

DETLEF FABER; WERNER HECHT; ALEXANDER HERZOG; KARL KUGELSCHAFTER, Gießen

Populationsgenetische Untersuchungen am Feldhasen (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in Hessen auf der Ebene der Mitochondrien-DNS – erste Ergebnisse

Einleitung

Auf Grund des kontinuierlichen Rückgangs der Feldhasenstrecke in Hessen seit den siebziger Jahren wurden seitens der Jägerschaft immer wieder Untersuchungen über die Ursachen angeregt. Zuletzt das hessische Feldhasen - Untersuchungsprogramm 1994-96. Neben Populationsdichtebestimmung und Zuwachsermittlung mittels Scheinwerfertaxation, Jagdstreckenanalysen und Hygienestatus der Feldhasen, werden auch populationsgenetische Untersuchungen durchgeführt.

Geklärt soll werden:

1. Wie groß ist die genetische Vielfalt des Feldhasen im Untersuchungsgebiet?
2. Gibt es genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen?
3. Wie groß ist der Einfluß von Barrieren natürlicher Art, wie Flüssen oder Wäldern, und anthropogenen Ursprungs, wie Siedlungen, Landstraßen oder Autobahnen, auf die genetische Distanz von benachbarten Populationen?
4. Gibt es Populationen, die durch anthropogene Barrieren bereits Anzeichen einer genetischen Verarmung erkennen lassen?
5. Kann man einen Zusammenhang zwischen Zuwachsrate oder Gesundheitszustand einer Population und ihrer genetischen Struktur feststellen?

Material und Methode

Bislang wurden insgesamt 109 Gewebeproben, davon 88 aus 7 verschiedenen hessischen Gebieten untersucht. (Abb. 3). 12 Proben (polnischen Ursprungs) wurden vom Institut für Zoo- und Wildtierforschung Berlin zur Verfügung gestellt und weitere 9 Proben stammen aus einem Revier bei Aachen. Als Untersuchungsmaterial dienten Leber-, Nierengewebe, Ovarien oder Zunge, die nach der Entnahme auf Eis gekühlt und später bei -20°C eingefroren wurden. Jeweils 0,1 g Gewebe wurde mittels Proteinase K und 10%igem SDS aufgeschlossen. Nach Zentrifugation und Präzipitation in Ethanol wurde die Gesamt-DNS isoliert. Mit Hilfe der PCR wurde ein ca. 600 bp langes Stück aus dem d-loop Bereich der mtDNA amplifiziert, welches von zwei 20 und 21 bp langen Primern flankiert wird. Von 14 Tieren wurde jeweils ein 340 bp langes mtDNA Stück auf einem ABI PRISM 377 DNA-Sequenzer sequenziert und die so erhaltenen Sequenzen miteinander verglichen. Auf der Grundlage der durch den Sequenzvergleich gefundenen Mutationen wurden 4 Restriktionsenzyme (Rsa I, Fok I, Hph I und Bsp I) ausgewählt, mit deren Hilfe zunächst ein Teil der Mutationen bei allen Proben untersucht wurde. Die gefundenen RFLP's ließen sich durch Elektrophorese in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2% Agarosegel unter UV-Bestrahlung darstellen.

10	20	30	40	50	60	70
CTTTACTCTTAAATAACATATCCAAGTAACCTGTCACTATTGACAAAACACCCTTAATGCTATGTAATTC						
80	90	100	110	120	130	140
GTGCATTANTGCTTTCCCCATTAACATGNACCTATACTANCATTCTATAATCAACATTAGACCATTACA						
150	160	170	180	190	200	210
TGTTTAATCGTCATTAAGCTCTCCCCATGCATATAAGCTAGTACATCNCTGCTTAATAGGACATAGT						
220	230	240	250	260	270	280
ACATTCACTACTAAACTCACATAACNCTATCNCCAACATGGATATTCAATTCCAACACCCACCTTAATC						
290	300	310	320	330	340	
AACATCCAGACATCCATTCTTGATNGAACATAACCATCCGAGTCAAATCCTTCTTGT						

Abb. 1 Sequenz eines 340 bp langen d-loop Stückes der mtDNS des Feldhasen. A = Adenin, T = Tymin, C = Cytosin, G = Guanin, N = Stelle an der bei verschiedenen Tieren eine Mutation auftritt.

Ergebnisse

I. Sequenzierung

Aus den 14 sequenzierten mtDNS Stücken lässt sich folgende Konsensussequenz erstellen (Abb.1).

