscheidet man Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotid-MS. Sie kommen in großer Anzahl in allen bisher untersuchten Organismen vor und sind über das gesamte Genom verteilt, was sie für Genom-Kartierungs-Projekte sehr nützlich macht (SCHLÖTTERER, 1998). In Säugetieren zum Beispiel schätzt man, dass das Grundmotiv GA/AC im Mittel alle 30 kb auftritt (SCHLÖTTERER, 1998). So sind auch für alle wichtigen Nutz- und Haustierarten bereits eine große Anzahl an MS-Markern verfügbar; für das Schaf wurden über 300 Genbankeinträge gefunden (ACHMANN et al., 2000). Doch neben der zahlenmäßig hohen Verfügbarkeit, macht sie vor allem ihre ausgeprägte Variabilität zu einem der am meisten verwendeten Markersystemen. MS sind polymorph, d.h. normalerweise lassen sich in einer Population für einen bestimmten Genort (Locus) eine ganze Reihe von Allelen nachweisen. Im Mittel werden bei Säugetieren pro Locus etwa acht verschiedene Allele gefunden (DE WOODY & AVISE, 2000). Die unterschiedlichen Allele kommen durch eine unterschiedliche Anzahl an Wiederholungseinheiten zustande (z.B. (CA)<sub>15</sub>, (CA)<sub>17</sub>). Das repetitive Muster begünstigt Mutationen und ist eine der Ursachen für den hohen Polymorphismus der MS. Über den Mutationsmechanismus wurde lange Zeit debattiert (LEVINSON & GUTMAN, 1987; SCHLÖTTERER & TAUTZ, 1992; RICHARDS & SUTHERLAND, 1994), doch inzwischen ist man davon überzeugt, dass der Hauptmechanismus, der zu den verschiedenen Längenvarianten führt, Fehlpaarungen durch Strangverschiebungen („slipped-strand mispairing“) während der DNA-Replikation darstellen. Über spezifische Primer, die in den flankierenden Sequenzen des jeweiligen MS lokalisiert sind, lassen sich diese Längenpolymorphismen mittels PCR amplifizieren und nach hochauflösender Elektrophorese entsprechend den Unterschieden in der Repeatzahl als verschieden lange DNA-Fragmente darstellen. Bei entsprechender Auswahl können mit mehreren spezifischen Primerpaaren in einem PCR-Ansatz (Multiplex-PCR) ebenso viele MS-Marker amplifiziert werden. Das macht die Analyse vieler verschiedener Loci arbeits-, zeit- und kostengünstiger. Werden fluoreszenzmarkierte Primer zur Amplifikation der MS eingesetzt, können die Fragmente mittels Laserlicht-Detektion z.B. kapillarelektrophoretisch

analysiert werden. Dadurch wird die MS-Analyse automatisierbar, was einen maximalen Probendurchsatz in kurzer Zeit ermöglicht, wie es vor allem für Routineuntersuchungen gefordert wird (ACHMANN et al., 2000). MS lassen sich also mit relativ einfachen molekulargenetischen Methoden untersuchen, zusätzlich werden an das benötigte Probenmaterial nur geringe Anforderungen gestellt. Es genügen geringe Mengen von Blut, Gewebe, Haarwurzeln oder Speichel zur DNA-Isolation. Diese Vorzüge verbunden mit der bereits erwähnten hohen Variabilität und Verfügbarkeit haben dazu geführt, dass MS in den letzten Jahren die früher weit verbreiteten Blutgruppen- und biochemischen Marker in vielen Anwendungsbereichen abgelöst haben. So gelten sie heute als das Markersystem der Wahl für viele genetische Fragestellungen, wie beispielsweise in der Forensik, bei Abstammungsüberprüfungen, Genom-Kartierung und phylogenetischen Studien bis hin zur Populationsgenetik. MS eignen sich hervorragend zur Untersuchung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen Rassen, sowie zur Ermittlung der genetischen Diversität innerhalb einer Rasse (BUCHANAN et al., 1994; MAC HUGH et al., 1998; ARRANZ et al., 1998; SAITBEKOVA et al., 1999; DIEZ-TASCÓN et al., 2000; CAÑON et al., 2000).

### **1.2.1 Abstammungsüberprüfung mit Hilfe von DNA-Mikrosatelliten**

In der Tierzucht hat die Kenntnis der Abstammung eines Tieres eine grundlegende Bedeutung, denn zur Feststellung des Zuchtwertes, aber auch des Handelswertes eines Tieres spielt die gesicherte Zuordnung von Eltern und Nachkommen eine Hauptrolle. Ist die Abstammung ungewiss, ist der erbliche Einfluss von Elterntieren auf ihre Nachkommen nicht feststellbar und der Zuchtfortschritt einer Rasse erheblich gehemmt. Diese erblichen Einflüsse betreffen sowohl das Leistungsvermögen als auch die Erbgesundheit der Folgegeneration. Modellrechnungen haben gezeigt, dass Fehl Abstammungen Schätzwerte für die Heritabilität von Leistungsmerkmalen, den Zuchtwert eines Tieres und somit auch den Zuchtfortschritt beträchtlich beeinflussen (GELDERMANN et al., 1986; ISRAEL & WELLER, 2000). Der Anteil fehlerhaft dokumentierter Abstammungen in Zuchtbüchern ist bei Nutztieren zum Teil beachtlich. Bei Rindern wird der Anteil an Kälbern mit falscher Abstammung, je nach Untersuchung, auf 2,9 % bis 23 % geschätzt (GELDERMANN et al., 1986, RON et al., 1996). Ähnlich hohe Werte von 10 % bis 20 % werden für Schweine angegeben (JUNEJA & VÖGELI, 1998). Im Jahr 1999 wurden im Verlauf von Abstammungskontrollen bei österreichischen Schafen rund 14 % der angegebenen Abstammungen als falsch nachgewiesen (ACHMANN et al., 2000). Die Ursachen für falsche Abstammungsangaben sind vielfältig und reichen von Irrtümern bei der Zuordnung von Eltern und Nachkommen, über Fehler bei der künstlichen Besamung bis zu bewussten Falschangaben über verwandtschaftliche Beziehungen. Der relativ hohe Anteil an nachgewiesenen Fehl Abstammungen bei verschiedenen Nutztierarten macht deutlich, wie notwendig neben einer formalen Dokumentation der Abstammung im Zuchtbuch, Herdebuch oder Zuchtregister eine unabhängige Überprüfung der Eintragungen ist. Und gerade in einer Population, wie einer gefährdeten Nutztier rasse, in der es darauf ankommt, die genetische Variabilität so breit wie möglich zu erhalten, kann nur mit abgesicherten Verwandtschaftsverhältnissen eine Anpaarung nahe verwandter Tiere vermieden werden und somit die Inzuchtsteigerung minimiert werden.

Das Grundprinzip der biologischen Abstammungskontrolle besteht darin, an einer größeren Anzahl von polymorphen Marker-Loci die Allele bei Eltern und Nachkommen festzustellen. Da autosomale DNA-MS kodominant vererbt werden, sind sie ideal zur Abstammungskontrolle geeignet, da der Nachkomme an jedem Locus ein Allel von der Mutter erbt und das andere vom Vater. Bei Säugetieren kann das Muttertier in der Regel sicher angegeben werden und meist stellt sich das Problem, ob ein bestimmtes männliches Tier als Vater in Frage kommt. Im Prinzip handelt es sich bei der Abstammungssicherung um ein Ausschlussverfahren, denn hat der Nachkomme Allele, die nicht von der Mutter stammen können und beim untersuchten Vater nicht vorhanden sind, so ist die Elternschaft dieses Vätertieres auszuschließen. Die Wahrscheinlichkeit mit der ein falsch angegebener Vater auch als falsch entlarvt wird, die sogenannte Ausschlusswahrscheinlichkeit, kann berechnet werden und hängt von dem verwendeten Testsystem ab, v.a. von der Anzahl und der Variabilität der verwendeten Marker (JAMIESON, 1994; JAMIESON & TAYLOR, 1997). Eine ausreichend hohe Ausschlusswahrscheinlichkeit von über 99 % lässt sich in der Regel mit 10 bis 12 variablen MS-Markern erreichen (ACHMANN et al., 2000). Je mehr Marker untersucht werden, je größer die Anzahl an Allelen pro Marker ist und je gleichmäßiger diese Allele in der Population verteilt sind, desto größer ist die Sicherheit, mit der eine falsche Abstammung erkannt wird.

Obwohl MS-Marker sich für die Abstammungssicherung als sehr verlässlich und effektiv erwiesen haben, so gibt es doch auch einige Besonderheiten, die zu Problemen bei der Interpretation der Daten führen können. So kann es beispielsweise bei einzelnen Individuen durch Mutationen (Substitutionen, Insertionen, Deletionen) in den Primerbindungsstellen dazu kommen, dass die Amplifikation bestimmter MS-Allele beeinflusst wird. Je nachdem, an welcher Position der Primerbindungsstelle die Mutation auftritt, wird das betreffende Allel entweder gar nicht (Nullallel) oder mit stark verminderter Effizienz amplifiziert (ACHMANN et al., 2001). Beides kann dazu führen, dass eigentlich heterozygote Tiere als homozygot typisiert werden oder aber dass für solche Allele homozygote Tiere dadurch auffallen, dass für diesen Marker kein Genotyp erhalten werden kann. Die schwerwiegendste Folge dieses Genotypisierungsfehlers könnte ein ungerechtfertigter Ausschluss eines tatsächlichen Elterntieres von der Elternschaft sein (PEMBERTON et al., 1995; ACHMANN et al., 2001). Ein Hinweis auf die Existenz eines Nullallels oder eines Allels mit stark verminderter Amplifikation ist das vermehrte Auftreten von Fällen, bei denen nur für einen von mehreren untersuchten Markern ein Ausschluss gefunden werden kann, wobei zusätzlich Elter und Nachkomme für jeweils ein anderes Allel homozygot sind (ACHMANN et al., 2000). Tritt das Nullallel in einer Population mit hoher Frequenz auf, so können als zusätzlicher Hinweis auf das Vorhandensein dieses Problems signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auftreten. Das heißt, in dieser Population werden für den entsprechenden Marker deutlich mehr homozygote Tiere gefunden, als aufgrund der Allelfrequenzen zu erwarten wäre. Marker, die ein Nullallel mit einer derartig hohen Frequenz aufweisen, sollten für die Abstammungssicherung nicht verwendet werden. Alternativ können für solche Marker neue Primer mit einer anderen Zielsequenz definiert werden, mit denen dann die Amplifikation aller Allele möglich ist.

Mutationen können aber auch in der repetitiven Region des MS auftreten und in neuen Allelen mit veränderter Repeatzahl resultieren. Diese Mutationen machen letztlich die hohe Variabilität von DNA-MS aus, denn im Vergleich zu Basensubstitutionen, die mit einer Häufigkeit von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  auftreten, ist die Mutationsrate von MS um ein Vielfaches höher.

Es werden Mutationsraten zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-6}$  pro Locus und Generation beobachtet (SCHLÖTTERER, 1998). Auch diese Mutationen können in der Praxis zum ungerechtfertigten Ausschluss eines Elterntieres von der Elternschaft führen. Diese Fälle stellen sich in der Regel ebenfalls so dar, dass ähnlich wie beim Auftreten eines Nullallels nur für einen Marker ein mit der Elternschaft unvereinbarer Genotyp gefunden wird. Allerdings treten diese Fälle vergleichsweise selten auf. Um Fehlaussagen zu vermeiden, sollte der Nachweis der genetischen Unmöglichkeit der Elternschaft daher generell auf sicheren Ausschlüssen durch mehr als einen Marker beruhen (ACHMANN et al., 2000).

### **1.2.2 Mikrosatelliten für populationsgenetische Fragestellungen**

Das Gebiet der Populationsgenetik befasst sich mit den Mendelschen Gesetzen und anderen genetischen Grundprinzipien und ihren Auswirkungen auf Populationen (HARTL & CLARK, 1997). Als Populationen können verschiedene Paarungs- und Fortpflanzungsgemeinschaften bezeichnet werden. Dabei kann es sich um Menschen, Tiere, Pflanzen oder Mikroorganismen handeln, die Populationen können natürlich, züchterisch oder experimentell zustande kommen. Die Populationsgenetik hat durch die Etablierung neuer molekularer Methoden, v.a. auf DNA-Basis, ungeahnte Möglichkeiten in der Beantwortung von Fragen aus den verschiedensten Disziplinen erhalten. So trägt sie zur Bearbeitung von Problemen in vielfältigen Bereichen bei, wie Evolutionsbiologie, Genetik, Tier- und Pflanzenzüchtung, Landwirtschaft, Ökologie, Erhaltungsbiologie, Medizin, Rechtswissenschaften, Ethik, Soziologie, Anthropologie und Naturschutz.

Das Grundwerkzeug der Populationsgenetik sind die genetischen Variationen innerhalb und zwischen den Populationen, die es zu verstehen und zu beurteilen gilt. Diese genetische Variation ist in den Populationen in Form von verschiedenen Allelen vieler Gene enthalten und als Allelfrequenzen messbar, die das Verhältnis aller definierten Allele in den jeweiligen Populationen wiedergeben. Diese Allelfrequenzen können dann dazu verwendet werden, die genetische Beziehung zwischen den Populationen zu untersuchen. In der Populationsgenetik geht man von verschiedenen evolutionären Kräften aus, die die Unterschiede zwischen den Populationen beeinflussen. Zum einen kommt es durch die zufällige genetische Drift („*random drift*“) in den Populationen zum Verlust unterschiedlicher Allele und zu einer Verschiebung der Allelfrequenzen der Allele, die nicht verloren gehen. Die genetischen Unterschiede zwischen Populationen, die voneinander isoliert sind, werden durch die zufällige genetische Drift immer größer, je länger sie voneinander getrennt sind. Zusätzlich treten immer wieder *Mutationen* auf, die ebenfalls die genetische Differenzierung der Populationen erhöhen, da in jeder Population andere Mutationen auftreten und somit zu Unterschieden zwischen den Populationen führen. Da es aber in der Regel selten zu Mutationen kommt, ist dieser Einfluss erst entscheidend, wenn viele Generationen vergangen sind, seit die Populationen getrennt sind, also eine lange Divergenzzeit vorliegt, wie es zum Beispiel bei Spezies der Fall ist. Wenn eine *Selektion* stattfindet, sei dies durch natürliche Umstände oder aber züchterisch, so können Allele bevorzugt werden und in variierenden Allelfrequenzen in unterschiedlich selektierten Populationen resultieren, sie können aber auch durch Selektion in die selbe Richtung und dadurch Bevorzugung der selben Allele die eigentliche genetische Beziehung verfälschen. Aus diesem Grund wird selektionsneutralen Markern, wie etwa den Mikrosatelliten für populationsgenetische Studien der Vorzug

gegeben. Denn wenn zwei Populationen betrachtet werden, die von einer Ursprungspopulation abstammen, dann ist der Unterschied der Allelfrequenzen für selektionsneutrale Marker ein Maß für die Isolation der betreffenden Populationen voneinander (EDING & LAVAL, 1999). Letztlich spielt gerade bei Rassen die *Migration* (der Austausch von Individuen zwischen den Populationen) eine große Rolle, durch die Allele zwischen den Populationen ausgetauscht werden, was zu einer Verringerung der genetischen Differenzierung führt. Je ähnlicher sich die Allelfrequenzen der untersuchten Populationen sind, desto mehr Austausch findet zwischen ihnen statt (HARTL & CLARK, 1997). Innerhalb der Populationen teilen die Individuen gemeinsame Allele, die gemeinsame Vorfahren haben, die also miteinander verwandt sind. Um Aussagen über nah verwandte Individuen oder Populationen (z.B. Rassen einer Spezies) treffen zu können, ist es von Vorteil, die Informationen vieler verschiedener Allele in Betracht ziehen zu können. Diese Voraussetzung bringen hochvariable MS-Marker mit sich.

Mit Hilfe der Populationsgenetik kann also die genetische Variabilität innerhalb einer Rasse anhand von DNA-MS untersucht werden und mit der genetischen Variabilität anderer Rassen verglichen werden. Zusätzlich können die verwandtschaftlichen Beziehungen der Rassen untereinander geklärt werden. Für eine gefährdete Rasse, wie das Kärntner Brillenschaf, stellt sich ganz besonders die Frage der genetischen Distanz zu anderen Rassen. Denn wenn es eine eigenständige, genetisch differenzierte Rasse darstellt, ist ihre Erhaltung als wertvolle Genreserve zusätzlich gerechtfertigt.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

- Genotypisierung der österreichischen Kärntner Brillenschafpopulation mit 11 DNA-Mikrosatellitenmarkern
- Feststellung der genetischen Variabilität der Kärntner Brillenschafe und Vergleich mit anderen Schafrassen
- Überprüfung der Abstammungsangaben im Herdbuch
- Untersuchung der genetischen Beziehung der Kärntner Brillenschafe zu anderen Schafrassen

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Untersuchte Tiere**

Für die Untersuchung wurden von insgesamt 771 Kärntner Brillenschafen Ohrgewebeproben entnommen. Die Probenentnahme wurde vom „Verein der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria“ durchgeführt. Das geschah in mehreren Etappen im Zeitraum Sommer 1999 bis Winter 2000. Die meisten Tiere stammen aus Kärntner Betrieben. Elf Tiere stammen von Bayrischen Brillenschafzüchtern. Bei diesen 11 Tieren wurde vermutet, dass es sich um Hybride zwischen Bergschafen und Kärntner Brillenschafen handelt. Zusätzlich wurden 184 Villnöber Schafe aus Südtirol auf die gleiche Weise untersucht. Diese Daten dienen als Vergleichspopulation. Die Daten der Schafe anderer Rassen (Bergschaf, Texelschaf), die ebenfalls zu Vergleichszwecken herangezogen wurden, stammen aus der Routinediagnostik des Instituts für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

### **2.2 Probenentnahme**

Die Proben wurden mit dem Probenentnahmesystem TypiFix<sup>®</sup> entnommen. TypiFix<sup>®</sup> wurde von der Firma Agrobiogen (Hilgertshausen, Deutschland) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien entwickelt. Es handelt sich dabei um ein System zur wenig invasiven Entnahme von Gewebe für molekulargenetische Untersuchungen. Dem Tier wird mit einer Zange eine Plastikohrmarke eingezogen und gleichzeitig mittels eines Kegels ein Stück Ohrgewebe ausgestanzt. Somit ist das Tier durch nur einen Arbeitsschritt dauerhaft markiert und gleichzeitig existiert eine Gewebeprobe, die es möglich macht, durch DNA-Analysen das Tier und seine Produkte jederzeit zu identifizieren. Die Gewebeprobe wird direkt in einen Plastikbehälter gepresst und darin konserviert, so dass sie ohne besondere Anforderungen an die Temperatur und beliebig lang aufbewahrt und transportiert werden kann. Der Probenbehälter ist mit der gleichen Nummer bedruckt wie die Ohrmarke des jeweiligen Tieres, so dass eine Verwechslung der Proben ausgeschlossen ist. Die Proben der Kärntner Brillenschafe wurden bis zu ihrer Abgabe an das Institut für Tierzucht und Genetik im Kühlschrank bei 4 °C bis 5 °C aufbewahrt.

### **2.3 Molekulargenetische Methoden und Arbeitsprotokolle**

#### **2.3.1 Isolierung der DNA aus TypiFix<sup>®</sup>-Proben**

Die Probenbehälter wurden aufgeschnitten und der darin befindliche Plastikkegel samt Gewebe in ein 2 ml-Eppendorf-Tube gegeben. Der Großteil der Proben wurde mit einem DNA-Isolierungs-Kit von Macherey-Nagel (NucleoSpin Multi96 Tissue) im 96well-Format nach folgendem Protokoll isoliert:

### 2.3.1.1 Methode NucleoSpin Multi96 Tissue/ MACHEREY-NAGEL

#### Material:

2 ml Eppendorf Tubes  
 Eppendorf-Schüttler  
 Multikanal-Pipetten  
 Zentrifuge, Sigma 4-15C  
 96er Deep-well Blöcke (1,5 ml und 2 ml)  
 NucleoSpin<sup>®</sup> Multi-96 Tissue Platten  
 T1 (Lysispuffer, Kitkomponente)  
 Proteinase K (20 mg/ml)  
 B3 (Bindungspuffer, Kitkomponente)  
 Ethanol absolut (99 %)  
 BW (Waschpuffer, Kitkomponente)  
 B5 (Waschpuffer, Kitkomponente)  
 BE (Elutionspuffer = 5 mM TRIS/HCl, pH 8,5, Kitkomponente)

Durchführung: (nach Kit-Protokoll, modifiziert)

#### **Verdau:**

- Kegel in 2 ml Eppendorf Tubes geben
- 590 µl T1 und 10 µl Proteinase K zu jeder Probe geben
- bei 56 °C über Nacht auf Eppendorf-Schüttler stellen

#### **Isolation:**

- BE auf 70 °C erwärmen
- 205 µl Verdau in 2 ml-96well Platten überführen
- 200 µl B3 mit 8-Kanalpipette dazugeben und 10 min bei 70 °C inkubieren
- kurz abzentrifugieren
- 210 µl Ethanol absolut dazugeben und durch auf- und abpipettieren gut mischen
- kurz abzentrifugieren
- NucleoSpin<sup>®</sup> Multi-96 Tissue Platten in neue 2 ml-96well Platten stecken
- Proben auf NucleoSpin<sup>®</sup>-Platten überführen
- 1 min bei 6000 x g zentrifugieren
- umstecken in neue 1 ml-96well Platten
- 500 µl BW dazugeben und 3 min bei 6000 x g zentrifugieren
- umstecken in neue 1 ml-96well Platten
- 500 µl B5 dazugeben und 3 min bei 6000 x g zentrifugieren
- umstecken
- und nochmal 500 µl B5 dazugeben und 5 min bei 6000 x g zentrifugieren
- Eluat wegkippen und nochmal 3 min zentrifugieren
- in neue 2 ml-96well Platten stecken und Filter 10 min bei 60 °C trocknen
- 100 µl 70 °C warmen BE dazugeben und 1 min bei 6000 x g zentrifugieren
- 100 µl 70 °C warmen BE dazugeben und nochmal 1 min bei 6000 x g zentrifugieren

**Agarosegelkontrolle:**

zur Isolationskontrolle und zur visuellen Konzentrationsschätzung wurde von jeder Platte ein Agarosegel hergestellt

Der Rest des verdauten Gewebes wurde bei -20 °C eingefroren. Die isolierte DNA wurde mit einem Plastikdeckel verschlossen in 2 ml-96well Platten im Kühlschrank (4 °C-5 °C) aufbewahrt.

**2.3.1.2 Methode Extraktion mit NaClO<sub>4</sub>/Chloroform**

Einige Proben wurden einzeln nach folgendem Standardprotokoll (GEMMELL & AKIYAMA, 1996, modifiziert) isoliert:

Material:

Eppendorf Tubes (1,5 ml und 2 ml)  
 Eppendorf-Schüttler  
 Überkopfschüttler  
 Zentrifuge, 5417 R (Eppendorf)  
 T1 (Lysispuffer) (siehe 2.3.1.1)  
 Proteinase K (20 mg/ml)  
 TRIS-HCl (10 mM, pH 8,0)  
 NaClO<sub>4</sub> (5 M)  
 Chloroform  
 Ethanol absolut (99 %)  
 Ethanol (70 %)

Durchführung:**Verdau:**

- Kegel in 2 ml Eppendorf Tubes geben
- 590 µl T1 und 10 µl Proteinase K zu jeder Probe geben
- bei 56 °C über Nacht auf Eppendorf- Schüttler stellen

**Isolation:**

- die Tubes gut vortexen und kurz abzentrifugieren
- 205 µl Verdau in 1,5 ml Eppendorf Tubes geben
- 200 µl 10 mM TRIS-HCl pH 8,0 dazupipettieren
- 200 µl 5 M NaClO<sub>4</sub> dazugeben und mischen
- 600 µl Chloroform unter einem Abzug dazugeben
- 30 min im Überkopfschüttler mischen
- 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- 400 µl des wässrigen Überstandes vorsichtig abpipettieren und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube geben
- 800 µl absoluten Ethanol dazugeben und schwenken, dabei überprüfen, ob die DNA als weißes Präzipitat sichtbar ausfällt

- 30 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abkippen, dabei kontrollieren, ob DNA-Pellet vorhanden ist
- 500 µl Ethanol 70 % zum Pellet geben (Waschvorgang)
- 10 min bei 14000 rpm zentrifugieren
- Ethanol abkippen und Restflüssigkeit vorsichtig abpipettieren
- Pellet an der Luft trocknen lassen
- Pellet in 200 µl 10 mM TRIS-HCl pH 8,0 auflösen, dabei 20 min bei 37 °C schütteln

#### **Agarosegelkontrolle:**

zur Isolationskontrolle und zur visuellen Konzentrationsschätzung wurde ebenfalls ein Agarosegel hergestellt

### **2.3.2 DNA-Quantifizierung mittels Photometer**

Bei einigen der Platten wurde mit einem Spektralphotometer (Spectra MAX 250) die DNA-Konzentration bestimmt. Dabei wird die optische Dichte (OD) der DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) gegen einen Nullwert mit dem verwendeten Aufnahmepuffer (BE) gemessen. Dafür wurden in einer sorgfältig gereinigten 96er-Quarzplatte Verdünnungen der jeweiligen Proben angelegt. Es wurden 50 µl BE in die wells der Quarzplatte vorgelegt, die jeweiligen Leerwerte wurden mit 100 µl BE gefüllt. Dann wurden 50 µl der DNA-Stocklösungen dazupipettiert und durch vorsichtiges Aufziehen und an der Wand ablaufenlassen mit BE gemischt. Dabei sollten keine Luftblasen entstehen. Die so befüllte Platte wurde dann in das Gerät gestellt und sechs Mal gemessen. Aus diesen sechs Messungen berechnet das Gerät den Mittelwert und gibt diesen als Ergebnis an. Die Umrechnung der optischen Dichte (OD) in die DNA-Konzentration der Lösung erfolgte unter Berücksichtigung des Faktors 23, der durch Eichung des Gerätes bestimmt wurde.

Zum Vergleich wurden auch einige Proben einzeln im Spektralphotometer Gene Quant II nachgemessen. Dafür wurden die Verdünnungen in Eppendorf Tubes angelegt. Die Quarzküvette wurde mit BE gefüllt, um den Nullwert einzustellen. Dann wurden die jeweiligen Proben in der Quarzküvette gemessen, die zwischen jeder Probe mit Wasser gespült wurde. Hierbei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren festzustellen, wurde mit dem Photometer auch der Quotient  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  bestimmt. Dieser Quotient sollte optimalerweise zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

### **2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese**

#### Material:

Agarose

0,5 x TBE-Puffer (50 mM TRIS-HCl, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)

Dimidiumbromid (1 mg/ml)

10 x Bromphenolblau-Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 30 % Glycerin, in Wasser gelöst)

DNA-Molekulargewichtsmarker ( $\lambda$ -DNA HindIII Marker, MBI Fermentas, 10 ng/ $\mu$ l)  
Eagle Eye II (Stratagene)

Durchführung:

Um den Erfolg der DNA-Isolation zu kontrollieren und eine semiquantitative Abschätzung der DNA-Menge durchzuführen, wurden die DNA-Proben auf Agarosegele aufgetragen. Dafür wurde ein 0,8 %iges Agarosegel hergestellt. Die Größe des Gels sowie die Anzahl der Geltaschen richteten sich nach der Anzahl der jeweiligen Proben. Die Agarose wurde in TBE gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Unter ständigem Rühren wurde sie auf etwa 60 °C abgekühlt bevor das Dimidiumbromid (4  $\mu$ l/ 50 ml Gel) zugegeben wurde. Das Gel wurde in die Gelkammer gegossen und stehen gelassen, bis es fest war. Um eine Diffusion der Proben aus den Geltaschen zu verhindern, bzw. den Verlauf der Elektrophorese beobachten zu können, wurden die Proben vor dem Laden mit Bromphenolblau-Ladepuffer (BPB) vermischt (Endkonzentration 1 x BPB). Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer in die Gelkammer gefüllt. Dann wurde eine elektrische Spannung von etwa 120 V angelegt. Nach 10 bis 15 min wurde das Ergebnis der Elektrophorese im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die aufgetragene DNA-Menge konnte nun anhand einer flankierend mitaufgetragenen definierten Menge an  $\lambda$ -DNA (50 ng bzw. 20 ng) abgeschätzt werden.

### **2.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die PCR ist ein molekulargenetisches Verfahren zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten. Die jeweiligen Primerpaare bestimmen dabei den Abschnitt des Genoms, der vervielfältigt werden soll. Die PCR-Bedingungen hängen von den Primersequenzen ab, die bei einer bestimmten Temperatur am besten „annealen“, was entscheidend ist, wenn eine optimale Ausbeute erreicht werden soll. Um den Arbeits- und Kostenaufwand zu reduzieren, setzt man nach Möglichkeit mehrere Primerpaare gemeinsam in einer PCR ein (Multiplex-PCR). Dabei müssen die Bedingungen so gewählt werden, dass alle Amplifikationsprodukte in ausreichender Menge und optimalerweise in etwa gleicher Menge erhalten werden.

Für diese Untersuchung standen 2 Multiplex-Sets zur Verfügung, mit denen insgesamt 11 autosomale DNA-Mikrosatellitenmarker amplifiziert werden konnten. Die Marker stammen aus einer Empfehlung des „International Society of Animal Genetics (ISAG) Sheep and Goat Comparison Test 1998“ (siehe Tab.1). Einer der jeweiligen Primer wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert („gelabelt“), wodurch eine lasergestützte Detektion der PCR-Produkte ermöglicht wird. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe der 11 Primerpaare sind in Tabelle 6 aufgeführt. Um die Auswertung zu erleichtern, wurden einige Primer „getailt“, d.h. es wurden für die Zielsequenz unspezifische Nukleotide angehängt. Dadurch wird die Adenylierung des 3'-Endes durch die Taq-Polymerase auf nahezu 100 % gefördert und somit die Auswertung vereinheitlicht (BROWNSTEIN et al., 1996).

