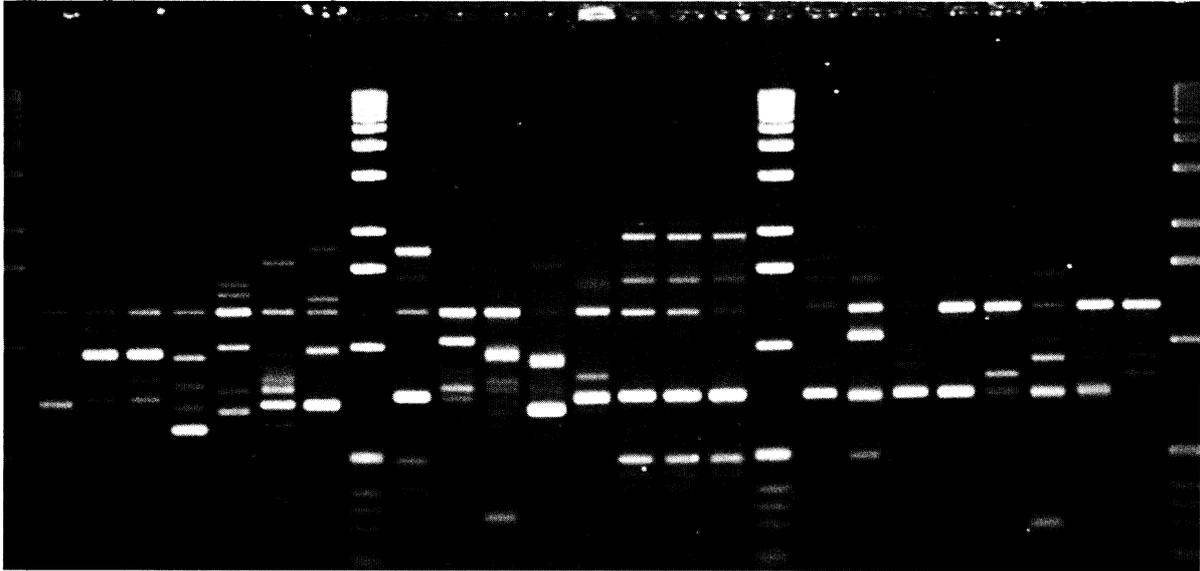


Teil C

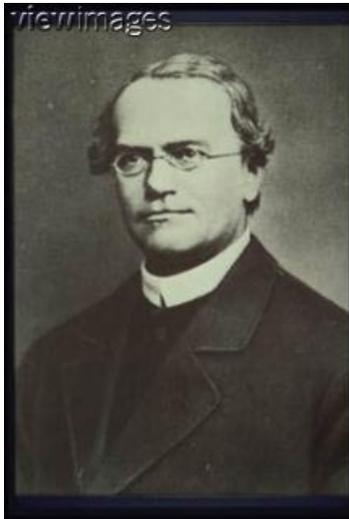
Rhododendron spp. 1 to 12

Samples A B C

Rh. luteum / vaseyi



Mendelgenetik-Genmarker



Meine wichtigsten Ergebnisse:

- 1 Vererbare Merkmale werden durch Gene bestimmt, die auch in Hybriden stabil sind. Gene werden nie miteinander vermischt.

Keine Kompromisse mit den Rezessiven!
- 2 Gene können dominant über andere (Allele) sein. Aber rezessive kommen früher oder spät wieder zum Vorschein!!

Das Geheimnis meiner geschickten Ziegen!
- 3 Jeder erwachsene Organismus hat zwei Kopien eines Gens - eines von jedem Elternteil. Bei ihrer Entstehung erhält jedes Pollenkorn (oder Spermium) und jede Eizelle davon je eine Kopie.
- 4 Verschiedene Allele verteilen sich frei und unabhängig in Spermium und Eizelle. Alle Kombinationen von Allelen sind gleich wahrscheinlich.

AABBCCDDEEFFGGHH
Aa BBCCDDEEFFGGHH
Aa BBCCDDEEFFGGHH
aa BBCCDDEEFFGGHH
AA bBCCDDEEFFGGHH
AA BbCCDDEEFFGGHH
Aa BbCCDDEEFFGGHH
Aa BbCcE ETC!
Aa BbCcE ETC!

Vererbungsanalyse phänotypischer Variation

Seit Jahrhunderten realisierte der Mensch, dass individuelle Eigenschaften (Merkmale) von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben werden. Er nutzte diese Beobachtung schon sehr früh für züchterische Zwecke, indem er jene Individuen auslas und weitervermehrte, die über Eigenschaften verfügten, welche für seine Zwecke besonders nützlich waren. Schon zur Römerzeit existierten bspw. etwa 35 Birnen-(Kultur)-sorten und noch mehr Apfelsorten, die grössere und schmackhaftere Früchte produzierten als sie der ursprüngliche Wildapfel oder die Holzbirne hervorbrachten. Die Mechanismen der Vererbung solcher **phänotypischer Eigenschaften** (Merkmalsausprägungen) waren aber bis in dieses Jahrhundert unbekannt. **Gregor Mendel**, der Vater der Genetik, war der erste, welcher erkannte und mittels Versuchen belegen konnte, dass eine spezielle genetische Einheit (heute als Gen bezeichnet) von Generation zu Generation weitergegeben wird.

GREGOR MENDEL

*Geboren 1822 in Heizendorf, Österreich. Als Mönch und Priester eines Klosters in Brünn (Tschechische Republik) studierte er Physik und Mathematik. Um akkreditierter Lehrer zu werden, wurde er von seinem Orden an die Universität Wien gesandt. Mendel bestand jedoch die Prüfung nicht und kehrte nach Brünn zurück, wo er dennoch als Lehrer tätig war. Mendel war schon sehr früh angetan von der Tierzucht. Weil seine Vorgesetzten ihm jedoch nicht erlaubten, Tiere zu züchten, konzentrierte er sich auf die Züchtung von Gartenerbsen (*Pisum sativum*) und von anderen Pflanzen des Klostersgartens. Mendel gelang es, aufgrund seiner Kreuzungsversuche, die Grundlagen der Vererbung zu erkennen. Die Ergebnisse seiner Arbeit veröffentlichte er 1865 in Brünn und ein Jahr später auch in deutscher Sprache. Obwohl diese Publikationen relativ weite Verbreitung fanden, wurde die Bedeutung seiner Arbeiten von seinen Zeitgenossen nicht erkannt, wohl teilweise deshalb, weil er seine Ergebnisse mit Mathematik bewies. Mendel publizierte später keine weiteren Arbeiten mehr. Er war sich der allgemeinen Gültigkeit seiner 1865 formulierten Vererbungsgesetze später selber nicht mehr sicher, weil er bei der Wiederholung mit einer anderen Pflanzenart völlig andere Ergebnisse erhielt (heute wissen wir, dass er eine Art untersuchte, die apomiktisch d.h. ohne Pollenbeitrag Nachkommen produziert). Er starb 1884, bevor seine Arbeit Anerkennung fand. Erst im Jahre 1900 wurde seine Forschung wiederentdeckt.*

*Der Erfolg Mendels war auf mindestens drei Voraussetzungen gegründet. Zunächst erkannte er, dass er alle Ergebnisse genau dokumentieren musste, um die Gesetzmässigkeiten der Vererbung zu verstehen. Die Fähigkeit zur exakten wissenschaftlichen Arbeit besass er aufgrund seiner mathematischen und physikalischen Studien. Zum zweiten wählte er mit der Gartenerbse eine Art, die für solche Kreuzungsexperimente aus mehreren Gründen sehr geeignet war. Zum einen gab es bereits zu Mendel's Zeiten viele Sorten mit klar differenzierten phänotypischen Merkmalen (bspw. weisse oder rote Blütenfarbe oder runde und gekerbte Samen). Zudem sind die Blüten der Erbse gross, daher einfach zu bestäuben und die Pflanzen produzierten reichlich Nachkommen, die man untersuchen konnte. *Pisum sativum* war auch deshalb als Studienobjekt besonders günstig, weil sie selbstbefruchtend ist und daher zu reinen Linien gezüchtet werden kann (d.h. alle Nachkommen haben die gleichen Merkmale wie die Mutterpflanze). Bevor Mendel mit den Kreuzungsexperimenten begann, kultivierte er seine Sorten für zwei Jahre im Klostersgarten, um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um reine Linien handelte. Mendel begriff schliesslich, dass er die Gesetzmässigkeiten der Vererbung am besten entschlüsseln kann, wenn er sich zunächst nur auf ein Merkmal beschränkte (während seine Zeitgenossen viele Merkmale gleichzeitig studierten und die Gesetzmässigkeiten deshalb nicht erkannten). Die Versuche Mendels werden im Anschluss an den folgenden Abschnitt im Detail wiedergegeben.*

Die Prinzipien der Vererbungsanalyse

Zunächst ist zu untersuchen, ob ein beobachtete Merkmalsvariation überhaupt genetisch kontrolliert ist d.h. ob genetisch unterschiedliche Information an der Variation der Ausprägung eines Merkmals beteiligt ist (Nachweis der **genetischen Kontrolliertheit**). Nicht jede Merkmalsvariation hat genetische Hintergründe, sondern sie kann allein aufgrund der Um-

welt bedingt sein. Für viele phänotypische Merkmale gilt jedoch, dass sie aus einem Zusammenwirken von Genotyp und Umwelt resultieren (**Phänotyp = Genotyp x Umwelt**). Ist eine Merkmalsvariation vorwiegend genetisch bedingt, so stellt sich die Frage nach der **Art der genetischen Kontrolle** d.h. wie lassen sich die unterschiedlichen Ausprägungen eines Merkmals auf die Anwesenheit bestimmter Gene zurückführen bzw. wie lässt sich die Anwesenheit bestimmter Gene am Phänotyp erkennen. Die Mitwirkung von Genen bei der Ausprägung von Merkmalen lässt sich bei ihrer Weitergabe von den Eltern auf die Nachkommen erkennen (mittels Vererbungsanalyse).

Die **Vererbungsanalyse** umfasst zwei Teile:

- Analyse des **Weitergabemodus** des Merkmals d.h. eingeschlechtliche oder zweigeschlechtliche Vererbung, Anzahl Genorte, Lage der Genorte auf dem Chromosom
- Analyse des **Wirkungsmodus** der Gene auf den Phänotyp von Eltern und Nachkommen (Dominanz, partielle Dominanz, Kodominanz, Rezessivität)

Wichtige Begriffe in diesem Zusammenhang

homozygot: Ein diploides Individuum verfügt an einem Genort über zwei gleiche Allele (reinerbig)

heterozygot: Ein diploides Individuum verfügt an einem Genort über zwei verschiedene Allele (mischerbig)

Liegt ein Genort homozygot vor, so ergibt sich nur ein Phänotyp. Wenn wir das Beispiel von Mendels Erbsen wieder aufgreifen, so sind seine „reinen“ Linien, die er für die Kreuzungsversuche verwendet hat, an den Genorten der untersuchten Merkmale (Blütenfarbe, Fruchtform) reinerbig, d.h. homozygot gewesen. Dies liess sich durch wiederholte Selbstbefruchtung und Beobachtung der Nachkommen durch Mendel überprüfen.

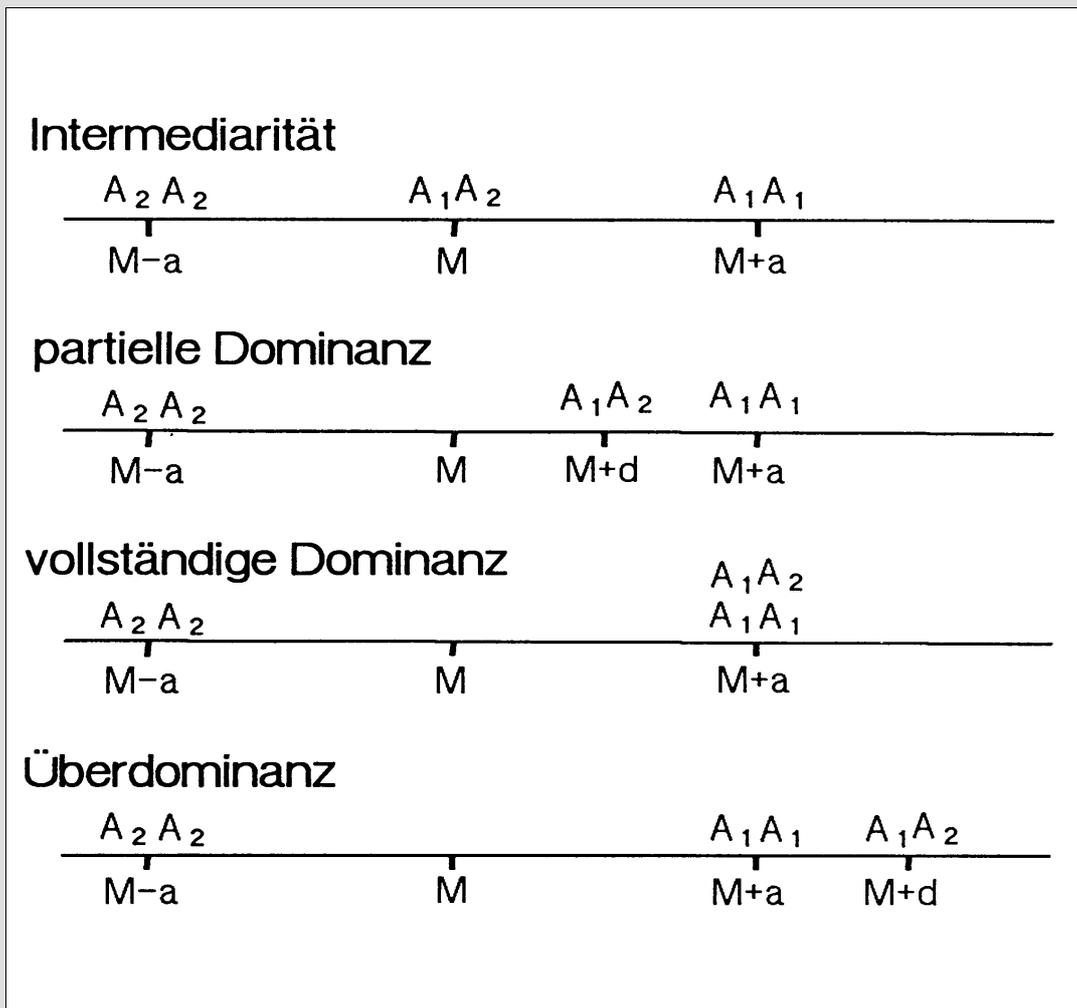
Liegt ein Genort hingegen heterozygot vor, so kann der von diesem Genort kontrollierte Phänotyp die Wirkung der beiden Allele auf verschiedene Weise erkennen lassen, es entstehen also je nach **Wirkungsmodus** unterschiedliche Phänotypen:

- Zeigt der Phänotyp eines heterozygoten Genotyp die Wirkung nur eines Allels, so verhält sich dieses **vollständig dominant** gegenüber dem anderen Allel, welches wir als **rezessiv** bezeichnen

Beispiel Blut-Buche

Die purpurrote Pigmentierung der Blatt- und Blütenorgane ist durch ein dominantes Allel R_2 bedingt. Homozygote Träger R_2R_2 wie auch heterozygote Träger R_1R_2 zeigen beide eine verstärkte Anthozyan-Pigmentierung, weil R_2 über das normale Allel R_1 dominant ist. Lediglich die homozygoten Träger des normalen Allels R_1R_1 bilden normal grüne Blätter aus. R_2 ist also vollständig dominant, während R_1 rezessiv ist

- Liegt die Ausprägung des Merkmals beim heterozygoten Genotyp genau zwischen jenen der beiden Homozygoten, so sprechen wir von **Intermediarität** bzw. von **kodominanter** Vererbung
- Zeigt der Phänotyp des Heterozygoten ungleiche Abstände zu jenen der beiden Homozygoten, ist aber von beiden noch unterscheidbar, so liegt **partielle Dominanz** vor
- Liegt die Ausprägung des Merkmals beim Heterozygoten ausserhalb der beiden Homozygoten, so liegt **Überdominanz** vor

Wirkungsmodi der Gene auf den Phänotyp

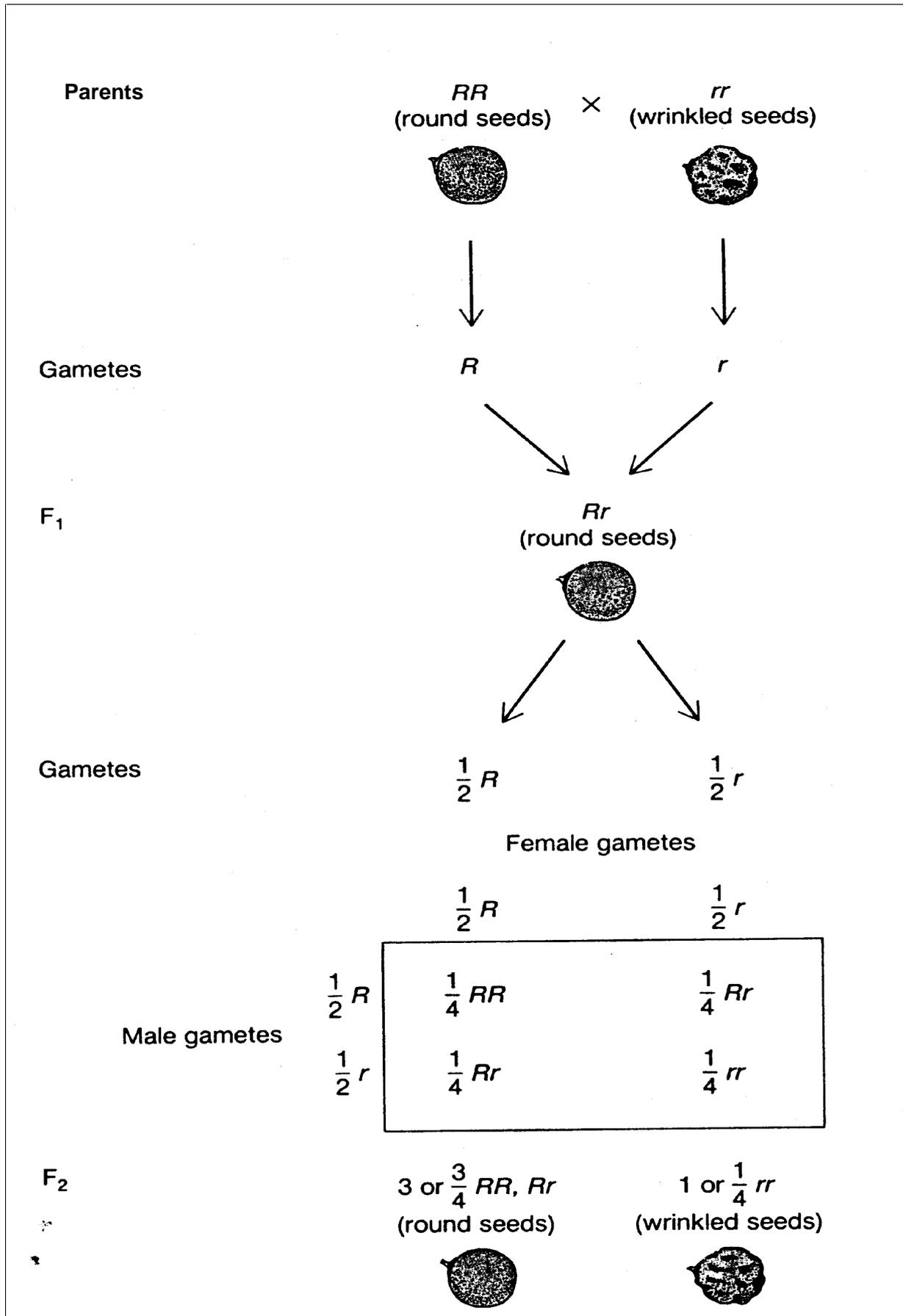
Aus HATTEMER et al. 1993

Die Versuche von Mendel – Mendelsche Vererbungsgesetze

Mendel untersuchte **7 verschiedene Merkmale an der diploiden Erbse** (*Pisum sativum*). Er verwendete reine Linien d.h. Pflanzen, die nach Selbstbestäubung für das zu untersuchende Merkmal nicht mehr aufspalteten d.h. reinerbige Nachkommen produzierten (die Pflanzen waren also homozygot am kontrollierenden Genort). Er führte Kreuzungsexperimente bis zur sechsten Generation durch und verwendete auch reziproke Kreuzungen, um den Weitergabemodus zu studieren. Er erfasste die Nachkommen nach Merkmalsklassen getrennt und analysierte ihr Zahlen-Verhältnis zueinander, um so die Gesetzmässigkeiten der Vererbung zu verstehen.