Bei einem Vergleich der Sequenzen der verschiedenen Tiere in Tabelle 1 kommen folgende Varianten zutage:

Bei 7 der 14 untersuchten Tiere tritt eine 100%ige Übereinstimmung auf. Sie werden im weiteren Verlauf als „Wildtyp“ bezeichnet. Es treten an 6 Stellen Transversionen (3x Tymin→Cytosin, 2x Cytosin→Tymin, 1x Guanin→Adenin) und an einer Stelle eine Transition (Adenin→Tymin) auf. Insgesamt kann zwischen 7 Genotypen unterschieden werden. 4 Tiere unterscheiden sich in je einer Base

Tab.1: Lokalisation der Mutationen bei 14 Tieren ermittelt durch Sequenzvergleich eines 340 bp langen mtDNS-Stückes. Horizontal aufgetragen die jeweilige Stelle im untersuchten DNS-Stück. Vertikal die Untersuchungsnummern der Tiere. Dunkel unterlegt sind die Abweichungen der Sequenz eines Tieres vom sogenannten Wildtyp (erste Zeile).

n=14

Tier-Nr.	Localisation						
	79	100	111	191	237	243	306
610 / 637 / 652 / 653 / 788 / 829 / 830	G	T	T	C	T	A	C
656/700	A	T	T	C	T	A	C
642	G	T	T	T	T	A	C
717	G	T	T	C	T	A	T
639	G	T	T	T	T	T	C
609	A	T	C	C	C	A	C
789	A	C	T	C	C	A	C

(2 x Austausch an Stelle 79 und je 1 x Austausch an Stelle 191 bzw. 306) vom Wildtyp, ein Tier durch zwei Austausche (Stelle 191 und 243) und zwei Tiere durch je drei (Stelle 79, 100, 237 bzw. 79, 111 und 243).

II. Restriktionsverdau:

Die Ergebnisse der Restriktionsverdau weisen methodisch bedingte Unterschiede zu den Se-

quenzvergleichen auf. Die Differenzierung verschiedener Varianten ist etwas ungenauer, da im Vergleich zur Sequenzierung nur einzelne Loci, nicht aber das komplette amplifizierte DNS-Stück, betrachtet werden können. Die Methode hat aber den Vorteil, daß die, für die populationsgenetischen Untersuchungen notwendigen großen Probenzahlen, mit geringem finanziellen und zeitlichen Aufwand bearbeitet werden können.

Abb. 2 Beispiel einer Verdau-Serie mit je 12 DNS Proben geschnitten von den vier Restriktionsenzymen *Rsa I*, *Fok I*, *Hph I* und *Bsp I* (von links nach rechts und oben nach unten). An Position 1, 14 und 27 ist jeweils ein „*pUC/Asu*“ - Marker aufgetragen. An den Positionen 5 (*Rsa I*), 18, 24 (*Fok I*) in der oberen Reihe und 24 (*Bsp I*) in der unteren Reihe treten Unterschiede im Restriktionsmuster auf, die eine Mutation kennzeichnen. Die Schnittmuster aller vier Enzyme machen in ihrer Kombination für das jeweilige Tier eine bestimmte Variante aus.

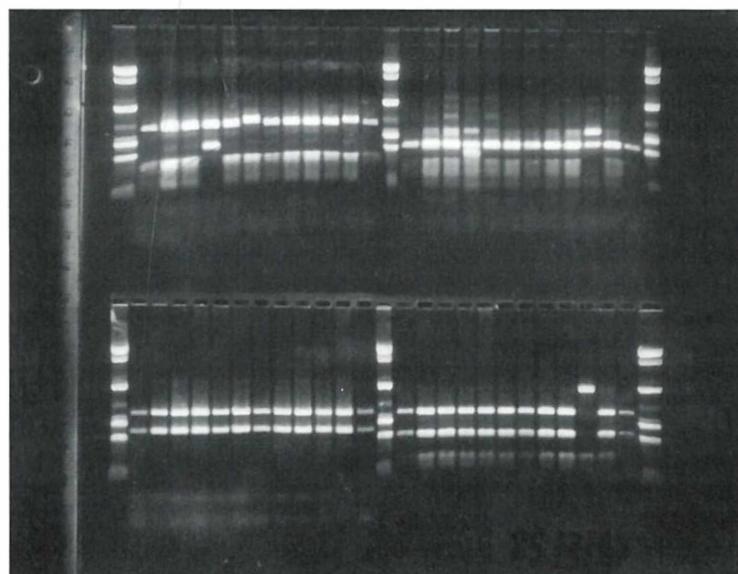


Tabelle 2 Aufgetretene Varianten (A - K, horizontal) mit der dazugehörige Tierzahl, geordnet nach ihrem Vorkommen in den Untersuchungsgebieten (1 - 200, vertikal).

