

JOSEF FEUEREISEL & MARTIN ERNST, Brno

Genetische Untersuchungen zum Einfluss langzeitiger Isolation einer Population weißer Hirsche (*Cervus elaphus* L.) in der Tschechischen Republik

Schlagworte/key words: weißes Rotwild, Inzucht, Genetik, Mikrosatelliten, genetische Diversität

1. Einleitung

Die Hege des weißen Hirschwildes stellt in der Tschechischen Republik eine einzigartige Hegeproblematik dar. Hier, wie auch an wenigen Stellen im Ausland, handelt sich nicht um Albinismus, sondern um Leuzismus. Bei seinem Auftreten ist die Haut pigmentiert, das Haar weiß, und die Iris blau. Die Vererbung dieses Merkmales ist nicht einfach, da in den einzelnen Populationen einzelne Individuen mit unterschiedlicher Färbung – rein weiße, überwiegend weiße, gefleckte und klassisch wild braun-rote – hervor, in der Folge der Kreuzung mit europäischem Rotwild (*Cervus elaphus hippelaphus* Erx.) vorkommen.

Das Ziel der hegerischen Bemühungen ist die Erlangung von einem maximalen Anteil standard-weißen Individuen bei einer gleichzeitigen Aufrechterhaltung von einem guten Gesundheitszustand und der Reproduktion. Im Verlauf Jahrzehnte langer Hege des weißen Hirschwildes in unseren Ländern ist sein Bestand mehrmals kritisch zurückgegangen.

Aus diesen Gründen haben sich einige negative Auswirkungen der Inzucht (sog. Inbreeding-Depressionen) gezeigt (körperliche Anomalien, Unterkiefer-Verkürzung, niedrigere Lebensdauer,

er, schwache Konstitution und niedrigere Natalität). Infolgedessen wurde im Verlauf der Jahre mehrmals auf eine Blutauffrischung durch wild gefärbtes Rotwild zurück gegriffen.

Trotz der großen hegerischen Bemühungen, wahrscheinlich durch die Ausnutzung einer zahlenmäßig beschränkten Hegebasis, kommen weiterhin einige negative gesundheitliche Erscheinungen (z.B. körperliche Anomalien) vor. Aus diesen Gründen haben wir in Zusammenarbeit und mit Unterstützung der Firma „Forste der Tschechischen Republik“ versucht, zur Diagnostik der Verwandtschaftskreuzung molekular-genetische Methoden einzusetzen.

2. Historie der Hege des weißen Hirschwildes

Die historische Herkunft des weißen Hirschwildes ist noch nicht eindeutig nachgewiesen. Die Literaturquellen geben an, dass das weiße Hirschwild in die Mitteleuropa um das Jahr 1780 gelangt ist und zwar höchstwahrscheinlich aus Indien (Kaschmir) oder Persien, wo es frei in der Natur gelebt hat (NEVOLE, 1992).

Nach dem Import in Tschechien haben dieses Wild der Fürst Schwarzenberg und die Grafen

Waldstein, Czernin und Kinsky aus „Chlumec nad Cidlinou“ übernommen. Bei Schwarzenberg und Czernin sind die Hirsche nach kurzer Zeit ausgestorben. Bei Waldstein haben sie gut prosperiert bis um das Jahr 1870. Dann hat die Population angefangen, ziemlich stark zu degenerieren. Der letzte Hirsch wurde in dem Gehege „Mnichovo Hradiste“ im Jahr 1880 erlegt. In dem Gehege in „Chlumec“ ist es mit dem Wild auch schief gegangen. Wahrscheinlich hat deswegen im Jahr 1824 Graf Kinsky einige wenige letzte Stücke (ungefähr 10) Herrn Matyas Thun Hohenstein in „Zehusice“ übergeben. Hier ist ein Gehege aus einem Komplex von Wiesen, Aueböden und Hainen mit einer Größe von etwa 250 ha entstanden. Erstaunlicherweise hat sich das weiße Hirschwild hier erhalten und gut fortgepflanzt.

Nach einer Blutauffrischung durch wild gefärbtes Rotwild ist der Bestand im Verlauf von fünfzig Jahren auf etwa 200 Stück angewachsen und die Population hat gut prosperiert. Im Verlauf von Jahrzehnten ist ihr Bestand mehrmals bis auf eine kritische Grenze zurückgegangen (Kriegsjahre). Einen negativen Einfluss auf die Größe und Qualität der Population haben auch manche nicht ganz überlegte Hegexperimente (ein parallel gehaltener Muffelwildbestand.) und eine Vernachlässigung der forstlichen Pflege um den Hutewald gehabt.

Nach dem 2. Weltkrieg waren in „Zehusice“ nur 28 Stück dieses Wildes vorhanden, welches sich nur mit großer Mühe vermehrt hat. In der Population haben sich dann einige negative Folgen der Inzucht (Inbreeding-Depressionen) gezeigt: ein hoher Prozentsatz von körperlichen Anomalien, Unterkiefer-Verkürzung, niedrigere Lebensdauer, schwache Konstitution und niedrigere Natalität. Im Jahr 1967 waren in dem Stammbestand nur 35 Stück vom weiß gefärbten Rotwild. Der limitierende Faktor der weiteren Entwicklung der Population ist die niedrige Reproduktion geworden, eine Begleiterscheinung der Inzucht. Nach einer Blutauffrischung mit dem Karpaten-Rotwild (*Cervus elaphus montanus* Botezat) geht es dem Wild wieder besser und die Population wächst zahlenmäßig wieder an. Heutzutage hegt man hier etwa 130 Stück von weißem Rotwild. Unter Berücksichtigung dieser Entwicklung und aus veterinärmedizinischen Überlegungen (Infek-

tionsrisiken) wurde in der Nähe von „Zehusice“ eine geeignete Lokalität für die Gründung von einem zweiten Gehege zur Führung einer parallelen Linie des weißen Hirschwildes ausgewählt. Dieses Gehege liegt in der Nähe der Ortschaft und des Schlosses „Zleby“.