Das Prinzip der Segregation

Betrachten wir einen der vielen Versuche, die Mendel durchgeführt hat. Er kreuzte beispielsweise Erbsen mit runden Samen mit solchen, die runzelige Samen produzieren. Nennen wir das Gen, welches die Samen-Form bestimmt R ; nehmen wir ferner an, dass es zwei Allele aufweise, einmal das R -Allel für die runde Form und einmal das r -Allel für die runzelige Form. In diesem Fall sind drei Kombinationen von Genotypen möglich, zwei homozygote (RR , rr) und ein heterozygoter Rr -Genotyp. Mendels Kreuzungsexperiment sah folgendermassen aus:



Aus WEAVER und HEDRICK 1991

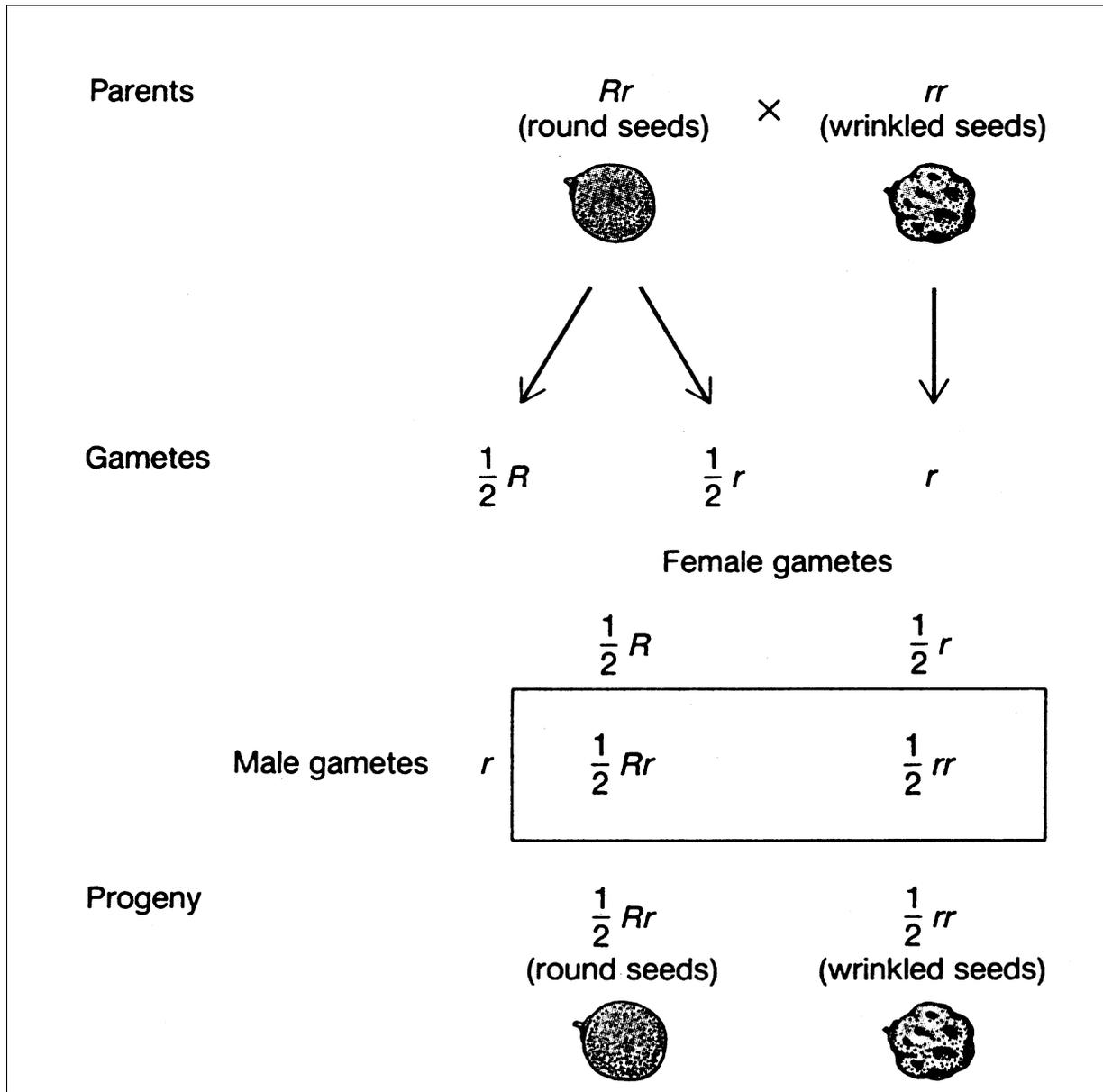
Mendel machte folgende Beobachtungen und zog daraus die folgenden **Schlussfolgerungen**:

- Die Nachkommen in der *F1*-Generation (1. Filialgeneration) brachten alle runde Samen hervor. Da die beiden Eltern unterschiedliche Allele tragen (*R*, *r*) muss die *F1*-Generation heterozygot (*Rr*) sein, weil der *RR*-Genotyp nur Gameten mit dem *R*-Allel, der *rr*-Genotyp nur solche mit dem *r*-Allel produzieren kann. Da die Fruchtform der *F1*-Generation rund und nicht runzelig oder intermediär war, liess sich der Schluss ziehen, dass das *R*-Allel für rund dominant sein muss, das *r*-Allel für runzelig hingegen rezessiv. Diese Hypothese liess sich in der nächsten Generation überprüfen und bestätigen.
- Mendel liess die *F1*-Generation sich selbst bestäuben. Um seine Ergebnisse zu erklären, nahm er an, dass die heterozygoten *F1*-Individuen gleich viele Gameten mit jedem Allel produzieren d.h. dass die Hälfte der Gameten das *R*-Allel, die andere Hälfte das *r*-Allel in sich tragen. Diese Annahme, die durch die Experimente bestätigt werden konnte, ist bekannt als das **Prinzip der Segregation** und wird auch als **1. Mendelsches Gesetz** bezeichnet. Die Segregation der Allele findet sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Gameten statt, so dass die Hälfte der Eizellen eines *Rr*-Heterozygoten das *R*-Allel, die andere Hälfte das *r*-Allel trägt. Das gleiche Verhältnis findet sich auch im Pollen. Die Gameten der *F1*-Generation können bei der Selbstbefruchtung also vier mögliche Kombinationen eingehen (*RR*, *Rr*, *rR*, *rr*), die alle die gleiche Wahrscheinlichkeit und damit Häufigkeit haben (je $\frac{1}{4}$). Die beiden *Rr* und *rR* sind genotypisch identisch, unabhängig davon, welcher Elter welches Allel beigesteuert hat. Trifft die Hypothese zu, dass das *R*-Allel dominant, das *r*-Allel rezessiv ist, so ist in der *F2*-Generation ein Verhältnis von 3 Individuen mit runden auf 1 Individuum mit runzeligen Früchten zu erwarten. Das zu erwartende Verhältnis lässt sich am besten mit einer sogenannten **Punnett-Matrix** (nach dem englischen Genetiker R.C Punnett; siehe Abbildung auf vorhergehender Seite) bestimmen. Mendel fand in den Nachkommen seines Experimentes tatsächlich ein 3 : 1 Verhältnis (genau 5'474 Individuen mit runden und 1'850 Individuen mit runzeligen Früchten d.h. ein Verhältnis von 2.961 : 1), was einerseits das Prinzip der Segregation und andererseits die Dominanz des *R*-Allels bestätigt.

Mendel führte viele weitere Test- und Rückkreuzungen durch, um seine Ergebnisse und Folgerungen zu überprüfen. In einem dieser Versuche liess er bspw. die *F1*-Generation nicht sich selbst bestäuben, sondern er kreuzte sie mit dem rezessiven Elter (dies bezeichnet man als Rückkreuzung; siehe dazu Abbildung auf der nächsten Seite). Dabei verwendete er den rezessiven Elter als männlichen, das *F1*-Individuum als weiblichen Kreuzungspartner.

Die heterozygoten *F1*-Individuen segregieren beide Allele d.h. in der Hälfte der Eizellen findet sich das *R*-Allel, in der anderen Hälfte das *r*-Allel. Eine Segregation zweier verschiedener Allele erfolgt jedoch nur beim weiblichen Kreuzungspartner. Im Pollen des homozygoten *rr*-Elters findet sich immer nur das *r*-Allel, so dass in der *F2*-Generation also lediglich 2 verschiedene Kombinationen möglich sind, nämlich der *Rr*- und der *rr*-Genotyp. In der *F2*-Generation stellt sich deshalb ein 1 : 1 Verhältnis ein d.h. die Hälfte der Individuen zeigt runde, die andere Hälfte runzelige Früchte, weil das rezessive *r*-Allel für runzelige Früchte in der Hälfte der produzierten Nachkommen homozygot vorliegt und deshalb im Phänotyp exprimiert wird. Durch diese Rückkreuzung ist auch der Beweis erbracht, dass die *F1*-Individuen heterozygote *Rr* und nicht etwa homozygote *RR* sind. Gleichzeitig bestätigt das Ergebnis wiederum die Dominanz des *R*-Allels.

Die Rückkreuzung zwischen *F1*-Generation und rezessivem Elter ist auf der nächsten Seite illustriert:



Aus WEAVER und HEDRICK 1991

Mendels Prinzip der Segregation wurde erst 1900 wiederentdeckt und durch Kreuzungsexperimente mit anderen Pflanzen und Tieren bestätigt. Verschiedene Forscher wiederholten Mendels Kreuzung zwischen Erbsen mit grünen und gelben Früchten und bestimmten das Verhältnis der beiden Phänotypen in der F₂-Generation. Wie bei Mendels Versuchen war das Verhältnis zwischen dominant und rezessiv nahe bei 3 : 1 wie folgende Tabelle zeigt:

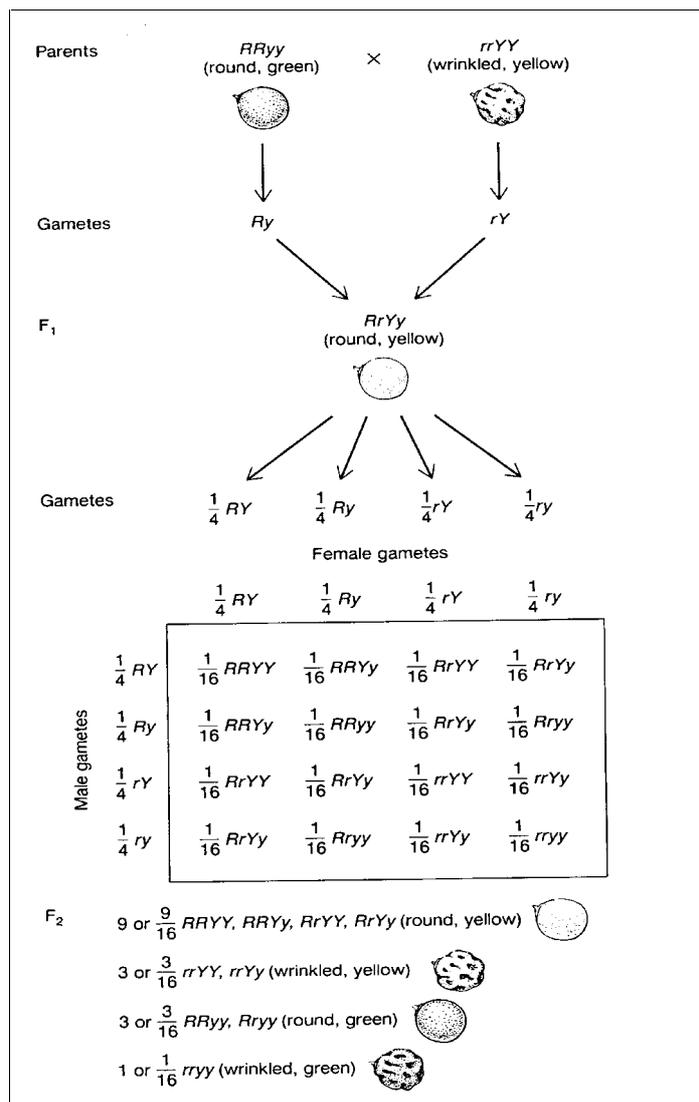
Forscher	Gelbe Früchte	Grüne Früchte	F ₂ -Verhältnis dominant/rezessiv
Mendel (1866)	6'022	2'001	3.01 : 1
Corens (1900)	1'394	453	3.08 : 1
Tschermak (1900)	3'580	1'190	3.01 : 1
Bateson (1905)	11'902	3'903	3.05 : 1
Darbishire (1909)	109'060	36'186	3.01 : 1
Total	131'958	43'733	3.02 : 1

Weil Selbstbefruchtung bei Tieren nicht möglich ist, müssen bei Tieren zwei verschiedene F_1 -Individuen gekreuzt werden. Dazu verwendete man Voll-Geschwister (Bruder und Schwester), um die Segregation in der F_2 -Generation zu beobachten. Mendels Prinzip der Segregation wurde auch bei Tieren bestätigt. Als erstes gelang dies CASTLE und CUÉNOT, welche den Nachweis der Segregation an einem Albino-Gen der Maus (weisse Farbe) erbrachten.

Das Prinzip der unabhängigen Rekombination (Unabhängigkeitsregel)

Die bisher betrachteten Versuche von Mendel bezogen sich auf Kreuzungen zwischen Eltern, die sich nur in Bezug auf ein Merkmal unterscheiden. Was geschieht nun aber, wenn die Eltern sich in zwei Merkmalen unterscheiden?

Nachdem Mendel die Gesetze der Vererbung (Segregation) für ein Merkmal erkannt hatte, führte er auch Kreuzungsexperimente mit Eltern durch, die sich an zwei Merkmalen unterschieden. In einem dieser Versuche kreuzte er Erbsen mit zwei verschiedenen Frucht-Merkmalen. Ein Kreuzungspartner hatte runde (RR), grüne (yy) Samen, während der andere runzelige (rr), gelbe (YY) Samen produzierte. Das Kreuzungsexperiment sah folgendermassen aus:



Alle Individuen der F_1 -Generation zeigen den doppelt dominanten Phänotyp mit runden, gelben Früchten. Die Merkmale rund (R) und gelb (Y) müssen also dominant sein, weil im doppelt heterozygoten Genotyp der F_1 -generation ($RrYy$) keine intermediären Formen beobachtet werden können. Lässt man diese F_1 -Generation sich selbst bestäuben, wie Mendel es tat, so treten in der F_2 -Generation vier verschiedene Merkmalsklassen auf. Mendel ging von der Hypothese aus, dass jeder der beiden Eltern je vier verschiedene Typen von Gameten produzieren kann, so dass 16 verschiedene Kombinationen möglich sind (Punnett-Matrix). Weil Dominanz vorliegt, erscheinen im Phänotyp allerdings nur vier verschiedene Merkmalsklassen. Die häufigste Kombination in der F_2 -Generation in Mendels Versuch war die dominante Form für beide Merkmale d.h. die Nachkommen mit runden, gelben Früchten. Die beiden Kombinationen mit jeweils einer dominanten Form (runzelige, gelbe Früchte bzw. runde, grüne Früchte) waren deutlich weniger häufig, ihre Anzahl war aber in etwa gleich gross. Die doppelt rezessive Form (runzelige, grüne Früchte) war am wenigsten häufig.

Mendel wiederholte diese Versuche mit anderen Merkmals-Kombinationen und fand, dass die vier Merkmalsklassen immer etwa im Verhältnis von 9 : 3 : 3 : 1 auftraten.

Aus WEAVER und HEDRICK 1991

Mendel beobachtete folgende Verhältnisse in der F_2 -Generation:

Phänotyp	Anzahl	Verhältnis
Runde, gelbe Früchte	315	9.84
Runzelige, gelbe Früchte	101	3.16
Runde, grüne Früchte	108	3.38
Runzelige, grüne Früchte	32	1.0

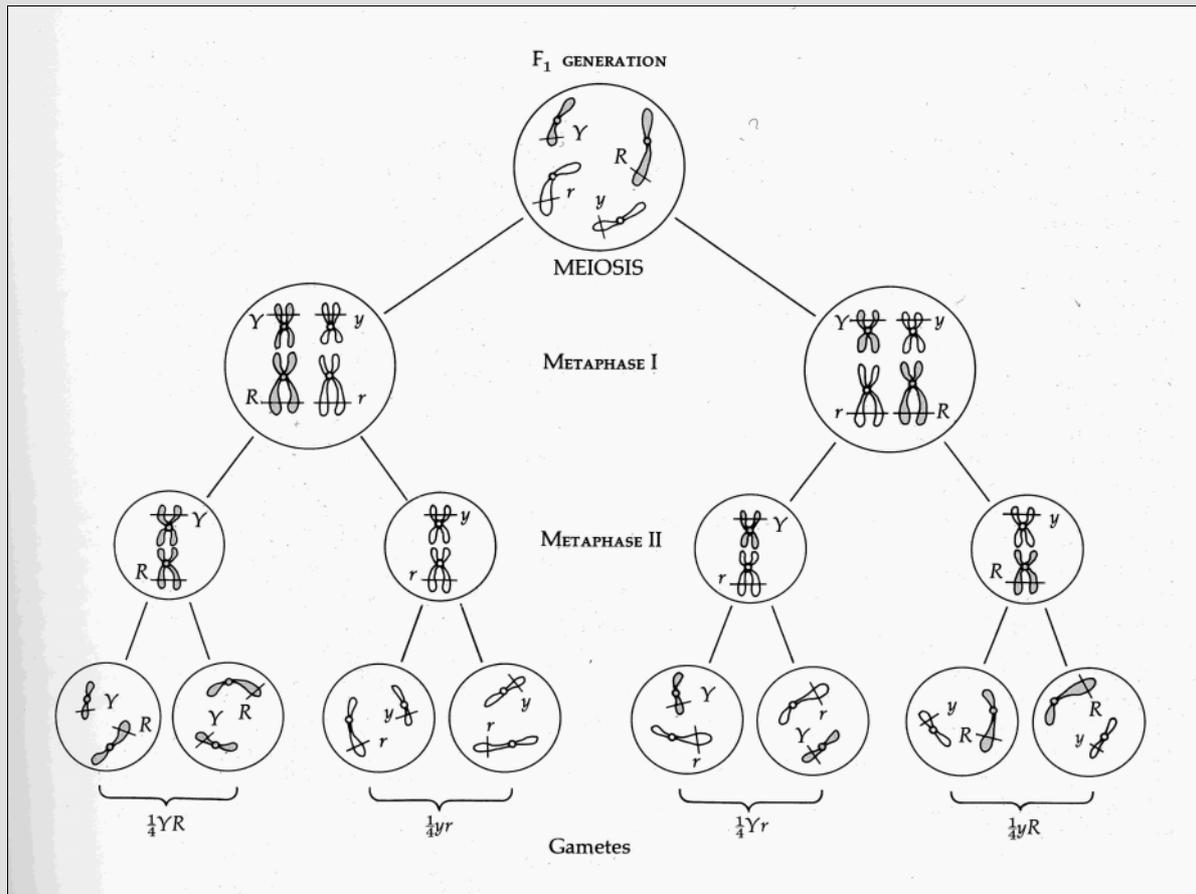
Bevor wir dieses Ergebnis genauer analysieren, wollen wir zunächst überprüfen, ob das Gesetz der Segregation (1. Mendelsches Gesetz) erfüllt ist. Wenn wir die Anzahl der in der F_2 -Generation beobachteten Samen-Phänotypen vergleichen, so finden wir 423 (315 + 108) Nachkommen, die runde Früchte und 133 (101 + 32) Nachkommen, die runzelige Früchte hervorbrachten. Das Verhältnis beträgt demnach 2.96 : 1 und entspricht ganz der Erwartung aufgrund des Prinzips der Segregation. Auch das Verhältnis zwischen gelben (315 + 101 = 416) und grünen Früchten (108 + 32 = 140) entspricht mit 2.97 : 1 den Erwartungen der Segregation. Das 1. Mendelsche Gesetz ist also bestätigt, doch damit noch nicht genug. Aufgrund dieser Beobachtung schloss Mendel nämlich auch, dass die beiden „genetischen Systeme“ (Gene) unabhängig voneinander sein müssen bzw. dass die Allele an den beiden Genorten unabhängig voneinander kombiniert werden können. **Das Prinzip der unabhängigen Rekombination von Genen wird daher manchmal auch als das 2. Mendelsche Gesetz bezeichnet.**

Betrachten wir nun das Kreuzungsexperiment im Detail. Wie konnte Mendel voraussagen, dass ein 9 : 3 : 3 : 1 Verhältnis in der F_2 -Generation entstehen würde? Zunächst ist zu beachten, dass alle Individuen in der F_1 -Generation heterozygot für beide Gene sind ($RrYy$), weil sie je ein dominantes Allel von einem Elter und ein rezessives vom andern Elter erhalten haben. Gemäss dem Prinzip der Segregation ist die Häufigkeit beider R und r Allele in den F_2 -Gameten $\frac{1}{2}$; ebenso verhält es sich mit den beiden Y und y Allelen. Die Häufigkeit der Gameten, die beide dominanten Allele (R und Y) gleichzeitig erhalten ist hingegen $\frac{1}{4}$. Dies ergibt sich aufgrund der Wahrscheinlichkeit. Die Wahrscheinlichkeit, ein R -Allel zu erhalten beträgt $\frac{1}{2}$, jene ein Y -Allel zu erhalten $\frac{1}{2}$, so dass die Wahrscheinlichkeit, beide R und Y Allele zu bekommen $(\frac{1}{2}) \times (\frac{1}{2}) = \frac{1}{4}$ beträgt. Wenn wir annehmen, dass der gleiche Prozess für alle vier Gameten (RY , Ry , rY , ry) zutrifft und zwar gleichermassen beim männlichen wie beim weiblichen Kreuzungspartner, so ergibt sich eine 4 x 4 Punnett Matrix für die möglichen Kombinationen (wie in der vorhergehenden Abbildung dargestellt). Alle Zellen dieser Matrix haben die gleiche Wahrscheinlichkeit und deshalb die gleiche Entstehungs-Häufigkeit von $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{16}$. In sechs Fällen ergeben zwei verschiedene Kombinationen von Gameten den selben Genotyp. Beispielsweise der $RRYy$ Genotyp kann durch Verschmelzung einer Ry -Eizelle mit einem RY -Pollen oder durch die Verschmelzung einer RY -Eizelle mit einem Ry -Pollen zustande kommen. Das 9 : 3 : 3 : 1 Verhältnis ist daher aufgrund dieser Kombinationsmöglichkeiten und der Dominanzverhältnisse offensichtlich: Der doppelt rezessive Genotyp $rryy$ (runzelig, grüner Phänotyp) kommt nur einmal vor (unten rechts). Die beiden Kombinationen, wo nur an einem Genort Dominanz vorliegt ($RRyy$ und $Rryy$ d.h. rund und grün) bzw. $rrYY$ und $rrYy$ (runzelig und gelb) kommen je in 3 Zellen vor. Die verbleibenden Zellen sind alle Genotypen mit zwei dominanten Allelen an beiden Genorten (phänotypisch daher alle rund und gelb), so dass wie das Verhältnis von 9 : 3 : 3 : 1 erhalten.

Mendel wusste damals noch nicht, weshalb die Gene gleichmässig segregieren und unabhängig rekombiniert werden. Heute wissen wir natürlich, dass dies während der Meiose durch zufällige Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene (resp. durch crossing-over bei Genen auf demselben Chromosom) geschieht. Ein Beispiel für zwei Genorte, die auf verschiedenen Chromosomen liegen, ist in der folgenden Darstellung gezeigt:

Beispiel: Kreuzung von Erbsen verschiedenen Fruchtformen und Farben

Die Kreuzung zwischen einer Erbse mit runden, gelben Früchten ($RRyy$) und einer Erbse mit eingeschrumpften, grünen Früchten ($rrYY$) ergab bei Mendels Versuchen (wie im vorangegangenen Beispiel gezeigt) in der F_1 Generation Erbsen mit runden, gelben Früchten ($RrYy$). In der Metaphase I der Meiose können sich die Chromosomen, die vom selben Elter der F_1 Generation stammen, mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf der selben Seite der Äquatorialebene (wie in der linken Hälfte der Darstellung gezeigt) oder aber auf verschiedenen Seiten (wie rechts in der Darstellung gezeigt) anordnen. Es entstehen so also vier verschiedene Gameten mit je einer Häufigkeit von $\frac{1}{4}$, die durch Kombination der weiblichen und männlichen Gameten zu den genotypischen Proportionen von 9:3:3:1 in der F_2 führen



Aus AYALA and KIGER (1984)

Abweichungen vom Prinzip der unabhängigen Rekombination

Die Unabhängigkeitsregel gilt für Gene, die auf verschiedenen Chromosomen liegen. Liegen die Gene auf demselben Chromosom, so ist eine unabhängige Rekombination durch crossing-over ebenfalls möglich, sofern der Abstand zwischen den Genen auf dem Chromosom genügend groß ist. In diesem Fall erreichen die Rekombinationsraten ebenfalls 50 % d.h. die Gene verhalten sich so, als ob sie auf verschiedenen Chromosomen liegen würden. Je näher zusammen die Gene nun liegen, umso unwahrscheinlicher wird nun aber eine freie Rekombination, weil die Wahrscheinlichkeit eines crossing-over von der Distanz zwischen den Genen abhängt. Je nach Distanz zwischen den Genen auf dem Chromosom gibt es teilweise oder ganze **Genkoppelungen**. Bei teilweiser Genkoppelung stellt man eine gewisse Abweichung vom 50 : 50 Verhältnis der Segregation fest; sind Gene teilweise gekoppelt, so findet man in mehr als 50 % der Gameten die ursprüngliche Kombination der Allele des Elternsatzes, während weniger als 50 % der Gameten nicht elterliche (d.h. neue, rekomb-

binierete) Kombinationen aufweisen. Bei totaler Koppelung finden sich immer die elterlichen Kombination in den Gameten, es findet also keine neue Kombination der Allele an den betreffenden Genorten statt. STURTEVANT (1913) war der erste, der erkannte, dass man aufgrund von gefundenen Rekombinationsraten zwischen Genen die Lage dieser Gene zueinander auf dem Chromosom kartieren resp. so eine genetische Karte anfertigen kann. Er bewies auch, dass die Anordnung der Gene auf dem Chromosom linear bzw. eindimensional ist, wie es die Form der Chromosomen ja auch erwarten lässt.