**Tab. 1:** Untersuchte DNA-Mikrosatellitenmarker

Locus	Herkunft	Genebank- Accession-Nr.	Primer A	Primer B
McM42	Schaf	L34281	* catctttcaaaagaactccgaaagtg	cttggaatccttcttaactttcgg
TGLA53	Rind	-----	* gctttcagaatagttgcattca	atcttcacatgatattacagcaga
OarFCB20	Schaf	L20004	* ggaaaacccccatatatactatac	aaatgtgttaagattccatacatgtg
INRA49	Rind	X71588	<u>gttt</u> gtattagttgttctttggc	* ttccacaatcacacaggcca
MAF65	Schaf	M67437	* aaaggccagagatgcaattaggag	ccactcctctgagaatataacatg
McM527	Schaf	L34277	* gtccattgcctcaaatcaattc	aaaccactgactactccccaa
OarCP49	Schaf	U15702	* acagacacggcttagcaactaac	<u>gttt</u> gtgggatgaatattcctcataag
OarAE119	Schaf	L11050	* ctgagcaaatggtctgggcacc	<u>gttt</u> atagtgggtgaccacttgatg
HSC	Schaf	M90759/M33306	* ctgccaatgcagagacacaaga	gtctgtctctgtcttctgcatc
MAF214	Schaf	M88160	*aatgcaggagatctgaggcaggacg	gggtgatcttagggaggtttggagg
OarFCB11	Schaf	L01531	* gcaagcaggttctttaccactagcacc	ggcctgaactcacaagttgatatatctatcac

\*gelabelte Primer, Farbstoff siehe Tab.6; unterstrichen = getailt

### Durchführung der PCR:

#### Material:

0,2 ml PCR-Tubes

DNA-Thermo-Cycler (Gene Amp PCR-System 9600)

Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold™, 5 U/μl)

10 x PCR-Puffer II (Applied Biosystems)

MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM, Applied Biosystems)

DMSO

PCR-Wasser (LiChrosolv®, Wasser für die Chromatographie, Merck)

Primermixe

dNTP's (2,5 mM von jedem)

#### Durchführung:

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma GibcoBRL, Wien bzw. VBCGenomics, Wien bezogen, in Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 10 μM eingestellt. Aus diesen Stocklösungen wurden Arbeitslösungen, bzw. Primermixe für die jeweilige Multiplex-PCR hergestellt. Ein Mix für 100 Proben setzt sich wie folgt zusammen:

**Tab. 2:** Multiplex 1 (6plex)

Stock (μM)	Endkonzentration(μM)	Locus	x 1 (μl)	x 100 (μl)
10	0,25	McM42	0,38	37,50
10	0,20	OarFCB20	0,30	30,00
10	0,13	MAF65	0,20	19,50
10	0,30	TGLA53	0,45	45,00
10	0,67	McM527	1,01	100,50
10	0,25	INRA49	0,38	37,50
Σ	<b>1,80</b>		<b>2,70</b>	<b>270,00</b>

**Tab. 3:** Multiplex 2 (5plex)

Stock ( $\mu\text{M}$ )	Endkonzentration( $\mu\text{M}$ )	Locus	x 1 ( $\mu\text{l}$ )	x 100 ( $\mu\text{l}$ )
10	0,26	OarCP49	0,39	39,00
10	0,26	OarFCB11	0,39	39,00
10	0,30	OarAE119	0,45	45,00
10	0,13	MAF214	0,20	19,50
10	0,50	HSC	0,75	75,00
$\Sigma$	<b>1,45</b>		<b>2,18</b>	<b>217,50</b>

Die PCR wurde in einem Volumen von 15  $\mu\text{l}$  angesetzt. Da zur Arbeitserleichterung mit einer 8-Kanalpipette gearbeitet wurde und das minimale Pipettiervolumen dieser Pipette 5  $\mu\text{l}$  betrug, musste die DNA verdünnt werden. Denn in Vorversuchen stellte sich heraus, dass ohne eine Verdünnung in diesen 5  $\mu\text{l}$  entweder zu viel DNA oder Hemmstoffe für die PCR in zu hoher Konzentration enthalten waren. Die besten Ergebnisse konnten mit einer generellen 1:5-Verdünnung der 96er-Platten mit PCR-Wasser erzielt werden. Dafür wurden in eine neue 96well-Platte 20  $\mu\text{l}$  der DNA-Lösung vorgelegt und mit 80  $\mu\text{l}$  Wasser vermischt. Von dieser Arbeitslösung wurden 5  $\mu\text{l}$  in die PCR eingesetzt. Die Ansätze der beiden Multiplex-Reaktionen sahen folgendermaßen aus:

**Tab. 4:** PCR-Ansätze der zwei Multiplex-Reaktionen (6plex und 5plex)

Komponenten	6plex		5plex	
	Volumen/Probe	Konzentration/Menge	Volumen/Probe	Konzentration/Menge
DNA	5,00 $\mu\text{l}$	im Mittel etwa 25 ng	5,00 $\mu\text{l}$	im Mittel etwa 25 ng
Primermix	2,70 $\mu\text{l}$	1,80 $\mu\text{M}$	2,18 $\mu\text{l}$	1,45 $\mu\text{M}$
dNTP's	1,50 $\mu\text{l}$	0,25 mM von jedem	1,50 $\mu\text{l}$	0,25 mM von jedem
Puffer	1,50 $\mu\text{l}$	1 x	1,50 $\mu\text{l}$	1 x
MgCl <sub>2</sub>	1,20 $\mu\text{l}$	2 mM	1,20 $\mu\text{l}$	2 mM
DMSO	0,75 $\mu\text{l}$	5 %	---	---
Taq-Polymerase	0,15 $\mu\text{l}$	0,75 U	0,20 $\mu\text{l}$	1 U
H <sub>2</sub> O	2,20 $\mu\text{l}$		3,43 $\mu\text{l}$	
<b>Summe</b>	<b>15,00 <math>\mu\text{l}</math></b>		<b>15,00 <math>\mu\text{l}</math></b>	

**Tab. 5:** PCR-Profile der beiden Multiplex-Reaktionen

Phase	6plex		5plex	
	Temperatur, Zeit	Anzahl der Zyklen	Temperatur, Zeit	Anzahl der Zyklen
erste Denaturierung	95 °C, 10 min	1 x	95 °C, 10 min	1 x
Denaturierung	95 °C, 40 sec	32 x	95 °C, 30 sec	32 x
Rampe	1 min		1 min	
Annealing	52 °C, 40 sec		65 °C, 30 sec	
Rampe	1 min		---	
Elongation	72 °C, 40 sec		72 °C, 1 min	
letzte Elongation	72 °C, 60 min	1 x	72 °C, 60 min	1 x

### 2.3.5 Kapillarelektrophorese

Die Fragmentlängenbestimmung der Amplifikate erfolgte mit einer lasergestützten Kapillarelektrophorese. Dazu stand ein ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Wien) zur Verfügung. Um alle Produkte einer Multiplex-Reaktion gleichzeitig analysieren zu können, wurden die Primer mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die zu erwartenden Allellängenbereiche einer Farbmarkierung sich nicht überschneiden. Für die 11 untersuchten Mikrosatelliten wurde das folgendermaßen gelöst:

**Tab. 6:** Farbstoffmarkierung und Allellängen der 11 Mikrosatellitenmarker

<b>Locus</b>	<b>Multiplex-PCR</b>	<b>Fluoreszenzfarbstoff</b>	<b>Länge der Allele (bp)</b>
McM42	1	FAM	81-107
TGLA53	1	FAM	140-163
OarFCB20	1	TET	85-116
INRA49	1	TET	133-159
MAF65	1	HEX	118-140
McM527	1	HEX	165-184
OarCP49	2	FAM	78-135
OarAE119	2	FAM	145-182
HSC	2	FAM	263-299
MAF214	2	TET	175-267
OarFCB11	2	HEX	120-145

Für die Kapillarelektrophorese wurde das gesamte PCR-Volumen von 15 µl eingesetzt. Zur Denaturierung der Amplifikationsprodukte wurden in jedes PCR-Tube 60 µl Formamid pipettiert und durch Auf- und Abziehen gut mit dem PCR-Ansatz gemischt. Zusätzlich wurden die Proben vor dem Lauf bei 95 °C für 5 min denaturiert. Als Längenstandard wurde GeneScan®-500 (TAMRA) Size Standard verwendet. Als Puffer stand 310 Genetic Analyzer Puffer mit EDTA zur Verfügung. Dieser wurde vor dem Einsatz 10fach verdünnt. Die Kapillare wurde mit dem Polymer POP-4™ (Performance Optimized Polymer 4) gefüllt. Die Vorbereitung und die Bedienung des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Applied Biosystems, Wien).

## 2.4 Auswertung der Daten

Mittelwerte wurden stets mit Standardabweichung SD (±) angegeben.

### 2.4.1 Auswertung der Typisierungen

Die Auswertung der Typisierungen erfolgte mit den Softwareprogrammen *GeneScan*® 2.1. und *Genotyper*® 2.1. (Applied Biosystems, Wien). *GeneScan*® 2.1. berechnet aus den aufgenommenen Rohdaten der Kapillarelektrophorese mit Hilfe des Längenstandards die jeweilige Länge der detektierten DNA-Fragmente. Das Softwareprogramm *Genotyper*® 2.1.

ordnet diesen Fragmentlängen definierte Allelbezeichnungen zu. Die so bestimmten Allele der 5plex- und der 6plex-Reaktion für jedes Tier wurden in eine *Microsoft® Excel*-Tabelle zusammenkopiert. Die so entstandene Genotypen-Matrix aller untersuchten Tiere für alle 11 DNA-Mikrosatellitenmarker bildete die Basis für die weiteren Auswertungen.

### **2.4.2 Genetische Diversität**

Für diese Berechnungen wurden alle Daten herangezogen, die vollständig vorlagen. Das heißt der Genotyp war für alle 11 Marker komplett. Die genetische Diversität einer Population lässt sich recht gut an der Anzahl der Allele und der Allelverteilung abschätzen. Je mehr Allele in einer Population vertreten sind und je gleichmäßiger sie in dieser verteilt sind, desto variabler ist das genetische Potential dieser Population anzusehen. Die Allelfrequenzen sowie die Anzahl der Allele pro Locus wurden mit dem Softwareprogramm *Fstat v.2.9.1* (GOUDET, 1995, <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>) berechnet. Auch die erwartete sowie die beobachtete Heterozygotierate, das heißt der Anteil der heterozygoten Tiere in der Population, ist ein guter Hinweis auf die genetische Variabilität. Die erwartete Heterozygotie errechnet sich aus den Allelfrequenzen und die beobachtete Heterozygotie stellt die tatsächlich in der Population beobachteten heterozygoten Tiere dar. Diese Werte wurden mit dem Softwareprogramm *Genetix v.4.01* (BELKHIR et al., 2000, <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>) berechnet.

### **2.4.3 Abstammungsüberprüfung**

Autosomale DNA-Mikrosatelliten-Marker eignen sich sehr gut zur Abstammungskontrolle, da sie kodominant vererbt werden. Das heißt der Nachkomme besitzt an einem Locus ein Allel, das er vom Vater geerbt hat und das andere stammt von der Mutter. Wenn er an einem oder mehreren Loci ein Allel besitzt, das weder von dem angenommenen Vater, noch von der vermuteten Mutter stammen kann, so nennt man das einen Ausschluss und die Abstammung muss angezweifelt werden. Die Abstammungsüberprüfung der Kärntner Brillenschafe wurde mit dem Softwareprogramm *Cervus<sup>©</sup> v.1.0* (MARSHALL et al., 1998, <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html>) durchgeführt. Es wurden auch die Ausschlusswahrscheinlichkeiten (JAMIESON & TAYLOR, 1997) errechnet, um die Eignung des verwendeten Markersystems für die Abstammungsüberprüfung in dieser Population zu beurteilen. Die Ausschlusswahrscheinlichkeit gibt an, in wieviel Prozent der Fälle, ein falsch angegebener Elter auch als falsch identifiziert und ausgeschlossen werden kann. Wenn keiner der Eltern eines Nachkommens bekannt ist („first parent“-Fall), ist die Ausschlusswahrscheinlichkeit niedriger als für den Fall, dass ein Elternteil als sicher angenommen werden kann („second parent“-Fall). Diese Berechnung, sowohl für jeden Marker einzeln, als auch für alle 11 Marker in Kombination, wurde ebenfalls mit dem Softwareprogramm *Cervus<sup>©</sup> v.1.0* durchgeführt.

#### 2.4.4 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Nullallele

Alle Daten wurden auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) untersucht. Das geschah mit Hilfe des Softwareprogramms *Genepop v.3.1d.* (RAYMOND & ROUSSET, 1995, <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>) Bei multiplen Tests wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert (RICE, 1989). Mit dem Softwareprogramm *Cervus*® v.1.0 wurde für jeden Marker die Nullallelfrequenz geschätzt.

#### 2.4.5 F-Statistik

Die F-Statistik, bestehend aus den Fixationsindices  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  und  $F_{st}$ , wurde ursprünglich von S. WRIGHT (1951, 1965) in den vierziger und fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts eingeführt und wurde mittlerweile von verschiedenen Wissenschaftlern weiterentwickelt. Mit Hilfe dieser Messwerte kann das Ausmaß der genetischen Differenzierung in strukturierten Populationen abgeschätzt werden. Die Fixationsindices vergleichen die Reduktion der Heterozygotenrate zwischen allen Ebenen einer strukturierten Population (HARTL & CLARK, 1997). Der  $F_{is}$ -Wert setzt die einzelnen Individuen mit der dazugehörigen Subpopulation in Beziehung. Der  $F_{it}$ -Wert vergleicht die Individuen mit der Gesamtpopulation und der am häufigsten verwendete  $F_{st}$ -Wert setzt die Subpopulationen mit der Gesamtpopulation in Beziehung. Alle drei Werte können als eine Art Inzuchtkoeffizient betrachtet werden, da sie den Verlust an Heterozygoten auf jedem Level der Populationshierarchie im Vergleich zu einem höheren Level messen (HARTL & CLARK, 1997).  $F_{st}$  gilt als Maß für die genetische Differenzierung der Subpopulationen und ist immer positiv, da innerhalb einer Subpopulation trotz Zufallspaarung die mittlere Heterozygotie im Vergleich zur Gesamtpopulation abnimmt, denn die Individuen innerhalb einer Subpopulation besitzen in der Regel gemeinsame Vorfahren. Die Werte liegen zwischen 0 (= kein Unterschied zwischen den Subpopulationen) und 1 (= Fixation bestimmter Allele in verschiedenen Subpopulationen).  $F_{is}$  und  $F_{it}$  sind Messwerte für die Abweichung vom HWG innerhalb der Subpopulationen bzw. der Gesamtpopulation, wobei positive Werte auf einen Verlust von Heterozygoten hinweisen, während negative Werte einen Überschuss an Heterozygoten bedeuten (HEDRICK, 2000). Der  $F_{is}$ -Wert quantifiziert das Verhältnis der heterozygoten Genotypen innerhalb der Individuen einer Subpopulation im Vergleich zu dem unter Zufallspaarung erwarteten heterozygoten Anteil innerhalb der jeweiligen Subpopulation. Daher wird er oft mit dem Inzuchtkoeffizienten in Verbindung gebracht. NEI (1977) zeigte, dass die Fixationsindices relativ einfach durch die beobachteten und erwarteten Heterozygotiewerte dargestellt werden können. Das beruht auf folgenden Beziehungen:

$$F_{is} = H_S - H_O / H_S$$

$$F_{it} = H_T - H_O / H_T$$

$$F_{st} = H_T - H_S / H_T$$

wobei  $H_O$  die mittlere beobachtete Heterozygotierate in einer Subpopulation über alle Loci darstellt,  $H_S$  ist die mittlere erwartete Heterozygotierate in den Subpopulationen über alle Loci

und  $H_T$  ist der Mittelwert der erwarteten Heterozygotierate in der Gesamtpopulation über alle Loci.

NEI (1987) beschrieb auch eine weitere Theorie, die es ermöglicht, die genetische Variation in der untersuchten Population abzuschätzen und zu quantifizieren, in welchem Verhältnis diese genetische Variation innerhalb und zwischen den Subpopulationen aufgeteilt ist. Dazu führte er den Parameter  $G_{ST}$  („coefficient of gene differentiation“) ein, der angibt, welcher Anteil der genetischen Diversität der Gesamtpopulation auf die Diversität zwischen Subpopulationen zurückgeführt werden kann. Er ist folgendermaßen definiert:

$$G_{ST} = D_{ST} / H_T$$

wobei  $H_T$  wiederum die erwartete Heterozygotierate (=genetische Diversität) der Gesamtpopulation beschreibt, die sich aus der genetischen Diversität innerhalb der Subpopulationen ( $H_S$ ) und der Diversität zwischen Subpopulationen ( $D_{ST}$ ) zusammensetzt, es gilt also:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Die F-Statistik wurde nach WEIR & COCKERHAM (1984) mit dem Softwareprogramm *Genepop v.3.1d*, bzw. *Fstat v.2.9.1* berechnet. Der  $F_{st}$ -Wert wurde einerseits über alle Loci und Populationen gemittelt erhoben, andererseits im paarweisen Vergleich der einzelnen Populationen. Im letzteren Fall können die  $F_{st}$ -Werte als genetische Distanzmaße betrachtet werden. NEI's Schätzwerte wurden ebenfalls mit *Fstat v.2.9.1* berechnet.

#### **2.4.6 Populationsdifferenzierung**

Die folgenden Analysen befassen sich mit der genetischen Beziehung der untersuchten Populationen zueinander. Es wurden die privaten Allele der jeweiligen Populationen herausgesucht, wobei als private Allele die Allele bezeichnet werden, die nur in einer der untersuchten Populationen vorkommen. Ebenfalls wurden die paarweisen privaten Allele ausgezählt. Das sind die Allele, die im Vergleich zweier Populationen nur in einer der beiden vorkommen. Die Anzahl dieser privaten Allele stellt somit ein Maß für die genetische Differenzierung der jeweiligen Populationen dar.

Mit Hilfe des Softwareprogramms *Genepop v.3.1d* wurde die genetische Differenzierung der untersuchten Populationen einmal auf Grundlage der Allelverteilung und aufgrund der Genotypenverteilung untersucht. Die Nullhypothese ist jeweils, dass die Verteilung der Allele bzw. der Genotypen innerhalb der Populationen identisch ist. Das wurde für jeden Locus über alle Populationen, sowie auch im paarweisen Vergleich der Populationen durchgetestet.

Die paarweisen genetischen Distanzen aller Populationen wurden nach fünf verschiedenen Distanzmaßen berechnet:

- Nei's standard genetic distance *Nei's D* (NEI, 1972)
- Nei's corrected genetic distance *Nei1978* (NEI, 1978)
- Nei's minimum distance *Nei<sub>min</sub>* (NEI, 1987)
- Reynolds' distance *D<sub>REY</sub>* (REYNOLDS et al., 1983)

- Distanz nach Cavalli-Sforza & Edwards *Cav.-Sfz.* (CAVALLI-SFORZA & EDWARDS, 1967)

Alle diese Distanzen wurden mit dem Softwareprogramm *Genetix v.4.01* berechnet. Nach EDING u. LAVAL (1999) sollen die Distanzmaße  $Nei_{min}$  und  $D_{REY}$  besonders gut für die Differenzierung von Rassen geeignet sein. Sie wurden für kurze Divergenzzeiten, wie das bei Rassen, v.a. innerhalb eines Kontinents der Fall ist, entwickelt. Da es generell schwierig ist, die Eignung verschiedener Distanzmaße für die jeweilige Situation zu beurteilen, wurde durch eine Korrelationsmatrix versucht, darzustellen, inwieweit die hier verwendeten Distanzmaße zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Das Konstruieren von phylogenetischen Bäumen kann zur Darstellung von genetischen Distanzen verwendet werden. Das können die Distanzen zwischen Populationen sein (Populationsbaum) oder aber zwischen einzelnen Individuen (Individuenbaum). Für den Populationsbaum wurde das Distanzmaß nach Reynolds (REYNOLDS et al., 1983) verwendet. Mit dem Softwareprogramm *Microsat v.1.5d* (MINCH et al., 1995, <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/>) wurde eine durchschnittliche Distanzmatrix aus 100 Wiederholungen erstellt und diese dann dazu genutzt, einen phylogenetischen Baum nach dem „Neighbor-Joining“-Verfahren (SAITOU & NEI, 1987) zu konstruieren. Dafür wurde das Softwarepaket *Phylip* (FELSENSTEIN, 1993, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) verwendet. Es wurde auch ein Individuenbaum erstellt, d.h. als taxonomische Einheiten (OTU) wurden einzelne Individuen betrachtet. In diesem Fall wurden die Distanzen zwischen den Individuen aufgrund der Anteile an gemeinsamen Allelen („proportion of shared alleles“) berechnet (BOWCOCK et al., 1994). Die Darstellung der phylogenetischen Bäume erfolgte mit dem Softwareprogramm *TreeViewPPC*® v.1.6.5. (PAGE, 1996, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). Mit dem Softwareprogramm *Genetix v.4.01* wurde eine Hauptfaktorenanalyse (Principal Components Analysis, PCA) nach CAVALLI-SFORZA et al., (1994) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein statistisches Verfahren, mit dem genetische Daten kondensiert werden, um genetische Differenzierungen von Populationen graphisch darstellen zu können.

Es wurde auch untersucht, wie sicher sich die Individuen aufgrund der genetischen Daten ihrer Ursprungspopulation zuordnen lassen („breed assignment“), denn auch das gibt Hinweise darauf, wie gut die einzelnen Populationen genetisch differenziert sind. Als Grundlage dafür können die genetischen Distanzen zwischen den Individuen und den jeweiligen Populationen verwendet werden oder die Genotypen der Individuen im Verhältnis zu den Allelfrequenzen der verschiedenen Populationen. Im ersten Ansatz werden die Individuen der Population zugeordnet, zu der die genetische Distanz die geringste ist. Die zweite Methode ordnet die Individuen der Population zu, in der der Genotyp des Individuums mit der größten Wahrscheinlichkeit vorkommt. Das Softwareprogramm *GeneClass v.1.0.02* (CORNUET et al., 1999, <http://www.ensam.inra.fr/URLB/geneclass/geneclass.html>) bietet die Möglichkeit, beide Methoden auszuprobieren und wurde unter verschiedenen Bedingungen auf den Datensatz angewendet.

Ein ebenfalls auf Allelfrequenzen beruhender Ansatz liegt dem Softwareprogramm *Structure* (PRITCHARD et al., 2000, <http://www.stats.ox.ac.uk/~pritch/software.html>) zugrunde mit dem Unterschied, dass hier a priori keine Populationen definiert werden. Vielmehr kann die Strukturierung in einer Population erst erkannt oder eine vorher definierte Populationsstruktur bestätigt werden. Dafür wurden mehrere Läufe mit dem Programm *Structure* durchgeführt und dabei verschieden viele Populationen angenommen. Die Anzahl an Populationen, die am

besten auf den Datensatz passt, gibt die genetische Struktur allein aufgrund der Genotypen wieder.

Das Softwareprogramm *Structure* bietet auch die Möglichkeit, eine Population auf Hybride zu untersuchen, d.h. Tiere ausfindig zu machen, die Kreuzungen verschiedener Rassen darstellen. Da das bei 11 Brillenschafen aus Bayern vermutet wurde, wurde für diese Tiere untersucht, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass sie Genanteile anderer Rassen besitzen.

## **2.5 Verwendete Chemikalien, Geräte, Hilfsmittel, Enzyme und Softwareprogramme**

Die wichtigsten verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 7 angeführt. In der Tabelle 8 sind die verwendeten Geräte, die wichtigsten Hilfsmittel in der Tabelle 9 aufgelistet. In der Tabelle 10 sind die verwendeten Enzyme und molekularbiologischen Kits zu finden und in der Tabelle 11 die verwendeten Softwareprogramme.

**Tab. 7:** Auflistung der wichtigsten Laborchemikalien und ihrer Bezugsquellen

<u>Produkt</u>	<u>Vertrieb</u>
Agarose	Gibco BRL
Borsäure	Merck
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
Chloroform	J.T.Baker
Dimidiumbromid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
EDTA	Fluka
Ethanol	Merck
Formamid	Merck
310 Genetic Analyzer Puffer mit EDTA	Applied Biosystems
Genescan-500 (TAMRA)	Applied Biosystems
Glycerin	Merck
LiChrosolv <sup>®</sup> , Wasser für die Chromatographie	Merck
Magnesiumchlorid	Applied Biosystems
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumperchlorat	Fluka
PCR-Puffer II (10x)	Applied Biosystems
Phenol	Gibco BRL
Polymer POP-4 <sup>TM</sup>	Perkin Elmer

**Tab. 8:** Auflistung der wichtigsten Geräte und ihrer Hersteller bzw. Bezugsquelle

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller/Bezugsquelle</u>
DNA-Thermo-Cycler Gene Amp PCR-System 2400	Perkin Elmer
DNA-Thermo-Cycler Gene Amp PCR-System 9600	Perkin Elmer
Eagle Eye II	Stratagene
Elektrophorese-Kammern, horizontal, lang	Advanced Biotechnologies
Elektrophorese-Kammern, horizontal, midi	Gibco BRL
Elektrophorese-Kammern, horizontal, mini	Gibco BRL
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac300	BIO RAD
Genetic Analyser 310, ABI prism <sup>TM</sup>	Perkin Elmer
Heizblock QBT4	Grant
Inkubator	Memmert
Mikrowelle Radarange	Amana

Minishaker MS1	IKA
Multikanal- Pipetten, PreCision 5-50µl	Biozym
Multikanal- Pipetten, PreCision 50-1200µl	Biozym
Pipetten 1000, 250, 100, 10 µl	Eppendorf
Pipetten 1000, 200, 20, 10 µl	Gilson
RNA/DNA Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Schüttelinkubator Thermomixer 5436	Eppendorf
Spektralphotometer Spectra MAX 250	MWG- Biotech
Spektralphotometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Sterile Werkbank LaminAir	Holten
Tischzentrifuge 5410	Eppendorf
Über-Kopf-Schüttler Reax2	Heidolph
UV-Küvetten, Quarzglas Suprasil	Hellma
Zentrifuge, 5415C	Eppendorf
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge, Spinchron R	Beckmann
Zentrifuge, Sigma 4-15C	Sigma

**Tab. 9:** Auflistung der wichtigsten Hilfsmittel

Produkt	Vertrieb
Mikrotestplatte aus Quarzglas mit 96 Nöpfchen	Hellma
PCR-Reaktionsgefäßketten, 8x 0,2 ml	Advanced Biotechnologies
Pipettenspitzen filter tip 200, 100, 20, 10µl	Greiner Labortechnik
Pipettenspitzen Safeseal-tips, 1200µl	Biozym
Quarzglasküvette	Hellma
Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml	Sarstedt
Röhrchen mit Schraubverschluß, 14 ml	Greiner
Röhren mit Schraubverschluß, 15 ml, zentrifugierbar	Sarstedt
Sterilfilter	Sartorius
Vinylhandschuhe	Roth

**Tab. 10:** Auflistung der wichtigsten Enzyme und molekularbiologischen Kits

Produkt	Vertrieb
dNTP-Satz	MBI Fermentas
Lambda-Phagen-DNA ( $\lambda$ )	MBI Fermentas
NucleoSpin <sup>®</sup> Tissue	Macherey-Nagel
NucleoSpin <sup>®</sup> Multi 96 Tissue	Macherey-Nagel
Proteinase K	Gibco BRL
Taq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems

**Tab. 11:** Auflistung der verwendeten Softwareprogramme

Produkt	Bezugsquelle
Cervus <sup>®</sup> v.1.0	<a href="http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html">http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html</a>
FSTAT v.2.9.1	<a href="http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html">http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html</a>
GeneClass v.1.0.02	<a href="http://www.ensam.inra.fr/URLB/geneclass/geneclass.html">http://www.ensam.inra.fr/URLB/geneclass/geneclass.html</a>
Genepop v.3.1d.	<a href="http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/">http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/</a>
GeneScan <sup>®</sup> 2.1.	Applied Biosystems
Genetix v.4.01	<a href="http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm">http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm</a>
Genotyper <sup>®</sup> 2.1.	Applied Biosystems
Microsat v.1.5d	<a href="http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/">http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/</a>
Phylip	<a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a>
structure	<a href="http://www.stats.ox.ac.uk/~pritch/software.html">http://www.stats.ox.ac.uk/~pritch/software.html</a>
TreeViewPPC <sup>®</sup> v.1.6.5	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 DNA-Isolierung**

Von den 771 entnommenen Ohrgewebeproben konnte aus 767 Proben erfolgreich DNA isoliert werden. In drei Probenbehältern befand sich kein Plastikkegel, so dass auch kein Gewebe der jeweiligen Tiere für die Isolation vorlag. Einem Tier wurde aus Versehen zweimal Gewebe entnommen. Es wurde aber nur einmal in die Untersuchung einbezogen.

Die DNA wurde, wie im Kapitel Material und Methode beschrieben, isoliert (siehe Kapitel 2.3.1). Die isolierte DNA-Menge war für den PCR-Einsatz mehr als ausreichend.

#### **3.2 Typisierung**

Von den 767 Tieren, von denen DNA isoliert werden konnte, konnten für 746 Tiere (97 %) alle 11 DNA-Mikrosatellitenmarker komplett amplifiziert werden. Für 20 Tiere konnten nur 10 Marker erfolgreich amplifiziert werden und bei einer Probe gelang lediglich die Amplifikation von 7 Markern. Der Marker HSC war besonders anfällig und fehlte trotz mehrfacher Änderung der PCR-Bedingungen am Ende immer noch bei 17 Tieren.

#### **3.3 Genetische Diversität der Kärntner Brillenschafpopulation**

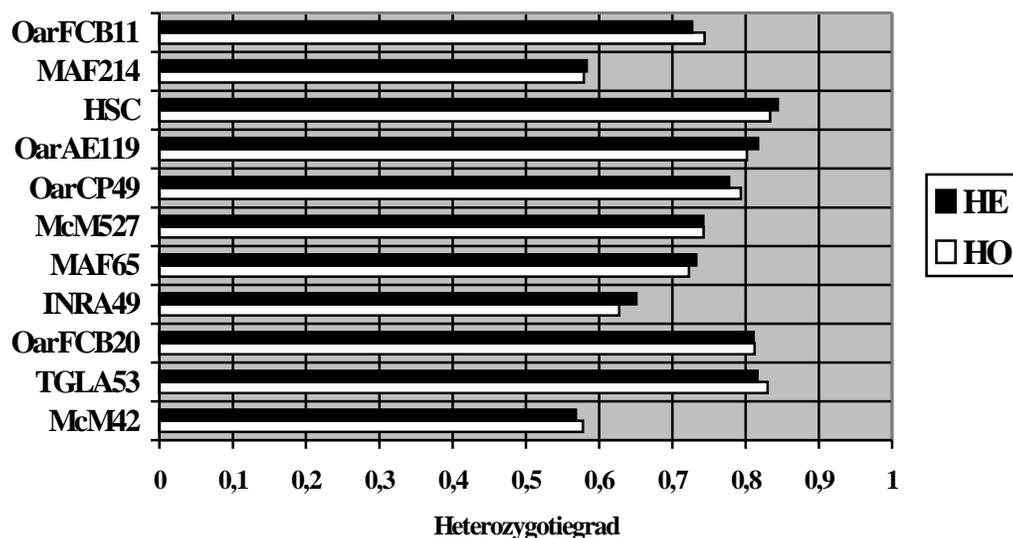
Zur Feststellung der genetischen Diversität der Kärntner Brillenschafpopulation wurden alle Tiere herangezogen, für die alle 11 Marker komplett amplifiziert werden konnten. Das waren insgesamt 746 Tiere. Alle 11 verwendeten DNA-Mikrosatellitenmarker erwiesen sich als polymorph. Die Anzahl der Allele pro Locus variierte zwischen 6 und 15. Die mittlere Anzahl an Allelen pro Locus lag dabei bei  $10,09 \pm 2,95/\text{Locus}$ . Die beobachteten Allelfrequenzen sind im Anhang aufgeführt. Neben der Alleldiversität gibt auch der Anteil an heterozygoten Tieren einen Hinweis auf die genetische Variabilität einer Population. Die erwartete und die beobachtete Heterozygotierate lagen bei den Kärntner Brillenschafen über alle 11 Marker gemittelt bei 73 % (siehe Tab.12).