n = 109

Gebiet NR.	Varianten-anzahl/Gebiet	Varianten (mit der jeweiligen Zahl der Individuen)									
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	5	5			1	3	5		1		
4	3		11	1						1	
5	2	1		2							
6	3			5						1	2
7	3		10				6		2		
8	1	19									
9	1	12									
100	1	9									
200	3	10						1		1	
Anzahl Gebiete pro Variante	6	2	3	1	1	2	1	2	2	1	1
Anteil Tiere in % pro Variante	51	19	7,3	0,9	2,8	10	0,9	2,8	1,8	0,9	1,8

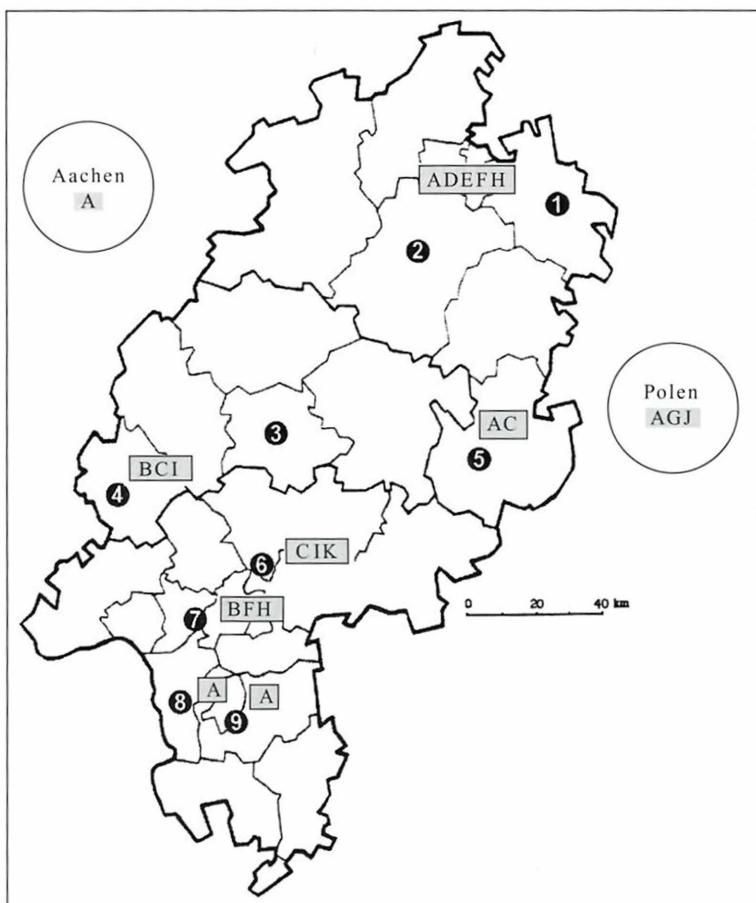


Abb. 3: Geographische Verteilung der mtDNS Varianten (A - K) in Hessen (1 - 9) und zwei Gebieten (Aachen = 100, Polen = 200) außerhalb.

Insgesamt konnten 11 Varianten bei den untersuchten Tieren gefunden werden. Die einzelnen Varianten treten lokal unterschiedlich häufig auf. Variante A kommt großflächig vor, in sechs Gebieten bzw. 51 % der untersuchten Tiere, Variante C in drei Gebieten, vier Varianten (B, F, H und I) in zwei Gebieten und fünf (D, E, G, J und K) in je nur einem Gebiet.

Die geographische Verteilung (Abb. 3) der Varianten auf die 9 Untersuchungsregionen sieht wie folgt aus: Im Gebiet Nr. 1 treten die Varianten A, D, E, F und H auf, in 4 Gebieten je drei Varianten (Nr. 4: B/C/I, Nr. 6: C/I/K, Nr. 7: B/F/H, Nr. 200: A/G/J), in Gebiet Nr. 5 zwei Varianten A und C und drei Gebiete (Nr. 8, 9, 100) haben nur die Variante A.