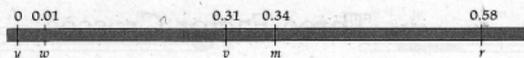
Beispiel: Rekombinationshäufigkeiten einiger Mutationen (Allele) auf dem X Chromosom von *Drosophila melanogaster* nach STURTEVANT (1913):

Table 5.1
Recombination frequencies for some sex-linked mutations in *Drosophila melanogaster*

Genes	Recombination Frequency
yellow (y) & white (w)	0.010
yellow (y) & vermilion (v)	0.322
yellow (y) & miniature (m)	0.355
vermilion (v) & miniature (m)	0.030
white (w) & vermilion (v)	0.300
white (w) & miniature (m)	0.327
white (w) & rudimentary (r)	0.450
vermilion (v) & rudimentary (r)	0.269

From A. H. Sturtevant, *J. Exp. Zool.* 14:43 (1913).

Yellow und white haben eine Rekombinationsfrequenz von 0.01 (1%) d.h. sie müssen sehr nahe beisammen liegen, deutlich näher etwa als yellow und vermilion mit einer Frequenz von 0.332. White und vermilion haben eine Frequenz von 0.300, was bedeutet, dass white näher bei vermilion liegen muss als yellow und dass white zwischen yellow und vermilion liegt. Auf dieselbe Weise lassen sich auch die anderen Gene relativ zueinander auf der Karte positionieren, was die nachfolgend gezeigte Genkarte des X Chromosoms ergibt:

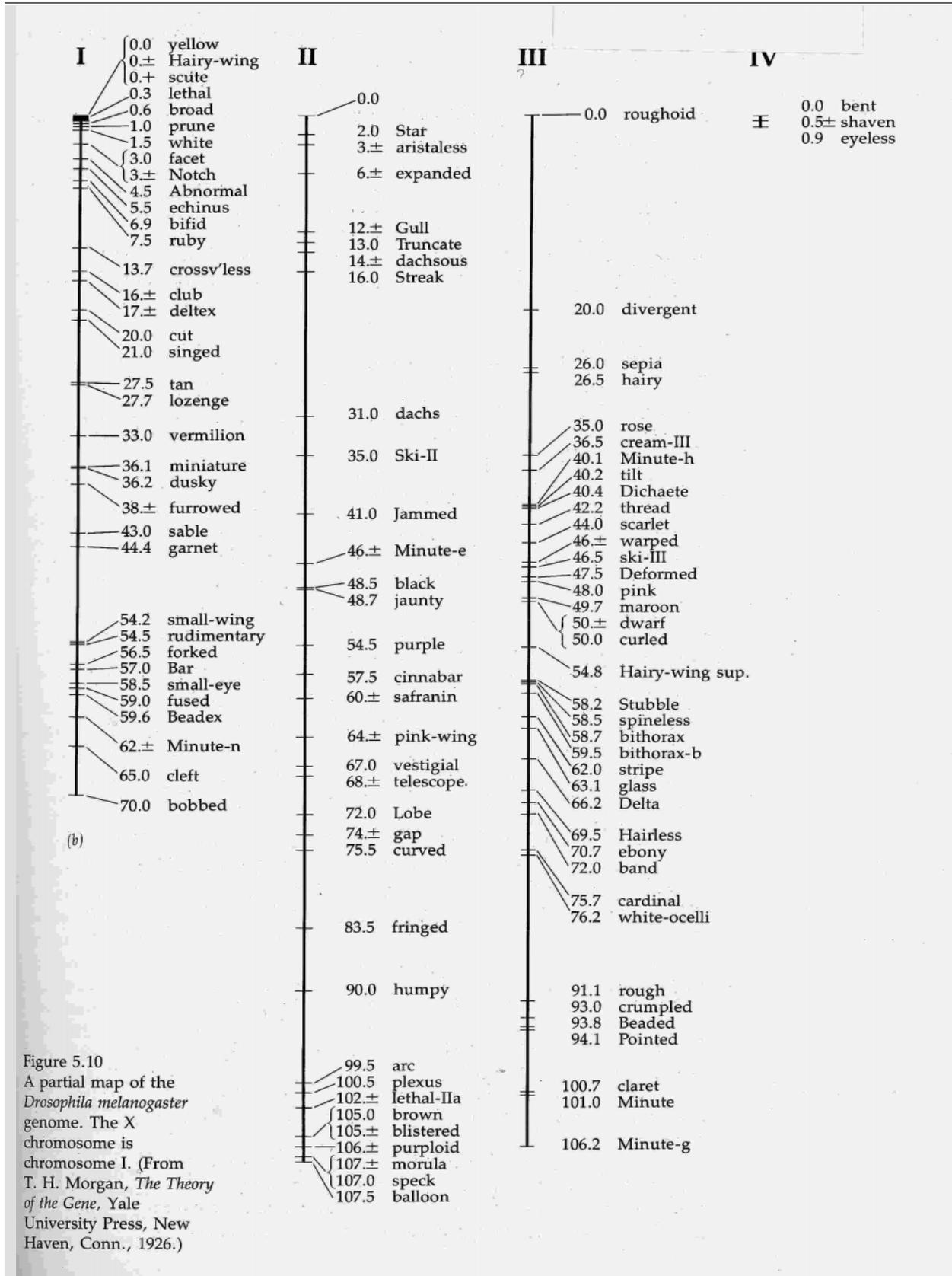


Zu beachten ist: yellow wurde gutachtlich als Nullpunkt angenommen.

Eine Rekombinations-Häufigkeit von 1 % wird als eine Karteneinheit (1 Centimorgan) definiert. Die Lokalisierung jedes Gens ist angegeben als Abstand in Centimorgan vom Ende des letzten Gens. Bsp: yellow und white 0.01, white und vermilion 0.31 (yellow-vermilion 0.32)

Aus AYALA und KIGER (1984)

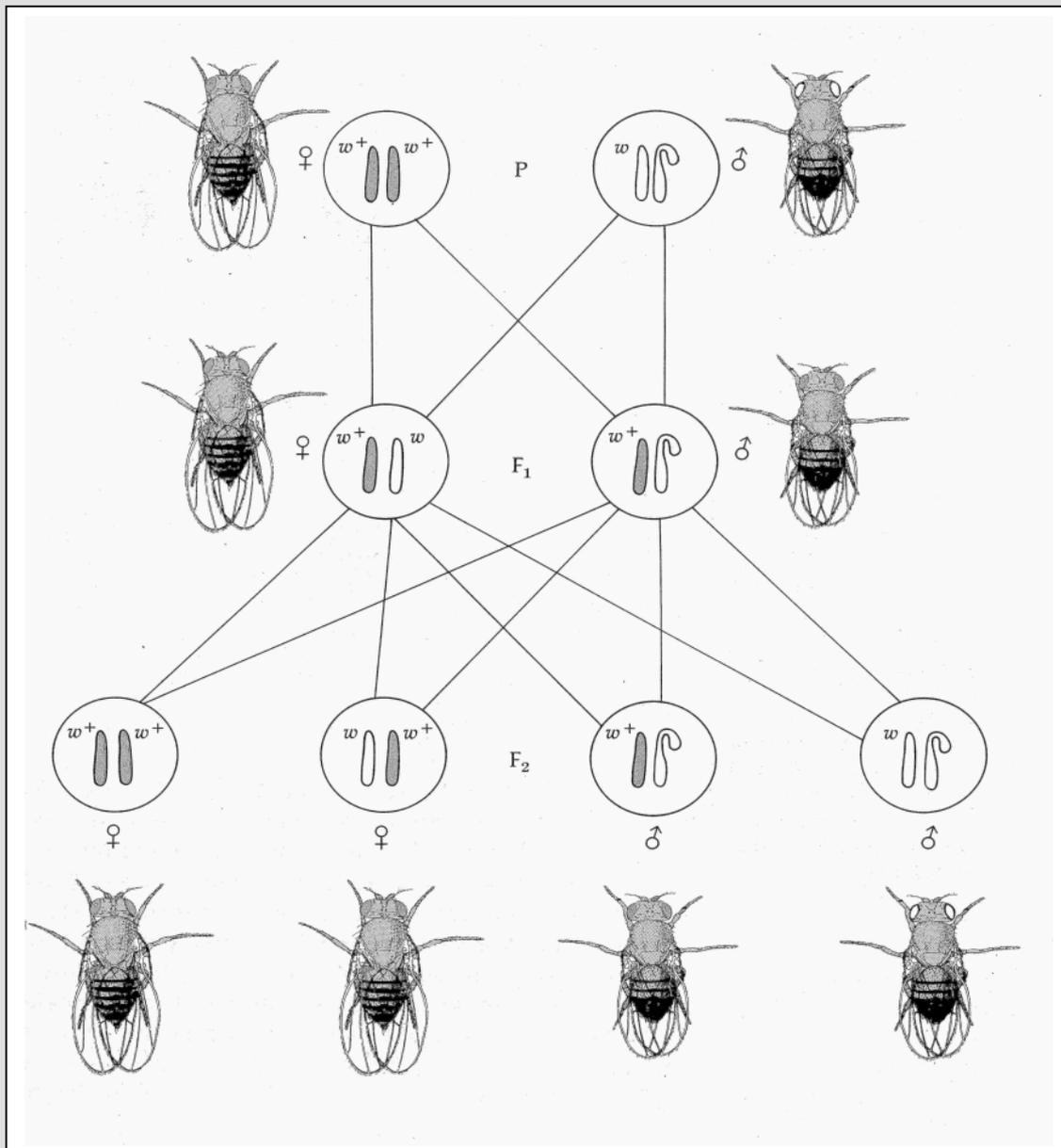
Auf diese Weise lassen sich ganze Genkarten herstellen, wie das folgende Beispiel von *Drosophila melanogaster* zeigt. Dargestellt sind 4 Chromosomen, wobei die Nummer 1 das X-Chromosom ist mit der Lage der bereits erwähnten Gene. Beachte: Es gibt vollständig gekoppelte Gene (yellow, hairy-wing, scute)



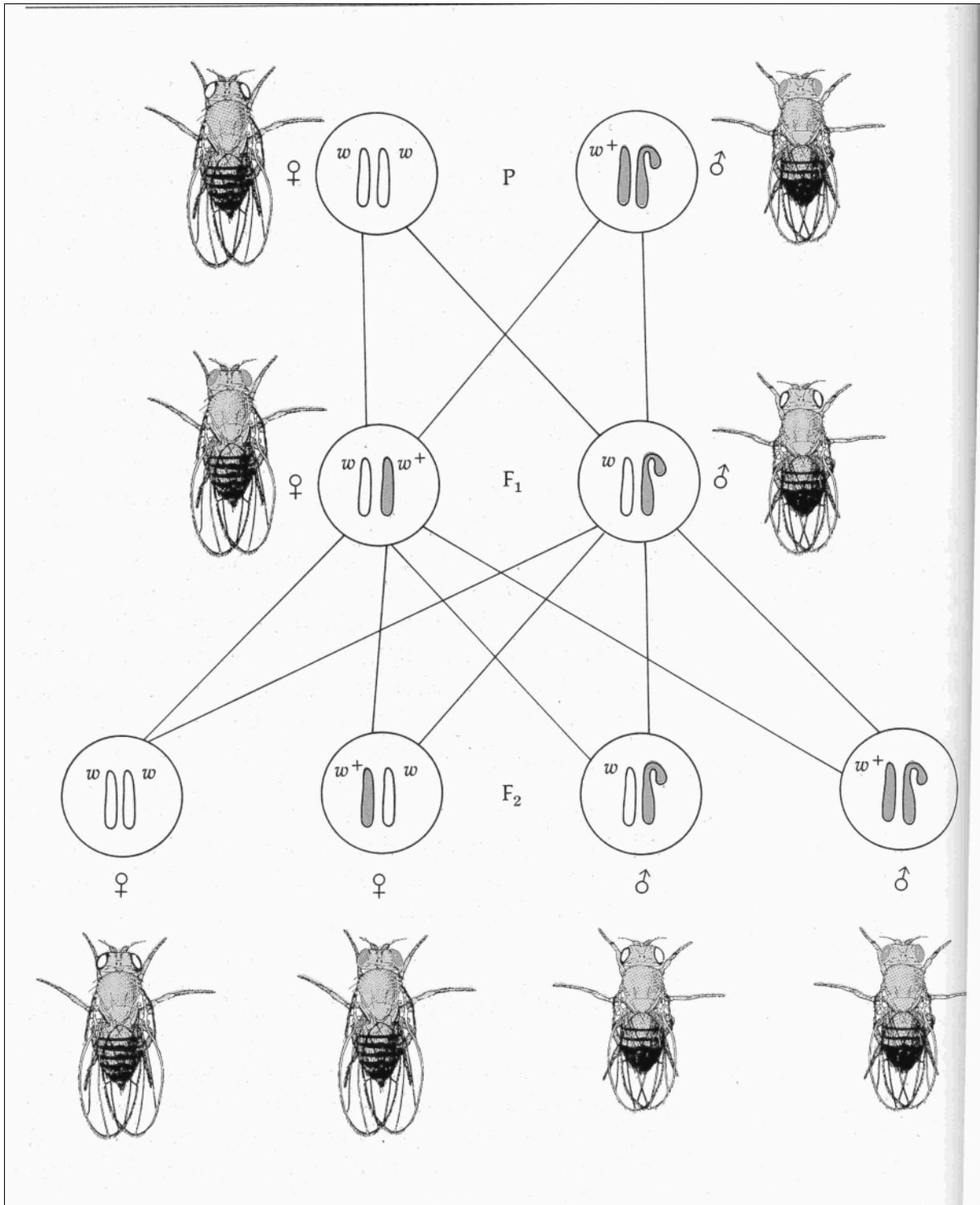
Eine weitere Abweichung von den Mendelschen Regeln ergibt sich auch für Gene, die auf den Geschlechts-Chromosomen liegen, wie folgendes Beispiel zeigt:

Beispiel: Geschlechtsgekoppelte Vererbung bei *Drosophila melanogaster*

T.H. MORGAN kreuzte eine Linie von *Drosophila* mit weissen Augen mit einer Linie mit roten Augen. Die weisse Linie war reinerbig (homozygot) d.h. die Nachkommen von weissen Fliegen hatten alle weisse Augen. Die Nachkommen der Kreuzung weiss mal rot hingegen zeigten Abweichungen von den Erwartungen nach den Mendelschen Regeln. Bei der Kreuzung eines roten Weibchens mit einem weissen Männchen zeigten alle Nachkommen rote Augen, wie erwartet, wenn rot über weiss dominant ist. Bei den Nachkommen der F₂ Generation waren $\frac{3}{4}$ rotäugig und $\frac{1}{4}$ weissäugig, ebenfalls wie erwartet bei Dominanz von rot. Hingegen zeigten alle Weibchen der F₂ rote Augen während die Männchen je zur Hälfte weisse und rote Augen hatten, was nach Mendel nicht zu erwarten war. Unerwartet war auch, dass die rotäugigen F₂ Männchen alle rotäugige Nachkommen, die weissäugigen F₂ Männchen alle weissäugige Nachkommen hatten. Die F₂ Weibchen produzierten zur Hälfte ausschliesslich rotäugige Nachkommen, während die andere Hälfte wiederum zur Hälfte weissäugige oder rotäugige Männchen hervorbrachte. Reziproke Kreuzungen ergaben zudem verschiedene Ergebnisse wie nachstehend ersichtlich wird (nächste Seite). Aus den Darstellungen wird klar, weshalb reziproke Kreuzungen verschiedenen Ergebnisse produzieren und weshalb der Erbgang von den Mendelschen Regeln abweicht. (Beachte: das dominante w^+ Allel bewirkt rote, das rezessive w Allel weisse Augen).



Aus AYALA and KIGER (1984)



Aus AYALA and KIGER (1984)

Vererbungs-Analyse

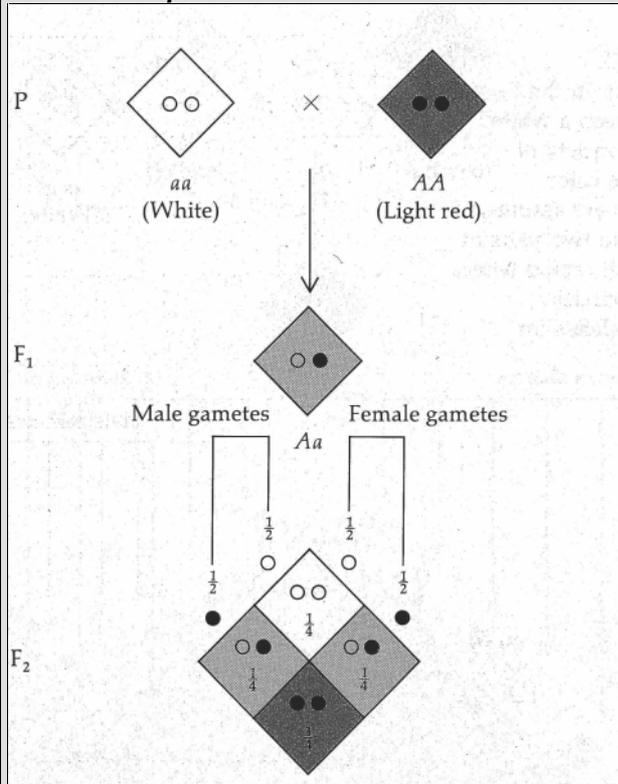
Der Schluss von der phänotypischen Ausprägung eines Merkmals auf die kontrollierenden Gene ist nicht immer so einfach wie für die von Mendel verwendeten Merkmale. Dies hat mehrere Gründe. Zum einen handelt es sich nicht immer um qualitative Merkmale, die in einfache Merkmalsklassen (wie runde oder runzelige Früchte) zerfallen und von einem Gen kontrolliert werden. Zum anderen spielt für die Ausprägung des Phänotyp nicht nur der Genotyp, sondern auch die Umwelt eine wesentliche Rolle. Bei der genetischen Analyse muss daher zunächst:

Die Frage nach der **genetischen Kontrolliertheit von Merkmalsausprägungen** beantwortet werden. Es gibt kaum Merkmale, bei denen die Variation in der Ausprägung nicht von der genetischen Information mitbestimmt ist, andererseits gibt es nur wenige Merkmale, deren Ausprägung nicht von der Umwelt mitbestimmt wird. Wesentlich ist nicht, dass ein Merkmal völlig unabhängig von der Umwelt ausgeprägt ist, sondern es genügt bereits, dass die Wertebereiche der von verschiedenen Genotypen ausgeprägten Phänotypen nicht überlappen; bereits in diesem Fall ist ein Merkmal überwiegend genetisch kontrolliert und jedem Genotypen lässt sich ein Phänotyp zuordnen. **Viele quantitative Merkmale** (d.h. mit kontinuierlich variierender Merkmalsausprägung) **hingegen erfüllen dieses Kriterium nicht und die Herstellung einer Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp ist daher nicht möglich.** Die meisten für Bäume interessierenden Merkmale wie Wuchskraft, Form, Qualität etc. gehören zu den Letzteren.

Die Analyse der Verteilung der beobachteten Merkmalsausprägungen erlaubt es, die Erfolgsaussichten einer genetischen Analyse zu beurteilen. Aufgrund des Kreuzungsversuchs von Mendel mit zwei Merkmalen, den wir betrachtet haben, wird deutlich, dass die möglichen Ausprägungen eines Merkmals (die Anzahl Merkmalsklassen) um so zahlreicher werden, je mehr Genorte das Merkmal kontrollieren. Das bedeutet, **dass sich mit zunehmender Anzahl Genorte die Chance vermindert, die genetische Kontrolle aufzuklären**, weil eine diskrete Verteilung einer grosse Anzahl an Merkmalsklassen, die zusätzlich durch die Umwelt modifiziert werden, zunehmend in eine kontinuierliche Verteilung übergeht.

Beispiel: 1, 2 oder 3 Paar Gene kontrollieren ein Merkmal:

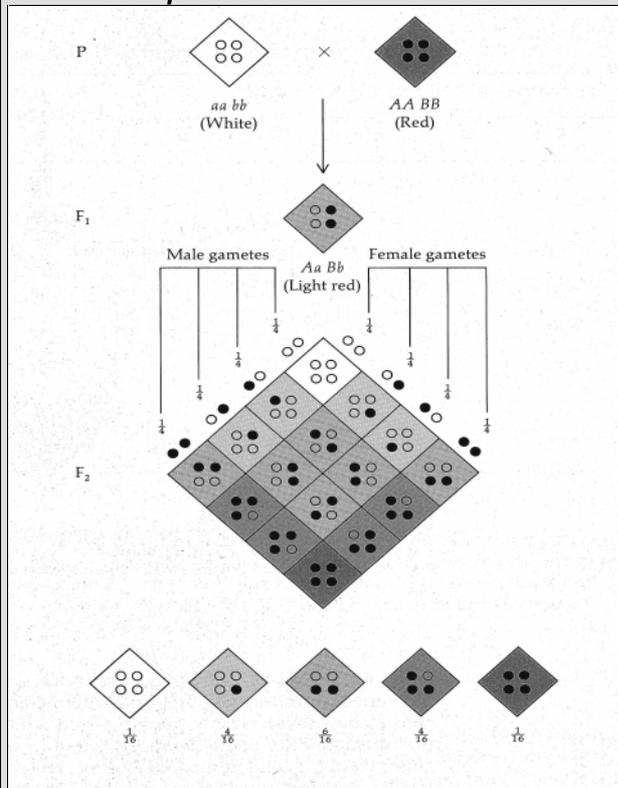
Fall 1: 1 Genpaar



Kreuzung zwischen einer Weizensorte mit unterschiedlicher Farbe der Körner. Im ersten Fall bewirkt ein Genpaar das Merkmal. Allel a bewirkt weisse Samen, Allel A leichte Rotfärbung der Samen. Ein Elter mit weisser Samenfarbe wird gekreuzt mit einem Elter mit leicht rötlicher Farbe. Die F1 Generation ist in der Samenfarbe intermediär zwischen beiden Eltern, da die Allele kodominant sind. In der F1 segregieren je 1 Allel, es entstehen so je $2^1=2$ verschiedene Gameten, woraus sich in der F2 4 Genotypen resp. 3 Phänotypen bilden können.

Im zweiten Fall bewirken 2 Genpaare das Merkmal. Die Allele a und b bewirken wiederum weisse Samen, die Allele A und B hingegen Rotfärbung. Da der rote Elter jetzt zwei Allele A und B besitzt, sind seine Samen nicht mehr nur rötlich sondern rot. Die F1 Generation ist wiederum intermediär zwischen beiden Eltern. In der F1 segregieren je 2 Allele, es entstehen so je $2^2=4$ verschiedene Gameten, woraus sich 16 Genotypen resp. 5 Phänotypen bilden können.