**Tab. 12:** Beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotieraten sowie die Anzahl der Allele der Kärntner Brillenschafpopulation (N=746) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker

<b>Locus</b>	<b><math>H_O</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b>Anzahl Allele</b>
McM42	0,578	0,568	7
TGLA53	0,830	0,816	11
OarFCB20	0,812	0,811	13
INRA49	0,627	0,651	6
MAF65	0,723	0,733	10
McM527	0,743	0,742	9
OarCP49	0,794	0,777	15
OarAE119	0,802	0,817	8
HSC	0,834	0,844	12
MAF214	0,579	0,583	13
OarFCB11	0,744	0,727	7
<b>TOTAL (11 Loci)</b>	<b>0,733 ± 0,097</b>	<b>0,734 ± 0,095</b>	<b>10,09 ± 2,95/Locus</b>

Der tatsächlich beobachtete Anteil an heterozygoten Tieren in der Population ( $H_O$ ) stimmt mit dem aus den Allelfrequenzen ermittelten Wert ( $H_E$ ) überein. Es gibt also keinen Hinweis darauf, dass sich die Population nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) befindet. Die Heterozygotiegrade der einzelnen Marker lagen alle über 50 % und variierten zwischen 57 % und 84 %, wobei auch hier die beobachteten Werte kaum von den erwarteten Werten abwichen (siehe Abb.1).

Die durchgeführten Tests auf Abweichungen vom HWG ergaben für keinen Marker eine signifikante Abweichung, nachdem das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert wurde.



**Abb. 1:** Erwarteter und beobachteter Heterozygotiegrad der 11 Mikrosatellitenmarker für die Kärntner Schafe

**Tab. 13:**  $F_{is}$ -Werte (nach Weir & Cockerham) der Kärntner Brillenschafpopulation (N=746) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker

<b>Locus</b>	<b><math>F_{is}</math>-Wert</b>	<b>P-Wert für <math>&gt;F_{is}</math></b>	<b>P-Wert für <math>&lt;F_{is}</math></b>	<b>Signifikanz</b>
McM42	-0,017	0,7934	0,2435	n.s.
TGLA53	-0,017	0,8510	0,1736	n.s.
OarFCB20	-0,002	0,5678	0,4687	n.s.
INRA49	+0,037	0,0716	0,9402	n.s.
MAF65	+0,014	0,2739	0,7527	n.s.
McM527	-0,001	0,5300	0,5090	n.s.
OarCP49	-0,021	0,8862	0,1342	n.s.
OarAE119	+0,019	0,1345	0,8847	n.s.
HSC	+0,012	0,2193	0,8137	n.s.
MAF214	+0,007	0,4111	0,6215	n.s.
OarFCB11	-0,023	0,8724	0,1460	n.s.
<b>alle 11 Marker</b>	<b>+0,001</b>	<b>0,4582</b>	<b>0,5515</b>	<b>n.s.</b>

P-Wert für  $>F_{is}$  heißt: Anteil der Permutationen, die einen größeren Wert ergeben als den beobachteten  $F_{is}$ -Wert

P-Wert für  $<F_{is}$  heißt: Anteil der Permutationen, die einen kleineren Wert ergeben als den beobachteten  $F_{is}$ -Wert

Die für die Kärntner Brillenschafpopulation gefundenen  $F_{is}$ -Werte sind alle von Null nicht signifikant verschieden. Die Population befindet sich also auch nach diesem Messwert im HWG. Es gibt für keinen der 11 Marker einen signifikanten Heterozygotenüberschuss oder ein signifikantes Heterozygotendefizit und somit keinen Hinweis auf Inzucht oder auf das Vorhandensein von Nullallelen.

### **3.4 Abstammungsüberprüfung der Kärntner Brillenschafe**

Für die Überprüfung der Abstammungsangaben im Herdbuch wurden alle Daten, die zur Verfügung standen, verwendet. Das heißt, alle 767 Brillenschafe, von denen erfolgreich DNA isoliert werden konnte, flossen in diese Untersuchung ein, unabhängig davon, wieviele Marker bei ihnen amplifiziert werden konnten. Ob sich die verwendeten Mikrosatellitenmarker zur Abstammungskontrolle in dieser Population eignen, wurde mit der Berechnung der Ausschlusswahrscheinlichkeiten geprüft. Die mit dem Computerprogramm *Cervus*® v.1.0 berechneten Ausschlusswahrscheinlichkeiten der einzelnen Marker sowie aller 11 Marker kombiniert sind in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tab. 14:** Ausschlusswahrscheinlichkeiten der 11 Mikrosatellitenmarker für die Kärntner Brillenschafpopulation (N=767), first parent = kein Elterntier bekannt, second parent = ein Elterntier bekannt

<b>Locus</b>	<b>Anzahl typisierter Tiere N</b>	<b>Ausschlusswahrscheinlichkeit (first parent)</b>	<b>Ausschlusswahrscheinlichkeit (second parent)</b>
McM42	766	0,190	0,366
TGLA53	766	0,462	0,637
OarFCB20	765	0,454	0,629
INRA49	765	0,235	0,393
MAF65	767	0,315	0,489
McM527	767	0,360	0,546
OarCP49	767	0,400	0,578
OarAE119	766	0,460	0,636
HSC	750	0,534	0,699
MAF214	767	0,180	0,323
OarFCB11	767	0,318	0,494
<b>TOTAL (11 Loci)</b>		<b>0,9933</b>	<b>0,9998</b>

Von den Fällen, in denen für alle 11 Marker die Genotypen vorliegen, sollte in über 99 % der Fälle ein falsch angegebener Elternteil auch als falsch erkannt und ausgeschlossen werden können. Das sollte sowohl für den Fall, dass ein Elternteil bekannt ist als auch für zwei unbekannte Eltern möglich sein. Dieser hohe Wert sollte ausreichen, um die Abstammungsangaben im Herdbuch der Kärntner Brillenschafe mit relativ großer Sicherheit zu überprüfen. Mit dem Softwareprogramm *Cervus*® v.1.0 wurden insgesamt 668 Abstammungsangaben kontrolliert. Dabei handelte es sich um 244 Vaterschafts- und 424 Mutterschaftsangaben. Für 175 Tiere waren sowohl Vater als auch Mutter angegeben. In diesen Fällen konnten also beide Angaben überprüft werden. Dabei stellte sich heraus, dass für 10 dieser Tiere weder der Vater noch die Mutter richtig angegeben waren. Die Abstammungsangaben dieser Tiere müssen aufgrund der gefundenen Ausschlüsse angezweifelt werden.

Generell kann die Anzahl an Ausschlüssen bei der Verwendung von 11 Markern von 1 bis 11 variieren. Hier wurden bei allen durchgeführten Abstammungskontrollen zwischen einem und acht Ausschlüssen gefunden und ein Tier mit einem Ausschluss erst dann von der Elternschaft ausgeschlossen, wenn sich durch den zweiten Elter zusätzliche Unstimmigkeiten ergaben.

Für weitere 23 Tiere konnte der angegebene Bock von der Vaterschaft ausgeschlossen werden, während die Mutter sich als passend erwies. Im Gegenzug mussten aber auch für 30 Tiere die Mütter ausgeschlossen werden, wobei die angegebenen Väter keine Ausschlüsse zeigten.

In 69 Fällen waren lediglich die Väter angegeben. Unter diesen mussten 10 Böcke von der Vaterschaft ausgeschlossen werden. Von 249 Tieren, von denen nur die Mutter bekannt war, erwiesen sich 38 Mutterschaftsangaben als falsch. Eine Liste der jeweiligen Probennummern dieser Tiere befindet sich im Anhang.

Insgesamt betrachtet wurden also unter 244 überprüften Vaterschaftsangaben 43 falsch angegebene Väter gefunden, was eine Fehlerrate von 17,62 % ausmacht. Von insgesamt 424 angegebenen Mutterschaften, die kontrolliert wurden, erwiesen sich 78 Angaben als falsch, was einem Fehlerquotienten von 18,40 % entspricht.

Leider blieben auch einige Fälle ungeklärt. Bei insgesamt 12 Tieren (1,80 %) konnte nur ein Ausschluss gefunden werden. Von 9 dieser Tiere war lediglich ein Elternteil angegeben. Dadurch war es nicht möglich, durch Einbeziehen des anderen Elternteils, weitere Ausschlüsse zu finden und somit den Verdacht auf eine Fehl Abstammung zu erhärten. Da sich aufgrund eines einzigen Ausschlusses eine Fehl Abstammung nicht beweisen lässt, mussten diese Fälle offen bleiben. In wichtigen Abstammungen könnte aber eine Nachuntersuchung dieser Tiere mit einem erweiterten Markersatz zur Aufklärung der Abstammungen durchgeführt werden. Die Probennummern dieser ungeklärten Fälle befinden sich ebenfalls im Anhang.

### 3.5 Nullallele

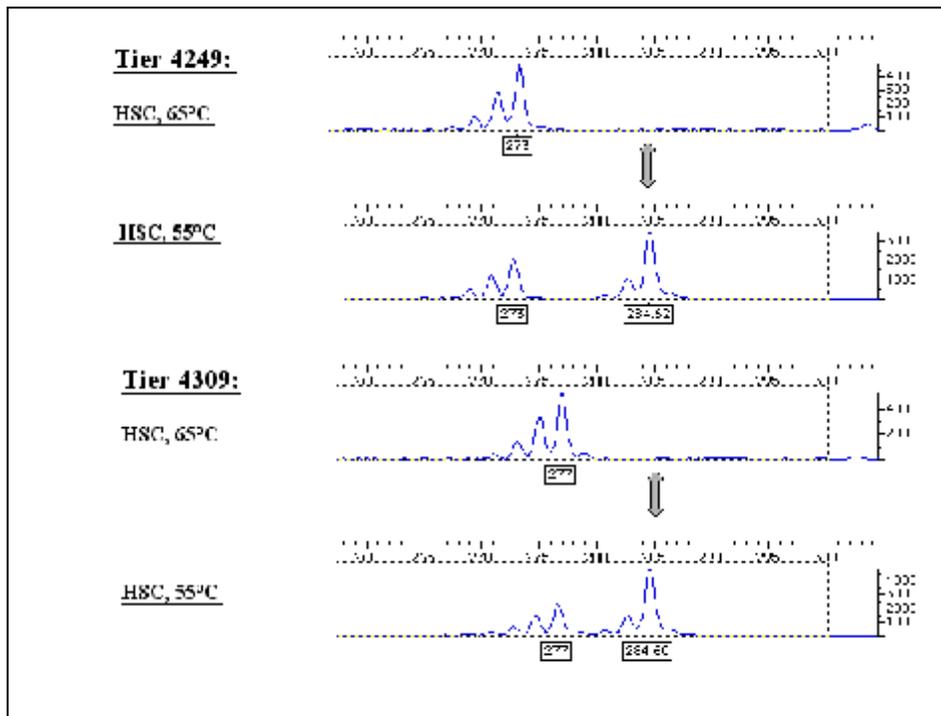
Mit dem Softwareprogramm *Cervus*® v.1.0 wurden die Nullallelfrequenzen für alle 11 Mikrosatellitenmarker geschätzt. Sie sind in folgender Tabelle 15 aufgeführt.

**Tab. 15:** Geschätzte Nullallelfrequenzen

<b>Locus</b>	<b>Nullallelfrequenz</b>
McM42	- 0,0122
TGLA53	- 0,0093
OarFCB20	0,0025
INRA49	0,0205
MAF65	0,0073
McM527	-0,0034
OarCP49	-0,0135
OarAE119	0,0080
HSC	0,0081
MAF214	0,0071
OarFCB11	-0,0141

Die Werte sind alle nahe Null. Negative Werte deuten auf einen Heterozygotenüberschuss hin, positive Werte auf ein Heterozygotendefizit. Die hier gefundenen Werte sind alle nicht signifikant von Null verschieden, nachdem das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert wurde. Das bedeutet, dass es entweder keine Nullallele für diese Marker gibt oder sie in dieser Population nur in sehr niedriger Frequenz auftreten.

Bei der Abstammungskontrolle ist jedoch in einigen Fällen aufgefallen, dass der einzige Ausschluss für den Marker HSC gefunden werden konnte und beide Tiere für diesen Marker homozygot waren. Eine Nachuntersuchung mit einer erniedrigten Annealingtemperatur von 55 °C ergab einen klaren Beweis für das Vorliegen eines Nullallels mit einer Länge von 285 Basenpaaren. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel.



**Abb. 2:** Beispiel des erfolgreichen Nachweises eines Nullallels

Es wird deutlich, wo das Problem liegt. Bei der üblichen Annealingtemperatur von 65 °C erscheinen beide Tiere homozygot. Das Tier mit der Probennummer 4249 für das Allel 273 und das Tier mit der Nummer 4309 für das Allel 277. 4249 sollte laut Abstammungsangaben die Mutter von 4309 sein, was nach diesen Typisierungsergebnissen jedoch angezweifelt werden musste. Eine zweite Analyse bei einer Annealingtemperatur von 55 °C machte das vorher nicht zu erkennende Allel (Nullallel) mit einer Länge von 285 Basenpaaren sichtbar und widerlegte die vermutete Fehlangabe.

Dies zeigt, dass für den Locus HSC Nullallele existieren, sie scheinen jedoch mit einer so niedrigen Frequenz in der Kärntner Brillenschafpopulation aufzutreten, dass sie das HWG nicht beeinflussen. Da dieser Locus auch der einzige war, der am Ende noch bei 17 Tieren fehlte, könnte auch vermutet werden, dass es sich bei diesen Tieren um Nullallel homozygote Tiere handelt und deswegen eine Amplifikation dieses Markers unter diesen Bedingungen nicht möglich war. Eine Nachuntersuchung dieser 17 Tiere bei einer Annealingtemperatur von 55°C konnte diese Vermutung allerdings nicht bestätigen.

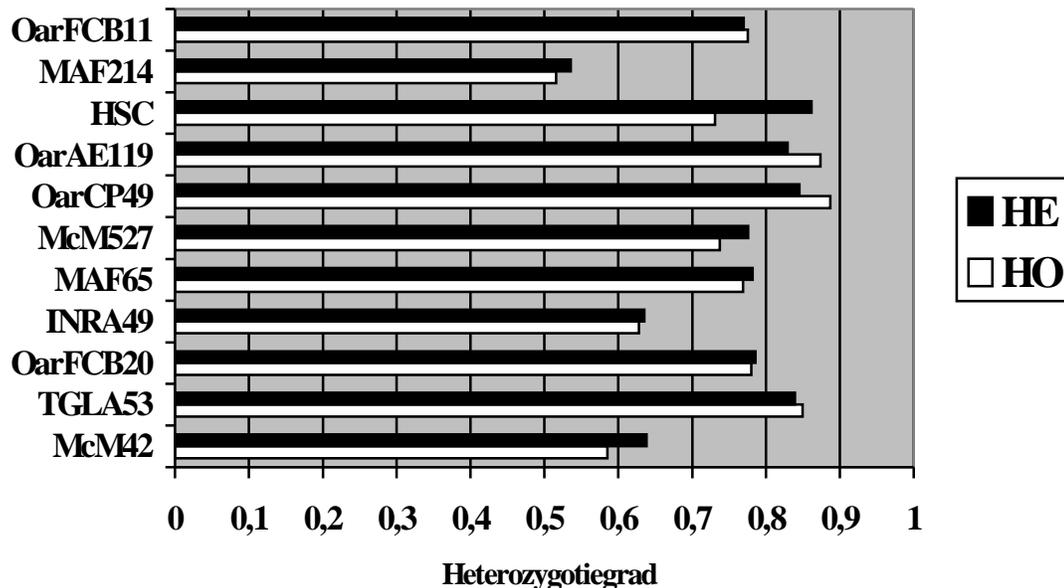
### **3.6 Genetische Diversität der Villnöber Schafe**

Als Vergleich zu den Kärntner Brillenschafen wurde auch die genetische Diversität der Villnöber Schafe aus Südtirol ermittelt. Dazu wurden die Daten von 160 Villnöber Schafen verwendet, die mit den gleichen 11 Mikrosatellitenmarkern untersucht worden waren wie die Kärntner Brillenschafpopulation. Auch in der Population der Villnöber Schafe erwiesen sich alle 11 Marker als polymorph. Die Anzahl der Allele pro Locus variierte zwischen 6 und 13,

die mittlere Anzahl an Allelen pro Locus lag bei  $9,55 \pm 2,21$ . Die beobachteten Allelfrequenzen sind im Anhang aufgeführt. Die beobachteten Anteile an heterozygoten Tieren lagen für die einzelnen Marker zwischen 52 % (MAF214) und 89 % (OarCP49) und über alle 11 Marker gemittelt bei 74 %. Die erwarteten Heterozygotieraten variierten zwischen 54 % (MAF214) und 86 % (HSC) und waren wie die erwartete Heterozygotie über alle Marker, die 75 % betrug, in den meisten Fällen größer als die tatsächlich beobachteten (siehe Tab.16 und Abb.3).

**Tab. 16:** Beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotieraten sowie die Anzahl der Allele der Villnöber Schafpopulation (N=160) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker

<b>Locus</b>	<b><math>H_O</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b>Anzahl Allele</b>
McM42	0,585	0,638	8
TGLA53	0,849	0,839	10
OarFCB20	0,780	0,786	10
INRA49	0,628	0,635	6
MAF65	0,769	0,782	8
McM527	0,738	0,775	8
OarCP49	0,887	0,845	13
OarAE119	0,873	0,829	8
HSC	0,731	0,861	13
MAF214	0,516	0,536	10
OarFCB11	0,775	0,770	11
<b>TOTAL (11 Loci)</b>	<b><math>0,739 \pm 0,119</math></b>	<b><math>0,754 \pm 0,105</math></b>	<b><math>9,55 \pm 2,21/\text{Locus}</math></b>



**Abb. 3:** Erwarteter und beobachteter Heterozygotiegrad der 11 Mikrosatellitenmarker für die Villnöber Schafe

Beim Test auf Abweichungen vom HWG erwies sich nur der Marker HSC als signifikant. Einen signifikanten Heterozygotenüberschuss wies nach der Bonferroni-Korrektur keiner der Marker auf. Signifikant weniger heterozygote Tiere als erwartet konnten nur für HSC beobachtet werden ( $P = 0,0000$ ). Die dazugehörigen  $F_{is}$ -Werte sind in Tabelle 17 aufgeführt. Sie sind nach der Bonferroni-Korrektur nur noch für HSC hochsignifikant.

**Tab. 17:**  $F_{is}$ - Werte (nach Weir & Cockerham) der Villnöber Schafpopulation (N=160) für alle 11 Mikrosatelliten-Marker

<b>Locus</b>	<b><math>F_{is}</math>-Wert</b>	<b>P-Wert für <math>&gt;F_{is}</math></b>	<b>P-Wert für <math>&lt;F_{is}</math></b>	<b>Signifikanz</b>
McM42	+0,083	0,0355	0,9845	n.s.
TGLA53	-0,012	0,6709	0,4182	n.s.
OarFCB20	+0,008	0,4318	0,6436	n.s.
INRA49	+0,011	0,4309	0,6382	n.s.
MAF65	+0,017	0,3782	0,6900	n.s.
McM527	+0,049	0,1245	0,9109	n.s.
OarCP49	-0,049	0,9618	0,0736	n.s.
OarAE119	-0,054	0,9573	0,0727	n.s.
HSC	+0,152	0,0009	1,0000	***
MAF214	+0,037	0,2891	0,7855	n.s.
OarFCB11	-0,007	0,5945	0,4845	n.s.
<b>alle 11 Marker</b>	<b>+0,020</b>	<b>0,0464</b>	<b>0,9545</b>	<b>n.s.</b>

P-Wert für  $>F_{is}$  heißt: Anteil der Permutationen, die einen größeren Wert ergeben als den beobachteten  $F_{is}$ -Wert

P-Wert für  $<F_{is}$  heißt: Anteil der Permutationen, die einen kleineren Wert ergeben als den beobachteten  $F_{is}$ -Wert

### **3.7 Genetische Diversität verschiedener Schafrassen im Vergleich**

Um die genetische Situation der Kärntner Brillenschafpopulation einordnen zu können, wurde eine vergleichende Analyse der genetischen Diversität mit drei weiteren Schafrassen durchgeführt. Dafür wurde aus den Daten der Routineabstammungsdiagnostik des Instituts für Tierzucht und Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien eine zufällige Stichprobe von 50 Bergschafen gezogen. Diese Rasse ist im alpinen Raum sehr weit vertreten und sie konnte zu keiner Zeit als gefährdet angesehen werden. Die Texelschafe sollten, als absolut nicht mit den Kärntner Brillenschafen verwandte Rasse, als Außengruppe dienen. Leider standen nur die Daten für 36 Texelschafe vollständig zur Verfügung. Villnöber Schafe waren in ausreichender Anzahl untersucht worden und aus dieser Datenbank wurde ebenfalls eine zufällige Stichprobe von 50 Tieren gezogen. Dies geschah ebenso mit den Kärntner Brillenschafen.

Die 11 untersuchten DNA-Mikrosatellitenmarker waren auch bei allen anderen Schafrassen polymorph. Die Anzahl der Allele pro Locus variierte zwischen zwei (MAF214 in der Rasse Texelschaf) und 11 (OarCP49 und HSC in der Villnöber Population) (siehe Abb.4).

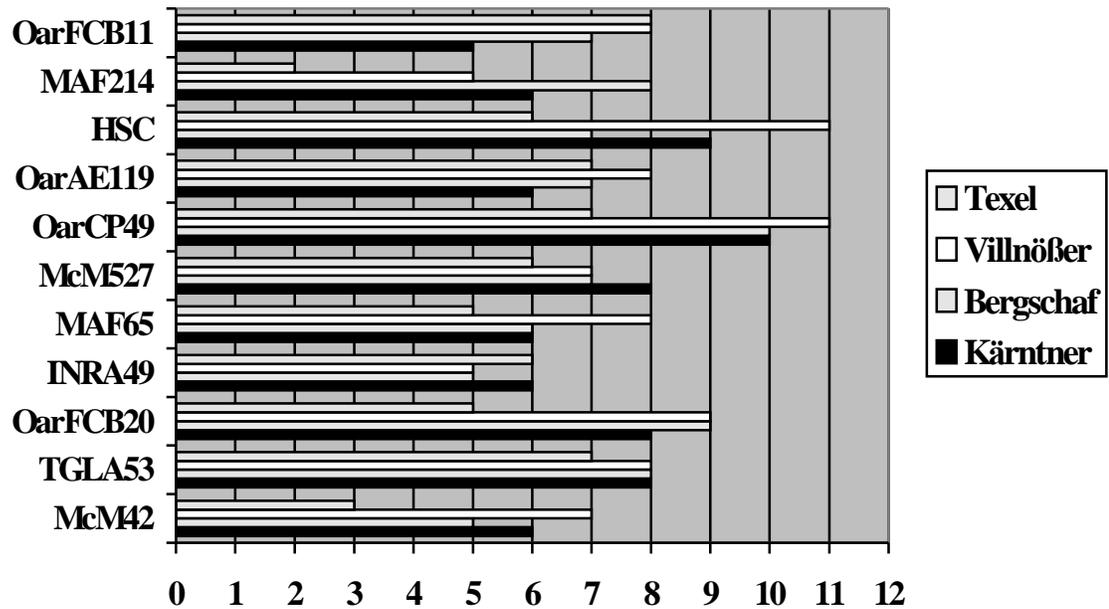


Abb. 4: Anzahl an Allelen pro Locus

Die mittlere Anzahl an Allelen pro Locus lag zwischen 5,64 bei den Texelschafen und 7,91 bei den Villnöber Schafen. Die Unterschiede erwiesen sich als nicht signifikant (siehe Tab.18).

Die gefundenen Allelfrequenzen in den vier Schafrassen sind im Anhang für jeden Locus tabellarisch und in Form eines Diagramms wiedergegeben.

Tab. 18: Anzahl sowie mittlere Anzahl an Allelen pro Locus der vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf, N=50; Bergschaf, N=50; Villnöber Schaf, N=50; Texelschaf, N=36 für alle 11 Mikrosatelliten-Marker

Locus	Kärntner Brillenschaf	Bergschaf	Villnöber Schaf	Texelschaf
McM42	6	5	7	3
TGLA53	8	8	8	7
OarFCB20	8	9	9	5
INRA49	6	5	5	6
MAF65	6	6	8	5
McM527	8	7	7	6
OarCP49	10	10	11	7
OarAE119	6	7	8	7
HSC	9	7	11	6
MAF214	6	8	5	2
OarFCB11	5	7	8	8
<b>Total</b>	<b>7,09</b>	<b>7,18</b>	<b>7,91</b>	<b>5,64</b>
<b>(11 Marker)</b>	<b>±1,58</b>	<b>±1,54</b>	<b>±1,97</b>	<b>±1,80</b>

(Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 7,2$ ; d.f. = 3; p = 0,066)

Die beobachteten und erwarteten Heterozygotieraten lagen über alle 11 Loci gemittelt über 70%, mit Ausnahme der Texelschafe. Hier war der Anteil an heterozygoten Tieren, sowohl der beobachtete als auch der geschätzte, etwas geringer und erreichte um die 65 %. Die Heterozygotiegrade der einzelnen Marker variierten zwischen 39 % und 88 % und sind in Tabelle 19 aufgeführt. Die Unterschiede zwischen den Rassen waren ebenfalls nicht signifikant.

**Tab. 19:** Beobachtete ( $H_O$ ) und erwartete ( $H_E$ ) Heterozygotieraten der vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf, N=50, Bergschaf, N=50, Villnößer Schaf, N=50, Texelschaf, N=36 für alle 11 Mikrosatelliten-Marker

Locus	Kärntner Brillenschaf		Bergschaf		Villnößer Schaf		Texelschaf	
	$H_O$	$H_E$	$H_O$	$H_E$	$H_O$	$H_E$	$H_O$	$H_E$
McM42	0,480	0,421	0,800	0,770	0,520	0,556	0,667	0,628
TGLA53	0,860	0,826	0,740	0,753	0,880	0,851	0,694	0,704
OarFCB20	0,880	0,840	0,640	0,655	0,840	0,792	0,667	0,755
INRA49	0,640	0,694	0,740	0,753	0,580	0,592	0,694	0,682
MAF65	0,780	0,746	0,720	0,711	0,860	0,828	0,667	0,626
McM527	0,840	0,776	0,540	0,582	0,860	0,798	0,778	0,735
OarCP49	0,820	0,808	0,800	0,862	0,880	0,821	0,750	0,774
OarAE119	0,720	0,807	0,860	0,789	0,860	0,825	0,500	0,428
HSC	0,800	0,846	0,680	0,813	0,680	0,825	0,389	0,439
MAF214	0,520	0,473	0,760	0,716	0,520	0,526	0,528	0,441
OarFCB11	0,780	0,699	0,720	0,640	0,660	0,685	0,806	0,809
<b>TOTAL</b>	<b>0,738</b>	<b>0,721</b>	<b>0,727</b>	<b>0,731</b>	<b>0,740</b>	<b>0,736</b>	<b>0,649</b>	<b>0,638</b>
<b>(11 Loci)</b>	<b>±0,136</b>	<b>±0,146</b>	<b>±0,086</b>	<b>±0,082</b>	<b>±0,150</b>	<b>±0,123</b>	<b>±0,127</b>	<b>±0,142</b>

In der Mehrheit der Fälle war der Anteil der tatsächlich beobachteten heterozygoten Tiere ( $H_O$ ) höher als der aufgrund der Allelfrequenzen zu erwartende Wert ( $H_E$ ). Auffällig war hier allerdings der Locus HSC, der der einzige Marker war, der durch alle Rassen hinweg einen niedrigeren beobachteten Wert aufwies, als erwartet. Es liegt also bei diesem Marker in allen Rassen ein Heterozygotendefizit vor. Das kann als weiterer Hinweis auf das Vorhandensein von Nullallelen bei diesem Marker gedeutet werden und es zeigt, dass dieses Phänomen in allen vier Rassen verbreitet ist.

Es wurden verschiedene Tests auf signifikante Abweichungen vom HWG durchgeführt. Zum einen auf ein Heterozygotendefizit und zum anderen auf einen signifikanten Überschuss an heterozygoten Tieren. Die gefundenen Werte waren bei keiner Population und bei keinem der Marker signifikant, nachdem die Bonferroni-Korrektur durchgeführt wurde.

Abbildung 5 zeigt nochmal die Heterozygotieraten der vier Rassen im Vergleich:

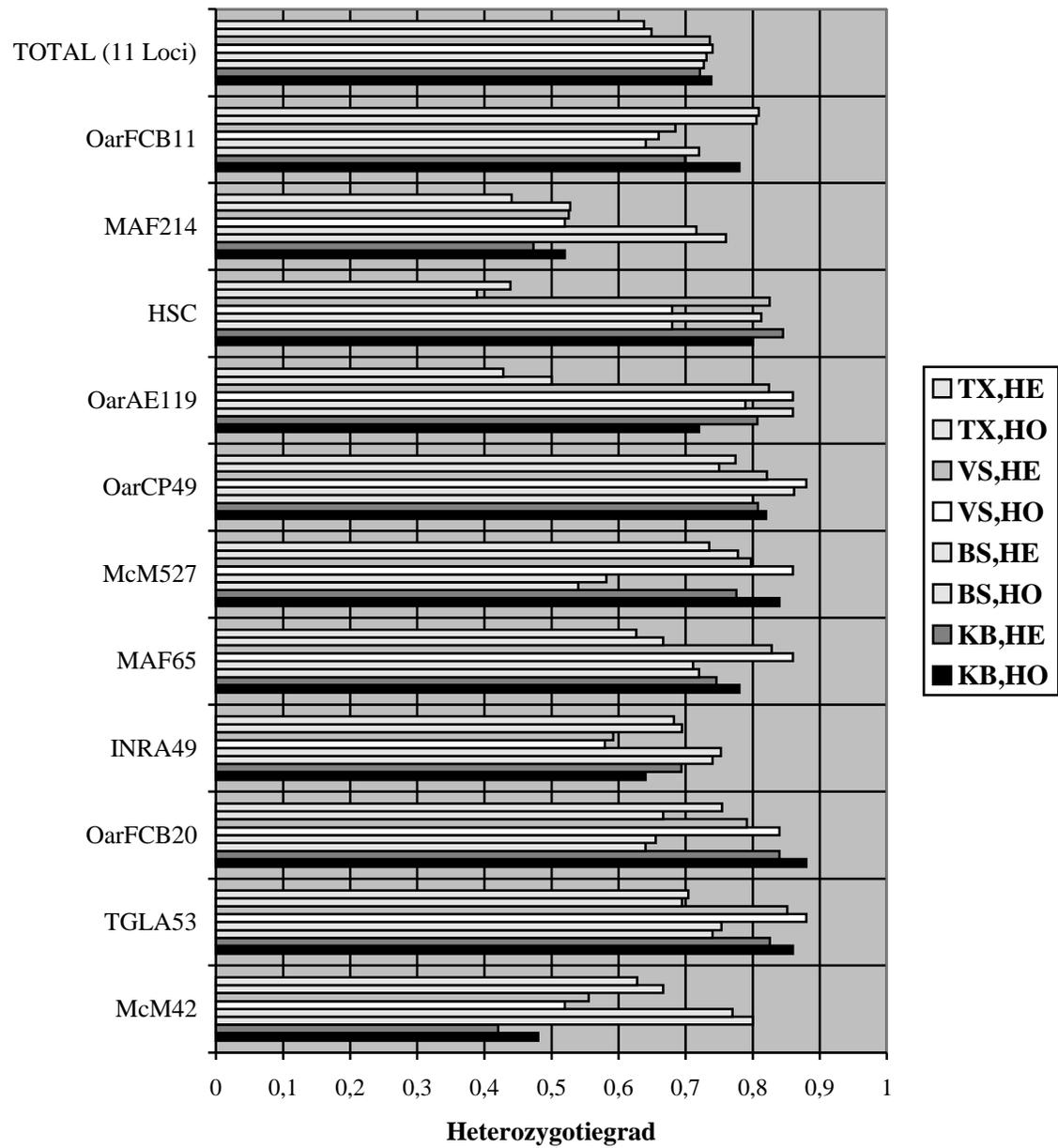


Abb. 5: Erwartete und beobachtete Heterozygotieraten

### **3.8 Genetische Differenzierung zwischen Rassen, bzw. Populationen**

Die folgenden Analysen sollten die Frage klären, inwieweit sich die verschiedenen Schafrassen genetisch voneinander abgrenzen lassen, d.h. ob und wie stark sie genetisch differenziert sind. Für diese Untersuchungen wurden ebenfalls Stichproben der oben erwähnten vier Schafrassen verwendet: 50 Kärntner Brillenschafe (KB), 50 Bergschafe (BS), 50 Villnöber Schafe (VS) und die 36 Texelschafe (TX).

