



Eduard Muráni (Autor)

Anwendung von AFLP zur Detektion von QTL für Schlachtkörperqualität beim Schwein



Arbeiten aus dem
Institut für Tierzuchtwissenschaft
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Eduard Muráni

Anwendung von AFLP zur Detektion von QTL
für Schlachtkörperqualität beim Schwein

Heft: 122

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3047>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung

Die Kenntnis genetischer Ursachen der Variabilität wirtschaftlich interessanter Merkmale stellt eines der Hauptziele der Genomanalyse bei Nutztieren dar. Die Ausprägung der Mehrheit dieser Merkmale ist das Ergebnis der Zusammenwirkung zahlreicher Gene, die als Quantitative Trait Loci (QTL, Geldermann 1975) bezeichnet werden, in Verbindung mit den Einflüssen der Umwelt. Fortschritte in der Molekulargenetik haben die Identifizierung und die Charakterisierung von QTL auf der DNA-Ebene ermöglicht (z.B. Glazier et al. 2002, Korstanje und Paigen 2002). Molekulare Information über QTL in der Form von DNA-Markern ist in der Tierzucht bei der Selektion von Merkmalen mit niedriger Heritabilität (z.B. Krankheitsresistenz), bei Merkmalen die post mortem gemessen werden (z.B. Schlachtkörper- und Fleischqualitätsmerkmale), oder bei Merkmalen die nur bei einem Geschlecht ausgeprägt werden (z.B. Milchleistung) von besonderem Nutzen (Georges 1999).

Die Anzahl von Genen im Genom der Säugetiere wird auf etwa 30000 geschätzt (Venter et al. 2001). Um unter den vielen Genen QTL mit einem deutlichen Effekt auf ein bestimmtes Merkmal aufzufinden, werden verschiedene Ansätze auf den Ebenen der DNA, der RNA und der Proteine integriert (z.B. Liu und Cheng 2002). Am Anfang der Suche nach QTL steht oft ein Genomscan (z.B. Andersson et al. 1994, Hernández-Sánchez et al. 2002), bei welchem die Vererbung von über das gesamte Genom verteilten DNA-Markern in geeigneten Tiergruppen (beim Schwein vorwiegend Kreuzungen divergenter Rassen) verfolgt wird. Signifikante Beziehung zwischen der Vererbung eines Markers bzw. einer Genomregion und der Variation in dem untersuchten Merkmal gibt einen Hinweis darauf, dass diese Region ein oder mehrere QTL umfasst. Gene, welche in dieser Region liegen stellen positionelle Kandidaten für das untersuchte Merkmal dar. Bei Nutztieren sind gegenwärtig Mikrosatelliten die Marker der Wahl für einen Genomscan wegen ihren hohen Informationsgehalt. Mit einem größeren Durchsatz, ohne vorherige Isolierung und Sequenzierung und in wesentlich größerer Anzahl und Dichte lassen sich für einen Genomscan Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Marker nutzen.

AFLP (Vos et al. 1995) ist eine DNA-Fingerabdruck Technik, die auf selektiver PCR-Amplifikation von Restriktionsfragmenten genomischer DNA beruht. Ein typischer AFLP-Fingerabdruck umfasst 50-100 Restriktionsfragmente von welchen etwa 10-20 % polymorphe Marker repräsentieren (z.B. Knorr et al. 1999). Mittels AFLP-Marker werden überwiegend Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) in einer binären Form, d.h. als Anwesenheit / Abwesenheit eines Fragments im Fingerabdruck, dargestellt. Die entsprechend niedrigere Informativität der AFLP-Marker ist zum großen Teil durch ihre hohe Anzahl ausgeglichen (Perez-Enciso und Roussot 2002). Plastow et al. (1998) haben als erste bei Nutztieren einen Genomscan basierend auf der Analyse von phänotypisch extremen Tiere mittels AFLP-Marker zur Detektion von QTL für Magerfleisch Zuwachsrates beim Schwein durchgeführt. Die Genotypisierung von nur phänotypisch extremen Tieren (selektive Genotypisierung) ist ein Ansatz, welcher den Aufwand gegenüber einem Genomscan zur Kopplungsanalyse wesentlich verringert. Die Kombination von AFLP mit selektiver Genotypisierung ist vorteilhaft, da AFLP-Analysen apriori Karten unabhängig sind und selektive Genotypisierung keine Familienstruktur zur Durchführung einer QTL-Analyse erfordert. Sie ist daher auch zur QTL-Detektion in kommerziellen Herden geeignet (Wales et al. 1999a).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von QTL mittels selektiver Genotypisierung von phänotypisch extremen Tiergruppen zweier Populationen, einer Duroc × Berliner Miniaturschwein F₂ Population und einer kommerziellen Herde der Deutschen Landrasse, mit AFLP-Markern. Als Modell-Merkmal wurde wegen der verhältnismäßig hohen Heritabilität und der ökonomischen Bedeutung die Rückenmuskelfläche ausgewählt. Ferner wurde ein QTL, welches in der F₂ Population detektiert wurde, durch eine Intervall-QTL-Kartierung und eine Analyse des Corticotropin Releasing Hormon (CRH) Gens als einen positionellen Kandidaten weiter charakterisiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Molekulargenetische Marker