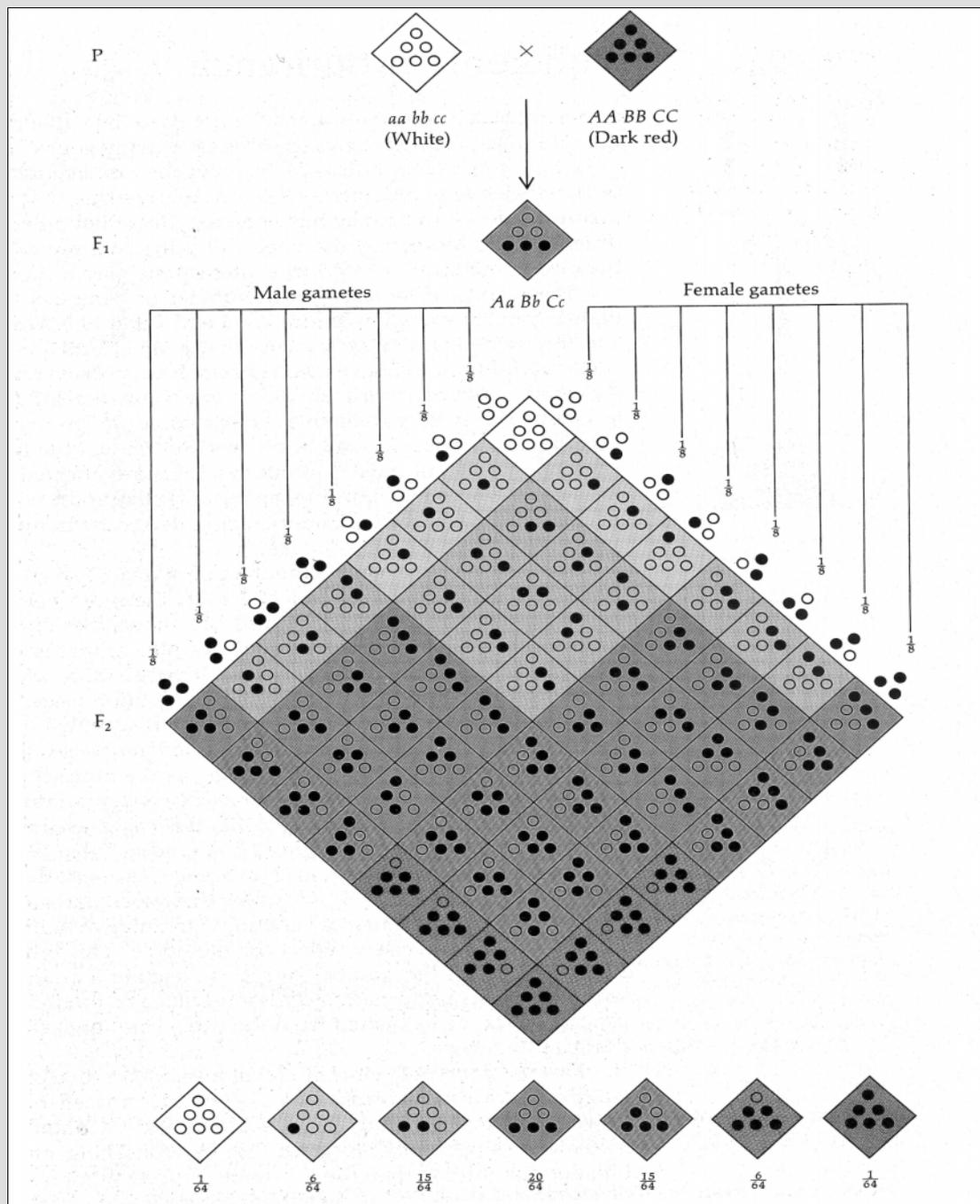
Fall 2: 2 Genpaare



Im dritten Fall (nächste Seite) ist die Farbe durch 3 Genpaare bedingt. Einer der Eltern hat nun 3 Allele für Rotfärbung (A,B,C), weswegen seine Samen nun dunkelrot sind. Die F1 ist wiederum intermediär. In der F1 segregieren je 3 Allele, es entstehen so je $2^3=8$ Gameten, woraus sich 64 Genotypen resp. 7 Phänotypen bilden lassen

Je mehr Gene also an der Ausbildung eines Merkmals beteiligt sind, umso mehr Gen- und Phänotypen entstehen und die Merkmalsklassen werden immer unübersichtlicher. (Aus AYALA and KIGER 1984)

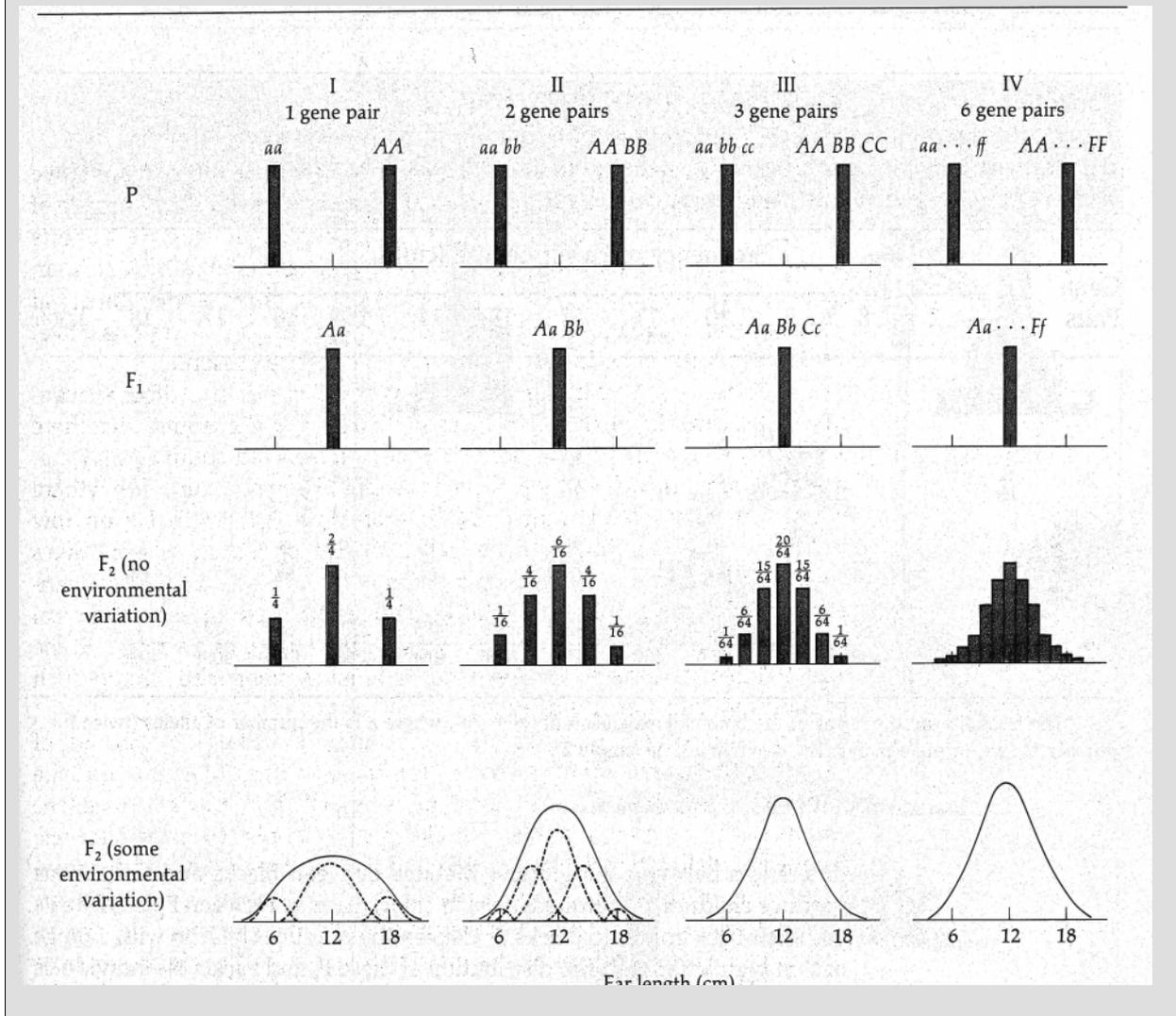
Fall 3: 3 Genpaare



Beispiel: Polygene Vererbung eines umweltabhängigen Merkmals und entstehende Merkmalsvariation

In diesem hypothetischen Beispiel wird angenommen ein Merkmal werde durch eine verschiedene Anzahl Genorte bestimmt. Im Fall I wird angenommen, dass der Unterschied im Merkmal durch ein Genpaar bedingt ist. Nehmen wir an, dass das Allel a eine Blattlänge von 6 cm bewirke, das Allel A hingegen eine zusätzliche Länge von 6 cm, jedesmal wenn es anwesend ist. In der F1-Generation haben alle Phänotypen eine Blattlänge von 12 cm (Aa). In der F2-Generation zeigt 1/4 eine Blattlänge von 6 cm (aa), 1/2 eine Blattlänge von 12 cm (Aa) und 1/4 eine von 18 cm (AA). Im Fall II mit zwei Genpaaren addieren die Allele A und B je 3 cm Länge, in Fall III die Allele A, B und C je 2 cm und im Fall IV die Allele A ...F je 1 cm. Die F1-Phänotypen haben immer noch alle 12 cm lange Blätter. In der F2-Generation jedoch treten nun verschiedene Anzahlen an Merkmalsklassen auf, die im Fall IV bereits einer Normalverteilung gleichen. Wenn nun die einzelnen Genotypen noch verschieden durch

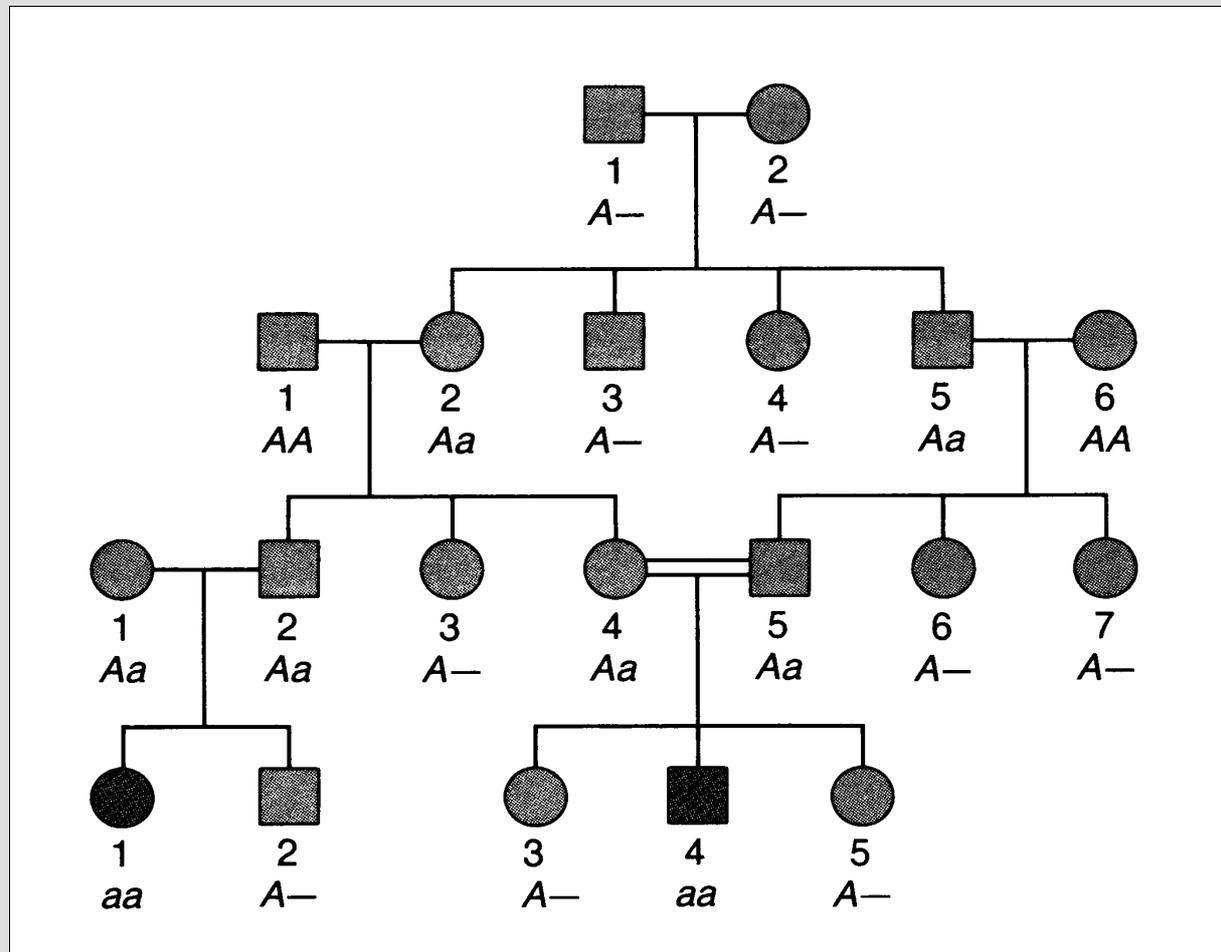
die Umwelt beeinflusst werden, d.h. aus den gleichen Genotypen entstehen durch die Umweltwirkung verschiedene Phänotypen, wie dies in der untersten Reihe dargestellt ist, so lassen sich bereits ab drei Genpaaren die Phänotypen nicht mehr diskreten Merkmalsklassen zuordnen, sondern es ergibt sich eine quantitative Verteilung des Merkmals. (aus AYALA and KIGER 1984).



Gene manifestieren sich am deutlichsten bei ihrer Weitergabe in einem sexuellen Prozess. Ihre Beobachtung und Wirkungsweise lässt sich deshalb am einfachsten untersuchen, wenn Individuen mit einer bekannten **Abstammungsbeziehung** vorhanden sind. Am einfachsten lässt sich das durch **Kreuzungsexperimente** bewerkstelligen, wie sie von Mendel verwendet wurden. Selbst wenn man für Merkmale, die durch mehrere Gene kontrolliert werden, den Zusammenhang aus den oben genannten Gründen zwischen Genotyp und Phänotyp nicht herstellen kann, lassen sich solche Kreuzungsversuche dennoch einsetzen, um die Genwirkung auf ein interessierendes Merkmal einzuschätzen, um bestimmte Individuen mit besonders günstiger Genwirkung für die Ausprägung des Merkmals auszuwählen und züchterisch zu nutzen (siehe Abschnitt *quantitative Genetik*). Ein weiteres Mittel der genetischen Analyse ist die **Verwendung von Stammbäumen**, da sie wichtige Informationen über den Wirkungs- und Weitergabemodus von Genen enthalten. Stammbäume sind vor allem dann nützlich, wenn keine Kreuzungen möglich sind und wenn Daten über mehrere Generationen vorliegen. Beim Menschen etwa sind verschiedene Erbkrankheiten so aufgeklärt worden wie die beiden folgenden Beispiele zeigen sollen:

Beispiele der Analyse von Stammbäumen beim Menschen:

Abgebildet ist ein Familien-Stammbaum eines rezessive vererbten Merkmals, welches nur in homozygoter Form im Phänotyp erscheint. Ein Beispiele für ein solches Merkmal ist die cystische Fibrose, eine schwere Störung der Lungenfunktion (übermäßige Schleimbildung) mit stark verkürzter Lebensdauer. Mit einem Fall auf 2'500 Geburten ist dies beim Menschen die häufigste rezessive Erbkrankheit. Der Erbgang ist anhand eines Familienstammbaums dargestellt:

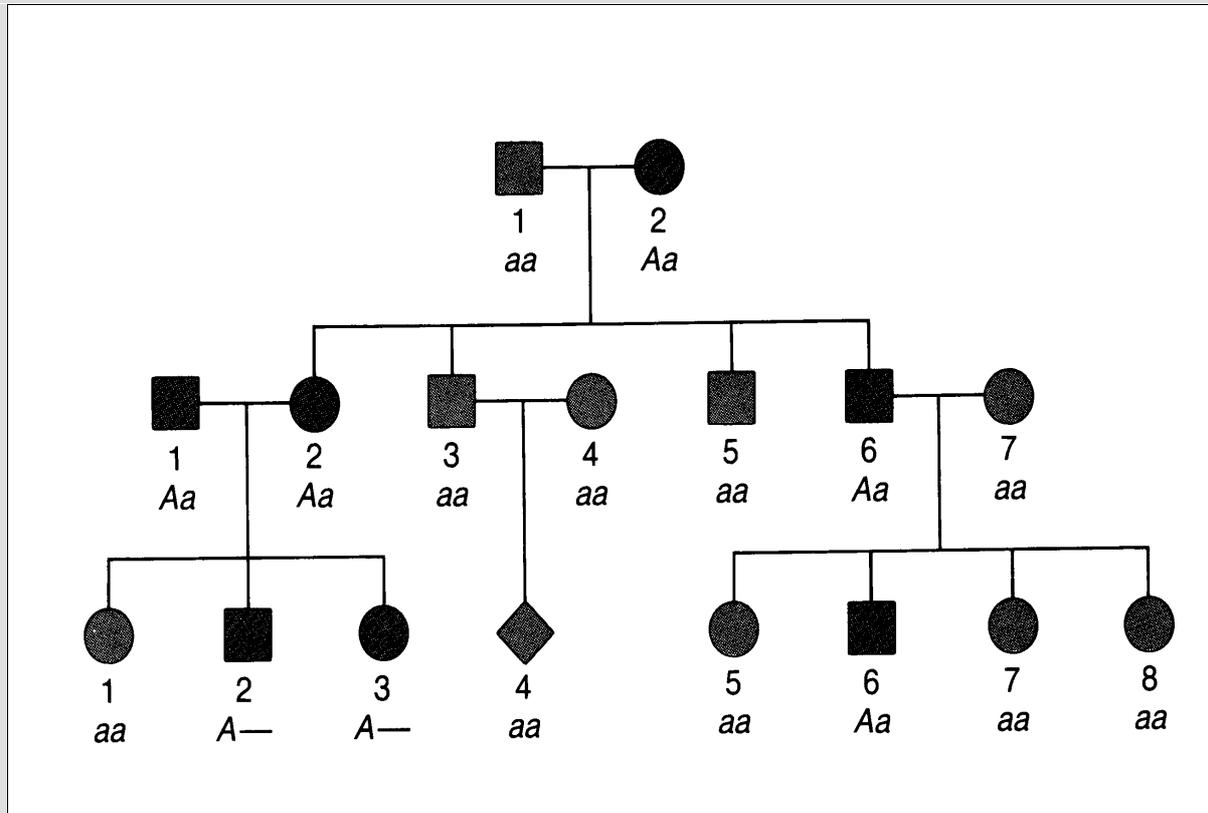


Aus WEAVER und HEDRICK 1991

Die beiden Individuen 1 und 4 der letzten Generation sind von der Krankheit betroffen, weil bei ihnen das kranke Allel (a) homozygot vorliegt und deshalb zum Ausdruck kommt. Der Strich bedeutet, dass das zweite Allel nicht bekannt ist. Zu beachten ist, dass in beiden Fällen die beiden Eltern nicht krank waren, weil das dominante Allele A die Expression der Krankheit verhindert hat. Alle Eltern sind jedoch heterozygoter Träger des krankmachenden Allels a. Typisch bei einem rezessiv vererbten Merkmal ist:

- Die Eltern sind nicht betroffen, die Krankheit tritt also nicht in jeder Generation auf
- Etwa ein Viertel der Nachkommen von zwei heterozygoten Eltern sind betroffen
- Die phänotypische Ausprägung rezessiv vererbter Merkmale ist oft die Folge von Verwandtenpaarung (Inzucht)
- Zwei betroffene Eltern haben nur betroffene Nachkommen (beide homozygot für das Allel a)

Bei einem dominanten Allel ist der Erbgang etwas verschieden. Beim Menschen ist zum Beispiel die *Chorea Huntington*, eine stark degenerative, neurologische Störung bis hin zur Demenz und stark verkürzter Lebenserwartung, durch ein dominantes Allel bedingt. Der Erbgang ist anhand eines Stammbaums auf der nachfolgenden Seite dargestellt:



Aus WEAVER und HEDRICK 1991

Chorea Huntington tritt bei allen Individuen auf die das A-Allel tragen. Der Strich bedeutet, dass das zweite Allel nicht bekannt ist. Typisch bei einem dominant vererbten Merkmal ist:

- Mindestens ein Elter ist betroffen; die Krankheit tritt also in jeder Generation auf
- Die Hälfte der Nachkommen eines kranken Elters hat die Krankheit, wenn er heterozygot, alle wenn er homozygot ist
- Gesunde Individuen haben keine kranken Nachkommen (da sie homozygot für das gesunde Allele sind)
- Zwei kranke Eltern können gesunde Nachkommen haben, falls beide heterozygot sind

Einige Regeln der Vererbungsanalyse

Fall 1:

Beobachtung:

Reziproke Kreuzungen ($\text{♀} \times \text{♂}$, $\text{♂} \times \text{♀}$) zwischen phänotypisch unterschiedlichen Eltern ergeben verschiedene Verteilungen der Phänotypen unter den Nachkommen

Erklärung:

Auch Gene ausserhalb des Zellkernes sind an der Vererbung beteiligt

Fall 2:

Beobachtung:

Kreuzungen zwischen phänotypisch unterschiedlichen Eltern führen zu einer Nachkommenschaft mit nur einem Phänotyp

Erklärung:

Sind die beiden Allele kodominant, so bedeutet die Uniformität der Nachkommen, dass jede Zygote den gleichen Allelbestand erhalten haben muss. Dies wiederum lässt darauf schließen, dass die beiden Eltern homozygot und die Nachkommen heterozygot sein müssen

Beispiel: $AA \times bb \Rightarrow Ab$ (das Fusionsergebnis der Gameten ist immer Ab)

Zeigen die Nachkommen den Phänotyp eines der beiden Eltern, so ist dieser homozygot für das dominante Allel, der andere Elter homozygot für das rezessiv Allel. Sind die Nachkommen jedoch von beiden Eltern unterscheidbar, so liegt Kodominanz oder unvollständige Dominanz vor

Fall 3:

Beobachtung:

Aufspaltung unter den Nachkommen d.h. phänotypisch gleiche oder ungleiche Eltern haben verschiedene Nachkommen

Erklärung:

Es segregieren unterschiedliche Allele. Dies bedeutet unweigerlich, dass mindestens einer der Eltern heterozygot am kontrollierenden Genort sein muss, weil eine uneinheitliche Ausstattung der Zygoten nur dann möglich ist, wenn die Gameten wenigstens eines Elters verschiedene Allele tragen

Beispiel: $Ab \times AA \Rightarrow \frac{1}{2} AA + \frac{1}{2} Ab$

	$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{2} b$
$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{4} AA$	$\frac{1}{4} Ab$
$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{4} AA$	$\frac{1}{4} Ab$

Fall 4:

Beobachtung:

In der Nachkommenschaft phänotypisch gleicher Eltern treten drei verschiedene Phänotypen mit der Häufigkeit $\frac{1}{4} : \frac{1}{2} : \frac{1}{4}$ auf

Erklärung:

Es segregieren unterschiedliche Allele was auf Heterozygotie der Eltern schließen lässt. Die Häufigkeitsverteilung zeigt an, dass beide Eltern heterozygot für die gleichen kodominanten Allele sind

Beispiel: $AB \times AB \Rightarrow \frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} AB + \frac{1}{4} BB$

	$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{2} B$
$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{4} AA$	$\frac{1}{4} AB$
$\frac{1}{2} B$	$\frac{1}{4} AB$	$\frac{1}{4} BB$

Fall 5:**Beobachtung:**

In der Nachkommenschaft phänotypisch gleicher Eltern treten zwei verschiedene Phänotypen mit der Häufigkeit $\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$ auf

Erklärung:

Beide Eltern sind heterozygot und haben die gleichen Allele, wobei ein Allel vollständig dominant ist

Beispiel: $Ab \times Ab \Rightarrow \frac{1}{4} AA + \frac{1}{2} Ab + \frac{1}{4} bb$

	$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{2} b$
$\frac{1}{2} A$	$\frac{1}{4} AA$	$\frac{1}{4} Ab$
$\frac{1}{2} b$	$\frac{1}{4} Ab$	$\frac{1}{4} bb$

Das Verhältnis beträgt nicht $\frac{1}{4} : \frac{1}{2} : \frac{1}{4}$ wie in Fall 4, weil das Allel A dominant ist

Genmarker**Was sind Genmarker?**

Als Genmarker bezeichnet man Merkmale, die einen eindeutigen Schluss vom Phänotyp auf den Genotyp zulassen. Dazu ist eine Vererbungsanalyse notwendig. Ein eindeutiger Schluss vom Phänotyp auf den Genotyp ist, wie wir gesehen haben, in der Regel aber nur dann möglich, wenn

- Das Merkmal durch einen Genort kontrolliert wird
- Die Allele kodominant sind
- Die Merkmalsausprägung von der Umwelt unabhängig ist

Damit sind auch die wichtigsten Voraussetzungen für die Eignung als Genmarker genannt. Als Genmarker kommen also in Frage:

- ⇒ uniparental vererbte Merkmale (bspw. Chloroplasten-Gene)
- ⇒ biparental vererbte Merkmale, die durch einen Genort kontrolliert und kodominant vererbt werden

Die Beobachtung eines Genmarkers erlaubt es also, anhand von Merkmalsausprägungen die Allele am „markierten“ Genort festzustellen. Man spricht von Markern, weil man nicht das Gen bzw. seine Allele selber beobachten kann, sondern lediglich deren phänotypische Expression. Wenn ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp besteht und er bekannt ist, dann markiert jedes phänotypische Merkmal direkt ein genetisches Merkmal. Der Genort, dessen Allelbesetzung an der Ausprägung des Genmarkers beteiligt ist, nennt man Marker-Genort. Genmarker gibt es auf verschiedenen Ebenen der Realisierung genetischer Information:

- Nukleotidsequenzen
- DNS – Fragmentlängen-Polymorphismen, Mikrosatelliten (repetitive DNS-Sequenzen)
- Isoenzyme
- Physiologische Merkmale (z.B. Terpene)
- Morphologische Merkmale (insbesondere qualitative Merkmale; bei Bäumen z.B. Albinismus, Pigmentierung (Blutfärbung), Schlitzblättrigkeit..)