#### **3.8.1 Private Allele**

Populationsspezifische Allele, sogenannte private Allele, konnten in allen vier Rassen gefunden werden (siehe Tab.20).

**Tab. 20:** Private Allele in den vier Schafrassen und ihre Frequenzen

<b>Locus</b>	<b>Allele (bp)</b>	<b>Kärntner</b>	<b>Bergschaf</b>	<b>Villnöber</b>	<b>Texel</b>
OarFCB20	110				0,139
INRA49	149				0,014
	159	0,050			
MAF65	118			0,020	
	122		0,010		
	133	0,020			
	140	0,020			
McM527	165				0,028
	184	0,010			
OarCP49	130	0,070			
OarAE119	165				0,014
HSC	293			0,070	
	295			0,010	
MAF214	254		0,010		
	267	0,010			
OarFCB11	120				0,056
	139			0,010	
	141				0,014
Anzahl		6	2	4	6

Die Anzahl der privaten Allele einer Rasse gegenüber den anderen Rassen kann als genetische Distanz gedeutet werden. Je mehr private Allele eine Rasse aufweist, desto weniger hat sie mit den anderen Rassen gemeinsam, desto weiter ist sie genetisch von den anderen entfernt. Die Unterschiede waren hier bei den vier betrachteten Rassen nicht so groß. Kärntner Brillenschafe und Texelschafe zeigten über alle Loci sechs private Allele, die Villnöber Schafe vier und am wenigsten distanziert scheinen die Bergschafe mit nur zwei privaten Allelen. Die Frequenzen dieser populationsspezifischen Allele waren eher niedrig und lagen fast alle unter 10 %. Lediglich das Allel 110 des Locus OarFCB20, das nur bei den Texelschafen vorkam, erreichte dort eine Frequenz von knapp 14 % (siehe ebenfalls Tab.20).

Einen Vergleich der paarweisen privaten Allele zeigt Tabelle 21. Dabei werden die Allele gezählt, die im Vergleich zweier Populationen nur bei einer der beiden vorkommen.

**Tab. 21:** Anzahl der paarweisen privaten Allele in den vier Schafrassen

<b>Locus</b>	<b>KB/BS</b>	<b>KB/VS</b>	<b>KB/TX</b>	<b>BS/VS</b>	<b>BS/TX</b>	<b>VS/TX</b>
McM42	3	3	5	2	6	6
TGLA53	2	4	3	4	5	5
OarFCB20	3	3	5	2	6	6
INRA49	3	3	4	2	3	3
MAF65	6	6	3	4	5	3
McM527	1	1	4	0	3	3
OarCP49	4	7	7	5	7	6
OarAE119	1	2	5	1	4	3
HSC	2	2	3	4	3	5
MAF214	4	5	4	3	6	3
OarFCB11	2	3	5	1	3	4
<b>TOTAL (11 Loci)</b>	<b>31</b>	<b>39</b>	<b>48</b>	<b>28</b>	<b>51</b>	<b>47</b>

Auch hier verhält es sich wieder so, dass die Anzahl der gefundenen paarweisen privaten Allele ein Maß für die genetische Distanz, bzw. Differenzierung der jeweiligen Rassen darstellt. Es fiel auf, dass die größten Unterschiede jeweils zu den Texelschafen bestanden. Alle drei Schafrassen (Kärntner, Bergschafe und Villnöber) wiesen gegenüber den Texelschafen über 45 private Allele auf. Mit 39 privaten Allelen unterschieden sich Kärntner und Villnöber Schafe recht deutlich. Die Bergschafe zeigten gegenüber den Kärntner und den Villnöber Schafen am wenigsten eigene Allele mit um die 30 privaten Allelen.

### **3.8.2 Populationsdifferenzierung**

Es wurde getestet, ob sich die vier Schafpopulationen signifikant voneinander differenzieren lassen. Einmal aufgrund der Allelverteilung („genic differentiation“) und einmal aufgrund ihrer Genotypenverteilung („genotypic differentiation“). Werden alle vier Rassen miteinander verglichen, so sind sowohl ihre Allelverteilungen, als auch ihre Genotypenverteilungen für alle 11 untersuchten Marker hoch signifikant verschieden. Das heißt, jede Rasse stellt eine eigene genetisch differenzierte Population dar. Beim paarweisen Vergleich der vier Populationen miteinander, kam man im Prinzip zum gleichen Ergebnis. Es zeigte sich jedoch, dass die verschiedenen Marker unterschiedlich gut geeignet sind, um Populationsunterschiede zu detektieren, was vor allem von ihrer Alleldiversität abhängt. So konnte mit dem Marker MAF214, sowohl bei der Allelverteilung, als auch bei der Genotypenverteilung kein signifikanter Unterschied zwischen den Populationen Texelschaf und Kärntner Brillenschaf, sowie zwischen den Populationen Texelschaf und Villnöber Schaf gefunden werden. Das könnte auf die geringe Variabilität dieses Markers bei diesen drei Schafrassen zurückgeführt werden, die gegenüber den Bergschafen deutlich reduziert ist. Die Texelschafe weisen zum Beispiel nur zwei Allele an diesem Marker auf, was eine Differenzierung gegenüber Rassen,

bei denen diese Allele ebenfalls und häufig vorkommen, erheblich erschwert bis unmöglich macht.

### 3.8.3 F-Statistik

Die Werte der drei Fixationsindices  $F_{is}$ ,  $F_{it}$  und  $F_{st}$  für die untersuchten vier Schafrassen sind in Tabelle 22 wiedergegeben.

**Tab. 22:** F-Statistik nach Weir and Cockerham (1984) für die vier untersuchten Schafrassen

<b>Locus</b>	<b><math>F_{is}</math></b>	<b><math>F_{it}</math></b>	<b><math>F_{st}</math></b>
McM42	-0,0378	+0,0814	0,1149
TGLA53	-0,0147	+0,0813	0,0946
OarFCB20	-0,0035	+0,0912	0,0944
INRA49	+0,0279	+0,1237	0,0985
MAF65	-0,0383	+0,0535	0,0884
McM527	-0,0434	+0,0117	0,0528
OarCP49	+0,0027	+0,0624	0,0599
OarAE119	-0,0261	+0,0671	0,0909
HSC	+0,1298	+0,2601	0,1497
MAF214	-0,0735	-0,0393	0,0319
OarFCB11	-0,0516	+0,1437	0,1857
<b>alle 11 Marker</b>	<b>-0,0093</b>	<b>+0,0906</b>	<b>0,0990</b>

Die  $F_{is}$ -Werte stellen ein Maß für die Abweichung vom HWG innerhalb der Subpopulationen dar. Der einzige Marker, der eine auffällige Abweichung von Null zeigt, ist HSC, der mit einem deutlich positiven Wert ein Heterozygotendefizit anzeigt. Beim Test auf die statistische Signifikanz dieser Abweichung war diese auch in zwei Subpopulationen (Bergschafe und Villnöber Schafe) signifikant, nach der Bonferroni-Korrektur allerdings nicht mehr. Der Test über alle vier Populationen zeigte aber ein signifikantes Heterozygotendefizit für den Marker HSC auch nach der Bonferroni-Korrektur.

Die  $F_{it}$ -Werte geben entsprechend einen Hinweis auf die Abweichungen vom HWG in der Gesamtpopulation. Außer dem Marker MAF214, weisen alle Marker mit einem positiven  $F_{it}$ -Wert auf einen Verlust an heterozygoten Tieren in der Gesamtpopulation hin. Nach der Bonferroni-Korrektur der Signifikanzwerte, waren diese Abweichungen noch bei drei Markern (OarFCB20, HSC, OarFCB11) und über alle Loci signifikant.

Die  $F_{st}$ -Werte sind als Maß für die genetische Differenzierung der untersuchten Subpopulationen, in diesem Fall der vier Schafrassen, immer positiv. Sie erreichten je nach Marker zwischen 5 % und 18 % und über alle 11 Marker gemittelt knapp 10 %. Im paarweisen Vergleich dienen die  $F_{st}$ -Werte auch als genetische Distanzmaße zwischen den jeweiligen Subpopulationen. Die für die vier untersuchten Schafrassen ermittelten Distanzen sind in Tabelle 23 aufgeführt. Den kleinsten Wert, das heißt die geringste genetische Distanz findet man zwischen den Kärntner Brillenschafen und den Villnöber Schafen. Das Bergschaf ist zu diesen beiden Rassen etwa gleich weit entfernt und das Texelschaf zeigt, wie erwartet, zu allen drei alpinen Rassen die größten genetischen Distanzwerte.

**Tab. 23:** Paarweiser Vergleich der  $F_{ST}$ -Werte zwischen den Schafrassen

Rasse	Bergschaf	Kärntner	Villnößer	Texelschaf
<b>Bergschaf</b>	-	0,0845	0,0858	0,1442
<b>Kärntner</b>		-	0,0557	0,1434
<b>Villnößer</b>			-	0,1030
<b>Texelschaf</b>				-

### 3.8.4 Genetische Variation innerhalb und zwischen den Rassen

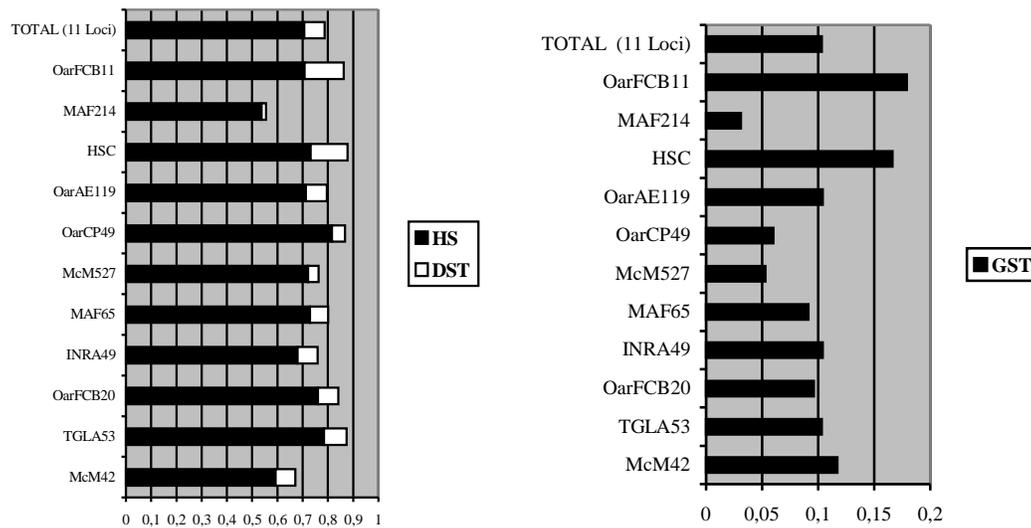
Das Verhältnis der genetischen Variation innerhalb und zwischen den Subpopulationen, ist auch ein Maß für die genetische Differenzierung. Je differenzierter die betrachteten Populationen sind, desto größer stellt sich der Anteil der interpopulären Diversität ( $D_{ST}$ ) gegenüber der intrapopulären Diversität ( $H_S$ ) dar. Tabelle 24 zeigt die für die vier untersuchten Schafrassen ermittelten Schätzwerte nach Nei:

**Tab. 24:** Nei's Schätzwerte zur genetischen Diversität innerhalb ( $H_S$ ) und zwischen Subpopulationen ( $D_{ST}$ ), sowie der Gesamtpopulation (vier Rassen) ( $H_T$ ) und dem Anteil der Diversität zwischen Teilpopulationen an der genetischen Diversität der Gesamtpopulation ( $G_{ST}$ ) für alle 11 Marker

Locus	$H_S$	$D_{ST}$	$H_T$	$G_{ST}$
McM42	0,593	0,078	0,671	0,117
TGLA53	0,784	0,090	0,873	0,103
OarFCB20	0,760	0,081	0,841	0,096
INRA49	0,680	0,079	0,759	0,104
MAF65	0,728	0,073	0,801	0,091
McM527	0,722	0,040	0,763	0,053
OarCP49	0,816	0,052	0,868	0,060
OarAE119	0,712	0,083	0,795	0,104
HSC	0,732	0,145	0,877	0,166
MAF214	0,538	0,017	0,556	0,031
OarFCB11	0,708	0,155	0,863	0,179
<b>TOTAL (11 Loci)</b>	<b>0,707</b>	<b>0,081</b>	<b>0,788</b>	<b>0,103</b>

Im Durchschnitt über alle 11 Loci ergibt sich eine genetische Diversität von  $H_T = 0,788$ , die sich aus einer Diversität zwischen den Rassen von  $D_{ST} = 0,081$  und einer Diversität innerhalb der Rassen von  $H_S = 0,707$  zusammensetzt. Es entfallen also insgesamt nur 10,3 % ( $G_{ST} = 0,103$ ) der genetischen Diversität auf die Diversität zwischen den Populationen. Es zeigt sich, dass einige Marker (z.B. HSC und OarFCB11) stärker zur Differenzierung der Populationen beitragen, als andere. Insgesamt betrachtet bestätigt sich aber bei jedem Locus das gleiche Verhältnis, wie im Durchschnitt aller Loci.

Die beiden Diagramme (siehe Abb.6 und 7) sollen diese Zusammenhänge noch einmal veranschaulichen:



**Abb. 6 und Abb. 7:** Genetische Diversität innerhalb (HS) und zwischen Subpopulationen (DST) sowie Anteil der Diversität zwischen Subpopulationen an der genetischen Diversität der Gesamtpopulation (GST) für die untersuchten Mikrosatellitenmarker

### 3.8.5 Genetische Distanzen

Die für die vier Schafrassen berechneten paarweisen genetischen Distanzen sind in Tabelle 25 aufgeführt. Die Auswahl der Distanzmaße erfolgte zum einen nach der allgemeinen Popularität, also nach der Möglichkeit des Vergleichs mit anderen Studien, und zum anderen nach der Eignung für die Differenzierung von Rassen, die im evolutionären Sinne eher durch kurze Distanzen getrennt sind.

**Tab. 25:** Paarweise genetische Distanzen für die vier Schafrassen nach den Distanzmaßen Nei's standard genetic distance (Nei's D), Nei's corrected genetic distance (Nei1978), Nei's minimum distance (Nei<sub>min</sub>), Reynolds' distance (D<sub>REY</sub>) und Distanz nach Cavalli-Sforza & Edwards (Cav.-Sfz.)

	Nei's D	Nei 1978	Nei <sub>min</sub>	D <sub>REY</sub>	Cav.-Sfz.
Bergschaf/Kärntner	0,348	0,321	0,083	0,09870	0,090
Bergschaf/Villnöber	0,321	0,293	0,075	0,08827	0,076
Bergschaf/Texelschaf	0,459	0,433	0,121	0,15114	0,129
Kärntner/Texelschaf	0,441	0,416	0,119	0,14966	0,130
Villnöber/Texelschaf	0,293	0,267	0,084	0,10404	0,096
Kärntner/Villnöber	0,205	0,178	0,052	0,05931	0,071

Auffällig ist, dass alle fünf gewählten Distanzmaße sich einig sind, dass die kürzeste Distanz zwischen den Kärntner Brillenschafen und den Villnöber Schafen zu finden ist. Die jeweils größten Distanzen werden zwischen den Texelschafen und den anderen drei Schafrassen festgestellt, allerdings zeigt sich hier, dass die verschiedenen Distanzmaße bezüglich der Villnöber Schafe zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Die Schätzwerte nach Nei ermitteln eine geringere Distanz zwischen Texelschafen und Villnöbern, als zwischen

Bergschafen und Kärntner bzw. Villnöber Schafen. „Nei’s minimum distance“ schätzt sie in etwa gleich ein, während Reynolds’ und Cavalli-Sforza’s Distanzen Bergschafe, Kärntner und Villnöber Schafe genetisch näher einschätzen, als Texelschafe und Villnöber Schafe. Diese unterschiedlichen Auswirkungen, je nachdem welches Distanzmaß gewählt wird, sind bekannt und um das Ausmaß dieser Abweichungen quantifizieren zu können, wurde eine Korrelationsmatrix der verwendeten Distanzmaße erstellt (siehe Tab.26).

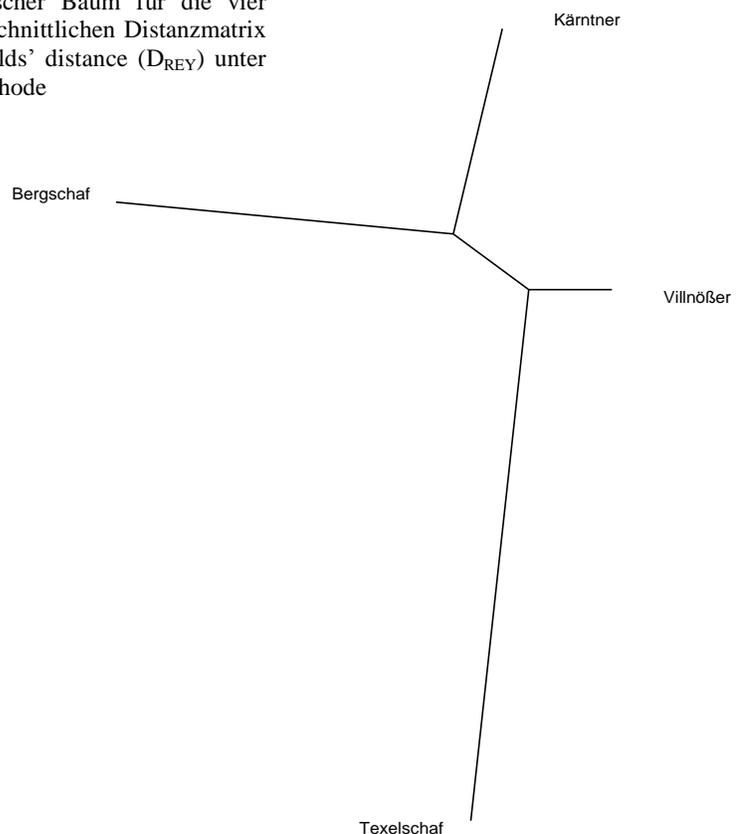
**Tab. 26:** Korrelationsmatrix der verwendeten Distanzmaße

	<b>Nei 1978</b>	<b>Nei<sub>min</sub></b>	<b>D<sub>REY</sub></b>	<b>Cav.-Sfz.</b>
<b>Nei’s D</b>	0,9999	0,9710	0,9603	0,9064
<b>Nei 1978</b>		0,9729	0,9625	0,9100
<b>Nei<sub>min</sub></b>			0,9991	0,9745
<b>D<sub>REY</sub></b>				0,9802

Die höchste Korrelation zeigte sich dabei zwischen Nei’s Schätzwerten (Nei’s D und Nei 1978), die auf dem gleichen Ansatz beruhen und ein weit verbreitetes Maß für lange Divergenzzeiten darstellen. Eine Korrelation ebenfalls über 0,99 wiesen „Nei’s minimum distance“ und „Reynolds’ distance“ auf, beides Distanzmaße, die für die Untersuchung kurzer Divergenzzeiten (beispielsweise Rassen) empfohlen werden.

Eine Möglichkeit, genetische Distanzen graphisch darzustellen, ist das Rekonstruieren phylogenetischer Bäume. Dazu wurden in diesem Fall die genetischen Distanzen nach Reynolds ausgewählt, da diese sich gut eignen sollen, die Beziehungen zwischen eng verwandten Populationen, wie hier die vier Schafrassen, aufzuklären. Der daraus resultierende Neighbor-Joining-Tree ist in Abbildung 8 dargestellt.

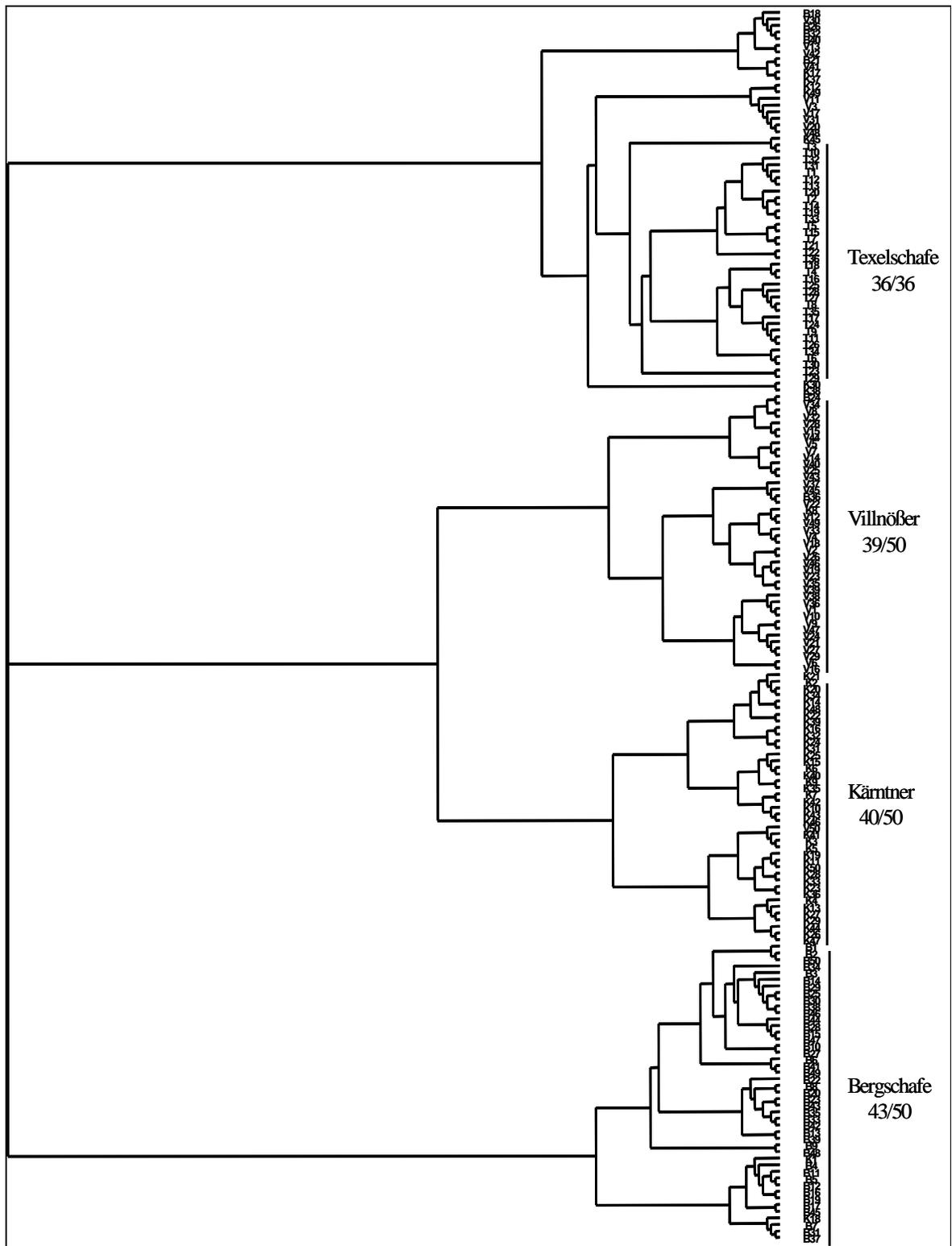
**Abb. 8:** Rekonstruierter phylogenetischer Baum für die vier Schafrassen auf der Basis einer durchschnittlichen Distanzmatrix aus 100 Bootstrap-Samples mit Reynolds’ distance ( $D_{REY}$ ) unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode



Dieser Baum hat keine Wurzel („unrooted tree“) und macht somit keine Annahme über phylogenetisch „ältere“ und „jüngere“ Populationen. Bei der gewählten Darstellungsform handelt es sich um eine eindimensionale Projektion der Distanzmatrix, die so zu verstehen ist, dass die Distanz zweier Populationen der Summe der Längen der sie verbindenden Äste entspricht. Da unterschiedliche Stichprobengrößen die Distanzen verzerren (je kleiner eine Stichprobe ist, desto größer ist die numerische Distanz) wurden von jeder Population nur 36 Tiere in die Berechnung eingesetzt. Bei hundert Wiederholungen („bootstrapping“) wurde die Gruppierung von Bergschaf und Kärntner Schafen in 73 Wiederholungen beobachtet und die Abspaltung der Texelschafe in 40 von 100 Wiederholungen. Das zeigt, dass die Baumstruktur nicht besonders robust ist.

Sowie die genetischen Distanzen zwischen Populationen errechnet werden können, so kann aufgrund der hohen Variabilität der Mikrosatellitenmarker auch zwischen Individuen mehr oder weniger deutlich unterschieden werden. Das Distanzmaß, das hier verwendet wird, beruht auf den Anteilen an gemeinsamen Allelen zwischen den Individuen („proportion of shared alleles“). Dabei werden die Individuen als taxonomische Einheiten (OTU) verwendet. Das Maß der Differenzierung der einzelnen Rassen zeigt sich hierbei in der Anzahl an Tieren einer Rasse, die sich in einem Cluster wiederfinden. Wenn eine Population genetisch sehr differenziert ist, so sollten auch alle Tiere dieser Population sich zu einer Gruppe zusammenfinden, da sie miteinander mehr Allele teilen sollten als mit Angehörigen anderer Rassen.

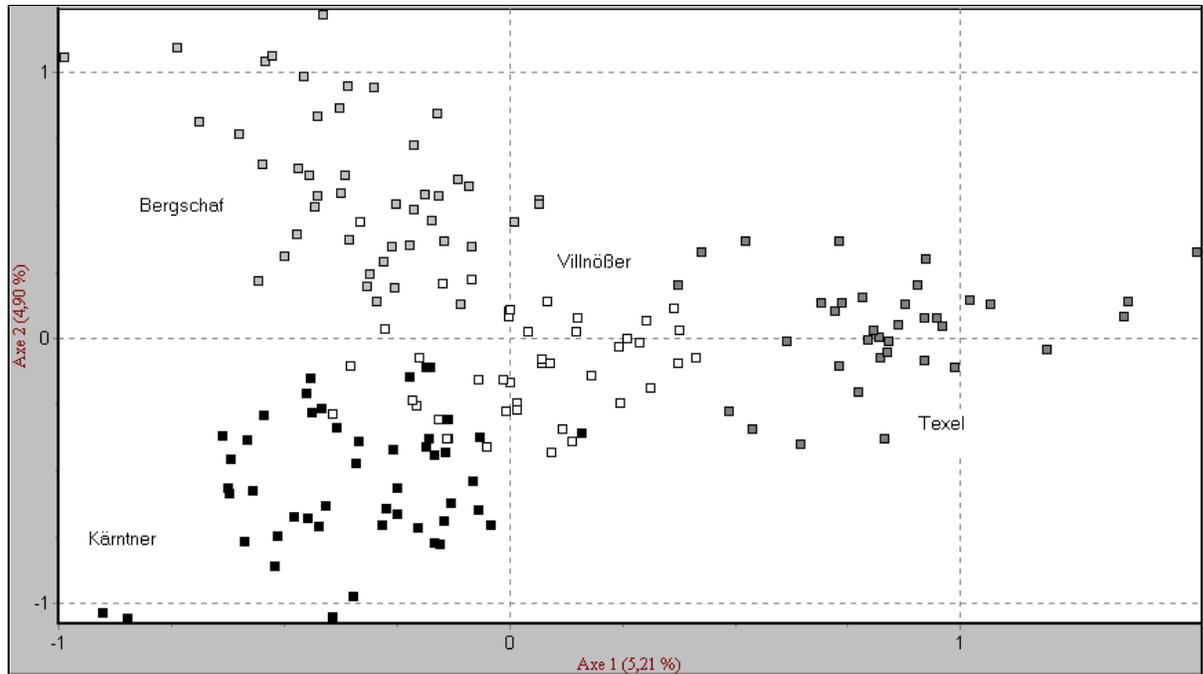
In Abbildung 9 ist ein solcher Individuenbaum für die hier untersuchten vier Schafrassen dargestellt. Den größten Grad der genetischen Differenzierung zeigt die Rasse der Texelschafe. Hier clustern alle 36 Tiere (100 %) in eine Gruppe zusammen. Bei den Villnöber Schafen finden sich von 50 Tieren 39 Individuen (78 %) in einem Cluster wieder. Von 50 Kärntner Brillenschafen bilden 40 Tiere (80 %) eine Gruppe und von 50 Bergschafen sind 43 Tiere (86 %) einem Cluster zugeordnet.



**Abb. 9:** Individuenbaum basierend auf den „allele-sharing distances“ zwischen 186 Individuen der vier Schafrassen unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode

### 3.8.6 Hauptfaktorenanalyse (Principal Components Analysis, PCA)

Es wurde, ebenfalls mit Individuen als OTU, eine Hauptfaktorenanalyse durchgeführt. Dieses statistische Verfahren kondensiert die Informationen aller Allele und Loci zu einer geringeren Anzahl an synthetischen Variablen, den Hauptfaktoren. Bei der PCA werden die beobachteten Allelfrequenzen, so umgerechnet, dass die erhaltenen Hauptfaktoren möglichst den maximalen Anteil der Variabilität, die in den Daten enthalten ist, erklären. Das Ergebnis dieser Analyse für die Individuen der vier untersuchten Schafrassen ist in Abbildung 10 zu sehen.



**Abb. 10:** Hauptfaktorenanalyse der untersuchten Schafrassen (50 Bergschafe, 50 Kärntner Brillenschafe, 50 VillnöBer Schafe und 36 Texelschafe); 1.Hauptfaktor auf der X-Achse, 2.Hauptfaktor auf der Y-Achse dargestellt, jeweils mit dem prozentualen Anteil der Gesamtvarianz, der durch diesen beschrieben wird; jedes Quadrat stellt ein Individuum dar

Es wurde hier die zweidimensionale Darstellungsform gewählt, da die dreidimensionale Darstellungsweise bei keiner zusätzlichen Information weniger übersichtlich ist. Mit den ersten beiden Hauptfaktoren können in diesem Fall lediglich 10,11 % der Gesamtvarianz beschrieben werden, wobei der erste Hauptfaktor stets informativer ist als der zweite und alle Faktoren unabhängig voneinander sind. Obwohl also rund 90 % der Information, die in den Daten steckt durch diese graphische Darstellung verloren sind, lässt sich aber deutlich erkennen, dass die Individuen einer Rasse zu einer Punktwolke zusammengruppiert. Am klarsten trennen sich die Texelschafe von den anderen drei Punkteclustern. Kärntner Brillenschafe und Bergschafe grenzen sich auch recht gut voneinander ab, während die VillnöBer Schafe zwar auch eine eigene Punktwolke produzieren, diese aber einen deutlichen Überschneidungsbereich mit den Kärntner Brillenschafen aufweist. Einige VillnöBer Individuen finden sich auch bei den Bergschafen wieder.