Im Jahre 1972 hat mit der Renovierung des alten Schlossgeheges die neue Geschichte des Geheges „Zleby“ angefangen. Im Jahre 1973 wurden hier 6 Stück vom wildgefärbten Rotwild von „Zehusice“, wo zu jener Zeit 51 Stück Rotwild lebten, umgesetzt. Bei diesem Wild hat es sich um rotbraun gefärbte Einzelstücke gehandelt, welche aber, als Mischlinge, die Anlagen für weiße Färbung besaßen. Unter dem Einfluss einer gezielten Selektion hat sich schrittweise die Farbstruktur des Rotwildrudels zu gunsten der überwiegend weißen Stücke geändert (Tabelle 1).

Außerdem hat man hierher im Jahre 1979 den damals größten und stärksten weißen Hirsch von „Zehusice“, namens „Borivoj“, gebracht. Im Jahre 1995, als in „Zleby“ der Frühlingsstammbestand schon auf 118 Stück Rotwild angewachsen war, wurde beschlossen, eine weitere selbständige Population zu gründen, um eine weite Zuchtlinie zu führen. Unter anderem wurde diese Maßnahme durch den Gedanken angeregt, in den zukünftigen Generationen eine Möglichkeit für die gegenseitige Blutauffrischung zu haben. Zu diesem Zweck wurde die Lokalität des bestehenden Geheges „Kopidlno“ ausgewählt, wohin man im Herbst des Jahres 1995 30 Stück und in den Jahren 1997/1998 weitere 61 Stück weißen Rotwildes von „Zleby“ übersiedelt hat. Dieser starke Eingriff in den Rotwildbestand in „Zleby“ hatte einen starken Rückgang zur Folge. Außerdem wurde durch die Erlegung einer größeren Anzahl wildgefärbten Rotwildes, das nicht in die Umsetzung nach „Kopidlno“ eingeschlossen war, der Bestand reduziert. Trotz dieses Eingriffes ist es bald gelungen, den Bestand erfolgreich zu stabilisieren. Heutzutage leben hier 80 Stück weißen Rotwildes. Im Jahr 1998 ist ein viertes Gehege für das weiße Rotwild in „Janovice“ bei „Hermanuv Mestec“ entstanden, wohin man im Jahre 1999 einen Stamm weißen Rotwildes von „Zleby“ gebracht hat.

Zur Zeit gibt es drei Gehegehaltungen von weißem Rotwild in der Verwaltung des Staats-

Tabelle 1 Zahlenmäßige Entwicklung der Bestände des weißen Rotwildes seit der Gründung des Wildgeheges „Zleby“

Jahr	Hirsche	Tiere	Kälber	Gesamt	Färbung	
					rot	überwiegend weiß
1973	4	2	-	6	6	-
1974	4	6	6	16	15	1
1975	7	8	6	21	21	-
1976	13	10	3	26	25	1
1977	14	10	4	28	27	1
1978	14	12	4	30	29	1
1979	12	14	7	33	29	4
1980	10	16	8	34	23	11
1981	7	17	9	33	24	9
1982	7	17	11	35	21	14
1983	9	24	9	42	22	20
1984	15	25	12	52	22	30
1985	13	38	16	67	34	33
1986	15	52	21	88	40	48
1987	15	62	16	93	33	60
1988	15	59	19	93	32	61
1989	20	60	16	96	31	65
1990	21	58	18	97	29	68
1991	22	58	17	97	25	72
1992	20	54	19	93	24	69
1993	28	57	20	105	24	81
1994	32	54	19	105	25	80
1995	38	58	22	118	20	98
1996	32	42	25	99	22	77
1997	32	50	20	102	19	83
1998	18	17	9	44	8	36
1999	15	18	9	42	7	35
2000	12	20	9	41	7	34
2001	14	27	8	49	9	40
2002	13	30	14	57	12	45
2003	15	33	18	66	15	51
2004	18	38	14	70	9	61
2005	20	40	13	73	8	65
2006	21	42	17	80	10	70

betriebes „Forste der Tschechischen Republik“ und eine private Haltung im Wildgehege „Zehusice“, in der Verwaltung der Gesellschaft Vaclav Stome – Forste Litošice.

Unsere genetischen Untersuchungen haben wir im Wildgehege „Zleby“ ausgeführt.

3. Gegenwärtiger Stand der gelösten Problematik

NECAS (1959) und BALIS (1980) hatten bei dem weiblichen Rotwild in „Zehusice“ deutlich niedrigere Natalität festgestellt als bei den anderen wildlebenden Populationen in Tschechien. Nach BARTOS et al. (1985, 1989) hat diese ungünstige Situation offensichtlich einen langfristigen Charakter. Sie haben auch festgestellt, dass eine höhere Anzahl von Tieren in der Population keine höhere Produktion von Kälbern mit sich gebracht hat.

Diese von ihnen festgestellte niedrige Natalität wurde durch die theoretischen Vorstellungen über die Vererbung der weißen Färbung und die Berechnung des Inzucht-Koeffizienten bestätigt.

Sie vermuten, dass die niedrige Reproduktionsfähigkeit des weißen Rotwildes vor allem durch den genetischen Hintergrund der Population verursacht wird. Diese Hypothese wurde auch durch hohes Vorkommen defekter Individuen bestätigt. Bei behinderten lebensfähigen Kälbern handelte sich in erster Linie um verkürzte Unterkiefer und im weiteren um die Anoftalmie (unentwickelte Augäpfel). Im Verlauf der Projektbearbeitung hatten wir in der Population des weißen Hirschwildes in „Zleby“ selber einen Fall von verkürztem Unterkiefer bei einem Hirschkalb und ein Tier hatte nur eine Ausscheidungsöffnung.

Sofern alle diese Anomalien durch einen genetischen Defekt auf rezessiver Basis verursacht sind, kann angenommen werden, dass mit einer hohen Inbreedingstufe sich die Möglichkeit von wiederholten Vorkommen verschiedener Abnormitäten erhöht.