Vererbungsanalyse bei Waldbäumen zur Entwicklung von Genmarkern

Für die Vererbungsanalyse bei Waldbäumen stehen folgende Methoden zur Verfügung:

- Kreuzungsexperimente
- Endosperm-Untersuchung bei Koniferen
- Nachkommenschaftsuntersuchung eines Samen-Elters
- Analyse von Stammbäumen

Kreuzungsexperimente

Für die Vererbungsanalyse von Waldbäumen werden häufig Kreuzungen verwendet. Als Beispiel sei hier nur die Analyse der genetischen Kontrolle von Isoenzymen-Phänotypen (Bandenmuster) bei Laubholzarten genannt. Im Gegensatz zu Koniferen, wo andere Methoden anwendbar sind (*siehe nachher*), lässt sich die genetische Kontrolle von Isoenzymen bei Laubhölzern zum Beispiel mit gezielter Kreuzung zwischen Eltern mit bekannten Phänotypen und der Beobachtung der Aufspaltung bei den Nachkommen feststellen. Das folgende Beispiel soll dies demonstrieren:

Beispiele von Isoenzym-Phänotypen von Kreuzungseltern und ihrer Nachkommenschaften im Samenstadium.

Enzym-System	Genotyp der Eltern		Aufspaltung und Häufigkeit in der Nachkommenschaft				Signifikanz <i>p</i>
	♀	♂					
ACO	A2A3	A2A2	A2A2	A2A3			0.121 ns
	B2B3	B2B3	22	12			
DIA			B2B2	B2B3	B3B3		0.906 ns
			6	15	6		
LAP	A2A3	A2A2	A2A2	A2A3			0.856 ns
			14	16			
LAP	A1A5	A2A5	A1A2	A1A5	A2A5	A5A5	0.762 ns
			6	5	6	3	

Nach MÜLLER-STARCK 1993

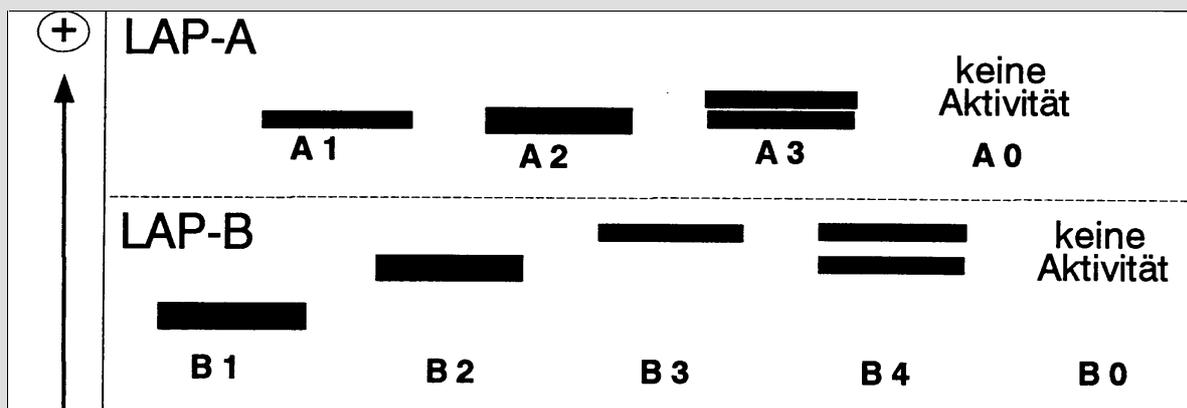
Die Genorte sind mit Buchstaben, die Allele mit Zahlen bezeichnet.

Aufgrund der Genotypen der Eltern lässt sich die erwartete Häufigkeitsverteilung in der Nachkommenschaft bestimmen, sofern die Segregation nach der Mendelschen Regel erfolgt und die Bande richtig interpretiert worden sind d.h. dass sie wirklich Allele des besagten Genortes darstellen. Die erwarteten Anteile lassen sich mittels einer Punnett-Matrix leicht bestimmen. Beim Enzymsystem ACO am Genort B ist beispielsweise ein Verhältnis von ¼ B2B2 : ½ B2B3 : ¼ B3B3 zu erwarten, wenn die Interpretation der Bande richtig ist und sie nach Mendel segregieren. Das tatsächlich beobachtete Verhältnis von 6: 15 : 6 (0.22 : 0.56 : 0.22) kommt der Erwartung sehr nahe. Die erwarteten Verhältnisse lassen sich in Wirklichkeit kaum exakt beobachten, da in den kleinen Stichproben, die untersucht werden können, die Wirkung des Zufalls sehr gross ist. Die Versuchsergebnisse lassen sich also kaum je exakt überprüfen, weil enorme Stichprobenumfänge notwendig wären. Hingegen lässt sich statistisch ermitteln, ob die beobachteten Anteile quantitativ mit den Erwartungswerten übereinstimmen. Entscheidend dabei ist, ob die Abweichung zwischen Beobachtung und Erwartung derart gering ist, dass sie nicht systematisch bedingt ist, sondern durch den Zufall verursacht sein kann. Dies wird mit einem χ^2 – Test (Chi-Quadrat Test) geprüft, welcher die Güte der Anpassung zwischen beobachteten und erwarteten Häufigkeiten ermittelt. Mit dem Signifikanzniveau *p* wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, mit welcher die Abweichungen als zufallsbedingt betrachtet werden können. Die Verteilung der Nachkommenschaft beim Enzymsystem ACO am Genort A weicht von der ½ : ½ Erwartung stark ab; der Test belegt jedoch, dass diese Abweichung noch immer im Rahmen des Zufalls liegt (die Abweichungen sind mit *p*= 0.121 nicht signifikant vom Zufall verschieden).

Endospermuntersuchungen bei Koniferen

Bei den Gymnospermen entwickelt sich das Endosperm aus einem Makrogametophyten, dessen Gewebe haploid ist und direkt auf ein Meioseprodukt zurückgeht, also nicht das Produkt der Fusion von weiblichen und männlichen Gameten darstellt. Dieses Gewebe besitzt deshalb nur einen einfachen Chromosomensatz, der vom Mutterbaum abstammt. In diesem Gewebe lässt sich daher die Segregation der mütterlichen Allele direkt beobachten, ohne dass Kreuzungen notwendig sind. Aufgrund des haploiden Gewebes treten in einem heterozygoten Samenelter nur Einfachbande auf und Interlocus-Hybridbänder bei polymeren Enzymen kommen nicht vor. Die Interpretation der Isoenzym-Mustern ist daher deutlich vereinfacht. Die Mendelschen Regeln können direkt überprüft werden, weil in den Endospermen eines heterozygoten Individuums beide Allele mit gleicher Häufigkeit erwartet werden. Aufgrund der Allele in den Samenendospermen lässt sich auch der mütterliche Genotyp bestimmen. Dazu muss allerdings eine genügende Anzahl (8-10) verschiedener Samen untersucht werden. Untersucht man auch den diploiden Embryo, so lässt sich der väterliche Beitrag bestimmen. Fehlt dem Samenelter das im Pollenbeitrag enthaltene Allel, so geht der entsprechende Same zwangsläufig auf eine Fremdbestäubung zurück.

Gametische Segregation an einem Enzym-Genort im Endosperm von Fichte



Zymogramm von Endospermen der Fichte bei Anfärben auf Aminopeptidase (LAP). Man beobachtet zwei Zonen, die zwei Genorten entsprechen. An beiden Genorten sind Null-Phänotypen (keine Enzymaktivität des Alleles) und Doppelbande vorhanden

Phänotypische Verteilung in den Endospermen der Samen von 5 Sameneltern am rascher wandernden Genort LAP-A:

Baum Nummer	Endosperm-Phänotypen	Stichprobe	Verteilung der Phänotypen	Prüfgröße χ^2
1	A1,A2	162	84 : 78	0.222
2	A1,A3	64	29 : 35	0.563
3	A1,A0	85	39 : 46	0.577
4	A2,A3	90	41 : 49	0.711
5	A2,A0	84	48 : 36	1.714

Die Aufspaltung zeigt in allen Fällen zwei Phänotypen, die wie erwartet etwa in der gleichen Häufigkeit auftreten, was die Hypothese unterstreicht, dass es sich um Alloenzyme eines Genortes handelt. Dies wird unterstrichen durch die quantitative Verträglichkeit mit der Segregationserwartung von 1 : 1 (χ^2 -Test). Die Phänotypen im Endosperm lassen im übrigen auch den Schluss auf den mütterlichen Genotypen zu.

Nach HATTEMER et al. 1993

Nachkommenschaftsuntersuchung eines Samen-Elters

Auch an einem Individuum und dessen Nachkommenschaft lässt sich die Weitergabe von Genen beobachten. Bei Bäumen benötigt man dazu den Phänotyp des Samenelterns und die von ihm geernteten Samen.

Postuliert man, dass an einem Enzym-Genort A eines Samenelterns zwei kodominante Allele A1 und A2 vorliegen, so ist aufgrund der Mendelschen Segregationsregel zu erwarten, dass in den Nachkommen die Summe der beiden Homozygoten (A1A1 + A2A2) den Heterozygoten A1A2 entspricht, sofern in den Pollen ebenfalls diese beiden Allele vorliegen (Punnett-Matrix von A1A2 x A1A2!). Diese Erwartung basiert auf der Annahme gleichmässiger Segregation und zufälliger Befruchtung, so dass folgende Erwartung gilt (P = Wahrscheinlichkeit):

$$P(A1_{\text{♀}}A1_{\text{♂}}) = P(A2_{\text{♀}}A1_{\text{♂}}) \text{ und } P(A1_{\text{♀}}A2_{\text{♂}}) = P(A2_{\text{♀}}A2_{\text{♂}})$$

Daraus ist unschwer ersichtlich, dass zwei Mal so viele Heterozygote (fett) als je Homozygote erwartet werden.

Befruchten andere Allele (Ax) die Sameneltern, so wird deren Häufigkeit gleich erwartet. Mathematisch geschrieben sieht dies nun folgendermassen aus:

Postulierter Genotyp des Samenelterns	Mögliche Phänotyp in den Nachkommen	Erwartetes Verhältnis zwischen den Phänotypen in den Nachkommen
A1A1	A1A1 A1Ax (Ax ≠ 1)	
A1A2	A1A1 A2A2 A1A2 A1Ax (Ax ≠ 1) A2Ax (Ax ≠ 2)	$\sum A1A2 = \sum A1A1 + \sum A2A2$ $\sum A1Ax = \sum A2Ax$

Die beobachteten Verhältnisse können wiederum mit einem χ^2 – Test mit den erwarteten Verhältnissen auf Übereinstimmung geprüft werden und die postulierte Annahme des elterlichen Phänotyps lässt sich dadurch entweder bestätigen oder verwerfen.

Beispiel: Genetische Analyse von vier Sameneltern von Castanea sativa (FINESCHI et al. 1990)

Anhand von Knospen wurden die Phänotypen von vier Sameneltern an Enzym-Genorten bestimmt (dargestellt sind zwei Genorte). Die gleichen Enzymsysteme wurden ebenfalls in den Samen derselben Bäume untersucht. Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, lag es nahe, an jedem der drei zunächst hypothetischen Enzym-Genorte die Existenz von je zwei Allelen zu postulieren. Die Vererbungsanalyse basiert auf dem Vergleich der tatsächlich beobachteten Häufigkeiten der hypothetischen Genotypen unter den Nachkommen:

Genort	Samen- eltern	hypothetischer Phänotyp des Samenelterns	Anzahl Samen	Anzahl Phänotypen in den Nachkommen			Erwartete Verteilung			χ^2
				11	12	22	11	12	22	
AP-B	1	11	99	69	30	-				
	2	12	99	36	47	16	25	50	25	0.25
	3	12	97	27	53	17	24	49	24	0.83
	4	22	50	-	36	14				
AP-C	1	12	99	42	55	2	25	50	25	1.22
	2	12	99	48	42	9	25	50	25	2.27
	3	12	97	32	51	14	24	49	24	0.26
	4	11	50	50	-	-				

Die Berechnung der Prüfgrösse X^2 erfolgt beispielsweise für den Samenelter 2 am Genort AP-B wie folgt:

$$X^2 = \frac{(N_{11} + N_{22} - \frac{N_{tot.}}{2})^2}{\frac{N}{2}} + \frac{(N_{12} - \frac{N_{tot.}}{2})^2}{\frac{N}{2}} = \frac{(36 + 16 - 49.5)^2}{49.5} + \frac{(47 - 49.5)^2}{49.5} = 0.25$$

Der errechnete Wert wird einem tabellierten Wert für ein angenommenes Signifikanzniveau p (und den entsprechenden Freiheitsgraden) verglichen und die Hypothese angenommen oder verworfen. Die Prüfgrösse X^2 liegt bei allen vier Sameneltern im Falle ihrer Heterozygotie am postulierten Genort im Annahmebereich. Die Hypothese zweier segregierender Allele im heterozygoten Zustand findet sich also nirgends im Widerspruch zu den Beobachtungen in den Nachkommen

Für die Vererbungsanalyse von komplexen DNS-Fragmentmustern sind spezielle Computerprogramme notwendig (z.B. COTRIX der Universität Hamburg).

Wofür sind Genmarker nützlich?

Das Problem, phänotypische Variation genetisch analysieren zu können, um damit Aussagen über den Genotyp machen zu können, hat bereits Mendel als grundlegend erkannt. Er hat gleichzeitig die grundlegenden Anstösse zur Bearbeitung dieses Problems geliefert und wurde damit zum Begründer der wissenschaftlichen Genetik überhaupt. Seinen systematischen versuchend verdankt die Biologie grundlegende Erkenntnisse:

- Aufgrund der Gesetzmässigkeiten über die Ausprägung phänotypischer Merkmale bei Eltern und ihren Nachkommen gelang Mendel der **Nachweis von Erbfaktoren**. Wir sprechen heute von Mendel-Genen, welche die Grundlage der Erbllichkeit von Merkmalsausprägungen über Generationen hinweg bilden.
- Mendel gelang nicht nur der Nachweis der Existenz von Genen, sondern auch deren **Identifizierung**. Er konnte klare Beziehungen zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp herstellen. Dies erlaubte ihm Schlüsse aus der Ausprägung von Merkmalen auf die Anwesenheit und Wirkungsweise aktiver Gene (-> Genmarker)
- Das Prinzip seiner Vorgehensweise ist **bis heute gültig** geblieben

Sein Beitrag macht ihn zu einem der grossen Klassiker der Biologie. Die Anwendung seiner Erkenntnisse reicht heute von der genetischen Analyse von morphologischen und physiologischen Merkmalen, Isoenzymen und anderen Proteinen bis zu Fragmentlängen-Polymorphismen der DNS.

Kodominante Genmarker können für verschiedene genetische Fragestellungen eingesetzt werden. Ihr Vorteil ist insbesondere, dass:

- Homozygote und heterozygote Zustände eindeutig identifiziert werden können (Kodominanz)
- Genotypen und Allele bei Stichproben von mehreren Individuen gezählt werden können
 - ⇒ damit kann genetische Variation quantifiziert, und
 - ⇒ damit können genetische Strukturen miteinander verglichen werden

Nachfolgend wird an einer ganzen Reihe von Beispielen gezeigt, für welche Fragestellungen Genmarker verwendet werden können.

Beispiele für den Einsatz von Genmarkern

1. Vergleich der Genotypen (bzw. Haplotypen) von Individuen und zwischen Arten

Zweck

- ⇒ Artidentifizierung
- ⇒ Abstammungsrekonstruktion

Beispiel: Artidentifizierung bei der Schwarzpappel

Die einheimische, autochthone Schwarzpappel (*Populus nigra* L.) gilt europaweit als stark gefährdet. Einerseits sind ihre bevorzugten Standorte (Auenwälder mit natürlicher Überschwemmungsdynamik) stark zurückgegangen, andererseits ist ihr ursprünglicher Genpool durch Hybridisierung mit euramerikanischen Kulturpappel-Klonen gefährdet. Zur Einleitung von Erhaltungsmaßnahmen bei der einheimischen Schwarzpappel ist zunächst eine Aufnahme ihres gegenwärtigen Bestandes notwendig, um einerseits die Gefährdung abzuschätzen, andererseits um Material für Generhaltungsmaßnahmen zu bekommen. Die Identifikation der Schwarzpappel und ihre Abgrenzung von den Hybridpappeln (*Populus x euramericana* = Kreuzung zwischen der amerikanischen *P. deltoides* und *P. nigra*) ist anhand von morphologischen Merkmalen äusserst schwierig und unsicher, insbesondere auch deshalb, weil viele Rückkreuzungen zu erwarten sind. Durch die Anwendung von Genmarkern ergibt sich jedoch die Möglichkeit, die Arten bzw. Hybriden klar zu unterscheiden, wie folgendes Beispiel zeigt:

Art:	Klone:	LAP-A	AAT-B	PGM-A	PGI-B
<i>P. nigra</i>	Baden 161(1), Baden 161(3), Blanquillo de Bucos, Calden 1 , Dornberg 4, Ederaue 9, Ederaue 11, Ederaue 14, Erbach, Fritzlär 1, Fritzlär 2, Goldgrund 1, Hördt, Hütteldorf , Ichenheim 2 , Italica , Jugenheim 1, Karlsruhe 48, Karlsruhe 62, Kenzingen 1, Loenen, Neuburg 2, Offenburg 1, Plantierensis , Purkersdorf , Pyramidalis, Schorldau, Terwolde, Torrey, Vereecken , Vert de Garonne, Woltersen, Drupal Wulst , Drupal Tulln , Brandaris , J. Pourtet	—	—	—	—
	Baden 161(2), Fritzlär 3, Kinsau, Leimersheim	n1n1	n1n1	n2n2	n2n2
	Thevestina	n1n1	n1n1	n1n2	n2n2
<i>P. x euramericana</i>	Agathe F, Allenstein, Avanzo, Baden 8/9/10 Füllbruch, Baden 553, Bellini, Belotto, Bietigheim, BL Costanzo, Blanc du Poitou, Bocalari, Branagesi, Büchig, Cappa Bigliona, Carpaccio, Cima, Clava, Dolomiten, Dorskamp, Flevo, Florence Biondi, Floßgrün, Gattoni, Gaver, Gelrica B 12, Ghoy, Gibeca, Goldgrund, Guardi, Guaneto, I 130, I 154, I 214, I 262, I 455, I 476, I 486, I 495/51, I 92/40, Isieres, Jacometti 78 B, Karolina, Kastenwörth, Lampenheim Findling, Lingenfeld, Oxy, Ostia, Panytol, Philipsburg A, Primo, Regenerata Kew, Rirtheim, Robusta Zeeland, Selys, Serotina, Speyer 02, Spijk, Sprengen, Spreewald, Steckby, Tannenhoeff, Tardif de Champagne, Triplo, Virginiana de Nancy, Virginie de Frignicourt, Voithenberg, Zürich 03/1, „ <i>Angulata de Chautagne</i> “	—	—	—	—
		d1n1	d1n1	d1n2	d3n2
<i>P. deltoides</i>	Alcinde, Marquette, 73/53 (3), 9/54 (1), 40/62 (22), 6261, 6278, San Martino	—	—	—	—
	72/53 (11)	d1d1	d1d1	d1d1	d3d3
	Harvard, Lincoln, Peoria, 72/53 (13), 73/53 (14), 301/56, 127/57	d1d1	d1d1	d1d1	d2d3
		d1d1	d1d1	d1d1	d1d3

Nach JANSSEN 1997

Dargestellt sind die Allele an vier Isoenzym-Genorten für die reine *P. nigra*, *P. deltoides* und *P. x euramericana* Hybriden (*P. nigra* x *P. deltoides*). Am Genort LAP-A zeigen alle *P. nigra* Klone ein einziges Band d.h. sie haben zwei gleiche Allele (homozygot n1n1). Bei *P. deltoides* tritt ebenfalls nur ein Band auf; dieses Allel zeigt jedoch eine grössere Wanderungsdistanz als das Allel n1. Auch bei *P. deltoides*

sind alle Klone homozygot (d_1d_1). Bei den Hybriden tritt ein Doppelband-Muster auf, typisch für monomere Enzymsysteme im heterozygoten Zustand. Zu sehen ist, dass je ein Allel von einem der Kreuzungseltern stammt d.h. die Hybriden sind n_1d_1 -Genotypen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Isoenzym-Phänotypen ist eine eindeutige Identifizierung der drei Pappel-Typen möglich. AAT-B und PGM-A zeigen die gleichen sortentypischen Isoenzym-Muster; PGI-B ist etwas komplizierter, da das Enzym dimer ist. Es soll hier nicht näher auf die Interpretation von PGI-B eingegangen werden.