### 3.8.7 Rassezuordnung von Einzeltieren („breed assignment“)

Es wurden verschiedene Methoden der Rassezuordnung auf den Datensatz der vier untersuchten Schafrassen angewendet und miteinander verglichen. Weit verbreitet sind die auf Allelfrequenzen beruhenden Methoden, die das Individuum der Population zuordnen, in der dieser Genotyp aufgrund der Allelfrequenzen der verschiedenen Populationen mit der größten Wahrscheinlichkeit auftritt. Ein neuerer Ansatz basiert auf Distanzen und ordnet das Individuum der Population zu, zu der es die geringste Distanz aufweist. Als Kriterium für die Güte der Zuordnungsmethoden wurde zum einen die Häufigkeit der korrekten wahrscheinlichsten Zuordnung errechnet und zum anderen untersucht, wie oft diese Zuordnungen auf dem 5 %-Irrtumsniveau signifikant sind. Im letzteren Fall werden nur die Tiere als korrekt zugeordnet gezählt, deren Zuordnungswahrscheinlichkeit zur tatsächlichen Herkunftspopulation mindestens 95 % beträgt, während bei der wahrscheinlichsten Zuordnung die absolute Höhe der Zuordnungswahrscheinlichkeit nicht entscheidend ist, sondern lediglich, dass das Tier mit der größten Wahrscheinlichkeit seiner tatsächlichen Ursprungspopulation zugeordnet wird. Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

**Tab. 27:** Anteile und Anzahl korrekter Zuordnungen von insgesamt 186 Schafen der vier untersuchten Rassen

<b>Methode</b>		<b>Anteil (Anzahl) korrekter ...</b>	
		<b>wahrscheinlichster Zuordnungen</b>	<b>signifikanter Zuordnungen</b>
“likelihood-based”	Bayes	97,85 % (182)	3,76 % (7)
	Frequenz	97,85 % (182)	3,76 % (7)
“distance-based”	Nei DA	97,31 % (181)	4,84 % (9)
	Nei Standard	95,70 % (178)	4,84 % (9)
	DAS	92,47 % (172)	3,23 % (6)

Es zeigt sich, dass die Methoden, die auf den Allelfrequenzen beruhen, etwas erfolgreicher sind, als die auf den genetischen Distanzen basierenden Methoden. Man sieht auch, dass es bei letzteren stark von dem Distanzmaß abhängt, das verwendet wird. Weitere Distanzmaße, die getestet wurden, führten zu noch schlechteren Ergebnissen und sind daher nicht aufgeführt. Die signifikanten Zuordnungen erreichten bei allen Methoden nicht einmal 5 %. Tabelle 28 zeigt nun, zu welcher Rasse die fehlerhaft zugeordneten Tiere gehören und welcher „falschen“ Rasse sie zugeordnet wurden.

**Tab. 28:** Rassezuordnung der insgesamt 186 Individuen zu den vier Schafrassen nach der „Frequenz-Methode“

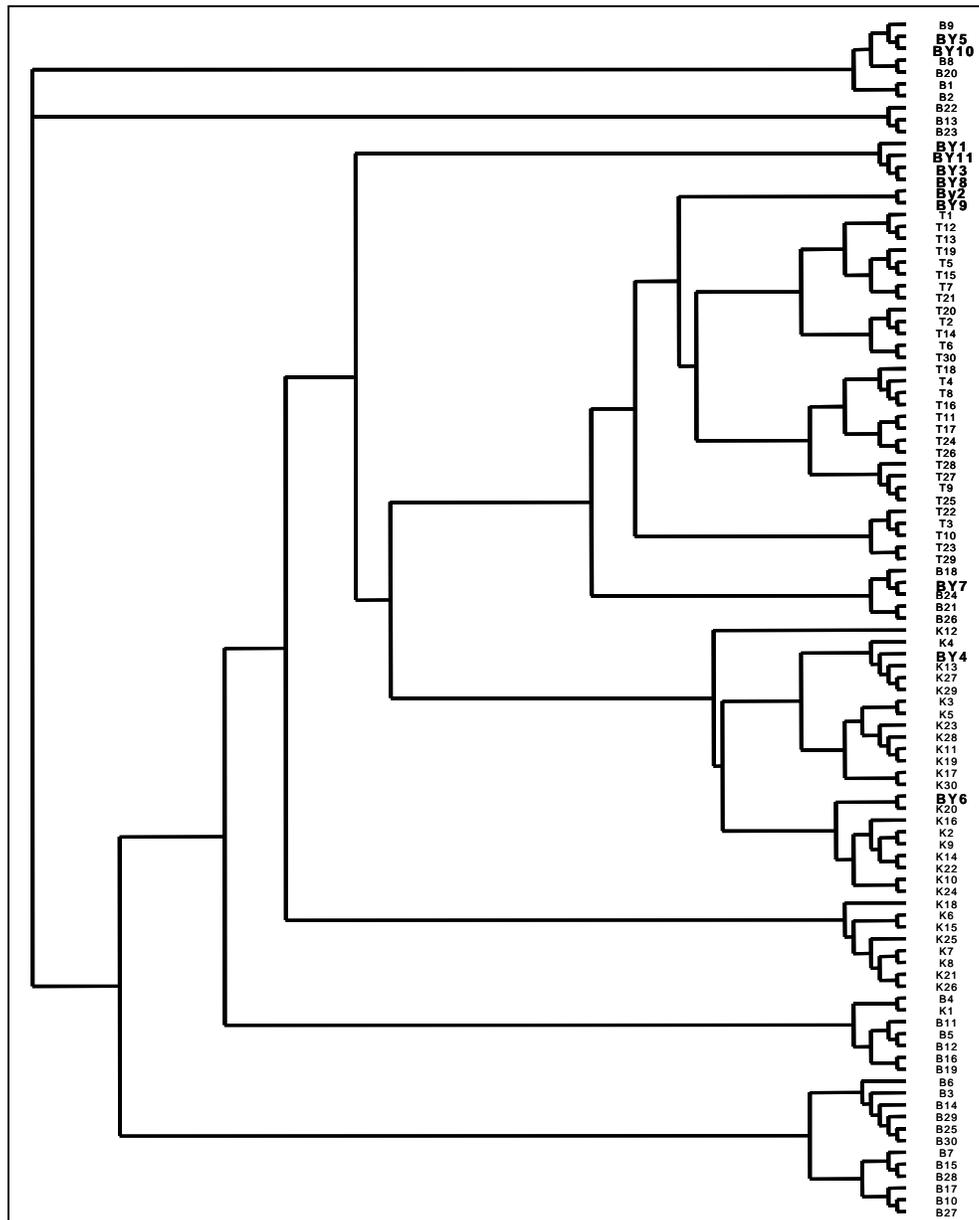
	<b>Kärntner</b>	<b>Bergschaf</b>	<b>Villnößer</b>	<b>Texel</b>	<b>Insgesamt</b>
<b>Kärntner</b>	50	0	0	0	50
<b>Bergschaf</b>	0	49	1	0	50
<b>Villnößer</b>	2	0	47	1	50
<b>Texel</b>	0	0	0	36	36

Es muss allerdings beachtet werden, dass keine dieser Fehlzuordnungen signifikant war und bei dieser Methode auf jeden Fall eine Population für das Individuum ausgewählt wird, auch wenn keine der vier Populationen sehr wahrscheinlich ist.

Mit dem Softwareprogramm *Structure* wurde untersucht, in wieviele Populationen sich der Datensatz der 186 Schafe aufgrund ihrer Genotypen strukturiert, wenn a priori keine Populationen angenommen werden. Dabei ergaben sich statt der vier Rassen fünf Subpopulationen, wobei sich die Villnößer Schafe in zwei Gruppen zu je etwa 40 % spalteten, während die anderen drei Rassen zu rund 90 % in jeweils ein Cluster fielen.

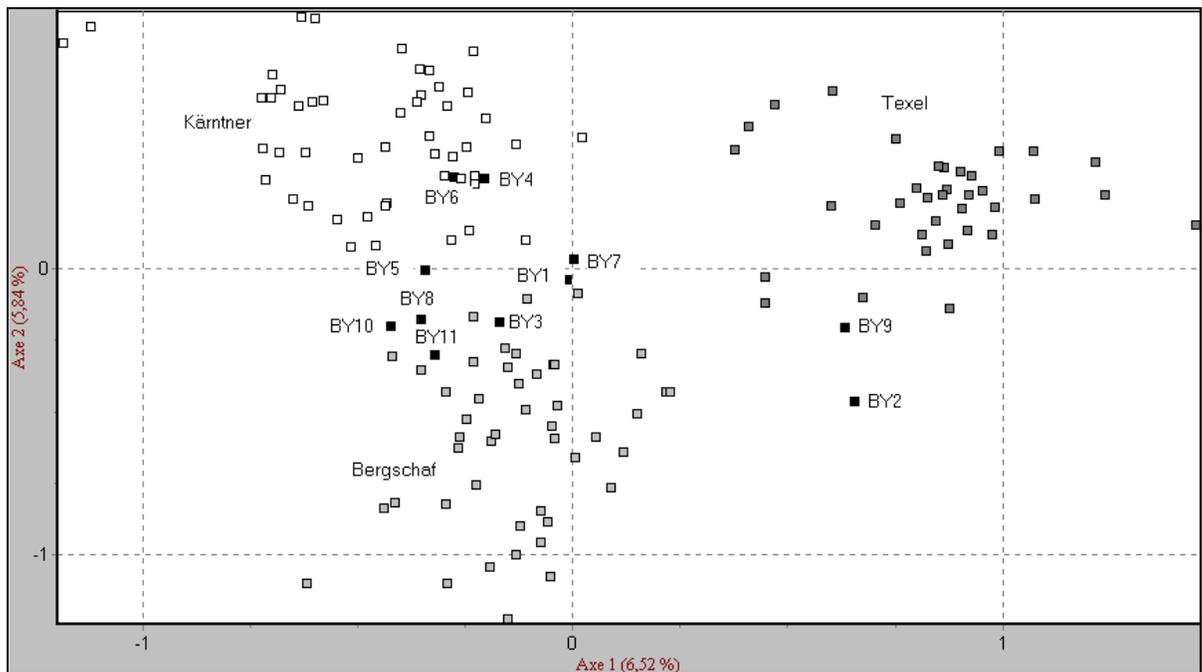
### 3.9 Untersuchung auf Hybride

Bei 11 Bayrischen Kärntner Brillenschafen bestand der Verdacht, dass es sich bei diesen Tieren um Kreuzungen von Kärntner Brillenschafen mit Bergschafen handelt. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde untersucht, in welcher Beziehung diese 11 Individuen zu den entsprechenden Rassen stehen. Dazu wurde ein Individuenbaum erstellt, der neben den 11 Bayrischen Kärntner Brillenschafen (BY), 30 Kärntner Brillenschafe aus Kärnten (K), 30 Bergschafe (B) und als Außengruppe 30 Texelschafe (T) enthält (siehe Abb.11).



**Abb. 11:** Individuenbaum basierend auf den „allele-sharing distances“ zwischen 101 Individuen unter Verwendung der Neighbor-Joining-Methode

Dabei fällt auf, dass lediglich zwei der elf Bayrischen Brillenschafe (BY4 und BY6) klar mit den Kärntner Brillenschafen zusammenclustern, während drei Bayrische Schafe (BY5, BY10 und BY7) mit Bergschafen zusammengruppieren. Vier der elf Bayrischen Schafe (BY1, BY11, BY3 und BY8) bilden ein eigenes Cluster und zwei Individuen (BY2 und BY9) scheinen von ihren Allelen her den Texelschafen am ähnlichsten zu sein. Ein vergleichbares Bild ergab die Hauptfaktorenanalyse dieser Individuen (siehe Abb.12).



**Abb. 12:** Hauptfaktorenanalyse von 147 Individuen (50 Kärntner Brillenschafe, 50 Bergschafe, 11 Brillenschafe aus Bayern und 36 Texelschafe)

Die beiden Bayrischen Brillenschafe BY4 und BY6 liegen deutlich in der Punktwolke der Kärntner Schafe und die beiden Außenseiter BY2 und BY9 zeigen auch hier relative Nähe zu den Texelschafen. Die drei Bayrischen Schafe BY5, BY10 und BY7, die im Individuenbaum mit Bergschafen zusammengruppierten, liegen mit dem Vierercluster (BY1, BY11, BY3 und BY8) im Grenzgebiet zwischen Bergschafen und Kärntner Brillenschafen und bilden eine Art Überlappungsbereich.

Bei dem Versuch ein „breed assignment“ dieser 11 Bayrischen Schafe durchzuführen, kamen keine verwertbaren Ergebnisse heraus. Werden die 11 Schafe als unbekannter Herkunft angegeben, werden nach der „Bayesian method“ fünf von ihnen den Kärntner Brillenschafen zugeordnet, zwei den Bergschafen und vier den Texelschafen. Keine dieser Zuordnungen war aber signifikant, die Zuordnungswahrscheinlichkeiten lagen alle bei Null. Ordnet man die Bayrischen Schafe den Kärntner Schafen zu und führt eine Selbstklassifikation durch, so werden sie bis auf zwei Tiere (BY2 und BY9) auch wirklich den Kärntner Schafen zugeordnet, wobei auch hier die Wahrscheinlichkeiten der Zuordnung sehr niedrig sind und bei den beiden Tieren, die den anderen Rassen zugeordnet wurden, sind sie Null.

Mit dem Softwareprogramm *Structure* wurde eine Untersuchung auf „admixture“ durchgeführt. Es wurde berechnet, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass diese 11

Bayrischen Brillenschafe Genanteile anderer Rassen besitzen. Dazu wurde untersucht, wie sicher sie den Kärntner Brillenschafen zugeordnet werden und wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass sie einer der anderen Rassen angehören oder aber ein Eltern- bzw. Großelternanteil aus diesen anderen Rassen aufweisen. Auffällig waren dabei wieder die beiden Außenseiter BY2 und BY9, die beide mit einer Wahrscheinlichkeit von 0 % den Kärntner Brillenschafen angehören und mit einer Wahrscheinlichkeit von 83 % bzw. 99 % den Texelschafen zugeordnet werden. BY2 hat mit einer Wahrscheinlichkeit von 13 % ein Elternteil aus der Population der Texelschafe, BY9 nur mit 0,5 %. Das Bayrische Schaf mit der Nummer BY11 wird nur mit 80 % Wahrscheinlichkeit den Kärntner Schafen zugeordnet und weist mit 8 %, bzw. 12 % Wahrscheinlichkeit ein Eltern- bzw. Großelternanteil aus der Population der Bergschafe auf. Die restlichen Bayrischen Schafe werden mit 90 %iger Wahrscheinlichkeit oder mehr den Kärntner Brillenschafen zugeordnet. Die Wahrscheinlichkeit, dass sie Vorfahren aus der Bergschafpopulation besitzen liegt bei ihnen nur zwischen 2 % und 6 %.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Genetische Diversität**

Das Kärntner Brillenschaf ist in seiner genetischen Variabilität keineswegs eingeschränkt. Die mittlere Anzahl an Allelen pro Locus von  $10,09 \pm 2,95/\text{Locus}$  und eine erwartete Heterozygotierate („gene diversity“) von 73 %, die in der Gesamtpopulation ermittelt werden konnten (siehe Tab.12), liegen im Bereich der in vielen Studien angegebenen Werte oder sogar darüber. So werden bei verschiedenen spanischen Schafrassen in einer Untersuchung mit 19 Mikrosatelliten zwischen 7,5 und 9,9 Allelen pro Locus und eine „gene diversity“ von 77 % bis 81 % gefunden (ARRANZ et al., 1998). FORBES et al. (1995) untersuchten verschiedene Schafrassen mit acht Mikrosatelliten und ermittelten eine mittlere Anzahl an Allelen pro Locus zwischen 5,6 und 6,8 und eine erwartete Heterozygotie zwischen 64 % und 69 %. Eine Untersuchung verschiedener Ziegenpopulationen in Asien mit 22 Mikrosatelliten ergab zwischen 4,3 und 5,9 Allelen im Mittel pro Locus und eine „gene diversity“ von 43 % bis 66% (BARKER et al., 2001). Europäische Rinderrassen, die mit 20 Mikrosatelliten untersucht wurden, wiesen eine mittlere Anzahl an Allelen pro Locus zwischen 5,2 und 6,0 und eine „gene diversity“ zwischen 58 % und 71 % auf (EDWARDS et al., 2000) und auch für verschiedene Pferderassen, die mit 13 Mikrosatelliten untersucht wurden, konnten Werte in dieser Größenordnung ermittelt werden, die mittlere Anzahl an Allelen pro Locus variierte hier von 5,1 bis 6,7 und die „gene diversity“ zwischen 69 % und 77 % (CAÑON et al., 2000). Diese Art der Vergleiche ist aber problematisch, denn es muss bedacht werden, dass in jeder Studie in der Regel unterschiedlich viele und v.a. andere Mikrosatellitenmarker verwendet werden. Der Polymorphismus von Mikrosatelliten hängt in erster Linie von der Länge des Repeats ab, wobei generell mehr Allele gefunden werden, je länger der repetitive Abschnitt des Mikrosatelliten ist (WEBER, 1990). Diese unterschiedliche Variabilität und auch die variierenden Stichprobengrößen zwischen den Studien können zu falschen Schlussfolgerungen führen. Idealerweise vergleicht man also Ergebnisse, die mit den gleichen Markersystemen erhalten wurden. Das ist beispielsweise für die Villnößer Schafe der Fall, bei denen sich in der Gesamtpopulation für die gleichen 11 Mikrosatellitenmarker eine mittlere Anzahl an Allelen pro Locus von  $9,55 \pm 2,21$  und eine „gene diversity“ von 75 % ermitteln ließ (siehe Tab.16). Aus der Routinediagnostik des Instituts waren die Daten anderer Schafrassen, die ebenfalls mit diesem Set von 11 Mikrosatellitenmarkern untersucht wurden, verfügbar. Der besseren Vergleichbarkeit wegen wurde eine Stichprobe von je 50 Tieren gezogen. Die Bergschafe bilden in Österreich den größten Anteil des Gesamtbestandes an Schafen. Mit knapp 18 000 Herdbuchtieren machen sie 1999 fast 60 % des österreichischen Schafbestandes aus (SAMBRAUS, 2001). Texelschafe standen leider nur 36 zur Verfügung, sie sollten aber als eine auf Fleisch selektierte Leistungsrasse zum Vergleich herangezogen werden. Die mittlere Anzahl an Allelen pro Locus lag zwischen 5,64 bei den Texelschafen und 7,91 bei den Villnößer Schafen. Die Unterschiede erwiesen sich als nicht signifikant (siehe Tab.18). Die „gene diversity“ variierte zwischen 64 % bei den Texelschafen und 74 % bei den Villnößer Schafen, wobei auch hier die Unterschiede nicht signifikant waren (siehe Tab.19). Kärntner Brillenschafe und Bergschafe lagen mit ihren Werten jeweils dazwischen. Die etwas geringere Variabilität der Texelschafe könnte einerseits ein Hinweis auf eine

verminderte genetische Variabilität aufgrund einer leistungsorientierten Selektion sein (FALGE et al., 1999), ist aber wohl eher auf die geringere Stichprobengröße zurückzuführen, die zudem keine zufällige Stichprobe darstellt und eine Verwandtschaft dieser 36 Tiere kann nicht ausgeschlossen werden.

Es lässt sich also kein Hinweis dafür finden, dass die Kärntner Brillenschafe im Vergleich mit Rassen, die nie in ihrem Bestand gefährdet waren, wie die Bergschafe, aber auch im Vergleich mit den Villnößer Schafen, die eine ähnliche Bestandsgröße, wie das Kärntner Brillenschaf aufweisen, genetisch eingeschränkt sind, obwohl die heutige Population auf recht wenige Tiere zurückzuführen ist. Der aus der Populationsgeschichte hervorgehende „bottleneck“, d.h. die erhebliche Reduktion der Populationsgröße, lässt sich in der heutigen Population an den Messwerten der genetischen Variabilität nicht erkennen. Das Problem wurde schon bei verschiedenen Wildtierpopulationen beobachtet (QUENEY et al., 2000, AMOS, 1999) und lässt sich dadurch erklären, dass ein signifikanter Verlust an Heterozygotie nur durch „drift“ alleine extrem langsam vor sich geht und sich je nach verbliebener effektiver Populationsgröße erst nach vielen Generationen bemerkbar macht. ALLENDORF (1986) hat beispielsweise gezeigt, dass bei einer effektiven Populationsgröße von 25 ein signifikanter Verlust an genetischer Diversität erst nach mindestens 15 Generationen beobachtet werden kann, wobei die Populationsgröße über diese 15 Generationen konstant niedrig bleiben muss. Wenn sich eine Population nach einem „bottleneck“ schnell wieder erholt und stark vermehrt, ist sie in der Lage einen Großteil ihrer genetischen Diversität zu bewahren. Dieses Phänomen zeigte auch die Antarktische Pelzrobbe, die zu Beginn des 20. Jahrhunderts, nachdem sie als ausgestorben galt, wiederentdeckt wurde und sich daraufhin schnell vermehrte und heute hohe Level an genetischer Variabilität aufweist (GEMMEL et al., 1997). Die Kärntner Brillenschafe hatten zu Beginn der gezielten Erhaltungszucht eine effektive Populationsgröße von 18 Tieren, haben sich dann aber rasch vermehrt und es wurden immer wieder neue Tiere ausfindig gemacht, die in die Zucht eingesetzt wurden und somit die genetische Basis erweiterten. Hinzu kommt, dass wir keine Vergleichspopulation an Kärntner Brillenschafen von vor dem durchgemachten „bottleneck“ zur Verfügung haben, die Aufschlüsse darüber geben könnte, wie groß die genetische Variabilität der Kärntner Brillenschafe einmal war und ob und wie stark sie sich nun verändert hat.

Beispiele aus der Wildtierbiologie sollen zeigen, wie ein wirklicher Verlust an genetischer Variabilität aussieht. Der Äthiopische Wolf ist von allen Caniden der am meisten gefährdete und weist bei einer Untersuchung mit neun Mikrosatelliten lediglich eine mittlere Anzahl an Allelen pro Locus von 2,4 und eine „gene diversity“ von 24 % auf (GOTTELLI et al., 1994). Turmfalken auf Mauritius haben einen schweren „bottleneck“ hinter sich; es wird vermutet, dass die heutige Population von 200 Brutpaaren auf ein einziges Brutpaar im Jahre 1974 zurückgeht. In einer Untersuchung mit 12 Mikrosatelliten konnte nur noch eine Variabilität von 1,41 Allelen im Mittel pro Locus und eine „gene diversity“ von 10 % festgestellt werden. In dieser Studie von GROOMBRIDGE et al. (2000) wurden zusätzlich bis zu 170 Jahre alte Museumstiere mituntersucht, um einen Vergleich von Falken vor dem „bottleneck“ mit den heutigen Falken zu ermöglichen. Dabei zeigten sich Allele, die in der heutigen Population nicht mehr auftreten, also durch den „bottleneck“ verloren gingen und insgesamt konnte ein Verlust der genetischen Variabilität von über 50 % festgestellt werden. Das ist ein Beweis dafür, dass sich eine Population auch trotz solch eines dramatischen Verlusts wieder erholen kann. Dass eine absolut eingeschränkte genetische Variabilität nicht automatisch schwerwiegende Folgen haben muss, zeigt auch das Beispiel einer wildlebenden Rinderherde

in Nordengland. Sie lebt dort seit etwa 300 Jahren in totaler Isolation und Inzucht und zeigte bei einer Untersuchung mit 25 Mikrosatelliten nur für einen Marker heterozygote Tiere. Für alle anderen 24 Marker waren alle untersuchten Tiere identisch. Und trotz dieser praktisch nicht vorhandenen genetischen Variabilität zeigt sich keinerlei Inzuchtdepression, wie etwa verminderte Fruchtbarkeit oder verkürzte Lebensdauer. Eine mögliche Erklärung wäre der vollständige Verlust nachteiliger Gene durch die starke Inzucht in Verbindung mit natürlicher Selektion (VISSCHER et al., 2001).

## **4.2 Abstammungsüberprüfung der Kärntner Brillenschafe**

Es wurden insgesamt 668 Abstammungsangaben im Herdbuch der Kärntner Brillenschafe überprüft. Dabei handelte es sich um 244 Vaterschafts- und 424 Mutterschaftsangaben. Von den 244 überprüften Vaterschaftsangaben mussten 43 Böcke von der Vaterschaft ausgeschlossen werden, was eine Fehlerrate von 17,6 % ausmacht. Von insgesamt 424 angegebenen Mutterschaften erwiesen sich 78 Angaben als falsch, was einem Fehlerquotienten von 18,4 % entspricht. Die Fehlerquote ist also für Vaterschafts- wie Mutterschaftsangaben in etwa gleich hoch, was nicht zu erwarten war, da man bei Säugetieren im allgemeinen davon ausgeht, dass das Muttertier seinem säugenden Jungtier ohne weiteres zugeordnet werden kann. Bei Schafen ist es auch nicht üblich, dass Lämmer bei anderen Mutterschaften als ihrer eigenen Mutter trinken, da diese ihre Lämmer am Geruch kontrolliert und fremde Lämmer von ihrem Euter vertreibt. Es wird oft berichtet, dass es eher schwierig ist und einer Menge Geduld und List bedarf, wenn man ein mutterloses Lamm einem anderen Mutterschaf „unterschieben“ möchte (Jasbinschek, 2001). Wie es zu diesem hohen Anteil an Fehl Abstammungen kommt, ist nicht leicht zu sagen. Es werden viele Unsicherheiten zu Beginn der herdbuchmäßigen Zucht der Kärntner Brillenschafe vermutet, die sich durch die ganzen Aufzeichnungen hindurchziehen. Es wurde damals versucht, die Verwandtschaftsverhältnisse der gefundenen Gründertiere durch die Befragung der Besitzer zu rekonstruieren. Es wurden zusätzlich die Verwandtschaftsverhältnisse der Besitzer eruiert, da oft Tiere innerhalb der Familien ausgetauscht wurden, und u.a. die Lokalität des Fundes berücksichtigt (Jasbinschek, 2001). Doch das alles waren nur Anhaltspunkte und diese Unsicherheiten in der gesamten Aufzeichnung könnten zu dem relativ hohen Anteil an Fehlangaben führen. Durch die hier erfolgte umfangreiche Überprüfung der Abstammungsangaben im Herdbuch der Kärntner Brillenschafe ist es nun möglich, diese Fehler zu beseitigen und Tiere von der weiteren Zucht auszuschließen, für die Fehler in der Abstammung gefunden wurden. Weiters sollten Fehlerquellen überdacht werden, wie etwa das häufige Übertragen der Tätowiennummern mit der Hand, was durch Unleserlichkeit schnell zu Unsicherheit und damit zu möglichen falschen Lebensnummern und fehlerhaften Abstammungsangaben führen kann.

Im Vergleich zu anderen Schafrassen, von denen am Institut für Tierzucht und Genetik im Laufe der Jahre 1999 und 2000 routinemäßig die Abstammungsangaben überprüft wurden, zeigt sich aber, dass es auch dort einen nicht geringen Anteil an Fehl Abstammungen gibt. So erwiesen sich im Jahre 1999 16 % der Angaben als falsch und im Jahre 2000 waren 13,8 % der angegebenen Böcke von der Vaterschaft auszuschließen und doch auch immerhin 6,3 % der angenommenen Mütter falsch. Es scheint also auch in anderen Schafzuchtvereinen Schwächen in der Aufzeichnung der Zuchtdaten zu geben.

Vergleichswerte aus der Literatur liegen bei Rindern für den Anteil an Kälbern mit falscher Abstammung je nach Untersuchung bei 2,9 % bis 23 % (GELDERMANN et al., 1986, RON et al., 1996) und ähnlich hohe Werte von 10 % bis 20 % werden für Schweine angegeben (JUNEJA & VÖGELI, 1998). Das macht deutlich, dass eine Überprüfung der Abstammungsangaben mit Hilfe der Molekulargenetik durchaus sinnvoll ist und dazu beitragen sollte, diesen hohen Unsicherheitsfaktor in der Tierzucht zu reduzieren. In der Lebensmittelproduktion wird die Forderung nach einem gesicherten Nachweis der Herkunft eines Tieres und damit seiner Abstammung immer dringlicher, da der Verbraucher zunehmend durch die immer wieder auftretenden Meldungen über BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) und den damit gefürchteten Risiken verunsichert ist. Beim Schaf ist eine genetisch bedingte Anfälligkeit für die entsprechende Krankheit Scrapie bekannt. Eine gezielte Zucht auf Scrapie-resistente Linien kann durch eine gesicherte Abstammung erheblich erleichtert werden.

Für eine gefährdete Rasse, wie das Kärntner Brillenschaf ist ein anderer Aspekt wichtiger, nämlich der, dass die Erhaltung einer möglichst breiten genetischen Basis nur durch gesicherte Abstammungen erfolgreich sein kann, da dadurch das unwissentliche Anpaaren verwandter Tiere vermieden wird.

### **4.3 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, Nullallele**

Für die Kärntner Brillenschafpopulation wurden keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) gefunden. Bei der Kontrolle der Abstammungsangaben sind aber Fälle aufgetreten, die lediglich für den Marker HSC einen Ausschluss zeigten und bei weiterer Untersuchung dieses Problems konnte ein Nullallel nachgewiesen werden (siehe Abb.2). Dieses Nullallel scheint aber in der Brillenschafpopulation nur in einer niedrigen Frequenz aufzutreten, so dass das HWG dadurch nicht beeinflusst wird. Bei der Villnößer Schafpopulation scheint das nicht der Fall zu sein, denn hier zeigte der Marker HSC als einziger Marker eine signifikante Abweichung vom HWG und zwar ein hochsignifikantes Heterozygotendefizit (siehe Tab.17). Die anderen untersuchten Rassen zeigten keine signifikanten Abweichungen vom HWG. Allerdings weist der deutlich positive  $F_{is}$ -Wert für die vier Schafrassen für den Marker HSC ebenfalls auf ein Heterozygotendefizit hin, das sich auch als signifikant erweist (siehe Tab.22). Es gibt also für den Marker HSC das Problem eines Nullallels, das sich aber nur dann auf das HWG auswirkt, wenn es in hoher Frequenz in einer Population auftritt. Es wird generell davon abgeraten, einen Marker zu verwenden, für den dieses Problem bekannt ist. Doch da der Marker HSC durch seine hohe Variabilität ausgesprochen informativ ist (siehe Abb.6 und Abb.7), sollte in Erwägung gezogen werden, neue Primer zu erstellen, die eine Amplifikation aller Allele ermöglichen.