BARTOŠ et al. (1989) führen an, dass es nötig ist, die negative Folgen der Inzucht von den eventuellen letalen Auswirkungen, die mit den Genkombinationen der weißen Färbung verbundenen sind, experimental zu unterscheiden.

Diese beiden Faktoren verlangen verschiedene züchterische Einstellungen zu der Prävention ihrer negativen Einwirkung.

Weiter kann man gezielt genetisch weitläufiger verwandte Zuchtgruppen zusammenstellen, welche eine Garantie für die Erfüllung der Zuchtziele (Fruchtbarkeit, guter Gesundheitszustand und allmähliche Aufstockung der Anzahl von weißen und überwiegend weißen Stücken) in dem Gehege „Zleby“ sein werden.

Weil in der Populationen des weißen Rotwildes weiße, überwiegend weiße, gefleckte und rote Individuen vorkommen, nahmen BARTOS et al. (1985) das Vorhandensein von minimal drei Allelpaares an. Eins für die wild-rote Farbe verantwortliches Paar (Allel *A*, *a*), ein zweites für die weiße Farbe verantwortliches Paar (Allel *B*, *b* oder *W*, *w*) und ein drittes für die gefleckte Färbung (Allel *C*, *c* oder *S*, *s*). Mit großen Buchstaben sind die dominanten Allele bezeichnet und mit kleinen die rezessiven, welche den dominanten untergeordnet sind. Für ein epistatisches Allelenpaar wird jenes für wilde (Aguti) Färbung gehalten (ein epistatisches Allelenpaar ist den anderen immer übergeordnet).

Weiter existiert noch eine Vermutung, dass eine gewisse Genkombination eine letale Auswirkung für die embryonale Entwicklung des Individuums haben könnte. In Analogie mit anderen Säugertierarten, wäre *WW* die mögliche Genkombination mit pleiotroper Wirkung.

Tabelle 2 Vermutete Genotypen der Färbung beim weißen Rotwild (VACH et al. 1997)

Genotyp	Färbung
AAWwSs	wild (rotbraun)
AAWwss	wild (rotbraun)
AaWwSs	wild (rotbraun)
AaawwSs	wild (rotbraun)
Aaawwss	wild (rotbraun)
aaWwss	weiß, gefleckt
aaWwSs	weiß
aaawwss	wild (rotbraun)
aaWWSs	weiß
AaWWSs	weiß
AAWWSs	weiß (oder Abgang)

Pleiotropie ist ein Phänomen, bei welchem ein Gen mehr als ein Merkmal beeinflusst. In unserem Fall würde es heißen, dass die Anlage für Färbung gleichzeitig mit der Embryo-Mortalität zusammenhängt. Die Annahme, dass alle Embryonen mit dem Genotyp *WW* absterben würden, muss durch die Forschung entweder bestätigt oder widerlegt werden.

Zur Zeit sind die Gene, welche die weiße Färbung beeinflussen, schon bekannt und es ist nur eine Frage der Zeit, wann die Molekular-Genetik diese Fragen genauer beantworten wird. Eine Übersicht der vermuteten Genotypen ist in der Tabelle 2 aufgeführt.

4. Methodik

Zu der ersten Verwendung von molekular-genetischen Methoden bei der Wildhege in der Tschechischen Republik ist es bei der Bearbeitung unseres Projektes über weißes Rotwild in dem Wildgehege „Zleby“ gekommen. Das Hauptziel war mit der Hilfe von den sog. Mikrosatelliten-Analysen die einzelnen Stücke zu identifizieren und ihre gegenseitigen verwandtschaftlichen Verhältnisse zu überprüfen.

Die Arbeit bestand aus folgenden Einzelschritten: Entnahme der Blutproben von den einzelnen Individuen und ihre Einlagerung in eine DNA-Datenbank; Anfertigung und Evidenz der Angaben über die einzelnen Stücke des weißen Rotwildes in der Datenbank; Durchführung der molekular-genetischen Analysen; Anfertigung der Identitätskarten für jedes Stück; Berechnung des „Inzucht-Koeffizienten“ bei der untersuchten Wildgruppe. Infolge der gewonnenen Resultate wurden entsprechende Empfehlungen für die weitere Hege des weißen Rotwildes vorgeschlagen.

Ein Mikrosatellit ist eine gewisse Stelle auf der DNA und besteht aus mehrmals nacheinander wiederholten Abschnitten von unterschiedlicher Gesamtlänge. Ein Mikrosatellit wird von zwei Allelen gebildet. Der Nachkomme erbt immer ein Allel von seinem Vater und eines von seiner Mutter. Im Ganzen kommen im Rahmen eines Mikrosatelliten in der Population mehr Allele vor. Bei einem einzelnen Individuum wird aber der gleiche Mikrosatellit aus zwei Allelen gebildet. Die Diversität der Allele im Rahmen der

Population, der Polymorphismus des Mikrosatelliten, ermöglicht uns die einzelnen Individuen zu identifizieren und die verwandtschaftlichen Verhältnisse zu überprüfen. Falls wir eine größere Anzahl von Mikrosatelliten analysieren, ein Mikrosatelliten-Paneel, werden wir in der Population mit einem Wahrscheinlichkeitsmaß von 99,99 % kein gleiches Individuum finden. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich die verwandtschaftliche Kreuzung (Inzucht) zu kontrollieren und seine nachteilige Auswirkung auf die Hege des Wildes einzuschränken.

In einer Tiefgefrierbox (DNA-Datenbank) im Institut für Schutz der Wälder und Jagdwesen der Fakultät für Forst- und Holzwirtschaft der Mendel Universität für Land- und Forstwirtschaft in Brno sind heutzutage 99 Blutproben vom weißen Rotwild aus den Wildgehegen in Zleby, „Kopidlno“ und „Janovice“ platziert.

Vom Wild, welches weiter im Bestand geblieben ist, hat man die Blutproben aus der jugularen Vene, nach seiner Immobilisierung, entnommen. Die Immobilisierung erfolgte mit einem Narkosegeschoss. Zielobjekt war überwiegend der Schulterbereich.