Beispiel: Abstammungsrekonstruktion

Ein Beispiel für die Abstammungsrekonstruktion mittels Chloroplasten-Genmarkern wurde bereits am Beispiel der Eiche im Teil B gezeigt. An dieser Stelle soll ein anderes, nicht forstliches Beispiel angeführt werden, welches sehr schön zeigt, wie Genmarker wirkungsvolle eingesetzt werden können:

Die wanderfreudigen Frauen

Nicht kühne Feldherren oder abenteuerlustige Junggesellen der Spezies *Homo sapiens* haben den Globus erobert und ihre Gene in fremde Länder getragen. Es waren die Frauen, wie neue genetische Untersuchungen an den Tag gebracht haben.

Danach sind Merkmale, die nur von der Mutter über das Erbgut der zellulären Energiefabriken (Mitochondrien) vererbt werden, wesentlich uniformer verteilt über die fünf Kontinente als nur vom Vater stammende. Die an das männliche Y-Chromosom gebundenen Erbfaktoren sind erst in jüngster Zeit Gegenstand der populationsgenetischen Untersuchungen geworden.

Im Vergleich des Erbguts verschiedener Völker kann man die Verwandt-

schaftsverhältnisse feststellen. Aus Berechnungen der Rate an Erbsprüngen oder Mutationen lässt sich auch die zeitliche Dimension berechnen. Die von einem kalifornischen Forschungsteam durchgeführten neuen Studien haben ergeben, dass die Migrationsrate der Frauen etwa achtmal höher ist als diejenige der Männer.

Über den Grund der weiblichen Wanderfreudigkeit sinnierten die Genetiker auch nach. Sie kamen zum Schluss, dass des Rätsels Lösung in den Heiratsgebräuchen zu suchen sein könnte. Viel öfters nämlich als die Bräutigame verlassen in traditionellen Gesellschaften die Bräute ihre Familie und Heimat. Damit aber tragen sie auch ihr Erbgut in die Welt hinaus. (rws)

Tages Anzeiger vom 6.11.1998

Die unterschiedlichen Ausbreitungsmuster von Mann und Frau liessen sich rekonstruieren, weil Genmarker verwendet wurden, die lediglich von der Mutter (Mitochondrien) bzw. nur vom Vater weitervererbt werden (Gene auf dem männlichen Y-Chromosom).

2. Vergleich der Häufigkeiten von Genotypen und Allelen zwischen verschiedenen Populationen der gleichen Art

Zweck:

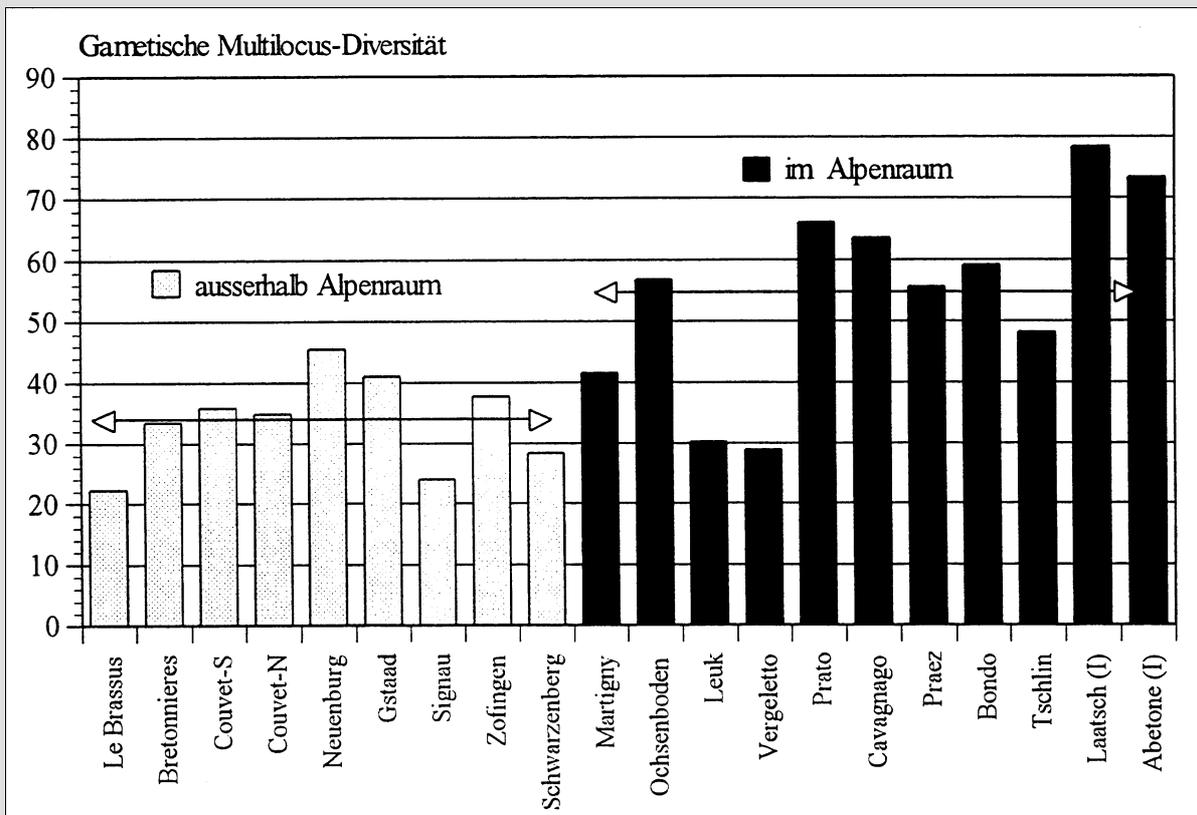
1. Vergleich der genetischen Variation innerhalb von Populationen
⇒ ⇒ Entscheidungshilfe für Generhaltungsmassnahmen
2. Analyse der genetischen Variation zwischen den Populationen (Verschiedenartigkeit, Differenzierung)

⇒ ⇒ Entscheidungshilfe für Generhaltungsmassnahmen

⇒⇒ ⇒ Rekonstruktion der nacheiszeitlichen Rückwanderung (Generhaltungsmassnahmen)

Beispiel: Ausscheidung von Genreservaten für die Weisstanne in der Schweiz

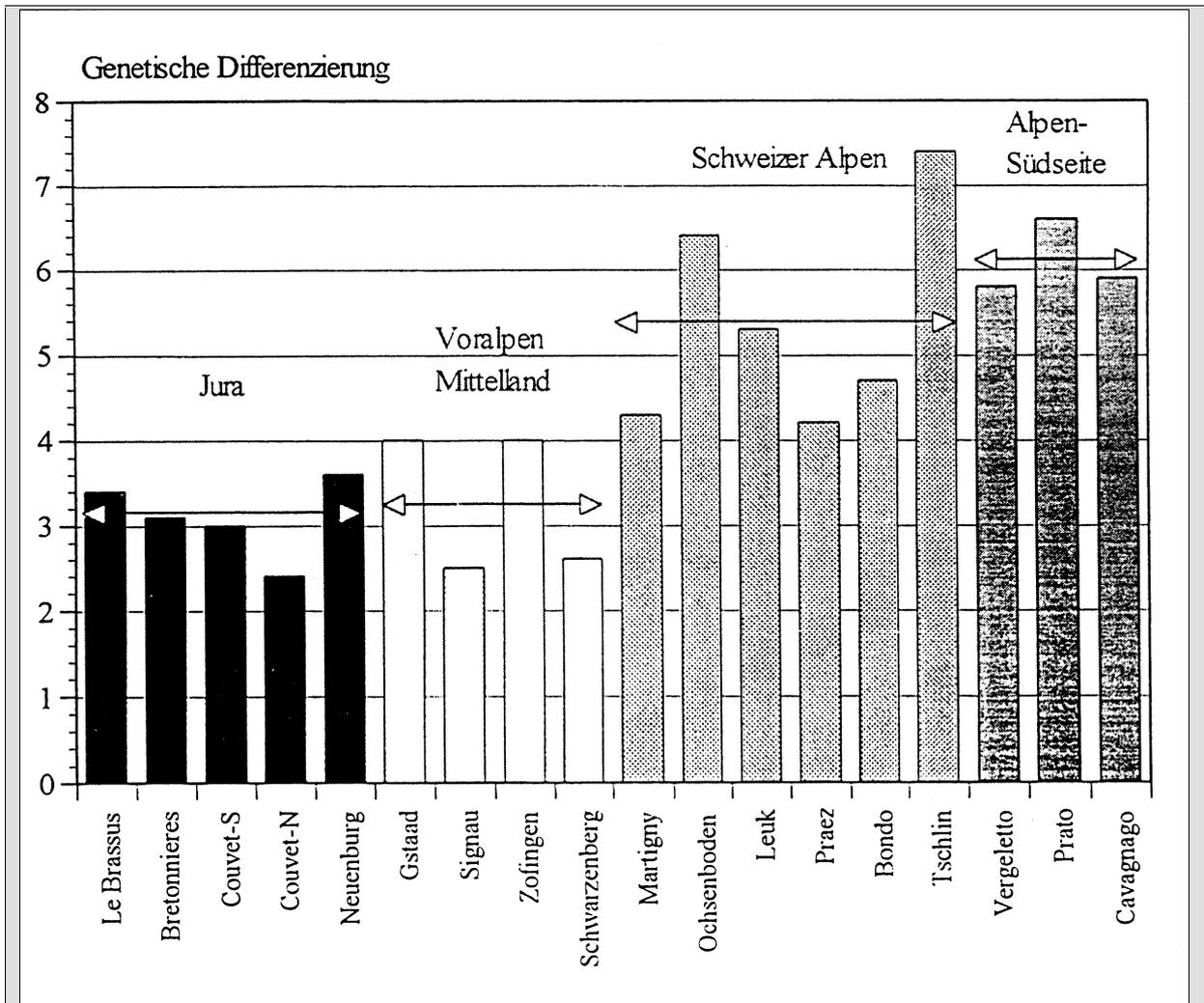
Als Grundlage für die Ausscheidung von Genreservaten für die Weisstanne in der Schweiz wurden 20 Weisstannenbestände in der ganzen Schweiz mittels Isoenzym-Genmarkern untersucht. In Bezug auf die genetische Variation innerhalb der Populationen sei hier stellvertretend die hypothetische gametische Multilocus-Diversität (v_{gam}) wiedergegeben. Hohe Werte von v_{gam} bedeuten, dass in der Population ein hohes Potential zur Erzeugung genetisch verschiedenartiger Gameten vorhanden ist; damit ist in der Folgegeneration ein grösseres Anpassungspotential vorhanden als bei Beständen mit kleinen Diversitäts-Werten:



Aus HUSENDÖRFER 1997

Zu beobachten ist, dass Populationen in den Alpen und auf der Alpen-Südseite, die unter heterogenen, extremen standörtlichen Verhältnissen gedeihen, über eine höhere genetische Diversität v_{gam} verfügen als Bestände unter standörtlich homogenen Bedingungen im Mittelland oder im Jura. Sie verfügen damit über ein grösseres Anpassungspotential, welches für das Überleben unter den schwierigeren Umweltverhältnissen eine Voraussetzung ist.

Mit den Isoenzym-Genmarkern lässt sich auch die Variation zwischen den Beständen beschreiben. In Bezug auf die genetische Verschiedenheit (Differenzierung) zwischen den Beständen ergab sich folgendes Bild:

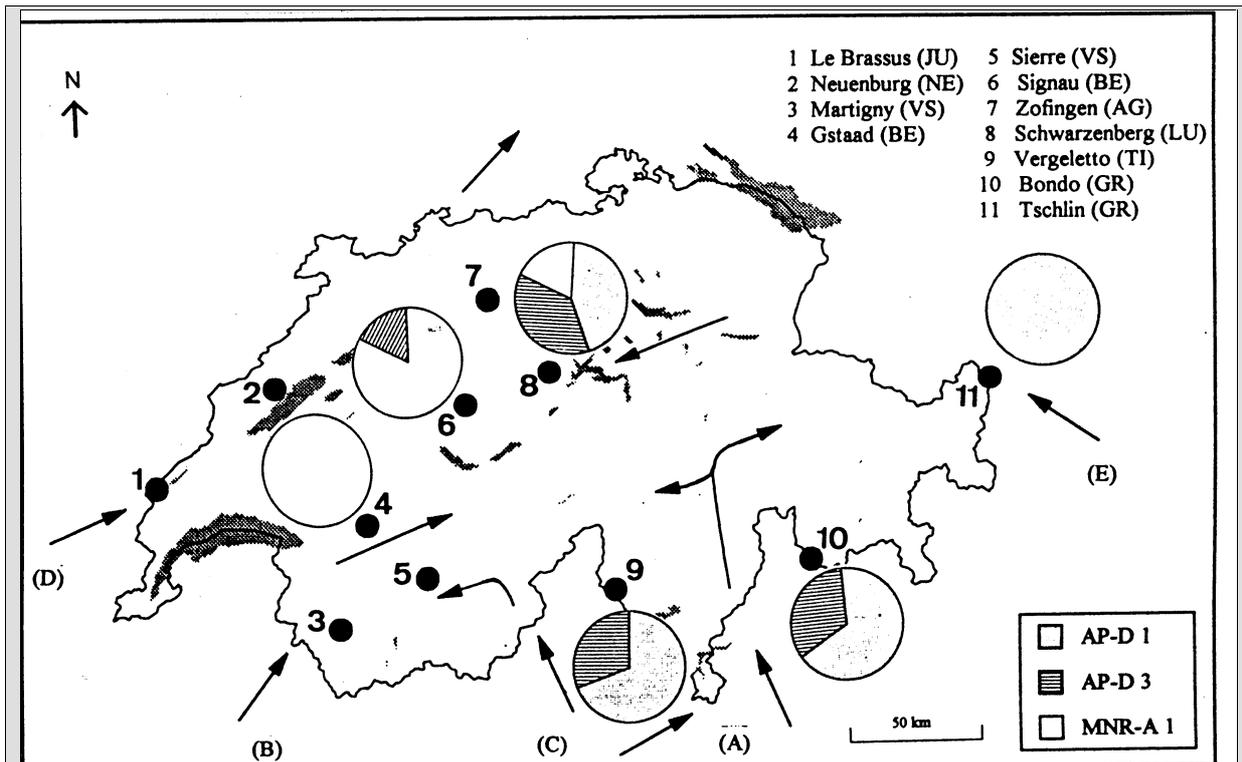


Aus HUSSENDÖRFER 1997

Die Unterschiede in der genetischen Struktur zwischen den Beständen sind auf der Alpen-Südseite und in den Alpen deutlich grösser als im Mittelland und im Jura. Dies dürfte mit den regional und kleinflächig stark verschiedenen Umweltbedingungen im Alpenraum zusammenhängen, an die sich die Populationen anpassen mussten.

Für die Generhaltung bedeuten die Ergebnisse der genetischen Inventur, dass im Alpenraum ein dichteres Netz an Genreservaten ausgeschieden werden sollte als im Mittelland oder im Jura, weil die Bestände dort ein vergleichsweise grösseres Potential an genetischer Anpassungsfähigkeit aufweisen und weil sie sich genetisch stärker voneinander unterscheiden als im Mittelland oder im Jura. Diese genetische Verschiedenheit sollte möglichst erhalten werden.

Aufgrund der genetischen Differenzierung und der Ausstattung mit Allelen lassen sich auch Vermutungen über die Wiedereinwanderung der Weisstanne nach der Eiszeit anstellen. Zu diesem Zweck ist vor allem das Vorhandensein oder Fehlen von seltenen Allelen verwendbar. Die Refugialgebiete, in denen die Tanne die Eiszeit überdauert hat, waren lange Zeit isoliert, so dass man annehmen kann, dass sich die Refugialpopulationen (und deren Nachkommen) vor allem in Bezug auf seltene Allele unterscheiden sollten. Begründung: Seltene Allele sind das Ergebnis von Mutationen. Da Mutationen zufällig auftreten, sollten sich die Mutationen und daher die seltenen Allele in den Refugialpopulationen unterscheiden, wogegen häufige Allele, welche lebensnotwendige Funktionen im Stoffwechsel kodieren, in allen Refugialgebieten vorkommen sollten. Die genetische Inventur der Weisstanne in der Schweiz ergab in Bezug auf seltene Allele folgendes Bild:



Aus HUSSENDÖRFER und MÜLLER-STARCK 1994

In Tschlin (11) fehlen die Allele AP-D3 und MNR-A1. Dies ist ein Hinweis auf eine eigene Einwanderungsrouten durch das Inntal aufwärts bis ins Engadin (Weg E). Im Tessin findet sich zusätzlich das Allel AP-D3, welches auch in Signau (6) und Schwarzenberg (8) zu finden ist. Diese Bestände gehen wahrscheinlich auf einen Einwanderungsstrom aus Italien zurück, der die Alpen überquert hat und ins Mittelland vorgestossen ist (Weg A und C). In der Westschweiz (bspw. Gstaad) fehlen hingegen beide Allele AP-D1 und AP-D3 vollständig, dafür tritt ein zusätzliches Allel am Genort MNR auf. Eine Einwanderung der Tanne aus einem Refugialgebiet im Westen ist deshalb wahrscheinlich (Weg D und B)

3. Vergleich der genetischen Struktur in verschiedenen Entwicklungsphasen (bspw. Struktur des Altbestandes, Struktur der Samen, Struktur der Naturverjüngung)

- ⇒⇒ Analyse des Paarungssystems (Anzahl beteiligter Eltern, Genfluss via Pollen und Samen, Inzucht)
- ⇒⇒ Analyse von Selektionsvorgängen (z.B. durch Immission oder waldbauliche Massnahmen)
- ⇒⇒ Analyse der Auswirkungen verschiedener Saatguternte-Methoden auf die genetische Struktur der Folgebestände

Beispiel: Paarungssystem in einer Kiefern-Samenplantage

Ohne näher auf die Methodik der Untersuchung einzugehen, soll hier ein Beispiel für den Einsatz von Genmarkern zum Studium des Paarungssystems in einer Samenplantage gezeigt werden. Unter den 36 Klonen einer Kiefern-Samenplantage kommen am LAP-B Genort lediglich drei Genotypen vor: B2B2, B1B2 und B2B3. Aufgrund dieser Genotypen-Konstellation der Mutterbäume lässt sich die erwartete Häufigkeit der Genotypen im Saatgut bestimmen, sofern die Paarung panmiktisch erfolgt. Unter Panmixie versteht man die rein zufällige Paarung, wobei alle Genotypen ihre Allele in einem konstanten Verhältnis beisteuern (d.h. identische allelische Strukturen in Pollen und Eizellen), alle sich

mit allen paaren können und die durchschnittliche Anzahl Nachkommen je Paarung gleich ist. Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, weichen die tatsächlich gefundenen Genotypen-Häufigkeiten jedoch davon zum Teil erheblich ab. Diese Abweichungen kommen dadurch zustande, dass sich nicht alle Klone miteinander paaren können, weil ihre Blühtermine sich zeitlich nicht überlappen bzw. weil die einzelnen Klone ungleiche Fertilitäten haben. Ungleiche Fertilität heisst, dass einzelne Klone sehr viele weibliche, dafür kaum männliche Blüten bilden und umgekehrt. Zu beachten ist ferner, dass das Paarungssystem jährlich starke Schwankungen aufweist, was unter anderem mit dem Wetter während der Blüte zusammenhängt. Vom gleichen Elternkollektiv entstehen dadurch unterschiedliche Paarungskonstellationen bzw. genetisch unterschiedliche Folgegenerationen. Dies ist auch in natürlichen Beständen der Fall.

LAP-B Genotyp	Häufigkeit unter den Plantagenklonen	Erwartung unter Panmixie	Häufigkeit im Saatgut		
			1974	1975	1976
B1B1	0	7.9	9	9	1
B2B2	27	490	444	528	522
B1B2	8	124	140	63	66
B1B3	0	2	8	4	7
B2B3	1	15.6	39	35	43

Die Beiträge einzelner Klone zur Nachkommenschaft schwanken stark. Im folgenden Beispiel ist der Beitrag von drei Klonen angegeben:

Klon	Jahr	Anzahl untersuchte Samen	Beitrag bei Panmixie	Realer ♀ Beitrag 1	Realer ♂ Beitrag 2	Beitrag Selbstbest. 3	Realer Gesamtbeitrag
Klon 2	1975	640	17.8	26	52	4	43
	1976	640	17.8	34	54	8	52
Klon 4	1975	640	17.8	32	6	0	19
	1976	640	17.8	32	26	4	33
Klon 14	1975	640	17.8	10	28	0	19
	1976	640	17.8	8	48	4	32

Die Gesamtbeiträge einzelner Klone (Mittel aus Spalte 1 und 2 zuzüglich Spalte 3) zur Nachkommenschaft weichen deutlich von den unter Panmixie zu erwartenden Werten ab. Die drei untersuchten Klone sind alle überrepräsentiert, und zwar um einen Faktor 1.1 bis 2.9. Notwendigerweise muss dieser Effekt durch eine unterdurchschnittliche Präsenz anderer Klone kompensiert werden. Es gibt Klone, die in den Nachkommen überhaupt nicht repräsentiert sind. Zu beachten ist auch (was oben schon angesprochen wurde), dass die Fertilität der Klone in verschiedenen Blühperioden unterschiedlich sein kann. Beide Tabellen nach MÜLLER-STARCK et al. 1982.