Für eine Abweichung vom HWG gibt es auch andere Ursachen, als ein Nullallel, doch meist machen sich diese dann nicht nur bei einem Marker bemerkbar. Läge zum Beispiel starke Inzucht in einer der Populationen vor, so würde man erwarten, dass sich ein signifikantes Heterozygotendefizit bei allen Markern in dieser Population zeigt. Eine Substrukturierung der Populationen, die durch den „Wahlund Effekt“ zu einem Heterozygotendefizit führen kann, würde sehr wahrscheinlich auch nicht nur einen Marker beeinflussen, sondern in der Regel alle Marker, für die die Allelfrequenzen zwischen den Subpopulationen variieren (HEDRICK,

2000), und das ist bei diesen vier Schafrassen für alle 11 untersuchten Marker der Fall. Diesem Effekt, dass es bei der künstlichen Zusammenfügung von eigentlich getrennten Fortpflanzungsgemeinschaften zu einer Population zu einem Heterozygotendefizit in dieser Population kommt, auch wenn jede Subpopulation im HWG ist (HEDRICK, 2000), sind hier die signifikant positiven  $F_{it}$ -Werte zuzuschreiben (siehe Tab.22). Die drei Marker, die hier auffällige Abweichungen vom HWG zeigten (OarFCB20, HSC, OarFCB11), sind auch die Marker, die in den Allelfrequenzen zwischen den Rassen am stärksten variieren (siehe Diagramme im Anhang). Eine starke Selektion, durch die homozygote Tiere bevorzugt würden, könnte ebenfalls für das beobachtete Heterozygotendefizit des Markers HSC verantwortlich sein. Doch in den untersuchten Rassen findet im Grunde keine starke Leistungsselektion statt. Eine Ausnahme ist das Texelschaf, das auf Fleischleistung selektiert wird, aber in der untersuchten Population war keine signifikante Abweichung vom HWG aufgefallen.

#### **4.4 Genetische Differenzierung verschiedener Schafrassen**

##### **4.4.1 Private Allele**

Private Allele wurden in allen vier untersuchten Schafrassen gefunden (siehe Tab.20 und Tab.21). Private Allele, also Allele, die nur in einer Population vorkommen, sind ein Maß für die genetische Differenzierung nah verwandter Populationen. Je mehr private Allele eine Population gegenüber anderen Populationen aufweist, desto länger ist sie bereits von diesen isoliert, desto weniger Genaustausch findet zwischen ihnen statt. Sind Populationen bereits isoliert oder handelt es sich um wilde und domestizierte Formen einer Spezies, so können private Allele dazu genutzt werden, Hybride nachzuweisen (GOTTELLI et al., 1994, BEAUMONT et al., 2001). Doch so wie die Anzahl der Allele, die man in einer Population findet, hängt auch die Anzahl der privaten Allele ganz entscheidend von der Stichprobe ab, die man untersucht. In den seltensten Fällen kann man eine gesamte Population untersuchen und jede Stichprobe stellt eben nur einen Ausschnitt aus dem gesamten Genpool dar. Kommen solch populationsspezifische Allele nur in einer niedrigen Frequenz vor, so ist die Wahrscheinlichkeit, sie in einer Stichprobe zu finden gering. Und findet man in einer Stichprobe ein Allel, das bei keiner anderen Stichprobe vorkommt, so kann es natürlich in der restlichen Population durchaus vorhanden sein. Das zeigt, dass man gerechterweise Stichproben gleicher Größe vergleichen sollte. FIRESTONE et al. (2000) zeigten durch Simulationen, dass mit etwa 30 bis 40 Individuen pro Population in den meisten Fällen ihrer Vergleiche das richtige Verhältnis an populationsspezifischen Allelen gefunden werden konnte. Das Ergebnis darf also lediglich als Tendenz gedeutet werden, vor allem wenn die Frequenzen der gefundenen privaten Allele sehr niedrig sind, wie in unserem Fall. Der Vergleich der jeweils 50, bzw. 36 Tiere einer Rasse zeigte hier, dass die Texelschafe gegenüber den drei anderen Schafrassen weiter differenziert sind, als die drei Rassen Kärntner Brillenschaf, Bergschaf und Villnöber Schaf untereinander. Das ist nicht verwunderlich, da diese Rasse eine völlig andere Entstehungsgeschichte hat und ein ausgesprochenes Fleischschaf darstellt. Auffällig ist noch, dass die Bergschafe gegenüber den Kärntner und den Villnöber Schafen am wenigsten differenziert scheinen, was auch nicht erstaunlich ist,

wenn man bedenkt, dass sie in den Bergen überall verbreitet sind und gerade in den Jahren bevor man Kärntner und Villnößer Schafe wieder gezielt züchtete einen nicht geringen Einfluss auf diese Rassen gehabt haben dürften.

#### **4.4.2 Populationsdifferenzierung**

Die vier Schafpopulationen erwiesen sich sowohl in ihrer Allelverteilung („genic differentiation“), als auch in ihrer Genotypenverteilung („genotypic differentiation“) als hochsignifikant verschieden. Das heißt sie unterscheiden sich deutlich in ihren Allelfrequenzen und Genotypenfrequenzen, was eine gewisse Differenzierung der Populationen bedeutet.

#### **4.4.3 F-Statistik**

Der  $F_{st}$ -Wert gilt als Maß für die genetische Differenzierung der untersuchten Populationen und beträgt für die hier betrachteten vier Schafrassen für alle 11 Marker gemittelt 9,9 % (siehe Tab.22). Das deckt sich mit dem ermittelten  $G_{ST}$ -Wert von 10,3 % (siehe Tab.24) und somit fallen nur rund 10 % der gesamten genetischen Variabilität auf die Diversität zwischen den untersuchten Rassen und 90 % sind auf die genetischen Unterschiede der einzelnen Individuen zurückzuführen. Dieser recht niedrig erscheinende Anteil liegt aber in der Größenordnung der Werte, die zwischen Rassen anderer Haustierspezies ermittelt wurden. MAC HUGH et al. (1998) untersuchten sieben europäische Rinderrassen mit 20 Mikrosatellitenmarkern und fanden einen mittleren  $F_{st}$ -Wert von 11,2 % und einen  $G_{ST}$ -Wert von 10,4 %. Auch hier war der Anteil der genetischen Variation zwischen den Rassen nur etwa 10 % der Gesamtvariation. Ebenfalls etwa 10 % fielen bei spanischen Hunderassen auf die Rasseunterschiede (JORDANA et al., 1992). Verschiedene spanische Pferderassen kamen nur auf rund 8 % genetischer Variation untereinander (CAÑON et al., 2000), während Ziegenrassen in der Schweiz auf 17 % genetische Unterschiede kommen (SAITBEKOVA et al., 1998) und in Asien auf 14 % (BARKER et al., 2001). Natürlich hängt bei dieser Art der Betrachtung das Ergebnis von der Auswahl der einbezogenen Populationen ab. Betrachtet man eine sehr heterogene Zusammensetzung von extremen Rassetypen, wird auch der Anteil der genetischen Diversität zwischen den Subpopulationen hoch sein.

Im paarweisen Vergleich dienen die  $F_{st}$ -Werte auch als genetische Distanzmaße zwischen den jeweiligen Subpopulationen. Bei den vier untersuchten Schafrassen konnte der kleinste Wert, das heißt die geringste genetische Distanz zwischen den Kärntner Brillenschafen und den Villnößer Schafen festgestellt werden (0,0557). Das Bergschaf ist zu diesen beiden Rassen etwa gleich weit entfernt (0,0845, bzw. 0,0858) und das Texelschaf zeigt, wie erwartet, zu allen drei alpinen Rassen die größten genetischen Distanzwerte: 0,1442 (zum Bergschaf); 0,1434 (zum Kärntner Brillenschaf); 0,1030 (zum Villnößer Schaf) (siehe Tab.23). Kärntner Brillenschafe und Villnößer Schafe sind sehr ähnliche Schafe und es wird vermutet, dass Kärntner Schafe durch die ausgeprägte Wanderschäferie und das rege Exportgeschäft in den letzten Jahrhunderten immer mal wieder in Südtirol hängen geblieben sind und so an der Entstehung der Villnößer Schafrasse direkt beteiligt waren. Es gab auch in der Zeit vor den Herdbuchgründungen einen gewissen Austausch von Tieren zwischen Südtirol und

Salzburger Brillenschafzüchtern (JASBINSCHKEK, 2001). Die geringe genetische Distanz zwischen diesen beiden Rassen, die hier im Vergleich zu den anderen Rassen festgestellt wurde, könnte dadurch zu erklären sein.

Nach WRIGHT (1978) werden  $F_{st}$ -Werte zwischen 0,05 und 0,15 als mäßige genetische Differenzierung bewertet. In anderen Studien, in denen ebenfalls die paarweisen  $F_{st}$ -Werte zwischen verschiedenen Rassen verglichen werden, liegen diese aber auch etwa in diesem Bereich. So lagen die  $F_{st}$ -Werte verschiedener Pferderassen zwischen 0,026 und 0,157 (CAÑON et al., 2000), verschiedene spanische Hunderassen erreichten  $F_{st}$ -Werte von 0,003 bis 0,137 (JORDANA et al., 1992) und eine Untersuchung von Populationen einer Rinderrasse (Holstein Frisian) ergab Distanzen zwischen 0,0217 und 0,286 (HANSLIK et al., 2000). Das zeigt, dass eine genetische Differenzierung zwischen Rassen durchaus vorhanden ist, doch in einem moderaten Umfang. Das lässt sich dadurch erklären, dass der Begriff der Rasse erstens nicht klar definiert ist und zweitens Rassen in der Regel keine völlig geschlossenen Fortpflanzungsgemeinschaften darstellen. Es fand und findet üblicherweise ein gewisser Genaustausch zwischen verschiedenen Rassepopulationen statt. Noch dazu sind die meisten Rassen erst vor etwa 100 bis 150 Jahren entstanden und oft ist erst viel später definiert worden, wie Angehörige dieser Rasse auszusehen haben und die Zucht nach diesen Zuchtzielen organisiert und ein Herdbuch gegründet worden. Im evolutionären Sinne ist das eine sehr kurze Zeit, um genetische Veränderungen in Populationen anzuhäufen und damit zu deutlichen genetischen Differenzierungen zu führen.

#### **4.4.4 Genetische Distanzen**

Bei den fünf ausgewählten genetischen Distanzmaßen zeigt sich für die vier Schafrassen eine ähnliche Beziehung wie für die paarweisen  $F_{st}$ -Werte. Die kürzeste Distanz wird nach allen fünf Distanzmaßen zwischen den Kärntner Brillenschafen und den Villnöber Schafen ermittelt. Die jeweils größten Distanzen werden zwischen den Texelschafen und den anderen drei Schafrassen gefunden. Allerdings gibt es hier geringfügige Unterschiede, was die Distanz zwischen den Texelschafen und den Villnöber Schafen angeht. Die Schätzwerte nach Nei ermitteln eine geringere Distanz zwischen Texelschafen und Villnöbern, als zwischen Bergschafen und Kärntner bzw. Villnöber Schafen. „Nei's minimum distance“ schätzt sie in etwa gleich ein, während Reynolds' und Cavalli-Sforza's Distanzen Bergschafe, Kärntner und Villnöber Schafe genetisch näher einschätzen, als Texelschafe und Villnöber Schafe (siehe Tab.25). Diese Diskrepanzen spiegeln sich auch in der Korrelationsmatrix wieder (siehe Tab.26). Die verschiedenen genetischen Distanzmaße korrelieren zwar alle zu über 90 %, was aber anscheinend nicht ausreicht, um zu den gleichen Schlussfolgerungen zu führen. Das liegt daran, dass die theoretischen Ansätze zu diesen Distanzmaßen auf verschiedenen biologischen Voraussetzungen beruhen. So wurden viele genetische Distanzmaße entwickelt, um die Divergenz zwischen zwei Populationen, die von einer Ursprungspopulation abstammen, zu untersuchen und dabei handelt es sich in der Regel bereits um Spezies, die per definitionem unabhängig voneinander evolvieren, d.h. es findet zwischen ihnen keine Migration und damit auch kein Genfluss mehr statt. Diese Distanzmaße ignorieren Migration und berücksichtigen lediglich Mutationen und „random drift“ als Grundlage für genetische Distanzen (z.B. „Nei's standard genetic distance“, NEI, 1972). Das trifft aber nur für Populationen zu, die schon eine sehr lange Zeit voneinander getrennt sind, wie etwa Spezies. Wenn man aber Rassen

vergleicht, die erst seit etwa 100 bis 200 Jahren getrennt sind, also eine recht kurze Divergenzzeit aufweisen, so ist der Anteil an Mutationen in der Regel vernachlässigbar und die genetischen Differenzen zwischen ihnen kommen hauptsächlich durch „random drift“ und Migration zustande. Diesen Umständen kommen neuere Distanzmaße wie etwa „Nei's minimum distance“ (NEI, 1987) und „Reynolds distance“ (REYNOLDS et al., 1983) eher nach (siehe auch EDING & LAVAL, 1999). Trotz allem werden die althergebrachten Distanzen nach Nei in vielen Studien berechnet und sollen hier auch zum Vergleich mit anderen Studien herangezogen werden. Die paarweisen Distanzen nach „Nei's standard genetic distance“ (NEI, 1972) lagen für die vier Schafrassen zwischen 0,205 zwischen Kärntner und Villnößer Schafen und 0,459 zwischen Bergschaf und Texelschaf (siehe Tab.25). Verschiedene spanische Schafrassen wiesen Distanzen nach „Nei's standard genetic distance“ zwischen 0,209 und 0,361 auf (ARRANZ et al., 1998) und in einer Untersuchung von spanischen Rinderrassen mit 30 Mikrosatelliten wurden paarweise Distanzen nach NEI (1972) von 0,071 bis 0,283 angegeben (MARTÍN-BURRIEL et al., 1999). Diese Vergleiche zeigen, dass zwischen Rassen genetische Distanzen in dieser Größenordnung zu erwarten sind und oft ist es so, dass sich in der genetischen Beziehung der Rassen zueinander, ihre historische Beziehung widerspiegelt, wenn auch ab und zu gerade genetisch aufgedeckt werden kann, dass Klassifikationen von Rassen rein nach morphologischen Gesichtspunkten mit der Geschichte der Entstehung der Rassen nicht übereinstimmen (ARRANZ et al., 1998). Dabei ist es generell schwierig, zu entscheiden, ob die genetischen oder die historischen Daten recht haben, da beide Quellen eine gewisse Unsicherheit mit sich bringen (RUANE, 1999). Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Ergebnisse der genetischen Distanzberechnungen mit Vorsicht zu bewerten sind, da es keine wahren oder Standardwerte zum Vergleich gibt und die Ergebnisse erheblich von den Studienvoraussetzungen beeinflusst werden, wie etwa die Anzahl der untersuchten Tiere, die Anzahl der untersuchten Marker, die Art der Marker und die verwendeten Distanzmaße. Wenn es darum geht, die genetische Einzigartigkeit einer Rasse festzustellen, um Erhaltungsmaßnahmen zu rechtfertigen, sollten laut RUANE (1999) ganz andere einzigartige Aspekte dieser Rasse viel mehr Beachtung finden, wie etwa die optimale Anpassung an eine Landschaft, die selbst in ihrer Erhaltung gefährdet ist, sowie der historische oder kulturelle Wert dieser Rasse, der oft mit wichtigen Eigenschaften verbunden ist, die in naher Zukunft ökonomisch wieder von Bedeutung sein können. Und diese bedeutenden Eigenschaften, in denen sich die Rassen ganz offensichtlich unterscheiden, können oft mit den als neutral angesehenen Mikrosatelliten-Markern nicht als entsprechende Distanz entdeckt werden, weil nicht gesagt ist, dass sich die Veränderungen an den wenigen durch Adaptation oder Selektion veränderten Loci auch an den neutralen Mikrosatelliten-Markern bemerkbar machen (RUANE, 1999).

Für das Kärntner Brillenschaf heißt das, dass die gefundenen Distanzen zu den anderen Rassen, v.a. aber zum Bergschaf, eine deutliche genetische Differenzierung zeigen und diese die ohnehin gerechtfertigte Erhaltung dieser Rasse noch zusätzlich unterstützen. Die in allen Distanzmaßen bestätigte genetische Nähe zu den Villnößer Schafen würde einen Austausch von Zuchttieren mit Südtirol zur gegenseitigen Blutauffrischung durchaus rechtfertigen. Denn eine Schließung des Herdbuches würde automatisch zu einer Inzuchtsteigerung im Laufe der Jahre führen.

Für den Populationsbaum wurden die Distanzen nach Reynolds (REYNOLDS et al., 1983) verwendet, da diese, wie bereits erwähnt, für den Vergleich von eng verwandten Rassen gut geeignet sind. Der erhaltene Baum zeigt die Beziehungen der vier Schafrassen, wie sie auch

von den Distanzen her erwartet werden, ist aber aufgrund niedriger Bootstrapwerte als nicht sehr robust anzusehen (siehe Abb.8).

Der Individuenbaum, der auf den Anteilen an gemeinsamen Allelen zwischen den einzelnen Individuen („allele-sharing distances“) basiert, zeigt durch die Gruppierung der Individuen einer Rasse innerhalb eines Clusters die genetische Differenzierung dieser Rasse an. Je mehr Tiere einer Rasse zusammengruppieren, desto differenzierter ist diese Rasse gegenüber den anderen Rassen. Hier zeigen auch wieder die Texelschafe am deutlichsten, dass sie von den anderen drei Rassen genetisch am weitesten entfernt sind. Von ihnen finden sich alle 36 Tiere in einem engen Cluster wieder. Von den anderen drei Rassen bestehen die Rassecluster der Bergschafe aus 86 % der Tiere, bei den Kärntner Brillenschafen clustern 80 % der Individuen zusammen und bei den Villnöber Schafen sind es 78 % (siehe Abb.9). Es zeigt sich also auch bei dieser Darstellungsmethode eine genetische Differenzierung der vier Rassen, aber eben auch eine gewisse Unsicherheit bei der Zuordnung einzelner Tiere der drei alpinen Rassen Bergschaf, Kärntner und Villnöber Schaf, die auf eine gewisse Verwandtschaft der drei Rassen zurückzuführen ist. Insgesamt werden 28 Tiere von 186 nicht ihrer Rasse zugeordnet, was einem Anteil von 15 % entspricht. Im Vergleich mit anderen Studien, wo bei einer Untersuchung europäischer Rinderrassen mit 20 Mikrosatellitenmarkern 12 % der Tiere nicht innerhalb ihres Rasseclusters fielen (MAC HUGH et al., 1998) und in einer Studie norwegischer Pferderassen mit 26 Mikrosatellitenmarkern, in der 10 % der Individuen in andere Cluster als das ihrer Rasse fielen (BJØRNSTAD & RØED, 2001), zeigt sich, dass trotz der Verwendung von mehr Markern unklare Zuordnungen in dieser Größenordnung bei der Untersuchung von Rassen üblich sind.

#### **4.4.5 Hauptfaktorenanalyse (Principal Components Analysis, PCA)**

Die durchgeführte Hauptfaktorenanalyse zeigt im Grunde die schon mit den vorhergehenden Methoden beschriebenen Tendenzen (siehe Abb.10). Alle vier Rassen bilden eine Punktwolke der ihr angehörigen Individuen, die sich mehr oder weniger deutlich von den anderen Rassen abgrenzt. Die Texelschafe sind wieder am deutlichsten von den anderen drei Rassen differenziert, die Bergschafe grenzen sich ebenfalls recht deutlich ab, während es zwischen den Kärntner Brillenschafen und den Villnöber Schafen einen Überlappungsbereich gibt, in dem sich Individuen beider Rassen wiederfinden. Das weist wieder auf die genetische Nähe dieser beiden Rassen hin, die sich in der Ähnlichkeit der Genotypen dieser Individuen widerspiegelt. Einzelne Villnöber Schafe befinden sich in der Punktwolke der Bergschafe, was ein Ausdruck der geringeren genetischen Distanz zwischen diesen beiden Rassen im Vergleich zu der Distanz zwischen Bergschaf und Kärntner Schaf sein könnte, worüber sich auch alle genetischen Distanzmaße einig waren.

#### **4.4.6 Rassezuordnung von Einzeltieren („breed assignment“)**

Die Frage der Zugehörigkeit eines einzelnen Individuums oder einer Gruppe von Individuen unbekannter Herkunft zu einer bestimmten Rasse oder Population ist in vielen Bereichen von großer Bedeutung. Neben den morphologischen Merkmalen, die früher oft die einzige Möglichkeit waren, haben genetische Methoden zunehmend in der Beantwortung dieser

Fragen ihr Potential bewiesen. Seit der Etablierung der äußerst variablen und leicht zu untersuchenden Mikrosatellitenmarker haben sich diese immer wieder als brauchbares Mittel erwiesen, Individuen aufgrund ihres Genotyps ihrer Ursprungspopulation zuzuordnen. Der erste Bericht dieser Art kam von BUCHANAN et al. (1994), die zeigten, dass Mikrosatelliten-Genotypen dazu genutzt werden konnten, einzelne Schafe ihrer entsprechenden Rasse zuzuordnen. Es folgten Berichte aus den verschiedensten Bereichen, wie etwa der Forensik (SHRIVER et al., 1997), der Wildtierbiologie (HAIG et al., 1997; FIRESTONE et al., 2000) und der Fischerei (NIELSEN et al., 2001), aber auch vermehrte Studien im Bereich der Tierzucht, wo die Frage der Rassezugehörigkeit eines Tieres aus unterschiedlichen Gründen oft gestellt wird (MAC HUGH et al., 1998; CAÑON et al., 2000; BJØRNSTAD & RØED, 2001). Wenn es um eine gefährdete Rasse geht, ist es beispielsweise von großem Interesse, ob ein gefundenes Tier oder eine Tiergruppe zu der entsprechenden Rasse gehört oder nicht, und folglich, ob sie zum Genpool dieser bedrohten Rasse hinzugefügt werden können, oder nicht.

Wir haben untersucht, wie gut sich die Individuen der vier untersuchten Schafrassen ihrer jeweiligen Rasse aufgrund der an 11 Mikrosatellitenmarkern erstellten Genotypen zuordnen lassen. Die Anteile der wahrscheinlichsten Zuordnung lagen je nach Methode zwischen 92 % und 98 %, was sich im Vergleich mit anderen Studien durchaus sehen lassen kann (77 % bis 97 % bei CAÑON et al., 2000; 96 % bei BJØRNSTAD & RØED, 2001 und 97 % bis 100 % bei NIELSEN et al., 2001). Wird aber die Signifikanz dieser Zuordnungen berücksichtigt, zeigt sich, dass nur 3 % bis knapp 5 % dieser Zuordnungen auf dem 5 %-Irrtumsniveau signifikant sind (siehe Tab.27). Die Signifikanz der Zuordnung ist aber entscheidend, wenn man die weit verbreitete Schwäche der „Assignment“-Methoden vermeiden will, nämlich, dass sie sich immer für eine der zur Verfügung stehenden Populationen entscheiden müssen, und zwar für die, die für das Individuum am wahrscheinlichsten ist, auch wenn die wirkliche Ursprungspopulation des Individuums gar nicht dabei ist. In manchen Fällen kann es wichtiger sein, eine gegebene Population als Ursprungspopulation auszuschließen, als die wahrscheinlichste Population zuzuweisen. Diese Möglichkeit bietet das Berücksichtigen der Wahrscheinlichkeit, dass das Individuum der zugewiesenen Population auch wirklich angehört, die über einem gewissen Grenzwert liegen sollte (siehe auch CORNUET et al., 1999).

Dass die erhobenen Werte für die vier untersuchten Schafrassen nicht ausreichen, um eine sichere Zuordnung eines unbekanntes Tieres durchzuführen, zeigten Versuche, in denen aus jeder Rasse fünf zufällige Tiere ausgewählt wurden und als unbekannt den jeweiligen Populationen zugeordnet werden sollten. Die Zuordnungswahrscheinlichkeiten lagen fast alle bei Null, was bedeuten würde, dass die Ursprungspopulation des Individuums nicht dabei ist, was ja nicht stimmte. Eine mögliche Erklärung für diese Unzulänglichkeit könnte eine zu geringe Differenzierung dieser vier Schafrassen sein. Das ist ein Problem, das bei erst vor kurzer Zeit divergierten Populationen immer wieder zu Zuordnungsschwierigkeiten führt (DAVIES et al., 1999). BJØRNSTAD & RØED (2001) haben ebenfalls festgestellt, dass die genetische Differenzierung zwischen Rassen das Potential der Rassezuordnung stark beeinflusst. Ein Maß für die genetische Differenzierung ist der  $F_{st}$ -Wert und wenn Populationen nicht sehr differenziert sind, das heißt einen  $F_{st}$ -Wert  $< 0,1$  aufweisen, dann müssen in der Regel eine größere Anzahl an Markern untersucht werden, um einen besseren Zuordnungserfolg zu erlangen (CORNUET et al., 1999). Die  $F_{st}$ -Werte der hier untersuchten Schafrassen lagen zwischen 0,0557 und 0,1442 und nach CORNUET et al. (1999) sollten bei

einem  $F_{st}$ -Wert  $\geq 0,05$  etwa 20 bis 30 Marker untersucht werden, damit eine 100 %ige Zuordnung möglich ist. Zusätzlich hängt der Erfolg aber auch von der Variabilität der verwendeten Marker ab und von der Anzahl der untersuchten Tiere.

Die mit dem Softwareprogramm *Structure* durchgeführte Untersuchung, in wieviele Populationen sich der Datensatz der 186 Schafe aufgrund ihrer Genotypen strukturiert, wenn a priori keine Populationen angenommen werden ergab statt der vier Rassen fünf Subpopulationen, wobei sich die Villnöber Schafe in zwei Gruppen zu je etwa 40 % spalteten, während die anderen drei Rassen zu rund 90 % in jeweils ein Cluster fielen. Diese Substrukturierung der Villnöber Schafpopulation versuchten wir damit zu erklären, dass diese Schafe in den einzelnen Tälern in Südtirol relativ isoliert gezüchtet wurden. Doch eine Untersuchung der Villnöber Population alleine auf eine mögliche Substruktur nach den fünf untersuchten Tälern, konnte diese Vermutung nicht bestätigen. Wir haben momentan keine Erklärung für diese Substrukturierung der Villnöber Schafpopulation, die eventuell in der Zuchtgeschichte zu finden wäre, doch darüber liegen uns nicht genügend Informationen vor.

#### **4.5 Untersuchung auf Hybride**

Bei gefährdeten Spezies ist eine Vermischung („admixture“) des ohnehin schon stark eingeschränkten Genpools mit Genen des domestizierten Verwandten durch verwilderte Haustiere in vielen Fällen eine zusätzliche Bedrohung. Hauskatzen und Hunde sind zum Beispiel in der Lage mit ihren wilden Verwandten wie Wildkatze, bzw. verschiedenen Caniden fruchtbare Nachkommen zu zeugen und man befürchtet durch die Vermischung dieser Genpools, wertvolle Genkombinationen oder Allele der Wildtiere durch Ausdünnung zu verlieren. Um diese Vermutungen zu beweisen und dadurch den gesetzlichen Schutz dieser Wildpopulationen zu forcieren, haben sich molekulargenetische Methoden und v.a. Mikrosatelliten als gut geeignet erwiesen, um Hybride festzustellen (GOTTELLI et al., 1994; BEAUMONT et al., 2001; RANDI et al., 2001).

Uns wurden 11 Gewebeproben Bayrischer Brillenschafe eingeschickt mit dem Verdacht, dass diese Tiere Kreuzungen zwischen Kärntner Brillenschafen und Bergschafen sind. Denn es ist in Bayern wohl üblich, dass im Sommer auf großen Almen Schafe verschiedener Rassen gemeinsam geweidet werden und es somit zu unbeobachteten Bedeckungen kommen kann. Es wird nun befürchtet, dass dadurch Kreuzungen fälschlicherweise als reinrassige Tiere in die Zucht eingesetzt werden. Wir haben untersucht, ob es aufgrund der Genotypen Hinweise darauf gibt, dass es sich bei diesen Schafen um Hybride handeln könnte. Dabei zeigte sich bei allen Methoden die gleiche Tendenz. Zwei der Bayrischen Brillenschafe (BY4 und BY6) werden konsistent den Kärntner Brillenschafen zugeordnet, was eine Kreuzung mit Bergschafen unwahrscheinlich macht. Dann fallen zwei Bayrische Schafe (BY2 und BY9) durchweg als Außenseiter auf. Sie clustern sowohl beim Individuenbaum (siehe Abb.11) als auch bei der PCA (siehe Abb.12) mit den Texelschafen zusammen und gehören zu 83 % bzw. 99 % Wahrscheinlichkeit der Population der Texelschafe an. Die Nachfrage, ob als Kreuzungspartner auch Texelschafe in Frage kommen, wurde verneint. Die Genotypen dieser Tiere unterscheiden sich von denen der Kärntner Brillenschafe erheblich, was natürlich durch eine Kreuzung mit einer anderen Rasse zustande gekommen sein kann, aber diese Rasse ist vermutlich nicht mituntersucht worden und somit war die künstlich gewählte Außengruppe der Texelschafe ihnen zufällig am ähnlichsten. Eine wichtige Zusatzinformation wäre das

phänotypische Aussehen dieser Tiere, um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Rassen in Frage kämen.