Von dem erlegten Wild sind die Blutproben aus der Halsschlagader entnommen worden. Die Proben wurden zuerst mit einem Antikoagulant gründlich durchgeschüttelt und auf eine Temperatur von 4°C und niedriger gekühlt. Anschließend hat man sie in die DNA-Datenbank im Institut für Schutz der Wälder und Jagdwesen transportiert, wo sie in einer Tiefgefrierbox bei einer Temperatur von -56°C gelagert sind.

Bei der Probeentnahme wurde gleichzeitig eine tierärztlichen Untersuchung des Stückes durchgeführt und eine Evidenzkarte mit visuell erhobenen Angaben erstellt (Geschlecht, Haarfärbung, Iris, Unterlippe, Gesichtsmaske, Hals, Spiegel, Schalen, Gefäßer und Anwesenheit vom Aalstrich).

Die Daten aus diesen Feldkarten sind in die Datenbank des weißen Rotwildes in „Zleby“ eingespeichert worden. Zur Zeit liegen Beschreibungen von 100 Stück Rotwild vor. Davon haben 39 Stück überwiegend weiße, 16 kombinierte, 15 rein weiße, 9 gefleckte und 20 rote Färbung.

Außer diesen Eintragungen aus den „Feldkarten“ beinhaltet die Datei für jedes Stück eine sog. Identifikationskarte. Hier sind die Resul-

tate der molekular-genetischen Analysen der einzelnen Mikrosatelliten, immer zwei Allele für einen Mikrosatelliten, eingetragen.

Da mehrere Mikrosatelliten definiert sind (Mikrosatelliten-Paneel), kann man mit ihrer Hilfe jedes Stück identifizieren und seine Verwandtschaft zu anderen Stücken, welche auch eigene Identitätskarten besitzen, überprüfen.

Eine komplette Karte haben bisher 13 Individuen. Bei weiteren 10 Stücken ist die Karte noch nicht vollständig, da es nicht gelungen ist, alle Allele einiger Mikrosatelliten zu analysieren. Der Grund dafür liegt in einer nicht optimalen Qualität der einzelnen Proben. Bei der Zusammenstellung des Mikrosatelliten-Paneels für das Rotwild hat uns die größten Schwierigkeiten die Isolierung der DNA bereitet.

Die Methodik der Isolation wurde unter anderem in Zusammenarbeit mit dem Kriminaltechnischen Institut der Tschechischen Polizei in Prag gelöst. Zusammen sind wir zu der Ansicht gekommen, dass das Problem im großen Aufwand liegt, qualitativ gute Zellen, welche für die DNA-Gewinnung geeignet sind, in den Blutproben zu finden.

Methodik der molekular-genetischen Analysen

Isolation der DNA – für die Isolation der DNA aus den Blutproben des Rotwildes wurden folgende drei Arbeitsverfahren angewendet:

Arbeitsverfahren 1 – QIAamp® Blood Kit

Arbeitsverfahren 2 – CHEMAGEN für eine manuelle Isolation aus 100 µl Blut

Arbeitsverfahren 3 – JETQUICK

PCR und MS-Analyse auf dem Sequenator

Bedingungen des „Zyklen“

Bezeichnung des Zyklers: GeneAmp PCR System 9700 cyclor

Zyklen: 95°C 10 min; 30 wiederholten Zyklen zu 95°C 30 s, 59°C 90 s, 72°C 90 s; 72°C 60 min; 4°C ∞.

Multiplex PCR Reaktion

Gesamtvolumen der Reaktionsmischung 6,25 µl (5,75 µl Master mix + 0,5 µl DNA/Verdünnung 10× auf 10-100 ng/µl). Master mix - 336 µM dNTP, 1,8 mM MgCl₂, Konzentration von einzelnen Primer 100-600 nM, 0,9U

Taq Gold Polymerase, 1,2 x PCR Puffer a 3 % DMSO. Angewendet wurden folgende Mikrosatelliten (Primer): *BM888*, *OarFCB5*, *RM188*, *RT1*, *RT13*, *T26*, *T156* und *T193*.

Nachfolgend wurde auch erfolgreich der Primer *T501* getestet. In Zukunft wird er in das Mikrosatelliten-Panel eingereiht. Für seine Erweiterung wurde weiter der Locus *CelJP27* vorgeschlagen (Tabelle 3). Die Qualitätskontrolle der isolierten DNA und der, mit den aufgeführten Methoden, hergestellten PCR Produkte wurde durch Elektrophorese in 1xTAE Puffer (40 mM Tris-Acetate; 1 mM EDTA, pH 8, BIO-RAD) erreicht, auf Agar-Gel mit Ethidium Bromid (0,5 µg/ml, BIO-RAD) gefärbt und im UV Licht bei einer Spannung von max. 5 V/cm visualisiert. Die Elektrophoresische Separation ist bei einer elektrischen Spannung von 100-150 V während 30-90 Minuten verlaufen.

Die Menge der aufgetragenen Genom-DNA und PCR-Produkte betrug 5 µl auf 1 % und 4 % Agar-Gel und als Auftragspuffer wurde die 6xLoading Dye Solution (MBI Fermentas) verwendet. Für die Bereitung der Gele wurden das Agar der Firma Serva und zur Größenbestimmung der PCR-Produkte die Gewichtsmarker MBI Fermentas verwendet.

Vorbereitung der Proben für die Fragment-Analyse:

1 µl PCR Produkt + 0,5 µl DNA Marker LIZ500 + 11,5 µl Formamid

Die Denaturierung ist bei 95°C während 5 Minuten verlaufen. Dann wurde die Probe auf Eis gelegt. Die PCR-Fragmente wurden nach der Denaturierung mit Hilfe des ABI 310 Analysators separiert und mit den Computer-Programmen Genescan und Genotyper ausgewertet.