Die Anwendung von Markern zur Analyse der Variation quantitativer Merkmale wurde das erste Mal von Sax (1923) beschrieben. Er verwendete drei morphologische Marker der Bohnen um die Vererbung der Bohnengröße in einer F₂ Population zu verfolgen. Vor der Einführung molekularer Marker wurden bei den Nutztieren in der QTL-Analyse biochemische und immunogenetische Marker verwendet (z.B. Mitscherlich 1965; Geldermann et al. 1985). Sie ermöglichten aber keine systematische Untersuchung des Genoms aufgrund nur weniger verfügbarer Marker.

Molekulargenetische Marker sind im Vergleich zu biochemischen und immunogenetischen Markern zahlreich vorhanden und in der Regel höher polymorph. Die ersten Schritte in der Entwicklung von molekulargenetischen Markern, die auch als DNA-Marker bezeichnet werden, wurden in den Siebziger Jahren mit der Erfindung von Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Markern gemacht (Soller 1990). Die meisten gegenwärtig angewendeten Marker in der Genomanalyse der Nutztiere basieren jedoch auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR; Saiki et al. 1988), die einen größeren Durchsatz in der Genomanalyse ermöglicht hat.

In Anlehnung an O'Brien (1991) werden als Typ I Loci kodierende Sequenzen, die zwischen unterschiedlichen Spezies konserviert sind, bezeichnet. Als Typ II Loci werden nichtkodierende DNA-Bereiche genannt. Typ II Loci weisen im Vergleich zu Typ I Loci größere Variation in der DNA-Sequenz auf, deshalb sind Typ II Marker häufiger und weisen auch höhere Polymorphie als Typ I Marker auf.

Marker, die es ermöglichen zwischen homozygoten und heterozygoten Individuen zu unterscheiden, werden als kodominant bezeichnet. Als dominant werden dann Marker, die als anwesend / abwesend bewertet werden, genannt, wobei es nicht möglich ist zwischen homozygot und heterozygot anwesend zu unterscheiden.

Anhand der Methode der Identifizierung von DNA-Markern können diese auch in DNA-Fingerabdruck und auf Klonierung / Sequenzierung basierte Marker unterteilt werden (Dodgson et al. 1997).

2.1.1 Auf Klonierung / Sequenzierung basierte Marker

2.1.1.1 Mikrosatelliten

Als Mikrosatelliten werden Tandemwiederholungen von kurzen Sequenzmotiven (mit einer Länge von 1 bis 6 Basenpaaren) genannt (Tautz 1993). Die Anzahl der Wiederholungen kann bis zu 100 zählen und ist sehr variabel. Diese Variabilität wird durch Replikationsschlupf (Levinson und Gutman 1987) oder ungleiches Crossing-over (Krawczak und Schmidtke 1994) erklärt und ist positiv korreliert mit der Anzahl von Motivwiederholungen (Brinkmann et al. 1998).

Mikrosatelliten sind mit großer Häufigkeit über das Genom mehr oder weniger gleichmäßig verstreut (Wintero et al. 1992). Beckmann und Weber (1992) haben die Frequenz der Mikrosatelliten (mit einer Gesamtlänge von mehr als 20 Basenpaaren) beim Mensch auf ein pro 6000 Basenpaare (bp) geschätzt. Beim Schwein stellen die Mikrosatelliten mit Motiven $(A)_n$ und $(CA)_n$ die häufigste Form dar. Die Kopienanzahl beträgt 400000 bei einem durchschnittlichen Abstand von 7000 bp bei den $(A)_n$ Mikrosatelliten und 100000 bei einem geschätzten Abstand von 30000 bp bei den $(CA)_n$ Mikrosatelliten (Wintero et al. 1992, Ellegren 1993).

Die Darstellung der Mikrosatelliten beruht auf PCR-Amplifikation und anschließender Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Variation in den Tandemwiederholungen wird als unterschiedliche Länge der amplifizierten Fragmente sichtbar (Weber und May 1989). Der Durchsatz der Mikrosatellitentypisierung kann durch Anwendung von automatischen DNA / Sequenziergeräten, durch mehrfaches Beladen der Gele und durch Koamplifikation von mehreren Mikrosatellitenloci mit sich nicht überlappenden Fragmentlängen (Multiplex-PCR) erhöht werden (z.B. Yue et al. 1999). Die Mikrosatelliten sind kodominante Marker (Weber und May 1989, Litt und Luty 1989). Ihre Auswertung ist aber durch das Auftreten von Stotterbanden, die überwiegend kürzer sind als das amplifizierte Fragment, erschwert (Walsh et al. 1996). Stotterbanden können vor allem bei heterozygoten Individuen zur falschen Bestimmung vom Genotyp führen.