Beispiel: Genetische Struktur der Folgebestände und Verjüngungstechnik

Vergleich der genetischen Variationsparameter (anhand von Isoenzym-Genmarkern) des Weisstannen Altbestandes Madiswil, Schweiz mit Jungpflanzen in der vorhandenen Naturverjüngung und in einer Kunstverjüngung derselben Herkunft (in einem Provenienzversuch):

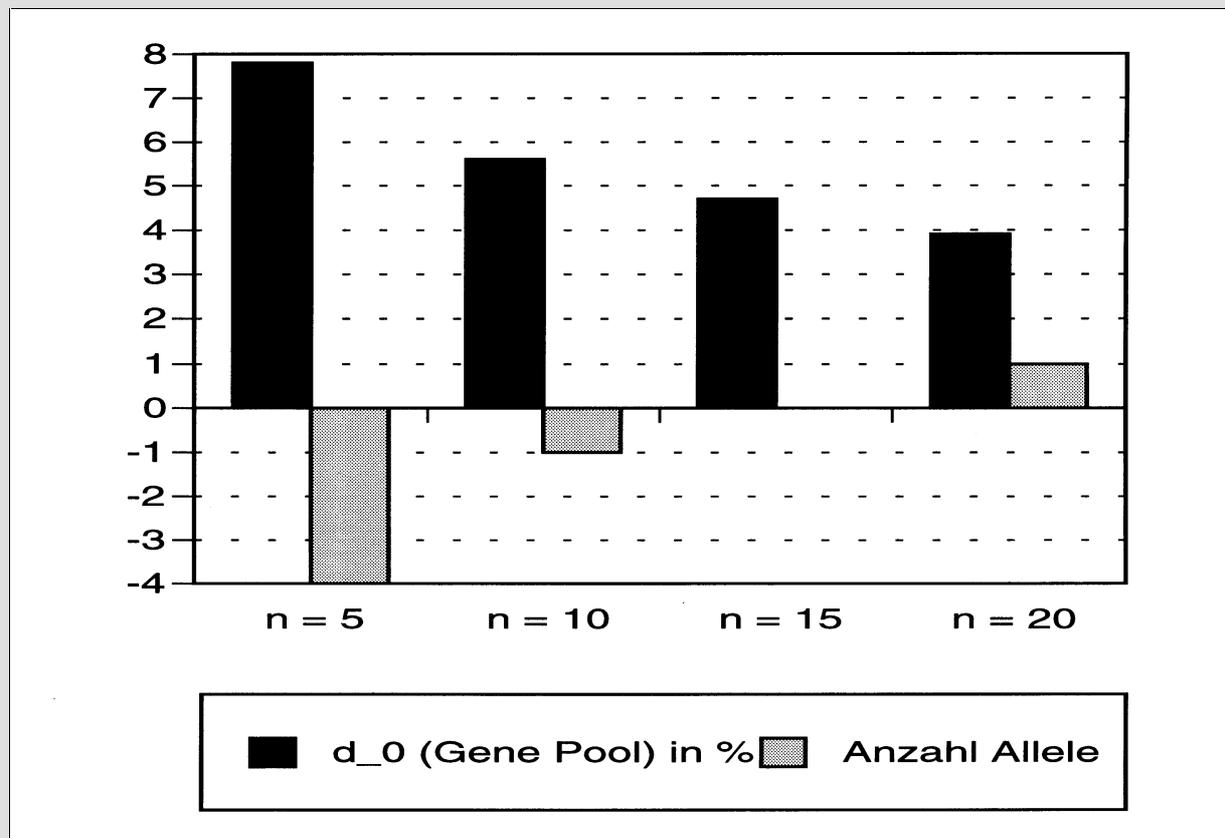
Parameter	Altbestand	Naturverjüngung	Kunstverjüngung
Anzahl Allele/Genort	2.29	2.36	1.93
Potentielle genotypische Vielfalt	14 Mio.	71 Mio.	0.4 Mio.
Gametische Multilocus Diversität v_{gam}	51.4	74.0	38.8

Nach HUSENDÖRFER (unveröffentlicht)

Die Naturverjüngung enthält eine grössere genetische Variation und ein grösseres genetisches Potential als der Altbestand. Dies ist einerseits stichprobenbedingt, andererseits eine Folge der Rekombination, des Genflusses und der bisher fehlenden Selektion in der Naturverjüngung. Die Kunstverjüngung zeigt hingegen eine deutlich reduzierte genetische Vielfalt und ein viel geringeres genetisches Potential. Dies dürfte auf eine zu geringe Zahl an Erntebäumen, von denen das Saatgut stammt, zurückzuführen sein. Die Repräsentativität der Ergebnisse der Herkunft im Provenienzversuch dürfte deshalb fraglich sein. Die Bedeutung einer genügend grossen Anzahl Samenerntebäume wird im folgenden Beispiel deutlich:

Beispiel: Einfluss der Anzahl Samenerntebäume auf die genetische Variation

Im Weisstannenbestand Signau, Schweiz, wurde die genetische Struktur von Saatgutproben, die von einer unterschiedlichen Anzahl von Mutterbäumen geerntet wurden, untersucht und mit der genetischen Struktur des Ausgangsbestandes verglichen. In der folgenden Darstellung ist der genetische Abstand (% Unterschied der genetischen Strukturen) und die Anzahl Allele der Saatgutproben im Vergleich zum Ausgangsbestand gezeigt:



Aus HUSSENDÖRFER 1996 Legende: n: Anzahl beernteter Samenbäume

Bei der Beerntung von lediglich 5 Mutterbäumen sind im Saatgut 4 Allele nicht vertreten. Selbst bei der Ernte von 20 Bäumen ist der genetische Abstand immer noch relativ gross, d.h. die genetische Struktur der Saatgutstichprobe weicht noch immer teilweise von der des Altbestandes ab. Interessanterweise wurde im Kollektiv der 20 Bäume hingegen ein Allel gefunden, welches in den 100 untersuchten Bäumen des Gesamtbestandes nicht vorgekommen ist (Stichprobenproblem, Genfluss).

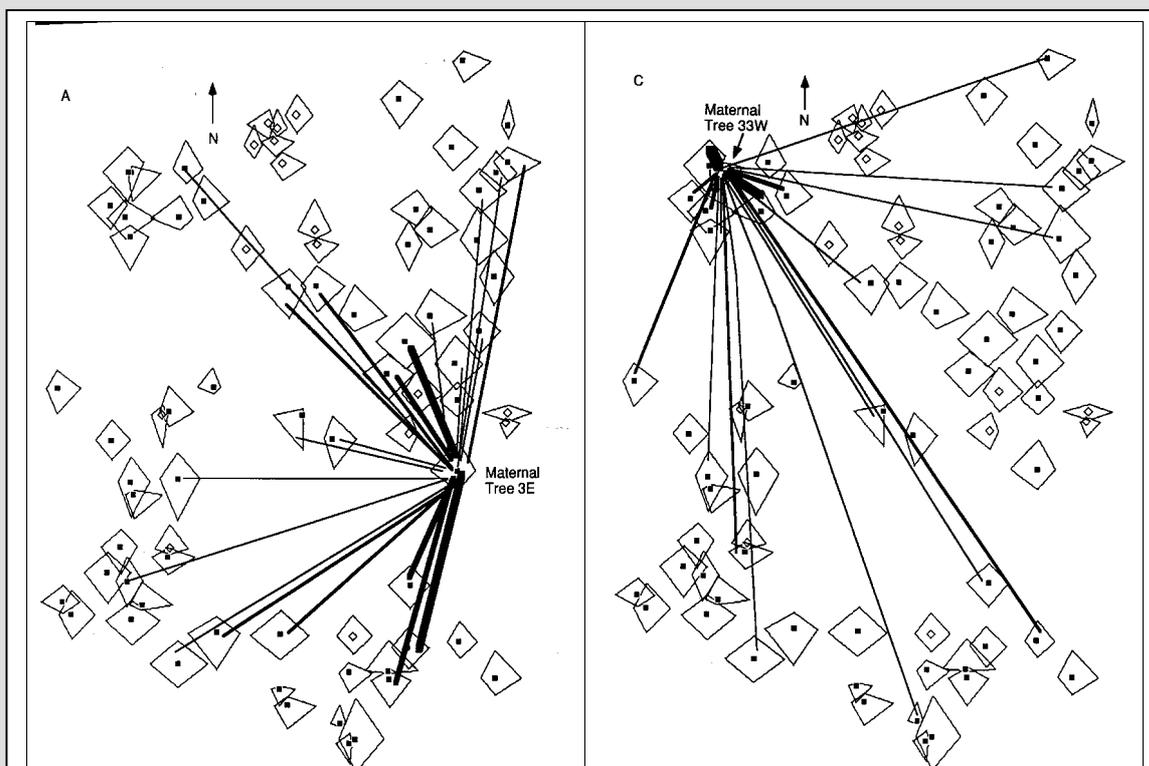
Beispiel: Elternschaftsanalyse, Paarungssystem und Genfluss bei Quercus macrocarpa

Das Untersuchungsobjekt ist ein isolierter, 200 X 250 m grosser Bestand aus Q. macrocarpa und Q. rubra, mit insgesamt 78 alten Bäumen. Untersucht wurde, wie sich die Bäume innerhalb des Bestandes paaren, wie viele Paarungspartner ein Baum hat, wo sie sich räumlich befinden und welcher Anteil an Pollen von ausserhalb des Bestandes stammt. Für die Untersuchung wurden Mikrosatelliten-Polymorphismen als Genmarker verwendet (siehe später). Diese Genmarker zeichnen sich durch eine hohe Anzahl von Allelen je Genort aus. In der vorliegenden Untersuchung wurden lediglich vier

Genorte untersucht, an denen aber zwischen 14 und 24 Allele vorlagen. Aufgrund dieser hohen Anzahl Allele ergibt sich bei der Paarung bereits an vier Genorten eine derart grosse Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten von Genotypen, dass für jeden Samen eines Mutterbaumes (mit bekanntem Genotyp) der Vater genau bestimmt werden kann, weil jeweils nur ein Pollendonator für den im Samen vorliegenden Genotyp in Frage kommt (alle anderen Väter lassen sich ausschliessen). Auf diese Weise ist es möglich, für jeden Samen den Pollenspender zu bestimmen und die Paarung im Bestand zu rekonstruieren. Findet sich im Bestand kein Pollendonator für einen bestimmten Samen-Genotyp, so muss der Pollen von ausserhalb des Bestandes stammen. Damit lässt sich auch der Genfluss feststellen, welcher in den Bestand hinein geflossen ist.

Im untersuchten Beispiel wurden alle Mutterbäume des Bestandes an den vier Genorten genotypisiert und für einige von ihnen wurden mit der gleichen Methode auch die Samen untersucht. Zu jedem Samen wurde dann der Pollenspender (passender väterliche Genotyp) bestimmt, der den Samen befruchtet hat.

Im folgenden sind die Pollenspender von zwei Samen-Mutterbäumen räumlich dargestellt:



Aus DOW and ASHLEY 1998

Legende: Gefüllt Rechtecke = *Q. macrocarpa*, leere Rechtecke = *Q. rubra*; Liniendicke: feinste Linie = 1 Befruchtung, dickste Linie = 9 Befruchtungen.

Mutterbaum 3E hatte 20, Baum 33W 18 Paarungspartner. Die höchste Anzahl Befruchtungen durch den selben Pollendonator lag bei 7 Befruchtungen für Baum 3E und 9 Befruchtungen für Baum 33W. Die Paarungspartner von Baum 3E waren zufällig verteilt, während bei Baum 33W eine deutliche Klumpung zu beobachten war. Paarungspartner von Baum 33W waren vor allem die Nachbarindividuen. In den Nachkommen von Baum 33W wurde ein reduzierter Heterozygotiegrad an drei der vier Genorte festgestellt, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Nachbarbäume unter sich eine gewisse Verwandtschaft aufweisen (vor allem bei schwersamigen Arten wie bei Eiche entstehen lokal Nachkommenschaften, die wenigstens die gleiche Mutter aufweisen). Durch Verwandtenpaarung passiert etwas ähnliches wie bei der Selbstbefruchtung, nämlich dass ein relativ grosser Anteil der Gameten an mehreren Genorten homozygot werden (Reduktion des Heterozygotiegrades). Baum 3E hatte 11 Befruchtungen von nahe stehenden Bäumen und 36 von Partnern, die mehr als 50 m entfernt waren. Baum 33W hingegen hatte 23 Befruchtungen von nahe stehenden, aber lediglich 11 von entfernt stehenden Bäumen. Bei Baum 33W ist zu beobachten, dass auch weit entfernt

stehende Bäume mehrere Befruchtungen beitragen können (dies hängt vermutlich mit einer guten Synchronisation der Blüte zusammen).

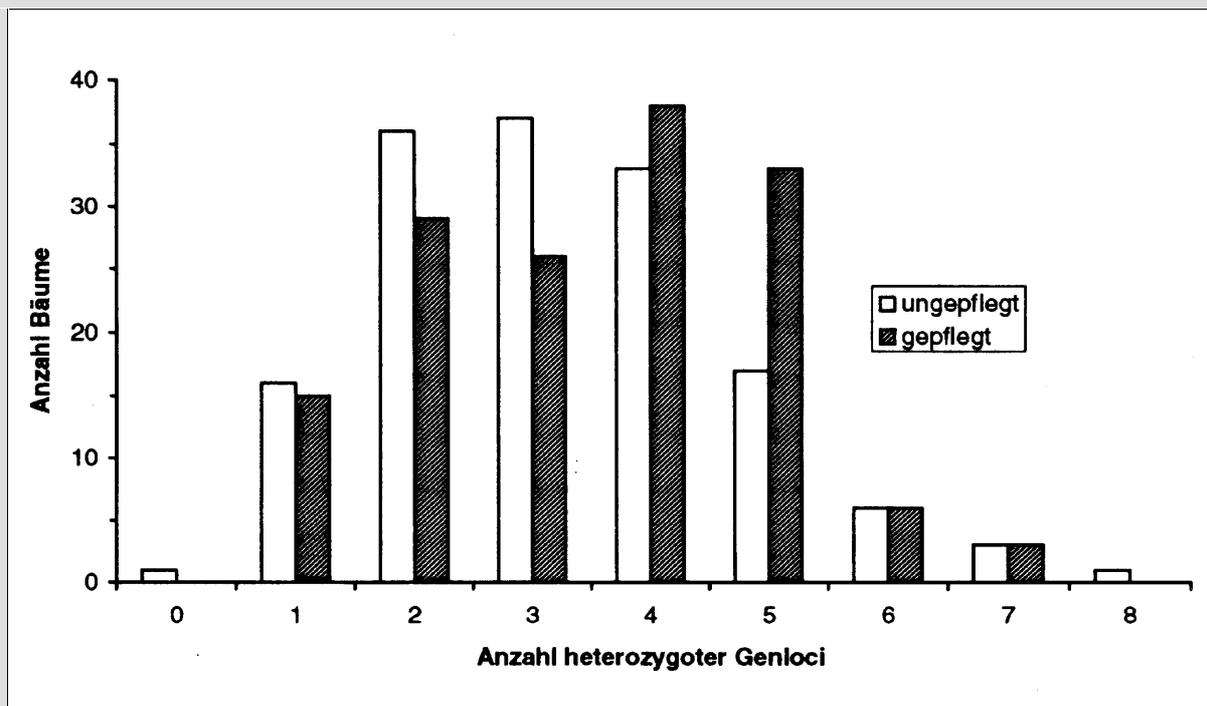
51 % der Befruchtungen von Baum 3E kamen von ausserhalb des Bestandes; bei Baum 33W waren es 58 % (nächste Bestände ca. 100 m entfernt). Entgegen der Erwartung zeigte ein Baum in der Mitte des Bestandes den höchsten Befruchtungsanteil von ausserhalb (63 %). Dies dürfte wiederum mit der Blühphänologie zusammenhängen.

4. Vergleich der genetischen Struktur natürlicher Populationen mit ausgewählten Teilkollektiven

- ⇒⇒ Vergleich gepflegter und ungepflegter Bestände
- ⇒⇒ Untersuchung von Plusbaumkollektiven in Samenplantagen
- ⇒⇒ Analyse der Repräsentativität der Plusbäume im Vergleich zur genetischen Struktur der Ausgangspopulation
- ⇒⇒ Analyse der genetischen Variation des produzierten Saatgutes in einer Samenplantage

Beispiel: Einfluss der Durchforstung auf die genetische Struktur von Buchenbeständen

In einem 60 jährigen Buchenbestand, dessen eine Hälfte in einem Bannwald liegt und die daher un- behandelt blieb, während die andere Hälfte normal durchforstet worden ist, wurde eine genetische In- ventur mit Isoenzym-Genmarkern durchgeführt, um allfällige Unterschiede in der genetischen Struktur zu quantifizieren. In Bezug auf die Anzahl Allele pro Genort, die Anzahl Genotypen und die Multilocus Diversität v_{gam} waren keine Unterschiede zwischen behandelt und unbehandelt zu beobachten. Hin- gegen fanden sich deutliche Unterschiede in Bezug auf den durchschnittlichen Heterozygotiegrad, der im gepflegten Bestand 9.2 % höher war als im ungepflegten Teil. Die Verteilung der individuellen He- terozygotiegrade zeigt im gepflegten Bestand eine deutliche Verschiebung hin zu höheren Werten:



Aus LAUBER, ROTACH, HUSSENDÖRFER 1997

Die höheren Heterozygotiegrade des gepflegten Bestandes sind wahrscheinlich eine Folge der waldbaulichen Eingriffe. Da sich die Auslese auf die vitalen, soziologisch herrschenden Bäume konzentriert, die normalerweise höhere Heterozygotiegrade aufweisen, sind diese Individuen in der gepflegten Fläche häufiger vertreten als in der ungepflegten. In der ungepflegten Fläche werden sich mit der Zeit die vitalsten und wuchskräftigsten (und heterozygotesten) Individuen natürlicherweise ebenfalls durchsetzen, so dass der Unterschied zum gepflegten Bestand im Laufe der Zeit verschwinden dürfte.

Beispiel: Untersuchung von Plusbäumen einer Elsbeer-Samenplantage

Für die Produktion von genetisch vielfältigem Nachzuchtmaterial mit guten Schaffformen wurden in der Nordostschweiz 89 besonders schöne Elsbeer-Plusbäume ausgelesen und Pfropfreiser dieser Bäume auf Unterlagen veredelt. Die vegetativ vermehrten Klone wurden anschliessend in eine Samenplantage gepflanzt, wo sie sich gegenseitig befruchten und das gewünschte Saatgut produzieren sollen. In diesem Zusammenhang interessierte die Frage, ob die ausgewählten Plusbäume den Genpool der Elsbeere in der Nordostschweiz genügend repräsentieren und ob die Plusbäume genetisch ausreichend vielfältig sind. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die Plusbäume mit Isoenzym-Genmarkern untersucht und mit 703 Elsbeeren aus der Nordostschweiz verglichen. Das Resultat war das folgende:

Kollektiv	Über alle untersuchten Individuen							Ohne Klone				
	N_{tot}	M	A/L	v	H_e	H_a	D_j	N_e	v	H_e	H_a	D_j
1	142	18	2,00	1.328	0,248	0,321	0,089	65	1.330	0,250	0,305	0,087
2	118	17	1,89	1.335	0,252	0,300	0,045	80	1.351	0,262	0,306	0,045
3	113	19	2,11	1.359	0,265	0,283	0,082	86	1.335	0,253	0,265	0,078
4	83	18	2,00	1.239	0,194	0,166	0,095	38	1.285	0,225	0,204	0,072
5	60	17	1,89	1.260	0,208	0,226	0,117	33	1.262	0,211	0,226	0,116
6	49	18	2,00	1.285	0,224	0,241	0,055	32	1.292	0,230	0,237	0,065
7	48	17	1,89	1.290	0,227	0,260	0,052	36	1.315	0,243	0,279	0,045
8	42	19	2,11	1.309	0,239	0,299	0,092	28	1.329	0,252	0,311	0,107
9	37	18	2,00	1.349	0,262	0,274	0,061	28	1.363	0,265	0,274	0,055
10	11	16	1,78	1.147	0,134	0,172	0,134	4	1.274	0,246	0,278	0,104
Mittelwert	-	17,7	1,97	1,290	0,225	0,254	0,082	-	1,314	0,244	0,269	0,077
Genpool	703	20	2,22	1.339	0,254	0,270	-	430	1.375	0,260	0,274	-
Plusbäume	89	20	2,22	1.365	0,269	0,273	0,027	89	1.365	0,269	0,273	0,027

Aus ROTACH (2000)

M : Anzahl Allele; A/L : Mittlere Anzahl Allele pro Genort; v : Diversität (Allele gewichtet mit ihrer Häufigkeit); H_e : erwarteter Heterozygotiegrad; H_a : mittlerer beobachteter Heterozygotiegrad; D_j : Differenzierung jedes Kollektives vom restlichen Kollektiv

Die 89 Plusbäume weisen die gleiche oder sogar eine höhere genetische Variation auf als der Gesamt-Genpool (vergleiche A/L, v und H_a). Sie repräsentieren den Genpool sehr gut, was am geringen genetischen Abstand von 0.027 (2,7 % Unterschied) zu ersehen ist. Mit lediglich 1/8 der gesamten Individuenzahl lässt sich also gleichwertiges Saatgut erzeugen, welches von allen 703 Individuen zusammen hervorgebracht würde. Zu bedenken ist aber, dass sich die 703 Individuen in Wirklichkeit nicht alle paaren können, weil sie über das gesamte Gebiet stark zerstreut vorkommen. In der Plantage hingegen herrschen optimale Voraussetzungen für die Paarung zwischen allen 89 Individuen.

5. Analyse der Entstehungsart

⇒⇒ Identifikation von Klonen und Verwandtschaften

Beispiel: Bestimmung des Anteils von Klonen in Elsbeerbeständen

Die Elsbeere verjüngt sich generativ und vegetativ durch Wurzelbrut. Zusammenstehende Individuen können daher aus verschiedene Genotypen bestehen oder aber sie sind erbgleiche Klone. Für die Gewinnung von Saatgut ist es wichtig, zu wissen, wie hoch der Anteil erbgleicher Individuen in einem Bestand ist, da bei einem hohen Anteil von Klonen kein Saatgut geerntet werden sollte, weil in diesem Fall hohe Inzuchtraten in den Nachkommen auftreten. Durch Paarung erbgleicher Individuen liegen in den Nachkommen mehr Genorte homozygot vor, so dass sich ungünstige, rezessive Allele im Phänotyp manifestieren, was zu erheblichen Auswirkungen führt (verminderte Wuchskraft, Vitalität etc.). Wenn ein heterozygotes Individuum mit dem Genotyp Ab (b sei das rezessive nachteilige Allele) sich mit sich selbst paart, so entstehen in den Nachkommen $\frac{1}{4}$ homozygote bb-Genotypen, welche die nachteilige Wirkung des rezessiven b-Alleles im Phänotyp zeigen. Da im Genom von Waldbäumen viele solcher negativer rezessiver Allele vorhanden sind, sind die Effekte von Inzucht bei Bäumen besonders gravierend.