Tabelle 3 Sequenzen der ausgewählten und verwendeten farbig bezeichneten Primer (Mikrosatelliten)

Mikrosatellit Bezeichnung	markierte Primer	Referenzen
	Nichtmarkierte Primer	
<i>BM888</i>	VIC-ACTAGGAGGCCATATAGGAGGC	BISHOP et al. (1994)
	AGCTCAAAACGAGGGACAGGG	
<i>OarFCB5</i>	6FAM-AAGTTAATTTCTGGCTGGAACCCAG	BUCHANAN et al. (1994)
	ACCTGACCCTTACTCTCTTCACTC	
<i>RM188</i>	VIC-GCACTATTGGGCTGGTGATT	BARENDSE et al. (1994)
	GGTTCACAAAGAGCTGGAC	
<i>RT1</i>	VIC-CATATGGCTAACTACCTAGCTTGCC	JONES et al. (2002)
	GAGTCCCAAAGATTTCAGCCCTAC	
<i>RT13</i>	NED-GCCAGTGTTAGGAAAGAAGA	JONES et al. (2002)
	CATCCCAGAACAGGAGTGAG	
<i>T26</i>	6FAM-TGCCATAGTTTTTCCTACCTTC	WILSON et al. (1997)
	GAAGTTCCAATAGACACGCTC	
<i>T156</i>	6FAM-ATGAATACCCAGTCTTGCTG	WILSON et al. (1997)
	TCTTCCTGACCTGTGTCTTG	
<i>T193</i>	NED-CTGCTGTTGTCATCATTACCA	WILSON et al. (1997)
	CAGTCCAAGCCTGCTAAATAA	
<i>T501</i>	PET-CTCCTCATTATTACCCTGTGA	WILSON et al. (1997)
	ACATGCTTTGACCAAGACCC	
<i>CelJP27</i>	PET-GCAAATCAGAAATAGACCCACAGAC	MARSHALL et al. (1998)
	GATCCCCTCCTTGTGCCAC	

Bem.: In der Mikrosatellitenbezeichnung ist die verwendete farbig Markierung des Primer verdeutlicht.

5. Resultate und Diskussion

5.1. Die Variabilität der Mikrosatelliten und weitere Anzeiger für die Auswertung der genetischen Diversität

Für die Bearbeitung der gewonnenen Daten wurde die Software Cervus 2.0 (MARSHALL et al., 1998), PopGen32 und Power Marker V3.25 (LIU, 2006) angewendet.

Die Eintrittsprobe für die Berechnungen wurde aus 13 Individuen (Nr. BJ2, BJ3, BJ11, BJ16, BJ29, BJ32, BJ34, BJ36, BJ52, BJ64, BJ66, BJ68 und BJ75), bei welchen alle Allele auf 8 Loci bestimmt wurden, zusammengesetzt. (Tabelle 4).

Bei der Auswertung der Identifikationskarten (siehe Tabelle 4) stellen wir z.B. bei dem rein weißen Tier Nr. BJ16 das Auftreten von Heterozygoten nur in den Loci *OarFCB5*, *T156* und

T26 fest. Die anderen fünf Loci sind Homozygote. Das dürfte heißen, dass die rein weißen Einzelstücke des Rotwildes eher eine Tendenz zeigen, Homozygoten zu sein.

In dem gegenwärtigen Forschungsstadium kann man aber nicht behaupten, dass der heutige Selektionsdruck auf die zahlenmäßige Erhöhung der weiß gefärbten Individuen, bei gleichzeitiger Erhaltung eines guten Gesundheitszustandes und der Reproduktion, die Ursache der erhöhten Homozygotenanzahl ist.

Die Resultate deuten auf die Gefahr und Probleme möglichen Inbreedings hin. Dies ist durch weitere Tests von weiß gefärbtem Rotwild in „Zleby“, eventuell in anderen Gehegen, nachzuprüfen.

Die Frequenzen der Hauptallele haben sich von 0,39 bis 0,50 bewegt, die Anzahl der Genotypen von 5 (Lokus *T26*) bis 9 (Lokus *BM888*,

Tabelle 4 Identifikationskarte der komplett ausgewerteten Einzelstücke des weißen Rotwildes

Rotwild Nr. (geboren)	Geschlecht	Färbung	<i>Oar FCB5</i>	<i>T 156</i>	<i>T 26</i>	<i>BM 888</i>	<i>RM 188</i>	<i>RT1</i>	<i>RT13</i>	<i>T193</i>
BJ2 (2002)	Hirsch	gefleckt	A/B	A/H	C/C	B/D	B/F	A/B	D/F	C/C
BJ3 (1993)	Hirsch	weiß	A/B	A/H	C/C	A/D	B/E	B/C	D/F	C/C
BJ11 (1987)	Tier	kombiniert	A/D	A/H	B/C	A/B	E/E	C/C	D/D	C/C
BJ16 (1999)	Tier	weiß	A/D	C/G	A/C	C/C	E/E	B/B	B/B	C/C
BJ29 (1998)	Tier	kombiniert	A/C	B/H	A/B	C/C	D/F	A/B	D/D	A/D
BJ32 (1995)	Tier	kombiniert	A/A	F/H	A/C	B/E	C/E	A/C	C/C	A/C
BJ34 (2000)	Hirsch	gefleckt	A/C	F/H	B/C	C/E	C/F	A/A	C/D	A/E
BJ36 (1995)	Tier	gefleckt	A/A	H/H	A/C	C/D	C/C	B/C	D/D	A/C
BJ52 (1997)	Hirsch	überwiegend weiß	A/E	A/H	A/B	C/D	A/C	A/C	B/D	A/F
BJ64 (2005)	Hirsch	rot	A/C	E/F	B/C	C/C	E/F	A/C	D/E	C/E
BJ66 (2004)	Tier	überwiegend weiß	C/D	B/H	B/C	C/C	C/E	A/D	A/E	D/E
BJ68 (1998)	Hirsch	überwiegend weiß	D/D	E/H	A/A	B/C	E/F	A/B	D/D	A/C
BJ75 (2003)	Tier	überwiegend weiß	A/D	C/F	A/C	E/E	C/E	A/A	C/E	A/E

RM188 und *RT13*) und die niedrigste Allelenanzahl lag in Locus *T26* (3 Allele) und die höchste in *T156* (7 Allele) (Tabelle 5).