III. Populationsgenetische Parameter

Die Untersuchungsgebiete lassen sich bezüglich ihrer genetischen Distanz nach folgender Formel vergleichen:

$$D_{i,k} = 1 - \sum_{j=1}^{nV} F_{i,j} \times F_{k,j}$$

$D_{i,k}$ = Distanz zwischen Gebiet i und k

$F_{i,j}$ = Frequenz der Variante j in Gebiet i

$F_{k,j}$ = Frequenz der Variante j in Gebiet k

nV = Anzahl Varianten

Die relative geographische Distanz wurde ermittelt aus

$$S = S_{ik} / S_{\max}$$

S_{\max} = Distanz zwischen den am entferntesten von einander liegenden Gebieten

S_{ik} = Distanz zwischen Gebiet i und k

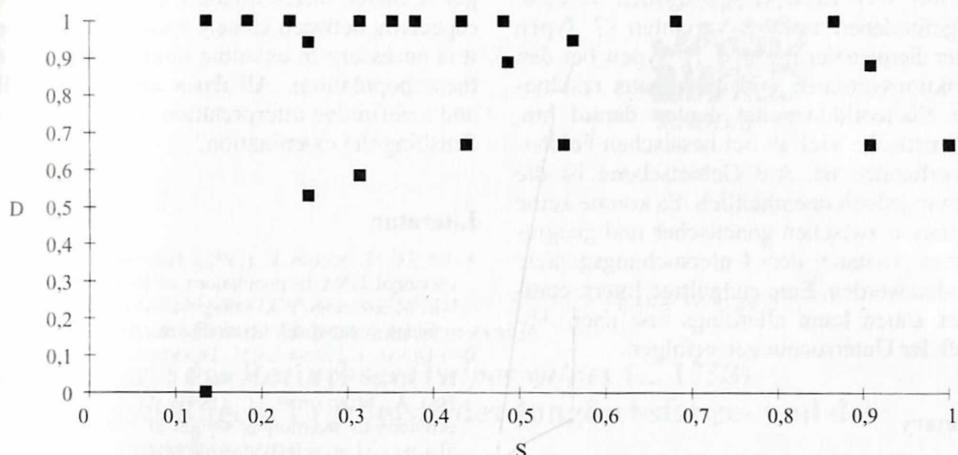


Abb. 4: Genetische und relative geographische Distanzen der Untersuchungsregionen im Vergleich

Besprechung der Ergebnisse

Aufgrund der noch geringen Untersuchungszahlen insbesondere aus einigen Untersuchungsgebieten und der somit nur vorläufigen Ergebnisse können die eingangs gestellten Fragen größtenteils noch nicht befriedigend beantwortet werden. Immerhin lässt sich aber anhand der gefundenen mtDNS-Varianten sagen, daß genetische Vielfalt in der hessischen Feldhasenpopulation zu beobachten ist. Die Nukleotiddiversität, ein Hinweis auf genetische Vielfalt, der untersuchten hessischen Hasen ist höher als beispielsweise die von Hartl et al. 1993 für niederösterreichische Populationen angegebene ($\pi = 0,01$; $SD = 0,02$). Hierbei muß berücksichtigt werden, daß unsere Werte auf Sequenzierungsdaten beruhen und daher etwas höher aber auch genauer sind, als die auf Restriktionsenzymebene entstandenen Daten, die immer einen Mindestschätzwert darstellen.

Auf der Ebene der Untersuchungsgebiete ist die Situation allerdings unterschiedlich. Während in Nordhessen die größte Varianz der untersuchten mtDNS auftritt, in einem Gebiet, wo die Feldhasendichte weit unter 20 Hasen je 100 ha Biotopfläche liegt, findet sich im hess. Ried mit 50 bis fast 100 Tieren je 100 ha nur eine Variante, der am weitesten verbreitete Wildtyp. Diese Verhältnisse müssen durch wei-

tere Untersuchungen, die die Qualität der Differenzierung und Quantität der Proben deutlich verbessern sollen, noch genauer geklärt werden.

Die Gebietsvergleiche bezüglich genetischer und geographischer Distanz (Abb. 4) zeigen keine Korrelation ($r = 0,09$). Es treten beispielsweise genetisch ähnliche Populationen sowohl benachbart wie auch in großer Distanz auf (Südhessen im Vergleich mit Aachen). Hier muß die Steigerung der Probenzahl besonders im kleinräumlichen Bereich auf Revierebene noch abgewartet werden, bevor die Interpretation der Daten zu verwertbaren Ergebnissen führt.

Zusammenfassung

Im Rahmen des hessischen Feldhasen-Untersuchungsprogramms 1994 - 1996 werden populationsgenetische Untersuchungen an Feldhasen (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) durchgeführt.