Die restlichen Bayrischen Brillenschafe nehmen eine Mittelstellung ein. Sie clustern im Individuenbaum (siehe Abb.11) teilweise mit Bergschafen, teilweise bilden sie ein eigenes Cluster und in der PCA (siehe Abb.12) kommen sie alle in einem relativ umschriebenen Bereich zwischen den Bergschafen und den Kärntner Brillenschafen zu liegen. Das deutet darauf hin, dass sie sich von den Kärntner Brillenschafen in gewisser Weise distanzieren, was aber auch dadurch erklärt werden könnte, dass sich Brillenschafe in Bayern ohnehin von den Brillenschafen in Kärnten unterscheiden, da der Genaustausch durch getrennte Herdbücher begrenzt ist und die Zuchtziele der Vereine nicht ganz die Gleichen sind. Um das zu beweisen, müsste eine größere Anzahl an „reinen“ Bayrischen Brillenschafen untersucht und in den Vergleich miteinbezogen werden. Bei der Untersuchung auf „admixture“ werden diese restlichen bayrischen Schafe mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit den Kärntner Brillenschafen zugeordnet und die Wahrscheinlichkeiten, dass sie Vorfahren aus der Population der Bergschafe besitzen ist gering. Wären es wirklich Hybride zwischen diesen beiden Rassen, dann wäre zu erwarten gewesen, dass einige Tiere klar den Bergschafen zugeordnet würden oder sich die Zuordnungswahrscheinlichkeiten auf beide Rassen aufteilen. Doch auch hier muss bedacht werden, dass die Bergschafe, die hier als Vergleichspopulation dienen, ausschließlich aus Österreich sind und bayrische Bergschafe nicht untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind schwer zu beurteilen, da nicht bekannt ist, wie ein wahrer Hybrid zwischen diesen beiden Rassen genetisch aussieht. Andere Studien beziehen meist echte Hybride, bei denen dies bekannt ist oder morphologische Hinweise darauf bestehen, in ihre Untersuchung mit ein und haben so eine Referenz, nach der sie beurteilen, was ein Hybrid sein könnte und was nicht (GOTTELLI et al., 1994; BEAUMONT et al., 2001; RANDI et al., 2001). Hinzu kommt, dass die genetischen Unterschiede zwischen einer Wildtierspezies und ihrer domestizierten Form sehr viel größer sind, als zwischen Rassen, da die Domestikation in der Regel mehrere tausend Jahre zurückliegt, die Entstehung der Haustierrassen aber erst 100 bis 200 Jahre. Die Rassen, um die es hier geht, sind zusätzlich eng verwandt, was folgendes Diagramm verdeutlichen soll:

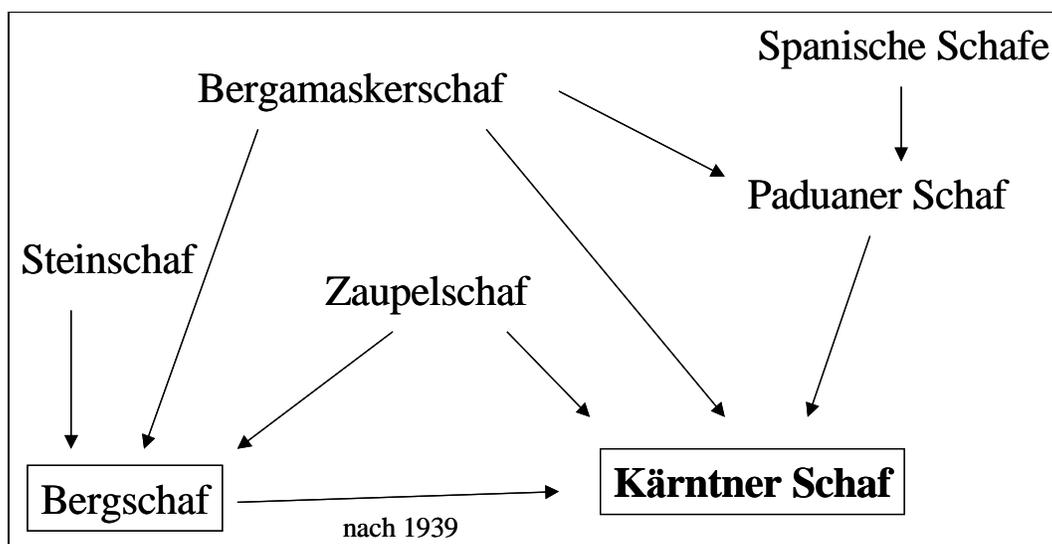


Abb. 13: Schafrassen, die an der Entstehung der Kärntner Schafe, sowie der Bergschafe beteiligt waren

Bergschafe und Kärntner Schafe haben im Bergamasker, sowie im Zaupelschaf gemeinsame Vorfahren. Zusätzlich hat durch die Zusammenfassung aller Bergschafassen im Jahre 1939 (siehe Kapitel 1.1.1) ein nicht unerheblicher Genfluss zwischen ihnen stattgefunden. Trotz allem haben die durchgeführten Untersuchungen auf genetische Differenzierung gezeigt, dass sie sich in den etwa 10 Jahren, seit wieder gezielt Kärntner Brillenschafe ohne Einfluss anderer Rassen gezüchtet wurden, genetisch distanziert haben. Aber der Grad der Differenzierung ist gering und macht es anhand dieser 11 Mikrosatellitenmarker nicht möglich, eine sichere Aussage über den Hybridstatus eines Tieres zu machen. Interessante Zusatzinformationen könnte die Untersuchung weiterer Mikrosatellitenmarker oder aber auch Mitochondrien-DNA-Sequenzen und Y-chromosomale-Marker bringen, die Aufschluss darüber geben könnten, über welches Geschlecht ein eventueller Genfluss stattfindet.

## **5 Zusammenfassung**

Das Kärntner Brillenschaf ist eine der gefährdeten Nutzierrassen Österreichs. Es ist im Laufe des 19. Jahrhunderts in Kärnten aus Kreuzungen der damaligen Landschaft mit italienischen Bergamasker- und v.a. Paduanerschafen entstanden. Es war aufgrund seiner Größe und seiner Robustheit ein sehr beliebtes Schaf und in weiten Teilen Österreichs verbreitet. Bis ins 20. Jahrhundert hinein wurden jährlich an die 30 000 Kärntner Schafe nach Frankreich und etwa 14 000 in die Schweiz verkauft. Noch im Ersten Weltkrieg und in der Zeit danach schätzte man diese Schafe aufgrund ihrer Größe und der hervorragenden Schlachtleistung. Im Jahre 1939 kam es im Zuge der „Rassebereinigung“ zu einer fast vollständigen Verdrängungskreuzung mit „reinweißen“ Bergschafen. In kleinen Beständen konnte sich das Kärntner Brillenschaf jedoch vereinzelt halten und vor etwa 10 Jahren begann man mit der gezielten Erhaltungszucht. Aus zunächst 17 weiblichen und sechs männlichen Tieren hat sich der Bestand in Österreich heute auf über 1500 Brillenschafe vermehrt.

In Zusammenarbeit mit dem „Verein der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria“ wurden 767 Brillenschafe mit 11 DNA-Mikrosatellitenmarkern untersucht. Anhand dieser Daten wurde die genetische Diversität der Kärntner Brillenschafpopulation bestimmt und mit der genetischen Diversität anderer Schafrassen verglichen. Eine mittlere Anzahl an Allelen pro Locus von  $10,09 \pm 2,95$  und eine „gene diversity“ von 73 % zeigen keine Einschränkung der genetischen Variabilität der heutigen Kärntner Brillenschafpopulation an. Die Variabilität der Mikrosatellitenmarker wurde auch dazu genutzt, die Abstammungsangaben im Herdbuch zu überprüfen. Alle 11 Marker kombiniert ergaben eine Ausschlusswahrscheinlichkeit von über 99 %. Von insgesamt 668 Abstammungsangaben, die kontrolliert wurden, mussten 17,62 % der Böcke und 18,40 % der Mutterschafe von der Elternschaft ausgeschlossen werden. Ein weiteres Ziel war es, die genetische Differenzierung der Kärntner Brillenschafe gegenüber anderen Schafrassen zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass die untersuchten vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf, Bergschaf, Villnöber Schaf und Texelschaf durchaus genetisch differenzierte Populationen darstellen, der Grad der Differenzierung jedoch als mäßig zu bewerten ist. Das Kärntner Brillenschaf steht genetisch den Villnöber Schafen am nächsten und die Texelschafe sind, wie erwartet, von den drei alpinen Rassen am weitesten distanziert. Für die Zuordnung eines unbekanntes Tieres zu seiner Ursprungsrasse anhand des Genotyps erwiesen sich diese 11 Marker für die vier untersuchten Rassen als unzulänglich. Auch der sichere Nachweis eines Kreuzungstieres zwischen den Rassen war nicht möglich.

Schlüsselwörter: Kärntner Brillenschaf, DNA-Mikrosatelliten, Genetische Diversität, Abstammungsüberprüfung, Genetische Differenzierung, Rassezuordnung, Hybride, gefährdete Nutzierrassen.

## 6 Summary

The “Kärntner Brillenschaf” from Carinthia is one of the endangered livestock breeds in Austria. This breed descended from local sheep crossbred with Paduaner and Bergamasca sheep from Italy. At the end of the 19<sup>th</sup> century it enjoyed great popularity because of its size, its robustness and the high quality of the meat. During the period of the national-socialistic regime, the “Kärntner Brillenschaf” was replaced by the “Deutsches Bergschaf”. After the second world war it became nearly extinct, but small populations survived and in 1988 a herdbook was established and many efforts have been made to conserve this breed. Today the number of breeding animals in Austria has recovered from 17 ewes and six rams to over 1500.

In cooperation with the “Verein der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria” we investigated 767 “Kärntner Brillenschafe” with 11 DNA-microsatellite markers. The genotype data were used to assess the genetic diversity within the “Kärntner Brillenschaf” and to compare these data with the diversity in other sheep breeds. The mean number of alleles per locus of  $10,09 \pm 2,95$  and a gene diversity of 73 % do not show any evidence of an impoverished genetic variability of the contemporary population of the “Kärntner Brillenschaf”. The variability of the microsatellite markers was further used for parentage control. With all 11 markers used in combination the exclusion power exceeded 99 %. From 668 parentage controls 17,62 % of the rams and 18,40 % of the ewes had to be excluded. Another aim was the investigation of the genetic relationship between the “Kärntner Brillenschaf” and other sheep breeds. The analysis revealed an existing genetic differentiation between the four investigated breeds, “Kärntner Brillenschaf”, “Bergschaf”, “Villnösser Schaf” and “Texelschaf” but the degree of differentiation was only moderate. The “Kärntner Brillenschaf” is genetically closest to the “Villnösser Schaf” and the “Texelschaf” is as expected most differentiated from the three alpine breeds. The 11 markers proved to be insufficient for the breed assignment of unknown animals to these four breeds. Moreover it was not possible to identify unambiguously crossings between the breeds from genetic information alone.

Keywords: “Kärntner Brillenschaf”, DNA-microsatellites, genetic diversity, parentage control, genetic differentiation, breed assignment, hybrids, endangered livestock breeds.

## 7 Literaturverzeichnis

ACHMANN, R. (1996):

Individueller Paarungs- und Fortpflanzungserfolg bei der Laubheuschrecke *Poecilimon hoelzeli*: Ein molekulargenetischer Ansatz.  
Diss., Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

ACHMANN, R. und BREM, G. (1998):

Parentage control in austrian domestic mountain sheep (*Ovis aries*) using DNA microsatellite analysis.  
*Anim. Genet.* **29**, 12-13.

ACHMANN, R., HUBER, T., WALLNER, B., DOVC, P., MÜLLER, M., BREM, G. (2001):

Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse.  
*Anim. Genet.* **32**, 52.

ACHMANN, R., WALLNER, B., SCHWEND, K., TRAXLER, B., MÜLLER, S., NECHTELBERGER, D., MÜLLER, M., BREM, G. (2000):

Abstammungsüberprüfung bei Nutztieren mit Hilfe der Analyse von DNA-Mikrosatelliten-Markern.  
In: GRADUIERTENKOLLEG MOLEKULARE VETERINÄRMEDIZIN JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN (Hrsg.) (2000): PCR-Methoden und Anwendungen.  
Fachverlag Köhler, Giessen, S. 23-33.

ALLENDORF, F.W. (1986):

Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity.  
*Zoo Biology* **5**, 181-190.

AMOS, W. (1999):

Two Problems with the Measurement of Genetic Diversity and Genetic Distance.  
In: LANDWEBER, L.F. und DOBSON, A.P. (ed.) (1999): Genetics and the Extinction of Species: DNA and the conservation of biodiversity.  
Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp75-100.

ANONYM (1775):

Erfahrungsmäßiger Unterricht wie die Schaafte durch gute Pflege zur vollkommensten Art gebracht, und bei solcher erhalten werden können.  
Gedruckt bei Ignaz Kleinmayer, landschaftlicher Buchdrucker, Klagenfurt.

ANONYM (1925):

In: WUTTE, M., PASCHINGER, V., LEX, F. (1925): Kärntner Heimatatlas.  
Österr. Bundesverl. für Unterricht, Wiss. u. Kunst, Wien.

ANONYM (1968):

In: MARKTGEMEINDE EISENKAPPEL- VELLACH (Hrsg.) (1968):

700 Jahre Markt Eisenkappel. Aus der Geschichte und Natur eines Kärntner Grenzlandmarktes.

Im Verlag des Geschichtsvereins für Kärnten, Klagenfurt.

ANONYM (1999):

Erhaltung der genetischen Vielfalt bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Deutsche Gesellschaft für Züchtungskunde e. V., Bonn.

ARRANZ, J.J., BAYÓN, Y., SAN PRIMITIVO, F. (1998):

Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites.

Anim Genet. **29**, 435-440.

BARKER, J.S.F., TAN, S.G., MOORE, S.S., MUKHERJEE, T.K., MATHESON, J.-L., SELVARAJ, O.S. (2001):

Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*).

J. Anim. Breed. Genet. **118**, 213-233.

BEAUMONT, M., BARRATT, E.M., GOTTELLI, D., KITCHENER, A.C., DANIELS, M.J., PRITCHARD, J.K., BRUFORD, M.W. (2001):

Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat.

Mol Ecol. **10**, 319-336.

BELKHIR, K., BORSA, P., CHIKHI, L., RAUFASTE, N., BONHOMME, F. (2000):

GENETIX 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.

Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

BJØRNSTAD, G., RØED, K.H. (2001):

Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers.

Anim Genet. **32**, 59-65.

BLOTT, S.C., WILLIAMS, J.L., HALEY, C.S. (1998):

Genetic variation within the Hereford breed of cattle.

Anim Genet. **29**, 202-211.

BLOTT, S.C., WILLIAMS, J.L., HALEY, C.S. (1999):

Discriminating among cattle breeds using genetic markers.

Heredity **82**, 613-619.

- BOWCOCK, A. M., RUIZ-LINEARES, J., 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.
- BROWN, T.A. (1993):  
*Moderne Genetik: eine Einführung.*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- BROWN, T.A. (1996):  
*Gentechnologie für Einsteiger.*  
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- BROWNSTEIN, M.J., CARPTEN, J.D., SMITH, J.R. (1996):  
Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping.  
*BioTechniques* **20**, 1004-1010.
- BRUFORD, M.W. und WAYNE, R.K. (1993):  
Microsatellites and their application to population genetic studies.  
*Current Opinion in Genetics and Development* **3**, 939-943.
- BUCHANAN, F.C., ADAMS, L.J., LITTLEJOHN, R.P., MADDOX, J.F., CRAWFORD, A.M. (1994):  
Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites.  
*Genomics* **22**, 397-403.
- CAÑÓN, J., CHECA, M.L., CARLEOS, C., VEGA-PLA, J.L., VALLEJO, M., DUNNER, S. (2000):  
The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data.  
*Anim Genet.* **31**, 39-48.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. und EDWARDS, A.W. (1967):  
Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures.  
*Am J Hum Genet.* **19**, Suppl 19, 233-257.
- CAVALLI-SFORZA, L.L., MENOZZI, P., PIAZZA, A. (1994):  
*The History and Geography of Human Genes.*  
Princeton University Press, Princeton, NJ.
- CORNUET, J.M., PIRY, S., LUIKART, G., ESTOUP, A., SOLIGNAC, M. (1999):  
New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals.  
*Genetics.* **153**, 1989-2000.

- COULSON, T.N., PEMBERTON, J.M., ALBON, S.D., BEAUMONT, M., MARSHALL, T.C., SLATE, J., GUINNESS, F.E., CLUTTON-BROCK, T.H. (1998):  
Microsatellites reveal heterosis in red deer.  
*Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **265**, 489-495.
- DAVIES, N., VILLABLANCA, F.X., RODERICK, G.K. (1999):  
Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics.  
*Trends Ecol Evol.* **14**, 17-21.
- DE WOODY, J.A. und AVISE, J.C. (2000):  
Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals.  
*Journal of Fish Biology* **56**, 461-473.
- DIENER, H.O. (1939):  
Arbeitsziele der Deutschen Bergschafzucht.  
*Zeitschrift für Schafzucht*, Heft 1/2, 28.Jahrgang, Verlag Schaper, Hannover.
- DIENER, H.O. (1973):  
Zur Geschichte der bayerischen Bergschafzucht. Eine historisch-etymologische Literaturstudie.  
*Bayerisches-Landwirtschaftliches-Jahrbuch*, **50**, 686-694.
- DIEZ-TASCÓN, C., LITTLEJOHN, R.P., ALMEIDA, P.A., CRAWFORD, A.M. (2000):  
Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites.  
*Anim Genet.* **31**, 243-251.
- EDING, J.H., LAVAL, G. (1999):  
Measuring genetic uniqueness in livestock.  
In: OLDENBROEK, J.K. (ed.) (1999): *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources.*  
DLO Institute for Animal Science and Health, Lelystad, pp. 33-58.
- EDWARDS, C.J., DOLF, G., LOOFT, C., LOFTUS, R.T., BRADLEY, D.G. (2000):  
Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related European cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci.  
*Anim Genet.* **31**, 329-332.
- ELLEGREN, H. (1999):  
Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*.  
*Hereditas* **130**, 239-244.

- ELLEGREN, H., SAVOLAINEN, P., ROSÉN, B. (1996):  
The genetical history of an isolated population of the endangered grey wolf *Canis lupus*: a study of nuclear and mitochondrial polymorphisms.  
*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **351**, 1661-1669.
- FALGE, R., TERLETSKI, V., MENDEL, C., GRUMBACH, S., GERDES, K., CARNWATH, J., NIEMANN, H. (1999):  
Schätzung des mittleren Heterozygotiegrades aus DNA-Fingerprints bei einheimischen Landschaftsrassen des norddeutschen und süddeutschen Raumes.  
*Züchtungskunde*, **71**, 147-157.
- FELSENSTEIN, J. (1993):  
PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c.  
Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- FIRESTONE, K.B., BRONWYN, A., HOULDEN, A., WILLIAM, B., SHERWIN, B., GEFFEN, E. (2000):  
Variability and differentiation of microsatellites in the genus *Dasyurus* and conservation implications for the large Australian carnivorous marsupials.  
*Conservation Genetics* **1**, 115-133.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (1998):  
Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans. Management of Small Populations at Risk.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (1999):  
The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources. Executive Brief.
- FORBES, S.H., HOGG, J.T., BUCHANAN, F.C., CRAWFORD, A.M., ALLENDORF, F.W. (1995):  
Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep.  
*Molecular Biology and Evolution* **12**, 1106-1113.
- GELDERMANN, H., PIEPER, U., WEBER, W.E. (1986):  
Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle.  
*J Anim Sci.* **63**, 1759-1768.
- GEMMELL, N.J. und AKIYAMA, S. (1996):  
An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues.  
*Trends in Genetics* **12**, 338-339.
- GEMMELL, N.J., ALLEN, P.J., GOODMAN, S.J., REED, J.Z. (1997):  
Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations.  
*Mol Ecol.* **6**, 661-666.

- GOLDSTEIN, D.B., LINARES, A.R., CAVALLI SFORZA, L.L., FELDMANN, M.W. (1995):  
Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 6723-6727.
- GOOD, P.I. (1994):  
Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypothesis.  
Springer-Verlag, New York.
- GOTTELLI, D., SILLERO-ZUBIRI, C., APPLEBAUM, G.D., ROY, M.S., GIRMAN, D.J., GARCIA-MORENO, J., OSTRANDER, E.A., WAYNE, R.K. (1994):  
Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*.  
Mol Ecol. **3**, 301-312.
- GOUDET, J. (1995):  
FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics.  
J. Hered. **86**, 485-486.
- GROOMBRIDGE, J.J., JONES, C.G., BRUFORD, M.W., NICHOLS, R.A. (2000):  
'Ghost' alleles of the Mauritius kestrel.  
Nature **403**, 616.
- GUTIÉRREZ-ESPELETA, G.A., KALINOWSKI, S.T., BOYCE, W.M., HEDRICK, P.W. (2000):  
Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation.  
Conservation Genetics **1**, 3-15.
- HAIG, S.M., GRATTO-TREVOR, C.L., MULLINS, T.D., COLWELL, M.A. (1997):  
Population identification of western hemisphere shorebirds throughout the annual cycle.  
Mol.Ecol. **6**, 412-427.
- HALLER, M. (2000):  
Seltene Haus- & Nutztierassen.  
Leopold Stocker Verlag, Graz- Stuttgart.
- HANSLIK, S., HARR, B., BREM, G., SCHLÖTTERER, C. (2000):  
Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations.  
Anim Genet. **31**, 31-38.
- HARTL, D.L. und CLARK, A.G. (1997):  
Principles of population genetics.  
third edition, Sinauer Associates, Sunderland.

- HEDRICK, P. W. (2000):  
Genetics of populations.  
second edition, Jones and Bartlett publishers, Sudbury, Massachusetts.
- ISRAEL, C., WELLER, J.I. (2000):  
Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations.  
J Dairy Sci. **83**, 181-187.
- JAMIESON, A. (1994):  
The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members.  
Anim Genet. **25** (Suppl 1), 37-44.
- JAMIESON, A. und TAYLOR, C.S (1997):  
Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion.  
Anim. Genet., **28**, 397-400.
- JASBINSCHKEK, F. (2001), persönliche Mitteilung
- JORDANA, J., PIEDRAFITA, A., SANCHEZ, A., PUIG, P. (1992):  
Comparative F statistics analysis of the genetic structure of ten Spanish dog breeds.  
J Hered., **83**, 367-374.
- JUNEJA, R.K. und VÖGELI, P. (1998):  
Biochemical genetics. In: ROTHSCCHILD, M.F., RUVINSKY, A. (eds) The genetics of the pig.  
CAB International, Wallingford, UK, pp. 105-134.
- LANDESARCHIV KÄRNTEN (1844):  
Statistisch- topographische Beschreibung der Provinz Kärnten.
- LEVINSON, G. und GUTMAN, G.A. (1987):  
Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution.  
Mol. Biol. Evol. **4**, 203-221.
- LITT, M. und LUTY, J.A. (1989):  
A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene.  
Am. J. Hum. Genet. **44**, 397-401.
- MAC HUGH, D.E. (1996):  
Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle.  
Diss., University of Dublin.

- MAC HUGH, D.E., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. (1998):  
Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers.  
*Animal Genetics* **29**, 333-340.
- MAC HUGH, D.E., SHRIVER, M.D., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P., BRADLEY, D.G. (1997):  
Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*).  
*Genetics* **146**, 1071-1086.
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUIK, L.E.B., PEMBERTON, (1998):  
Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations.  
*Mol Ecol.* **7**, 639-655.
- MINCH, E., RUIZ-LINARES, A., GOLDSTEIN, D., FELDMAN, M., CAVALLI SFORZA, L.L. (1995):  
Microsat (version 1.4d): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data.
- MOAZAMI-GOUDARZI, K., LALOË, D., FURET, J.P., GROSCLAUDE, F. (1997):  
Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites.  
*Anim Genet.* **28**, 338-345.
- NAGAMINE, Y. und HIGUCHI, M. (2001):  
Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers.  
*J. Anim. Breed. Genet.* **118**, 101-109.
- NEI, M. (1972):  
Genetic distance between populations.  
*American Naturalist* **106**, 283-292.
- NEI, M. (1977):  
F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations.  
*Ann. Hum. Genetics* **41**, 225-233.
- NEI, M. (1978):  
Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.  
*Genetics* **89**, 583-590.
- NEI, M. (1987):  
Molecular evolutionary genetics.  
Columbia University Press, New York.

- NIELSEN, E.E., HANSEN, M.M., SCHMIDT, C., MELDRUP, D., GRØNKJÆR, P. (2001):  
Fisheries: Population of origin of Atlantic cod.  
*Nature* **413**, 272.
- OLDENBROEK, J.K. (editor) (1999):  
Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources.  
DLO Institute for Animal Science and Health, Lelystad.
- PAGE, R.D. (1996): TREEVIEW:  
An application to display phylogenetic trees on personal computers.  
*Computer Applications in the Biosciences* **12**, 357-358.
- PARSONS, Y.M., COOPER, D.W., PIPER, L.R. (1996):  
Genetic variation in Australian Merino sheep.  
*Anim Genet.* **27**, 223-228.
- PEMBERTON, J.M., SLATE, J., BANCROFT, D.R., BARRETT, J.A. (1995):  
Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies.  
*Mol Ecol.* **4**, 249-252.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000):  
Inference of population structure using multilocus genotype data.  
*Genetics* **155**, 945-959.
- QUENEY, G., FERRAND, N., MARCHANDEAU, S., AZEVEDO, M., MOUGEL, F., BRANCO, M., MONNEROT, M. (2000):  
Absence of a genetic bottleneck in a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) population exposed to a severe viral epizootic.  
*Mol Ecol.* **9**, 1253-1264.
- RANDI, E., PIERPAOLI, M., BEAUMONT, M., RAGNI, B., SFORZI, A. (2001):  
Genetic identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using Bayesian clustering methods.  
*Mol Biol Evol.* **18**, 1679-1693.
- RANNALA, B. und MOUNTAIN, J.L. (1997):  
Detecting immigration by using multilocus genotypes.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**, 9197-9201.
- RAYMOND, M. und ROUSSET, F. (1995):  
GENEPOP: a population genetics software for exact tests and ecumenicism.  
*J. Hered.* **86**, 248-249.

- REYNOLDS, J., WEIR, B.S., COCKERHAM, C.C. (1983):  
Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance.  
*Genetics* **105**, 767-779.
- RICE, W.R. (1989):  
Analysing tables of statistical tests.  
*Evolution* **43**, 223-225.
- RICHARDS, R.I. und SUTHERLAND, G.R. (1994):  
Simple repeat DNA is not replicated simply.  
*Nat Genet.* **6**, 114-116.
- RON, M., BLANC, Y., BAND, M., EZRA, E., WELLER, J.I. (1996):  
Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement.  
*J Dairy Sci.* **79**, 676-681.
- ROQUES, S., DUCHESNE, P., BERNATCHEZ, L. (1999):  
Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study.  
*Mol Ecol.* **8**, 1703-1717.
- ROSENBERG, N.A., WOOLF, E., PRITCHARD, J.K., SCHAAP, T., GEFEL, D., SHPIRER, I., LAVI, U., BONNÉ-TAMIR, B., HILLEL, J., FELDMAN, M.W. (2001):  
Distinctive genetic signatures in the Libyan Jews.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 858-863.
- RUANE, J. (1999):  
A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources.  
*J. Anim. Breed. Genet.* **116**, 317-323.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., EHRLICH, H.A. (1988):  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.  
*Science* **239**, 487-491.
- SAITBEKOVA, N., GAILLARD, C., OBEXER-RUFF, G., DOLF, G. (1999):  
Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis.  
*Animal Genetics* **30**, 36-41.
- SAITOU, R.K. und NEI, M. (1987):  
The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.  
*Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.

- SAMBRAUS, H. H., (1999):  
Gefährdete Nutztierassen: Ihre Zuchtgeschichte, Nutzung und Bewahrung.  
2.Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- SAMBRAUS, H. H., (2001):  
Farbatlas der Nutztierassen: 250 Rassen in Wort und Bild.  
6.Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- SCHLÖTTERER, C. (1998):  
Microsatellites. In: HOELZEL, A.R.: Molecular Genetic Analysis of populations: A practical approach.  
IRL Press, Oxford, pp.237-261.
- SCHLÖTTERER, C. und PEMBERTON, J. (1994):  
The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations.  
EXS. **69**, 203-214.
- SCHLÖTTERER, C., und TAUTZ, D. (1992):  
Slippage synthesis of simple sequence DNA.  
Nucleic Acids Res. **20**, 211-215.
- SCHMID, M. (1998):  
Genetic diversity in Swiss cattle breeds.  
Diss., Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Bern.
- SECRETARIAT OF THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. (2000):  
Sustaining life on Earth. How the Convention on Biological Diversity promotes nature and human well- being.
- SHRIVER, M.D., JIN, L., BOERWINKLE, E., DEKA, R., FERRELL, R.E., CHAKRABORTY, R. (1995):  
A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci.  
Mol Biol Evol. **12**, 914-920.
- SHRIVER, M.D., SMITH, M.W., JIN, L., MARCINI, A., AKEY, J.M., DEKA, R., FERRELL, R.E. (1997):  
Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers.  
Am J Hum Genet. **60**, 957-964.
- SOHNER, A. (1929):  
Studien über das Kärntner Schaf. Arbeiten der Lehrkanzel für Tierzucht an der Hochschule für Bodenkultur in Wien.  
Emil Haim & Co., Wien und Leipzig, **4**, 52-107.

- STAMPFL, P. (1921):  
Maßnahmen zur Hebung der Schafzucht Österreichs.  
Kommissionsvertrag von Wilhelm Frick, Wien.
- SUNDQVIST, A.K., ELLEGREN, H., OLIVIER, M., VILÀ, C. (2001):  
Y chromosome haplotyping in Scandinavian wolves (*Canis lupus*) based on  
microsatellite markers.  
*Mol Ecol.* **10**, 1959-66.
- TAUTZ, D. und RENZ, M. (1984):  
Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes.  
*Nucleic Acids Research*, **12**, 4127-4138.
- TAUTZ, D. (1989):  
Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA  
markers.  
*Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- TRAXLER, B. (2000):  
Einsatz von DNA-Mikrosatelliten im Rahmen einer Untersuchung zur  
Zuchtgeschichte und Gefährdung von Wiener Haustaubenrassen (*Columba livia var.*  
*domestica*).  
Diss., Veterinärmedizinische Universität Wien.
- VANHALA, T., TUISKULA-HAAVISTO, K., ELO, K., VILKKI, J., MÄKI-TANILA, A.  
(1998):  
Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines  
using microsatellite markers.  
*Poultry Science* **77**, 783-790.
- VEREIN DER KÄRNTNER BRILLENSCHAFZÜCHTER ALPEN-ADRIA (2000):  
Informationsfolder des Vereins der Kärntner Brillenschafzüchter Alpen-Adria.  
3.Auflage, Ferlach.
- VISSCHER, P.M., SMITH, D., HALL, S.J.G., WILLIAMS, J.L. (2001):  
A viable herd of genetically uniform cattle.  
*Nature* **409**, 303.
- WAITS, L., TABERLET, P., SWENSON, J.E., SANDEGREN, F., FRANZÉN, R. (2000):  
Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the  
Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*).  
*Mol Ecol.* **9**, 421-431.
- WASER, P.M., STROBECK, C. (1998):  
Genetic signatures of interpopulation dispersal.  
*Trends Ecol.Evol.* **13**, 43-44.

- WEBER, J.L. (1990):  
Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>.(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms.  
*Genomics* **7**, 524-30.
- WEBER, J.L. und MAY, P.E. (1989):  
Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction.  
*Am. J. Hum. Genet.* **44**, 388-396.
- WEIR, B.S. und COCKERHAM, C.C. (1984):  
Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure.  
*Evolution* **38**, 1358-1370.
- WIESBÖCK, J. (1998):  
Förderung gefährdeter Nutztiere in Österreich.  
Der Förderungsdienst, 46.Jahrgang, Heft 6, 185-191.
- WIMMERS, K., PONSUKSILI, S., SCHMOLL, F., HARDGE, T., HATZIPANAGIOTOU, A., WEBER, J., WOSTMANN, S., OLEK, K., SCHELLANDER, K. (1998):  
Effizienz von Mikrosatellitenmarkern des internationalen Standards zur Abstammungsbegutachtung in deutschen Pferdepopulationen.  
*Züchtungskunde*, **70**, 233-241.
- WRIGHT, S. (1951):  
The genetical structure of populations.  
*Ann. Eugen.* **15**, 323-354.
- WRIGHT, S. (1965):  
The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating.  
*Evolution* **19**, 395-420.
- WRIGHT, S. (1978):  
Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations.  
University of Chicago Press, Chicago.
- ZAJC, I., SAMPSON, J. (1999):  
Utility of canine microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs.  
*J. Hered.* **90**, 104-107.