Zum Vergleich sind in der Tabelle auch Anzahlen von Allelen aus der Studie von PÉREZ-ESPONA (2005) enthalten, welche bei dem frei lebenden schottischen Rotwild ($n = 871$), unter anderem, die gleichen Mikrosatelliten-Loci untersucht hatte.

Die Allelenanzahl beim frei lebenden schottischen Rotwild überragt deutlich, sowohl in einzelnen Loci als auch gesamt, die von uns festgestellten Anzahlen beim weißen Rotwild in Tschechien. Ein gewisser Fehleranteil könnte

durch die niedrige Stückzahl der von uns untersuchten Populationsprobe bedingt sein. Andererseits könnte diese auch durch die langfristige Isolierung der Population beeinflusst sein.

Ein weiterer Anzeiger der genetischen Variation ist der Anteil der Heterozygoten. (Tabelle 6). Je höher dieser Anteil liegt, desto lebensfähiger ist die Population. Sie disponiert mit höherer Anzahl von Allelen und somit mit höherer Variabilität möglicher Genotypen. RELICHOVA (1997) gibt an, das eine zuverlässige Beurteilung dieser Eigenschaft auf dem Studium von mehr als vier Loci basieren muss (Locus ist eine Stelle auf dem Chromosom, wo sich die verlangte In-

Tabelle 5 Frequenz des Hauptallels; Genotypen- und Allelenanzahl in den verfolgten Loci von 13 Stück weißen Rotwild im Vergleich mit der Allelenanzahl aus der PÉREZ-ESPONA-Studie (2005) an der wildlebenden schottischen Rotwildpopulation ($n = 871$).

Lokus	Frequenz des Hauptallels	Genotypen-Anzahl	Allelen-Anzahl	Allelen-Anzahl (Pérez-Espona)
<i>OarFCB5</i>	0,5	7	5	13
<i>T156</i>	0,423077	8	7	20
<i>T26</i>	0,461538	5	3	14
<i>BM888</i>	0,461538	9	5	30
<i>RM188</i>	0,384615	9	6	11
<i>RT1</i>	0,423077	7	4	15
<i>RT13</i>	0,5	9	6	17
<i>T193</i>	0,461538	7	5	17
Durchschnitt	0,451923	7,625	5,125	17,125

Tabelle 6 Genetische Diversität, Anteil der Heterozygoten, polymorpher Informationsinhalt [PIC] und Inbreeding-Koeffizient [f] in den untersuchten Loci von 13 Stück weißen Rotwild

Lokus	Gen. Diversität	Heterozygoten-Anteil	PIC	f
<i>OarFCB5</i>	0,66568	0,769231	0,619844	-0,11628
<i>T156</i>	0,754438	0,923077	0,727404	-0,18519
<i>T26</i>	0,639053	0,769231	0,565947	-0,16505
<i>BM888</i>	0,710059	0,615385	0,673086	0,172414
<i>RM188</i>	0,733728	0,769231	0,691371	-0,0084
<i>RT1</i>	0,674556	0,692308	0,611192	0,013699
<i>RT13</i>	0,692308	0,538462	0,661085	0,259912
<i>T193</i>	0,683432	0,692308	0,634445	0,027027
Durchschnitt	0,694157	0,721154	0,648047	0,00111

formation befindet). Bei dem untersuchten Rotwild von „Zleby“ lag der niedrigste Anteil bei den Loci *RT13* (0,54) und *BM888* (0,62). Der höchste Anteil war beim Locus *T156* (0,92). Der durchschnittliche Anteil betrug 0,72, d.h. der prozentuelle Anteil der Heterozygoten ist 72 %.

Hinsichtlich des hohen Polymorphismus der Mikrosatelliten erscheint dieser Wert als befriedigend. Da uns aber belegbare Angaben über frei lebendes Wild in der Tschechischen Republik fehlen, wissen wir nicht ob er optimal ist oder nicht. Wenn wir diesen Wert mit den Resultaten von PÉREZ-ESPONA (2005) vergleichen, wo die Anzahl der Heterozygoten 75 % ausmachte, zeigt sich die Situation bei der untersuchten Populationsprobe als relativ gut.

Wir dürfen aber nicht vergessen, dass unsere Untersuchungen nur an einem kleinen Anteil der Population gemacht wurden und gegenüber der schottischen frei lebenden Population der Anteil der Heterozygoten immerhin um 3 % tiefer liegt.

Der niedrigste Wert von dem polymorphen Informationsinhalt (PIC) wurde für den Locus *T26* (0,57) und der höchste für den Locus *T156* (0,73) festgestellt. Sein durchschnittlicher Wert beträgt 0,65. Dieser Wert zeigt die die Wahrscheinlichkeit der Auswirkung des mütterlichen oder väterlichen Genes auf den Nachkommen. In der PÉREZ-ESPONA-Studie (2005) ist der durchschnittliche PIC-Wert für diese Loci 0,81. Der von uns festgestellter Wert bei dem weißen Rotwild liegt um 0,16 tiefer.

Aus der Tabelle 6 geht hervor, dass die niedrigste genetische Diversität, welche die Voraussetzung der Prosperität der Population ist, in dem Locus *T26* (0,64) und die höchste in dem Locus *T156* (0,75) war. Dabei der durchschnittlichen Wert im der getesteten Populationsprobe 0,69 ist.

Bei dem untersuchten Wild von „Zleby“ wurde auch die Inzucht (Inbreeding) getestet und zwar mit der Hilfe des zusammengestellten Mikrosatelliten-Paneel. Zu der Berechnung des Inbreeding-Koeffizientes [*f*] wurde der Heterozygoten-Anteil in diesen Multiloci verwendet. Sein durchschnittlicher Wert ist 0,0011. Die höchste Inzucht ist bei den Loci *RT13* (0,26) und *T156* (0,19), was auch dem niedrigsten Heterozygoten-Anteil in diesen Loci entspricht.