Die hier vorgestellten vorläufigen Ergebnisse basieren auf der Untersuchung von insgesamt 109 Feldhasen aus insgesamt 7 Gebieten innerhalb Hessens und zwei Gebieten außerhalb als Vergleich. Untersucht wurde jeweils ein ca. 340 bp bzw. 600 bp langes mtDNS-Stück aus dem d-loop Bereich. Es wurde sequenziert

bzw. mit vier Restriktionsenzymen verdaut. Die gefundenen mtDNS-Varianten (7 Typen bei der Sequenzierung und 11 Typen bei den Restriktionsverdau) und die daraus resultierende Nucleotiddiversität deuten darauf hin, daß genetische Vielfalt bei hessischen Feldhasen vorhanden ist. Auf Gebietsebene ist die Situation jedoch uneinheitlich. Es konnte keine Korrelation zwischen genetischer und geografischer Distanz der Untersuchungsgebiete gefunden werden. Eine endgültige Interpretation der Daten kann allerdings erst nach Abschluß der Untersuchungen erfolgen.

Summary

A total of 109 brown hares (*Lepus europaeus*, Pallas 1778) from 7 sampling sites in Hessen, Germany and 2 sampling sites outside (Aachen, Germany and Poland) were examined for genetic diversity in and between populations by DNA-sequencing (14 individuals) and digestion with 4 selected restriction endonucleases of about 600 bp in the d-loop of the mtDNA. 11 different types were found by digestion, the nucleotid diversity figured out by the sequences seems to be on a high level in the brown hare population of Hessen. A comparison between different populations within Hessen shows a non-uniform distribution of mtDNA types and there was no correlation between genetic and geographic distances. To

get a better differentiation of mtDNS types especially between closely located populations it is necessary to examine more individuals of these populations. All dates are provisionally and a definitive interpretation will follow after finishing the examination.

Literatur

- AVISE, J.C.; LANSMAN, R. (1983): Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: NEI, M & KOEHN, R.K. (Hrsg.): *Evolution of genes and proteins*. Sunderland, Massachusetts: 147-164.
- BIJU-DUVAL, C.; ENNAFAA, H.; DENNEBOUY, N.; MONNEROT, M.; MIGNOTTE, F.; SORIGUER, R.C.; EL GAAIED, A.; EL HILI, A.; MOUNOLOU, J.C. (1991): Mitochondrial DNA evolution in lagomorphs: Origin of systematic heteroplasm and organization of diversity in European rabbits. - *J. Mol. Evol.* **33**: 92-102.
- BROWN, W. M. (1983): Evolution of animals mitochondrial DNA. In: NEI, M & KOEHN, R.K. (Hrsg.): *Evolution of genes and proteins*. Sunderland, Massachusetts: 63-88.
- HARTL, G.B.; MARKOWSKI, J.; SWIATECKI, J.; JANISZEWSKI T.; WILLING, R. (1992): Genetic diversity in the Polish brown hare *Lepus europaeus* Pallas 1778: implications for conservation and management. - *Acta Theriologica* **37**: 15-25.
- HARTL, G.B.; SUCHENTRUNK, F.; NADLINGER, K.; WILLING, R. (1993): An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. - *Acta Theriologica* **38**, Suppl. 2: 33-57.
- JÄGER, F.; HECHT, W.; HERZOG, A. (1992): Untersuchungen an mitochondrialer DNS von hessischem Rehwild (*C. capreolus*). - *Z. Jagdwiss.* **38**: 26-33.
- NEI, M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York: 1 - 512

Anschrift der Verfasser:

DETLEF FABER,
DR. WERNER HECHT,

PROFESSOR DR. ALEXANDER HERZOG

Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Fachgebiet Veterinärmedizinische Genetik und Zytogenetik
Hofmannstr. 10
D - 35392 Gießen

KARL KUGELSCHAFTER

Arbeitskreis Wildbiologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen e.V.
Heinrich-Buff-Ring 25
D - 35392 Gießen

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Beiträge zur Jagd- und Wildforschung](#)

Jahr/Year: 1997

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Faber Detlef, Hecht Werner, Herzog Alexander,
Kugelschafter Karl

Artikel/Article: [Populationsgenetische Untersuchungen am Feldhasen \(*Lepus
europaeus* Pallas, 1778\) in Hessen auf der Ebene der Mitochondrien-DNS -
erste Ergebnisse 181-186](#)