**Gesetze und Verordnungen**

1992

Verordnung des Rates (EWG) Nr. 2078/92 für eine umweltgerechte und den natürlichen Lebensraum schützende landwirtschaftliche Produktion

1995

Internationales Übereinkommen über die biologische Vielfalt  
BGBl.Nr. 213/1995

2000

Sonderrichtlinie für das Österreichische Programm zur Förderung einer umweltgerechten, extensiven und den natürlichen Lebensraum schützenden Landwirtschaft (ÖPUL-Richtlinie)

## 8 Anhang

**Tab. 1a-11a:** Allelfrequenzen aller 11 Marker der Kärntner Brillenschafe (KB), N = 746 und der Villnöber Schafe (VS), N = 160

Tab.1a

<b>Locus: McM42</b>									
Allele	81	87	89	91	95	97	99	103	
KB	-----	0,629	0,029	0,158	0,050	0,009	0,046	0,079	
VS	0,151	0,566	0,047	0,016	0,091	0,019	0,013	0,097	

Tab.2a

<b>Locus: TGLA53</b>											
Allele	140	142	145	147	149	152	154	156	159	161	163
KB	0,026	0,088	0,190	0,276	0,063	0,003	0,007	0,010	0,129	0,207	0,001
VS	0,047	0,101	0,267	0,129	0,151	0,013	0,019	0,179	0,006	0,088	-----

Tab.3a

<b>Locus: OarFCB20</b>													
Allele	85	88	90	92	95	97	100	102	104	106	108	110	114
KB	0,001	0,027	0,183	0,245	0,011	0,052	0,001	0,102	0,098	0,009	0,001	0,001	0,269
VS	-----	0,016	0,381	0,088	0,123	0,028	-----	0,050	0,186	0,016	0,009	-----	0,104

Tab.4a

<b>Locus: INRA49</b>									
Allele	133	135	139	142	155	157	159		
KB	0,466	-----	0,342	0,009	0,109	0,029	0,044		
VS	0,494	0,010	0,330	0,006	0,103	0,058	-----		

Tab.5a

<b>Locus: MAF65</b>											
Allele	118	120	124	127	129	131	133	135	137	140	
KB	0,001	0,006	0,141	0,192	0,292	0,001	0,004	0,355	0,001	0,007	
VS	0,044	0,022	0,313	0,103	0,306	0,081	-----	0,088	0,044	-----	

Tab.6a

<b>Locus: McM527</b>									
Allele	167	169	171	173	175	178	180	182	184
KB	0,109	0,445	0,095	0,089	0,007	0,119	0,131	0,001	0,003
VS	0,166	0,372	0,153	0,059	0,019	0,178	0,047	0,006	-----

Tab.7a

<b>Locus: OarCP49</b>																	
Allele	79	83	85	87	89	91	93	95	97	100	101	104	105	107	130	132	135
KB	-----	0,015	0,333	0,003	-----	0,001	0,027	0,149	0,005	0,279	0,068	0,001	0,075	0,017	0,025	0,001	0,001
VS	0,013	0,132	0,308	0,091	0,069	0,016	-----	0,047	0,104	0,075	0,013	0,003	0,019	0,110	-----	-----	-----

Tab.8a

<b>Locus: OarAE119</b>								
Allele	145	152	155	159	174	178	180	182
KB	0,269	0,188	0,174	0,014	0,003	0,084	0,169	0,100
VS	0,174	0,285	0,073	0,161	0,022	0,047	0,114	0,123

Tab.9a

<b>Locus: HSC</b>															
Allele	263	267	269	271	273	275	277	279	281	283	286	291	293	295	299
KB	0,097	0,069	0,064	0,113	0,120	0,095	0,307	0,046	-----	0,076	0,011	-----	-----	0,001	0,001
VS	0,125	0,019	0,260	0,119	0,141	0,090	0,045	0,029	0,003	0,026	-----	0,013	0,109	0,022	-----

Tab.10a

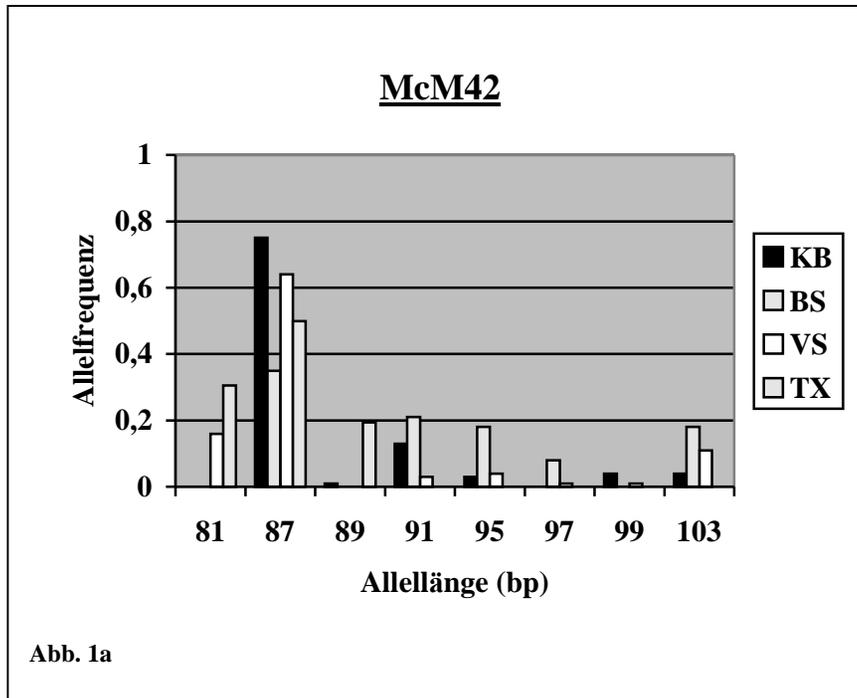
<b>Locus: MAF214</b>															
Allele	175	188	190	192	223	225	231	250	254	257	258	261	263	264	267
KB	0,001	0,014	0,560	0,315	0,001	0,002	0,001	-----	0,001	0,054	0,001	0,013	0,023	-----	0,015
VS	-----	0,016	0,640	0,226	0,013	0,019	0,064	0,006	-----	0,003	-----	-----	0,006	0,006	-----

Tab.11a

<b>Locus: OarFCB11</b>											
Allele	122	124	126	132	134	135	136	137	139	143	146
KB	0,152	0,095	0,300	0,383	0,003	-----	0,067	-----	-----	0,001	-----
VS	0,369	0,034	0,156	0,113	0,022	0,031	0,238	0,016	0,013	0,003	0,006

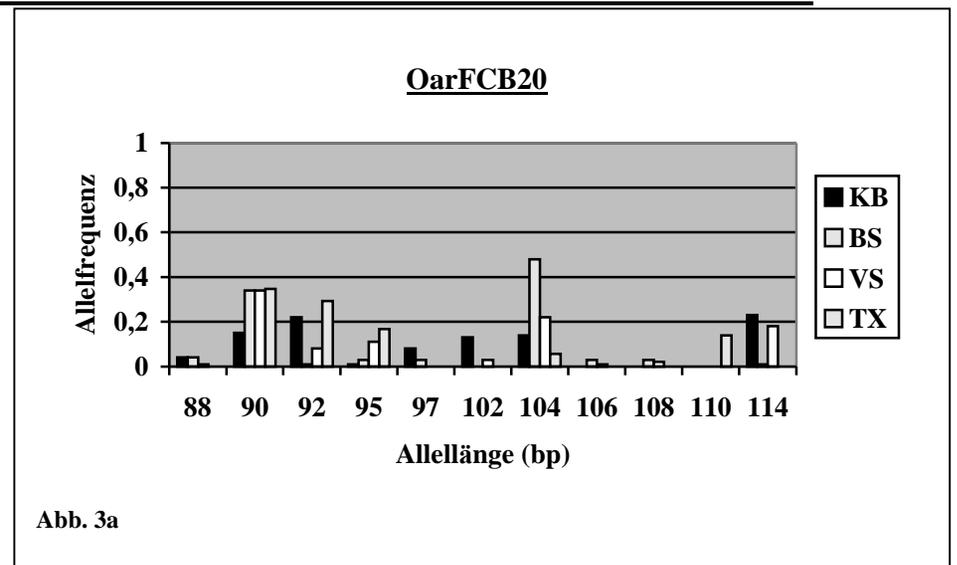
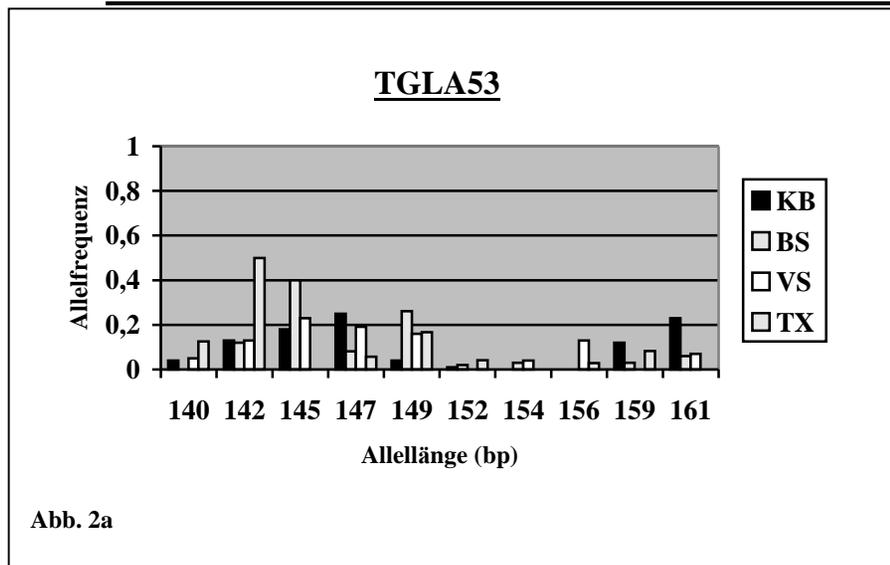
**Tab. 12a-22a und Abb. 1a-11a:** Allelfrequenzen aller 11 Marker der vier Schafrassen Kärntner Brillenschaf (KB) N = 50, Bergschaf (BS) N = 50, Villnöber Schaf (VS) N = 50, Texelschaf (TX) N = 36  
Tab.12a

<b>Locus:</b>	<b>McM42</b>							
Allele	81	87	89	91	95	97	99	103
KB	-----	0,750	0,010	0,130	0,030	-----	0,040	0,040
BS	-----	0,350	-----	0,210	0,180	0,080	-----	0,180
VS	0,160	0,640	-----	0,030	0,040	0,010	0,010	0,110
TX	0,306	0,500	0,194	-----	-----	-----	-----	-----



Tab.13a

<b>Locus: TGLA53</b>											
Allele	140	142	145	147	149	152	154	156	159	161	
KB	0,040	0,130	0,180	0,250	0,040	0,010	-----	-----	0,120	0,230	
BS	-----	0,120	0,400	0,080	0,260	0,020	0,030	-----	0,030	0,060	
VS	0,050	0,130	0,230	0,190	0,160	-----	0,040	0,130	-----	0,070	
TX	0,125	0,500	-----	0,056	0,167	0,042	-----	0,028	0,083	-----	

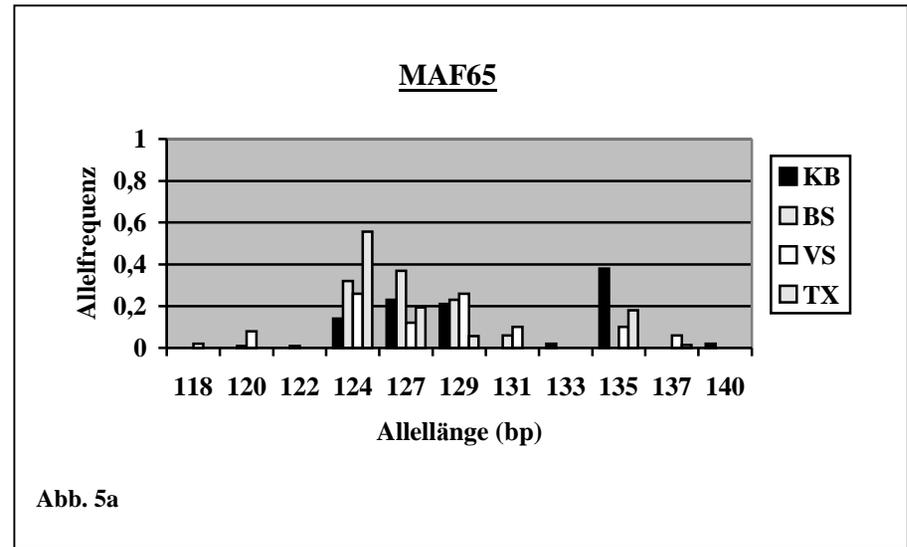
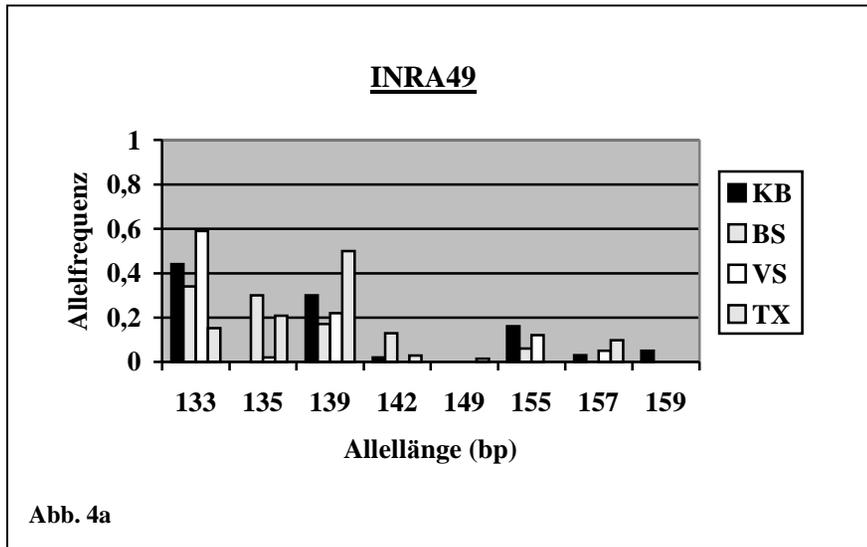


Tab.14a

<b>Locus: OarFCB20</b>											
Allele	88	90	92	95	97	102	104	106	108	110	114
KB	0,040	0,150	0,220	0,010	0,080	0,130	0,140	-----	-----	-----	0,230
BS	0,040	0,340	0,010	0,030	0,030	-----	0,480	0,030	0,030	-----	0,010
VS	0,010	0,340	0,080	0,110	-----	0,030	0,220	0,010	0,020	-----	0,180
TX	-----	0,347	0,292	0,167	-----	-----	0,056	-----	-----	0,139	-----

Tab.15a

<b>Locus:</b>	<b>INRA49</b>							
Allele	133	135	139	142	149	155	157	159
KB	0,440	-----	0,300	0,020	-----	0,160	0,030	0,050
BS	0,340	0,300	0,170	0,130	-----	0,060	-----	-----
VS	0,590	0,020	0,220	-----	-----	0,120	0,050	-----
TX	0,153	0,208	0,500	0,028	0,014	-----	0,097	-----

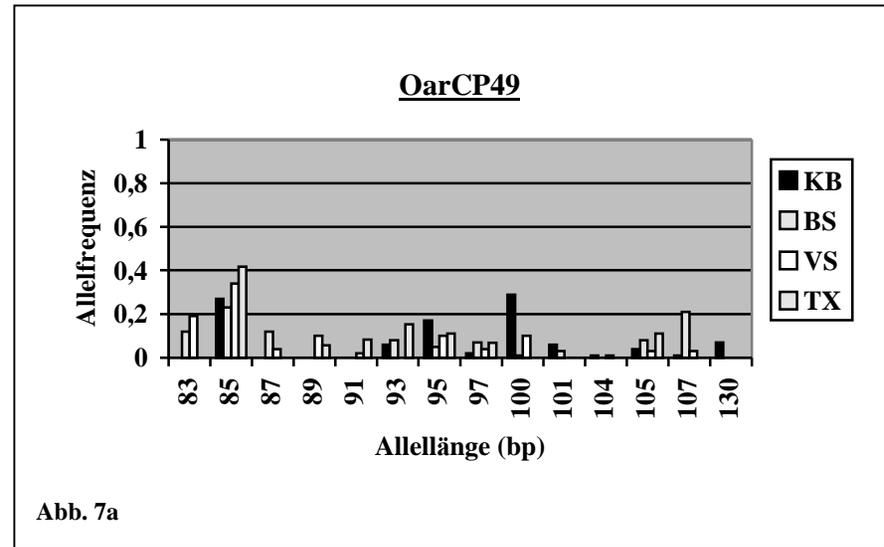
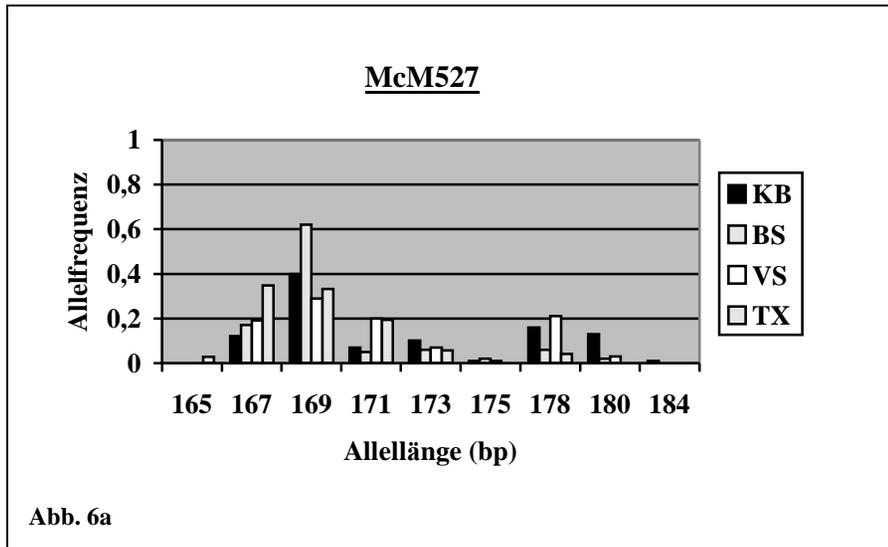


Tab.16a

<b>Locus:</b>	<b>MAF65</b>										
Allele	118	120	122	124	127	129	131	133	135	137	140
KB	-----	-----	-----	0,140	0,230	0,210	-----	0,020	0,380	-----	0,020
BS	-----	0,010	0,010	0,320	0,370	0,230	0,060	-----	-----	-----	-----
VS	0,020	0,080	-----	0,260	0,120	0,260	0,100	-----	0,100	0,060	-----
TX	-----	-----	-----	0,556	0,194	0,056	-----	-----	0,181	0,014	-----

Tab.17a

<b>Locus: McM527</b>										
Allele	165	167	169	171	173	175	178	180	184	
KB	-----	0,120	0,400	0,070	0,100	0,010	0,160	0,130	0,010	
BS	-----	0,170	0,620	0,050	0,060	0,020	0,060	0,020	-----	
VS	-----	0,190	0,290	0,200	0,070	0,010	0,210	0,030	-----	
TX	0,028	0,347	0,333	0,194	0,056	-----	0,042	-----	-----	



Tab.18a

<b>Locus: OarCP49</b>															
Allele	83	85	87	89	91	93	95	97	100	101	104	105	107	130	
KB	-----	0,270	-----	-----	-----	0,060	0,170	0,020	0,290	0,060	0,010	0,040	0,010	0,070	
BS	0,120	0,230	0,120	-----	-----	0,080	0,050	0,070	0,010	0,030	-----	0,080	0,210	-----	
VS	0,190	0,340	0,040	0,100	0,020	-----	0,100	0,040	0,100	-----	0,010	0,030	0,030	-----	
TX	-----	0,417	-----	0,056	0,083	0,153	0,111	0,069	-----	-----	-----	0,111	-----	-----	

Tab.19a

<b>Locus: OarAE119</b>									
Allele	145	152	155	159	165	174	178	180	182
KB	0,270	0,270	0,120	-----	-----	-----	0,080	0,110	0,150
BS	0,130	0,330	0,240	0,070	-----	-----	0,170	0,030	0,030
VS	0,170	0,300	0,060	0,190	-----	0,020	0,050	0,100	0,110
TX	0,014	0,750	-----	0,056	0,014	0,069	0,014	-----	0,083

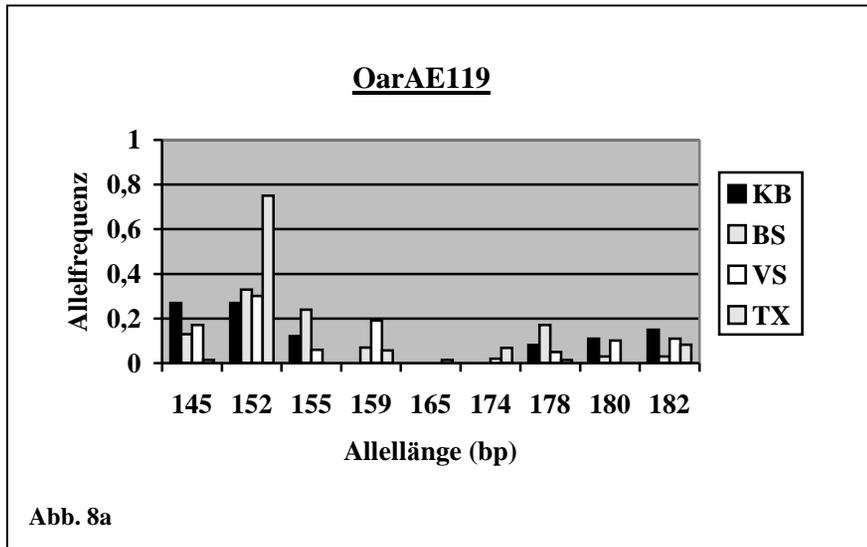


Abb. 8a

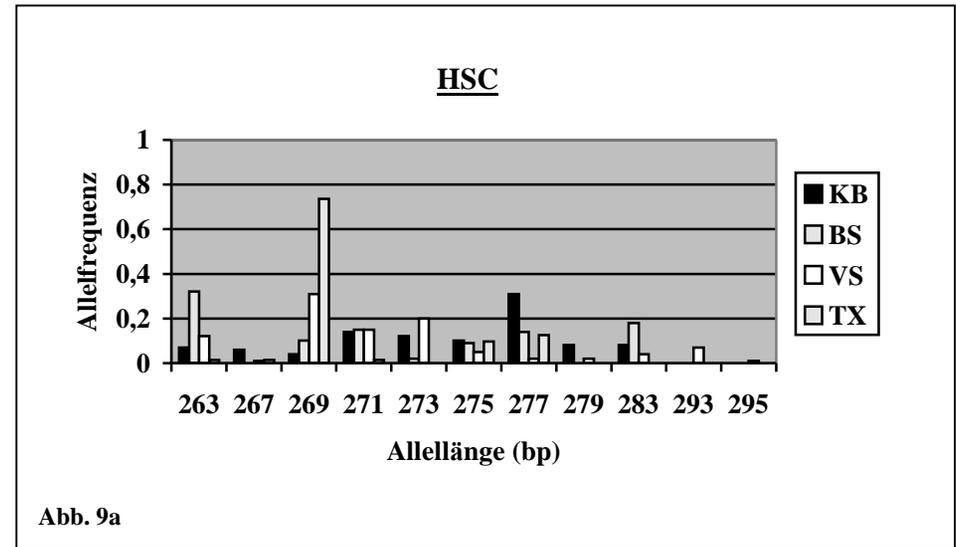


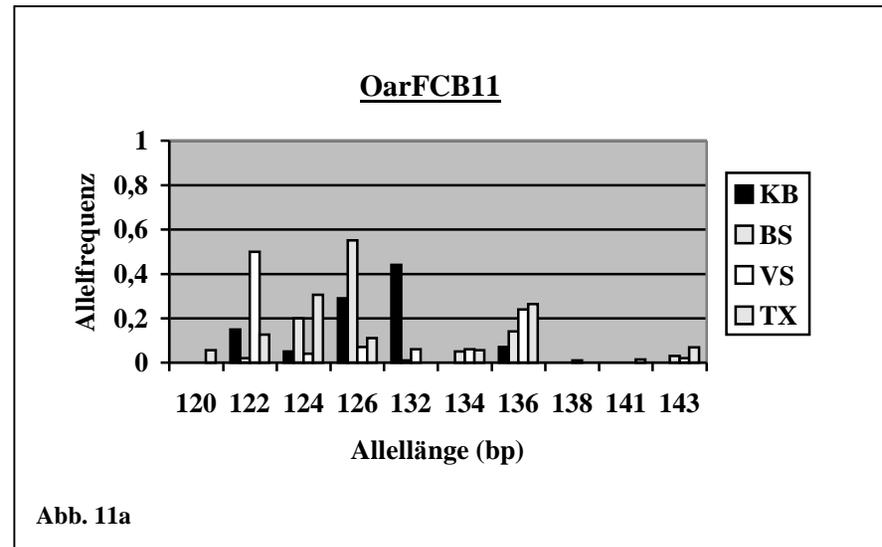
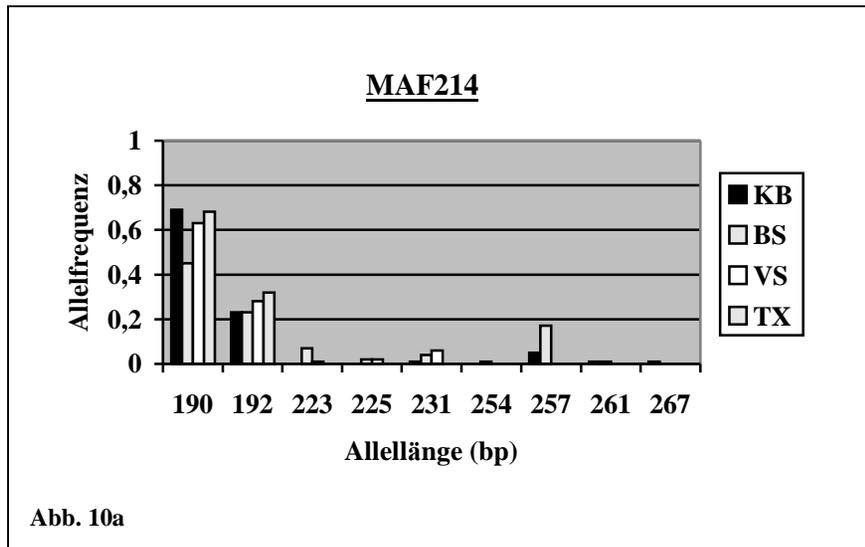
Abb. 9a

Tab.20a

<b>Locus: HSC</b>											
Allele	263	267	269	271	273	275	277	279	283	293	295
KB	0,070	0,060	0,040	0,140	0,120	0,100	0,310	0,080	0,080	-----	-----
BS	0,320	-----	0,100	0,150	0,020	0,090	0,140	-----	0,180	-----	-----
VS	0,120	0,010	0,310	0,150	0,200	0,050	0,020	0,020	0,040	0,070	0,010
TX	0,014	0,014	0,736	0,014	-----	0,097	0,125	-----	-----	-----	-----

Tab.21a

<b>Locus:</b>	<b>MAF214</b>									
Allele	190	192	223	225	231	254	257	261	267	
KB	0,690	0,230	-----	-----	0,010	-----	0,050	0,010	0,010	0,010
BS	0,450	0,230	0,070	0,020	0,040	0,010	0,170	0,010	-----	-----
VS	0,630	0,280	0,010	0,020	0,060	-----	-----	-----	-----	-----
TX	0,681	0,319	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



Tab.22a

<b>Locus:</b>	<b>OarFCB11</b>									
Allele	120	122	124	126	132	134	136	138	141	143
KB	-----	0,150	0,050	0,290	0,440	-----	0,070	-----	-----	-----
BS	-----	0,020	0,200	0,550	0,010	0,050	0,140	-----	-----	0,030
VS	-----	0,500	0,040	0,070	0,060	0,060	0,240	0,010	-----	0,020
TX	0,056	0,125	0,306	0,111	-----	0,056	0,264	-----	0,014	0,069

**Tab. 23a:** Probennummern der Tiere mit fehlerhafter Abstammung

Vater und Mutter angegeben: N=175			Nur Vater angg.: N=69	Nur Mutter angg.: N=249
Vater falsch	Beide falsch	Mutter falsch	Vater falsch	Mutter falsch
0149			0469	0339
		0389	1159	0689
0409			1379	0739
		0609	1959	1049
		0819	3879	1229
		0969	6219	1499
1109	1109	1109	6629	1649
		1259	6789	2019
1299			6959	2159
		1309	6979	2209
1319			<b>10</b>	2439
1369				2699
		1399		2709
		1409		3989
1439	1439	1439		4109
1539				4119
1839	1839	1839		4199
1849	1849	1849		4389
1859	1859	1859		4759
1879				4879
2009				4919
		2389		5189
2569				5229
		2969		5399
		3529		5589
		3759		5689
3789				5829
		4089		5949
		4169		6289
4419				6409
		4599		6429
		4699		6489
5339				6499
5349	5349	5349		6519
		5379		6609
5569	5569	5569		6709

2a

5699		
5729		
		5739
5749		
5759		
5909	5909	5909
5959		
5999	5999	5999
		6009
		6239
6269		
		6279
		6309
		6349
		6359
6439		
		6479
		6549
6579		
6589		
		6599
6719	6719	6719
		6729
		7139
7349		
7459		
		7609
<b>33</b>	<b>10</b>	<b>40</b>

7499
7649
<b>38</b>

Unklare Fälle:	
Väter	Mütter:
1929	0749
5479	0759
6159	2129
<b>3</b>	2219
	2379
	2539
	3509
	3829
	4709
	<b>9</b>

Vater und Mutter angegeben: N=175		
Vater falsch	Beide falsch	Mutter falsch
0149		0389
0409		0609
		0819
		0969
1109	1109	1109
		1259
1299		1309
1319		
1369		
		1399
		1409
1439	1439	1439
1539		
1839	1839	1839
1849	1849	1849
1859	1859	1859
1879		
2009		
		2389
2569		
		2969
		3529
		3759
3789		
		4089
		4169
4419		
		4599
		4699
5339		
5349	5349	5349
		5379
5569	5569	5569
5699		
5729		
		5739
5749		
5759		
5909	5909	5909
5959		
5999	5999	5999
		6009
		6239
6269		
		6279
		6309
		6349
		6359
6439		
		6479
		6549
6579		
6589		6599
6719	6719	6719
		6729
		7139
7349		
7459		
		7609
<b>33</b>	<b>10</b>	<b>40</b>

Nur Vater angg.: N=69		Nur Mutter angg.: N=249	
Vater falsch		Mutter falsch	
0469		0339	
1159		0689	
1379		0739	
1959		1049	
3879		1229	
6219		1499	
6629		1649	
6789		2019	
6959		2159	
6979		2209	
<b>10</b>		2439	
		2699	
		2709	
		3989	
		4109	
		4119	
		4199	
		4389	
		4759	
		4879	
		4919	
		5189	
		5229	
		5399	
		5589	
		5689	
		5829	
		5949	
		6289	
		6409	
		6429	
		6489	
		6499	
		6519	
		6609	
		6709	
		7499	
		7649	
		<b>38</b>	

Unklare Fälle:	
Väter	Mütter:
1929	0749
5479	0759
6159	2129
<b>3</b>	2219
	2379
	2539
	3509
	3829
	4709
	<b>9</b>