Teilweise zeigen sich bei diesem Koeffizienten auch Minus-Werte. Das bedeutet, dass bei der getesteten Probe in dem bestimmten Locus ein höherer Heterozygoten-Anteil vorhanden ist, als bei dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorausgesetzt ist.

FIEDLER et al. (2004) führen auf, dass die Inzucht, besonders durch die Verbindung von unerwünschten Faktoren von rezessiven Charakter, die Hauptursache von wesentlich geringerer Fruchtbarkeit, von einer höheren embryonalen Mortalität und niedrigeren Lebensfähigkeit der Früchte, sein könnte. Sie konstatieren, dass durch den Inbreeding-Prozess die Population ihre Anpassungsfähigkeit verliert und empfindlich auf die Schwankungen von äußeren Umweltbedingungen reagiert. Die einzelnen Individuen sind meistens auch weniger widerstandsfähig und unterliegen leichter verschiedenen Infektionen.

Für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit des Ausschlusses eines Elternteiles würde die Formel für die Berechnung der kombinierten Wahrscheinlichkeit des Ausschlusses des falschen Elternteiles, im Falle der Kenntnis der Genotypen des Nachkommens und beiden Eltern (CEP1); der kombinierten Wahrscheinlichkeit des Ausschlusses des falschen Elternteiles, im Falle der Unkenntnis des Genotyps von einem Elternteil (CEP2) und der kombinierten Wahrscheinlichkeit des Ausschlusses der beiden Eltern, im Falle der Kenntnis der Genotypen des Nachkommens und beider Eltern (CEP3) verwendet.

Bei der getesteten Populationsprobe wurden folgende Werte berechnet: CEP1 = 0,992749; CEP2 = 0,93261489 und CEP3 = 0,99975736. Aus den Resultaten geht hervor, dass bei der Verwendung des von uns zusammengestellten Mikrosatelliten-Paneel mit 8 Markern, man den „falschen Vater“ mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,27 % und 93,26 % ausschließen kann. Dieser Wert könnte teilweise durch die kleine Anzahl der getesteten Stücke beeinflusst sein. Eine weitere Ursache könnte auch die Isolation der Population sein, welche mit der niedrigeren Allelennzahl auf den einzelnen Loci evident ist. Bei frei lebendem Wild liegt die Allelennzahl deutlich höher. (Tabelle 5). Die Resultate weisen vor allem auf die Notwendigkeit hin, das Mikrosatelliten-Paneel um ein bis zwei Loci zu erweitern. Dies würde zu einer Erhöhung der

Genauigkeit der Resultate auf den maximalen Wert von 99,99 % führen. Nach diesem Schritt könnte das Mikrosatelliten-Paneel genauer und zuverlässiger für das Testen von kleinen und isolierten Wildpopulationen genutzt werden.

6. Schlussfolgerungen

Die molekulare Genetik bietet die Möglichkeit der Monitorierung der Genotypen von einzelnen geographisch getrennten Wildpopulationen. Auf dieser Basis könnten auch, für die weitere Wildhege genotypisch geeignete einzelne Stücke zu Gruppen gezielt zusammengestellt werden. Wir können dann die Inbreeding-Risiken, wie körperliche Anomalien, niedrigere Lebensdauer, schwache Konstitution und niedrigere Natalität heruntersetzen. Somit ist es möglich, die genetische Variabilität kontrollieren, beeinflussen und instand halten. So können wir auch positiv die Kondition, Gesundheitszustand und Reproduktion bei gleichzeitiger Beibehaltung von hegerisch bedeutenden und einzigartigen Eigenschaften der einzelnen Wildpopulationen, beeinflussen.

Aus dem Vorgetragenen geht hervor, dass in der Zukunft es möglich wird in die isolierten Populationen gewisse „fehlende“ Genotypen hinzufügen und somit ihre allmähliche Degradation auf dem gegebenen Gebiet zu verhindern.

7. Danksagung

Diese Publikation wurde mit Unterstützung des Forschungsvorhabens des Ministeriums für Schulwesen der Tschechischen Republik, Projekt Nr. 6215648902 und der Grantagentur der Firma „Forste der Tschechischen Republik“, s.p. ausgearbeitet.

8. Zusammenfassung

Die räumliche Isolierung von Wildpopulationen birgt bei zahlenmäßig beschränkten Populationsgrößen eine Gefahr ihrer Degenerierung (sog. Inbreeding-Depressionen, wie körperliche Anomalien, Unterkiefer-Verkürzung, niedrigere Lebensdauer, schwache Konstitution und niedrigere Natalität).

Am Beispiel einer langfristig isolierten Population des weißen Rotwildes (*Cervus elaphus* L.), welche seit dem Ende des 18. Jahrhunderts auf dem Gebiet der Tschechischen Republik gehegt wird, wurde eine Möglichkeit zur Anwendung von molekular-genetischen Methoden zur Diagnostik der Inzucht und ihrer folgenden Verminderung gesucht.

Eine Methodik der DNA-Isolation aus dem Wild entnommenen Blutproben wurde ausgearbeitet und eine Untersuchung der Proben mit der PCR-Methode und der Fragmentation-Analyse durchgeführt. Im Weiteren wurde die genetische Diversität, die Anzahl der Heterozygoten, der polymorphe Informationsinhalt [PIC] und der Inzuchtkoeffizient [f] in den verfolgten Loci bei 13 Stück vom weißen Rotwild beurteilt.

Bei der Projektbearbeitung wurden bei dem weißen Rotwild die Genotypen bei 8 Mikrosatelliten-Frequenzen (*BM888*, *OarFCB5*, *RM188*, *RT1*, *RT13*, *T26*, *T156*, *T193*) bestimmt und die Merkmale der genetischen Variabilität und Diversität berechnet. Die Qualität der Population scheint gut zu sein. Die durchschnittliche Heterozygotenanzahl beträgt 72,12 % und der durchschnittliche Inzucht-Koeffizient der getesteten Gruppe 0,11 %. Unter Berücksichtigung der relativ niedrigen Anzahl der untersuchten Populationsprobe aus dem Wildgehege „Zleby“ kann man vorläufig **nicht** sagen, dass die Population sich in einer Inbreeding-Depression befindet.

Summary

Genetic investigations to the influence of longterm isolation of a population of white red deer (*Cervus elaphus* L.) in the Czech Republic

A territorial isolation is a danger to the game population, causing deterioration called the inbreeding depression. The typical signs are anomalous body proportions, such as short lower jaw, shortened lifetime, weak physique and lower birth rate. This is caused by low number of game in the community.

There has been several researches engaged in possible utilization of molecular and genetic methods for inbreeding diagnosis and its pos-

sible reduction. This has been researched within the white red deer population (*Cervus elaphus* L.), which has been bred in the location of the Czech Republic since the end of the 18th century.

The method of DNA separation has been elaborated through the blood samples and examined by the method PCR and by fragmentation analysis. Furthermore the genetic diversity, heterozygote contribution, polymorphic information content [PIC] and inbreeding factor [f] has been assessed with 13 white red deers.

The idiotypes has been determined for eight microsatellite frequencies (*BM888*, *OarFCB5*, *RM188*, *RT1*, *RT13*, *T26*, *T156*, *T193*) and factors of genetic variability and diversity has been calculated for white red deer population during the project elaboration.

The quality of watched white red deer population in game preserve Žleby seems to be good. The average heterozygote contribution is 72,12 % and the average inbreeding factor amounts 0,11 %. However considering the low amount of examined subjects, we can not be certain, that observed deer population is not in inbreeding depression.

Literatur

- BALIŠ, M. (1980): Jelenia zver. Bratislava.
- BARENDSE, W.; ARMITAGE, D.; KOSSAREK, L.; SHALOM, A.; KIRLPATRICK, B.W.; RYAN, A.M.; CLAYTON, D.; LI, L.; NEIBERG, H.L.; ZHANG, N.; GROSSE, W.M.; WEISS, J.; CREIGHTON, P.; MC CARTHY, F.; RON, M.; TEALE, A.J.; FRIES, R.; MC GRAW, R.A.; NOORE, S.S.; GEORGES, M.; SOLLER, M.; WOMACK, J.E. & HETZEL, D.J.S. (1994): A genetic linkage map of the bovine genome, *Nature genetics*, 1994. 6, 2.
- BARTOŠ, L.; PERNER, V.; PICKOVÁ, I.; ŠILER, R.; FIEDLER, J. (1985): Genetické aspekty chovu bílé jelení zvěře. Dílčí závěrečná zpráva P11-329-453-01, únor 1985. VÚŽV Praha 10 – Uhřetěves.
- BARTOŠ, L.; PERNER, V.; PLACEROVÁ; ŠILER, R. (1989): Faktory ovlivňující populační dynamiku bílé formy jelená evropského v oboře Žehušice. *Folia Venatoria*, 19, 89–99.
- BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; SUNDEN S.L.F.; HAWKING, G.A.; SOLINS TOLDO, S.; FRIES, R.; GROSZ, M.D.; YOO, J. & BEATTIE, C.W. (1994): A genetic linkage map for cattle, *Genetics*, 1994. 136, 619–639.
- BUCHANAN, F.C.; GALOWAY, S.M. & CRAWORD, A.M. (1994): Ovine microsatellites at the *OarFCB5*, *OarFCB19*, *OarFCB20*, *OarFCB48*, *OarFCB129* and *OarFCB226* loci, *Animal Genetics*, 1994. 25, 60.
- FIEDLER, J.; BARTOŠ, L.; PERNER, V. (2004): Příbuzenská plemenitba a stanovení její intenzity u bílé jelení zvěře. *Svět myslivosti*, ročník 5, č. 2/2004, p. 7–9.
- LIU, J. (2006): PowerMarker V3.0. <http://www.power-marker.net>.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.
- JONES, K.C.; LEVINE, K.F. & BANKS, J.D. (2002): Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensis applications in California elk (*Cervus elaphus canadensis*), *Molekular Ecology Notes*, 2002. 2, 425–427.
- NEČAS, J. (1959): Jelení zvěř. SZN Praha, 1959.
- NEVOLE, Z. (1992): Praktická realizace programu genetického vedení zbarvení bílé jelení zvěře v oboře Žleby. Závěrečná zpráva z postgraduálního studia „Myslivost v ČSFR a zahraničí“, VŠZ Brno 1992.
- PÉREZ-ESPONA, S. (2006): An efficient and reliable 21 microsatellite multiplex protocol for high throughput population genetic studies of red deer (*Cervus elaphus*). *Handschrift Røed*, 1998.
- RELICHOVÁ, J. (1997): Genetika populací. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 1997, s. 175.
- VACH, M. (1997): Myslivost. Vydavatelství a nakladatelství SILVESTRI, Uhlířské Janovice 1997, s. 93. ISBN 80-901775-1-4.
- WILSON, G.A.; STROBECK, C.; WU, L. & COFFIN, J. (1997): Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus* and their use other artiodactyls, *Molecular Ecology Notes*, 1997. 6, 697–699.
- YEH, F.C.; BOYDLE, T.; RONGCAI, Y.; YE, Z.; XIYAN, J.M. (1999): POPGENE VERSION 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Quick User Guide, A joint Project Development by Francis C. Yeh and Rong-cai Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research, August 1999.

Anschrift der Verfasser:

Doz. Dipl. Forst.-Ing. JOSEF FEUEREISEL
Ph.D. und Dipl.-Ing. MARTIN ERNST
Ph.D. MENDEL
Universität für Land- und Forstwirtschaft
in Brno
Forst- und Holzwirtschaftliche Fakultät
Institut für Schutz der Wälder und Jagdwesen
Zemědělská 3
613 00 Brno
Tschechische Republik
E-Mail: feuer@mendelu.cz
ernst@email.cz

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 2007

Band/Volume: [32](#)

Autor(en)/Author(s): Feuereisel Josef, Ernst Martin

Artikel/Article: [Genetische Untersuchungen zum Einfluss langzeitiger Isolation einer Population weißer Hirsche \(*Cervus elaphus* L.\) in der Tschechischen Republik 327-337](#)