Durch eine genetische Analyse mit Genmarkern lässt sich der Anteil von erbgleichen Klonen bestimmen. In den untersuchten Beständen wurden alle Elsbeeren eingemessen und auf einem Plan dargestellt. Anschliessend wurden alle Individuen mittels Isoenzym-Genmarkern analysiert und ihr Multilocus-Genotyp (Allelbesetzung an allen Genorten) bestimmt. Untersucht man genügend Genorte, so ist die Chance, dass nicht-klonale Individuen den gleichen Multilocus-Genotyp aufweisen (die gleiche Kombination von Allelen an allen Genorten) verschwindend gering. Haben Individuen den gleichen Multilocus-Genotyp, stehen sie näher als 10 m zueinander und kommt kein anderer Genotyp dazwischen vor, so lässt sich also annehmen, dass die beiden Individuen aus Wurzelbrut des gleichen Mutterbaumes hervorgegangen sind. Mit diesem methodischen Vorgehen wurden in 10 untersuchten Elsbeer-Kollektiven die folgenden Resultate gewonnen:

Popu- lation	Anzahl Individuen	Anzahl verschiedener Multilocus- Genotypen	Anzahl bestimmter Klone	Anzahl Individuen, die Klone bilden	Anzahl vermeintlich unterschiedlicher Genotypen	in % der Indivi- duen
1	142	53	30	107	65	45.8
2	48	35	6	18	36	75.0
3	118	71	15	53	80	67.8
4	113	73	16	43	86	76.1
5	60	29	10	37	33	55.0
6	49	26	8	25	32	65.3
7	83	36	14	59	38	45.8
8	42	25	7	21	28	66.7
9	11	4	1	8	4	36.4
10	37	27	4	13	28	75.7
Total	703		111	384	430	61.2

Aus MENN 1998

Beispiel: Population No. 1 besteht aus 142 Individuen, wovon 53 einen verschiedenen Multilocus-Genotypen aufwiesen. Aufgrund der räumlichen Anordnung und des gleichen Multilocus-Genotyps konnten 30 vermutlich aus Wurzelbrut entstandene Klone mit zusammen 107 Individuen bestimmt werden. Daraus ergibt sich, dass das Kollektiv lediglich aus 65 unterschiedlichen Genotypen besteht (142-107+30; dreissig werden addiert, weil die dreissig Klone einen verschiedenen Multilocus-Genotyp aufweisen). Nimmt man an, dass ein durch Wurzelbrut entstandener Klon aus einem Mutterbaum und seinen Sprösslingen besteht, so ergibt sich, dass 40 % aller vorhandener Individuen aus Wurzelbrut entstanden sind. Eher wahrscheinlicher in diesem älteren Bestand ist allerdings, dass die ursprünglichen Mutterbäume nicht mehr vorhanden sind. In diesem Fall ergibt sich dass 384 Individuen oder 55 % vegetativen Ursprungs sind. Es scheint daher nicht ratsam, Saatgut in diesen Beständen zu ernten, da hohe Inzuchtraten erwartet werden müssen.

Basisverfahren für den Einsatz von biochemischen und molekulargenetischen Markern

Folgende Basisverfahren werden für die Entwicklung von Genmarkern eingesetzt:

- Elektrophorese
- Schneiden der DNS mit Restriktionsenzymen
- DNS Denaturierung und Hybridisierung
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Sequenzierung von DNS Abschnitten

Elektrophorese

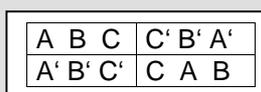
Die Elektrophorese ist ein **Verfahren zur Trennung von Molekülen** mit unterschiedlicher Nettoladung und Molekülgröße. Man bringt dazu die zu untersuchenden Substanzen wie beispielsweise Enzyme auf ein Gel (Medium bspw. aus Stärke, Agarose oder Polyacryl), in welchem die Substanzen in einem elektrischen Feld je nach Ladung und Molekülgröße verschieden weit wandern. Die Substanzen lassen sich so auftrennen bzw. unterscheiden. Eine Elektrophoreseapparatur ist schematisch in Teil B abgebildet.

Schneiden der DNS mit Restriktionsenzymen

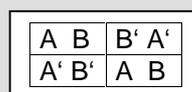
Das Erkennen genetischer Variation auf der Ebene der DNS ist möglich durch die Verwendung bestimmter Enzyme aus Bakterien. Diese Enzyme dienen den Bakterien zur Abwehr von Infektionen, indem sie eingedrungene, fremde DNS (z.B. von Bakteriophagen) durch zerschneiden unschädlich machen können. Die Entdeckung und Identifikation dieser **Restriktionsenzyme** (auch **Endonukleasen** genannt) war ein wichtiger Schritt in der Molekulargenetik, weil sie ein wichtiges Werkzeug für die Identifizierung von Genen sind. Restriktionsenzyme zerschneiden die DNS nicht wahllos, sondern an ganz bestimmten Stellen. Jedes Restriktionsenzym erkennt dabei ganz spezifische Sequenzen, die normalerweise 4 bis 6 Basenpaare lang sind. An diesen Stellen schneiden die Restriktionsenzyme die Doppelhelix vollständig durch. Je nach der Art der Schnittstelle unterscheidet man verschiedene Typen von Restriktionsenzymen. Die Typ I Enzyme schneiden die DNS an der jeweiligen Nukleotidsequenz „glatt“ durch d.h. die beiden Stränge werden an homologen Stellen durchtrennt. Die Typ II Enzyme hingegen schneiden die Einzelstränge an versetzten Stellen durch, so dass Teilstücke mit verschiedenen langen Enden entstehen. Nachfolgend sind Schnittart und einige Beispiele erläutert:

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Basensequenzen. In der Regel handelt es sich dabei um symmetrische Sequenzen in der Form:

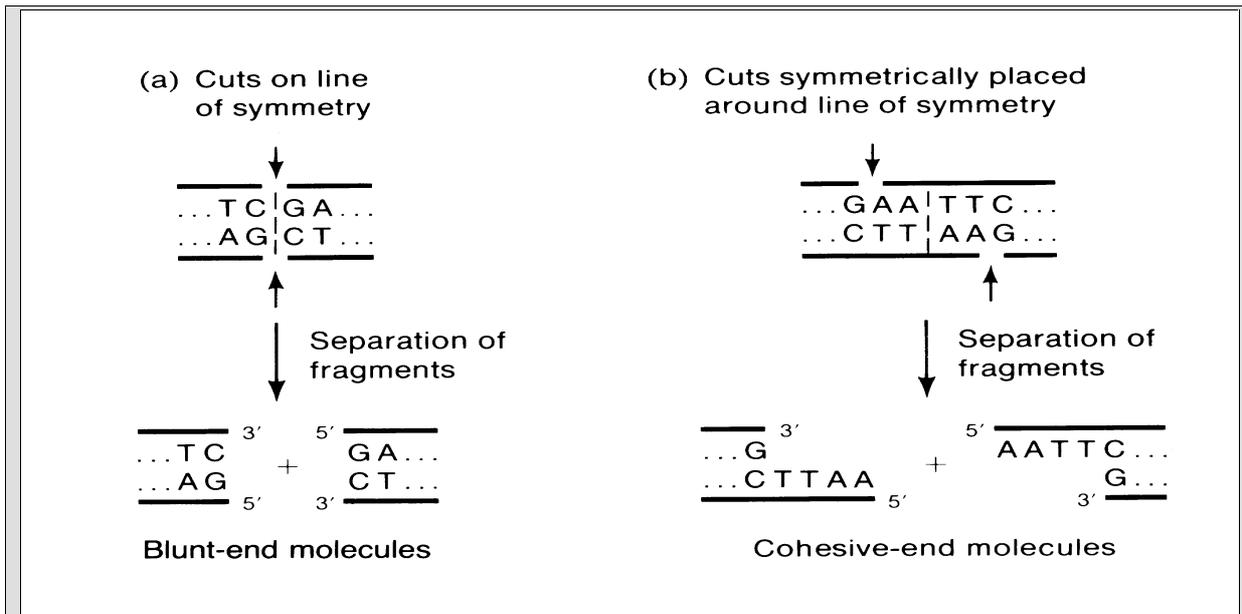


oder



Die Buchstaben stehen für eine Base, der ' steht für eine komplementäre Base, der Strich bezeichnet die Symmetrie-Achse

Beispiele von Restriktionsenzymen und ihre Schnittarten sind auf der folgenden Seite dargestellt:



Aus HARTEL et al. 1987

Beispiele von Endonukleasen:

Schneidetyp	Enzym-Kurzbezeichnung	isoliert aus Bakterium	Nukleotidsequenz und Spaltstelle
Typ I	Hae III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	-G-G- -C-C- -C-C- -G-G-
Typ I	Hind II	<i>Haemophilus influenzae</i>	-G-T-T- -A-A-C- -C-A-A- -T-T-G-
Typ II	Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i>	-A- -A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A- -A-
Typ II	Eco RI	<i>Escherichia coli</i>	-G- -A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A- -G-
Typ II	Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-G- -G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G- -G-

Aus HATTEMER et al. 1993

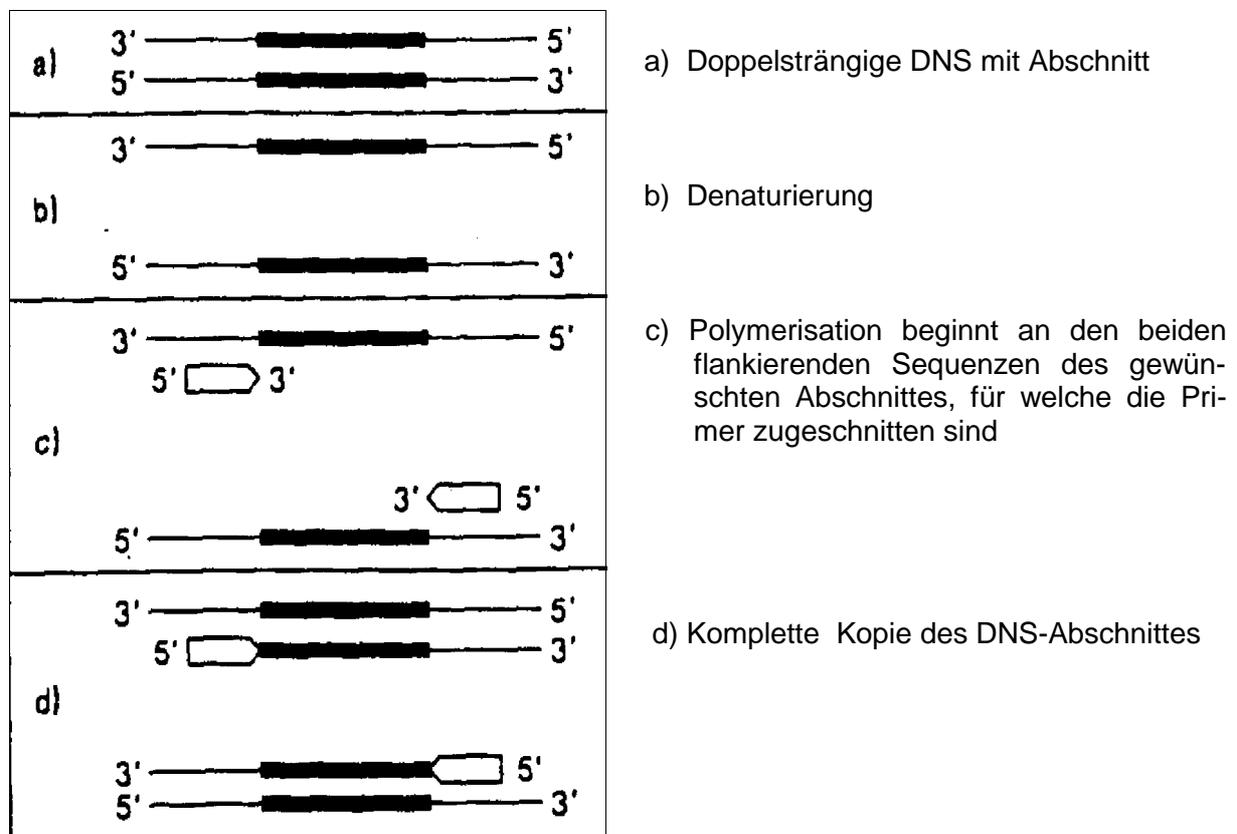
Denaturierung und Hybridisierung der DNS

Bei hohen Temperaturen und hohem PH-Wert trennen sich die Doppelstränge der DNS in Einzelstränge auf, weil sich die Wasserstoffbrücken lösen, was man **Denaturierung** nennt. Bei Senkung der Temperatur oder des PH-Wertes kommt es zur Wiederanlagerung der Einzelstränge durch komplementäre Basenpaarung, was man **Hybridisierung** nennt. Je nach Versuchsbedingungen erfolgt die Basenpaarung fehlerfrei (hohe Stringenz) oder aber die Sequenzen stimmen nur zum Teil überein (niedere Stringenz). Für die Hybridisierung können Proben mit klar definierten Sequenzen verwendet werden (Sequenz eines bekannten Gens), um den entsprechenden Abschnitte auf der DNS aufzuspüren und zu markieren (Genson-

den). Die Markierung geschieht beispielsweise indem die zugegebene Sequenz radioaktiv markierte Nukleotide enthält, die auf Film sichtbar gemacht werden können. Alternativ lässt sich die Sequenz durch Anfärben mit Ethidiumbromid und Betrachten unter UV-Licht sichtbar machen.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: Polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vermehrung (Amplifikation) von bestimmten DNS-Sequenzen. Dadurch lassen sich unzählige Kopien eines bestimmten Abschnittes herstellen und später untersuchen oder weiterverwenden. Das Prinzip ist einfach. Es basiert auf der Funktion der DNS-Polymerase, welche fähig ist, von einer DNS-Vorlage ein identisches DNS-Stück zu synthetisieren. Weil die neu synthetisierten Stücke immer wieder als Vorlage für eine weitere Runde der Synthese dienen, nimmt die Menge des amplifizierten DNS-Abschnittes exponentiell zu. Selbst wenn man nur mit einem einzigen DNS Molekül beginnt, lassen sich messbare Mengen (bis zu 10^7 Kopien) des gewünschten Abschnittes innerhalb von Stunden produzieren. Die Amplifikation bestimmter Abschnitte der DNS ist möglich durch die Herstellung und Verwendung spezifischer Nukleotidsequenzen (sogenannte "Primers"), welche mit den beiden flankierenden Seiten (Anfang und Ende) des gewünschten Abschnittes übereinstimmen. Primers sind einsträngige DNS Abschnitte mit 10 bis 20 Nukleotidsequenzen, welche durch ihr Übereinstimmen mit den flankierenden Sequenzen den Start- und Endpunkt des zu amplifizierenden Abschnittes bestimmen, so dass die Polymerase nur gerade diesen gezielten Abschnitt vervielfältigt. Es lassen sich jedoch auch Primers verwenden, die nicht gezielt auf einen bestimmten DNS-Abschnitt zugeschnitten sind. Das Amplifikationsprodukt ist in diesem Fall jedoch nicht bekannt, weil die Primers überall dort ansetzen und die Amplifikation ermöglichen, wo sie eine komplementäre Sequenz finden (zufällige Primers).

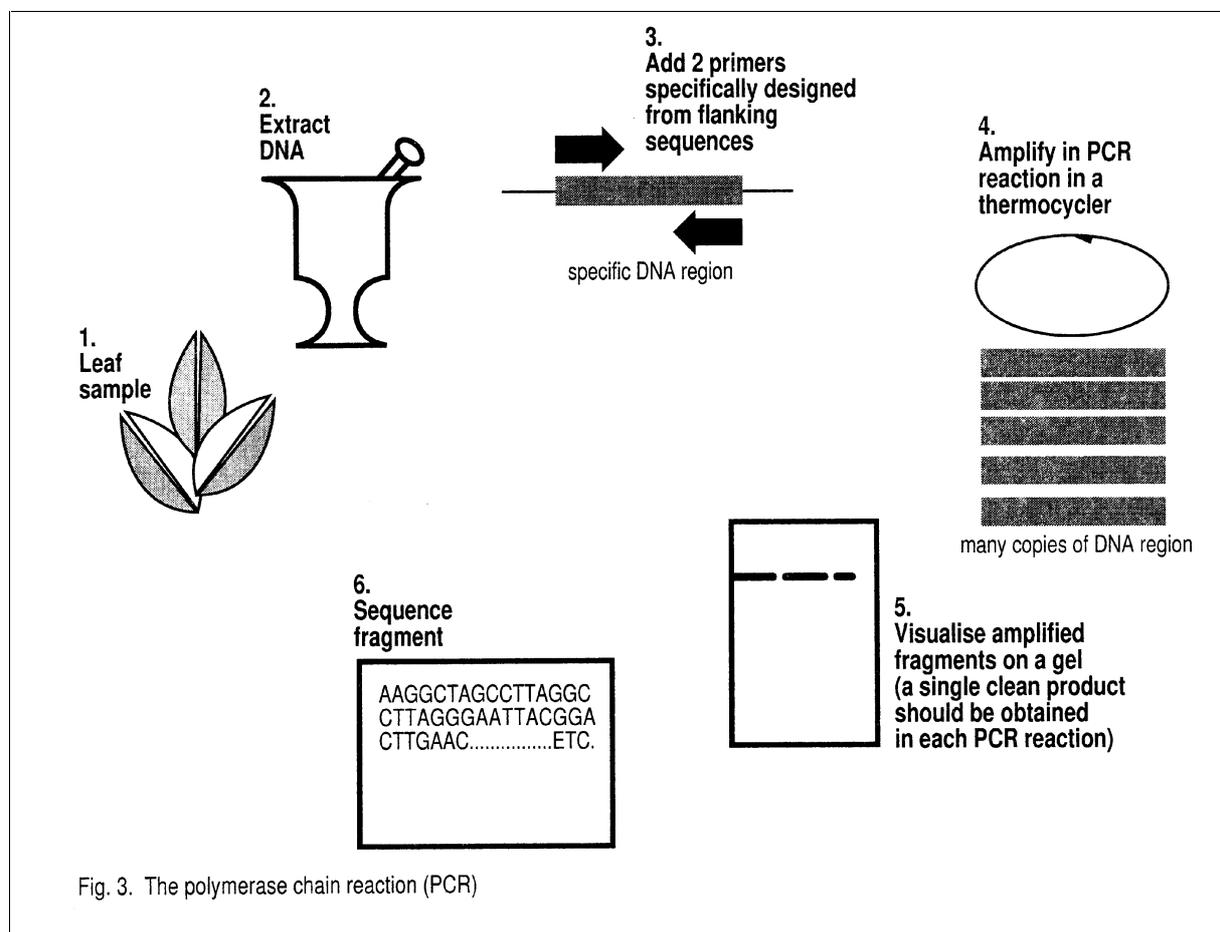


AUS HERRMANN UND HERRMANN 1992

Die Polymerase-Kettenreaktion läuft wie folgt ab:

- Extraktion von doppelsträngiger DNS aus den Zellen
- Denaturierung des Doppelstranges
- Zugabe von
 - DNS- Polymerase
 - Primer im Überschuss
 - Nukleotide im Überschuss
- Abkühlung und Hybridisierung der einsträngigen DNS mit den Primer-Sequenzen (d.h. die Polymerase vervollständigt die Sequenz zwischen den Primern)

Der Zyklus wird durch abwechslungsweise Erwärmen (denaturieren) und Abkühlen (polymerisieren) vielfach wiederholt. Dafür stehen heute Geräte zur Verfügung, welche solche thermischen Zyklen vollautomatisch durchführen. Ein Ablauf-Schema der PCR ist auf der folgenden Seite dargestellt:



Aus KARP et al. 1997

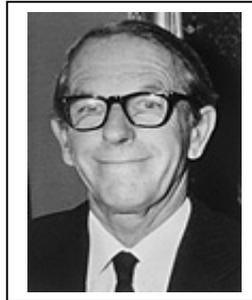
Sequenzierung von DNS Abschnitten

Die Bestimmung der Basensequenzen der DNS bildet die Grundlage, um Gene zu lokalisieren resp. um verschiedene Mutationen zu erkennen, die für bestimmte Merkmale wie bspw. Krankheiten verantwortlich sind. Sequenzierung ist zudem ein wichtiger Schritt im Prozess der Übertagung von Genen (genetic engineering). Wie jedoch lassen sich die Basensequenzen auf dem DNS bestimmen? Es gibt zwei verschiedenen Methoden, von denen

heute allerdings vorwiegend noch eine gebräuchlich ist. Die erste Methode wurde 1977 von Allan Maxam und Walter Gilbert entwickelt, die zweite etwa zur gleichen Zeit von Fred Sanger, wofür Gilbert und Sanger 1980 den Nobelpreis für Medizin erhielten.



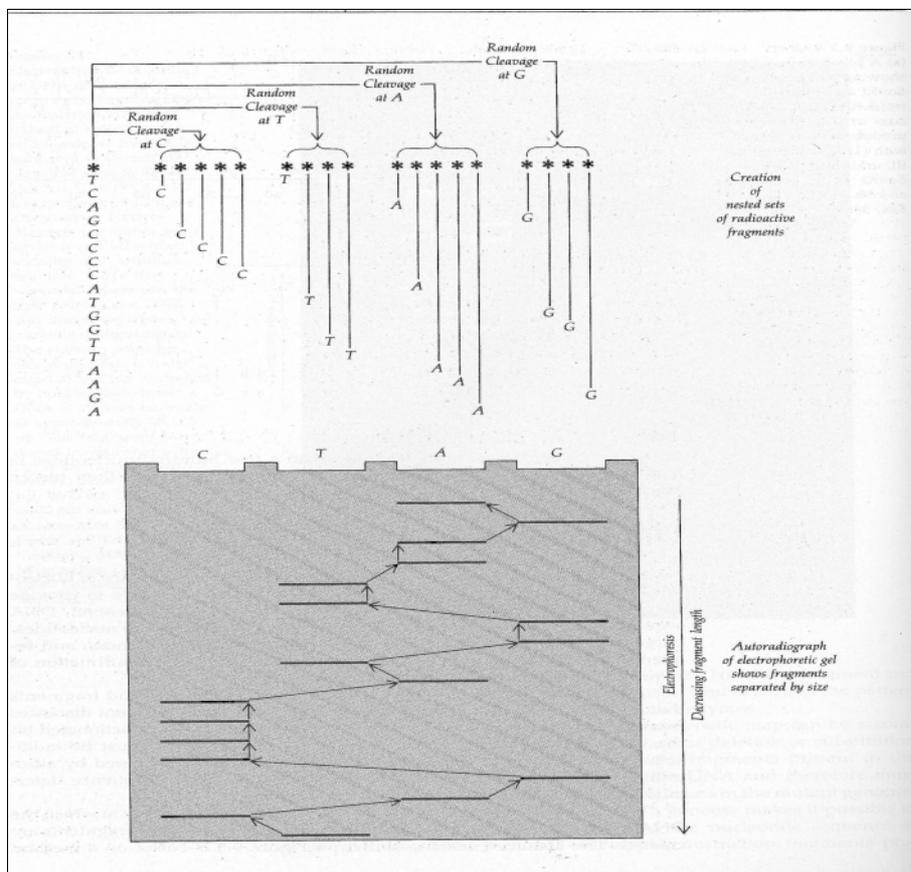
Walter Gilbert
USA



Fred Sanger
UK

Die Maxam-Gilbert Methode

Ein Restriktionsfragment wird isoliert und am 5'-Ende mit radioaktivem Phosphor markiert und die beiden Stränge getrennt. Das gleiche Fragmente resp. viele Kopien davon (PCR) werden in vier getrennten Reaktionen mit Chemikalien in der Weise degradiert, dass in der ersten Reaktion der DNS Strang zufällig an C-Basen, in der zweiten an T-Basen, in der dritten an A-Basen und in der vierten an G-Basen getrennt (zerschnitten) wird. Dadurch, dass die Trennung (cleavage) zufällig an verschiedenen Stellen der unterschiedlichen Fragmente erfolgt, ergeben sich so unterschiedlich lange DNS Stücke, die alle am 5'-Ende radioaktiv markiert sind und am 3'-Ende immer mit der gleichen Base aufhören. Diese Fragmente werden dann für jede der vier Reaktionen getrennt auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Position jedes Fragmentes lässt sich dann, da es radioaktiv markiert ist, auf einem Röntgenfilm sichtbar machen. Die Methode ist im folgenden anschaulich dargestellt:



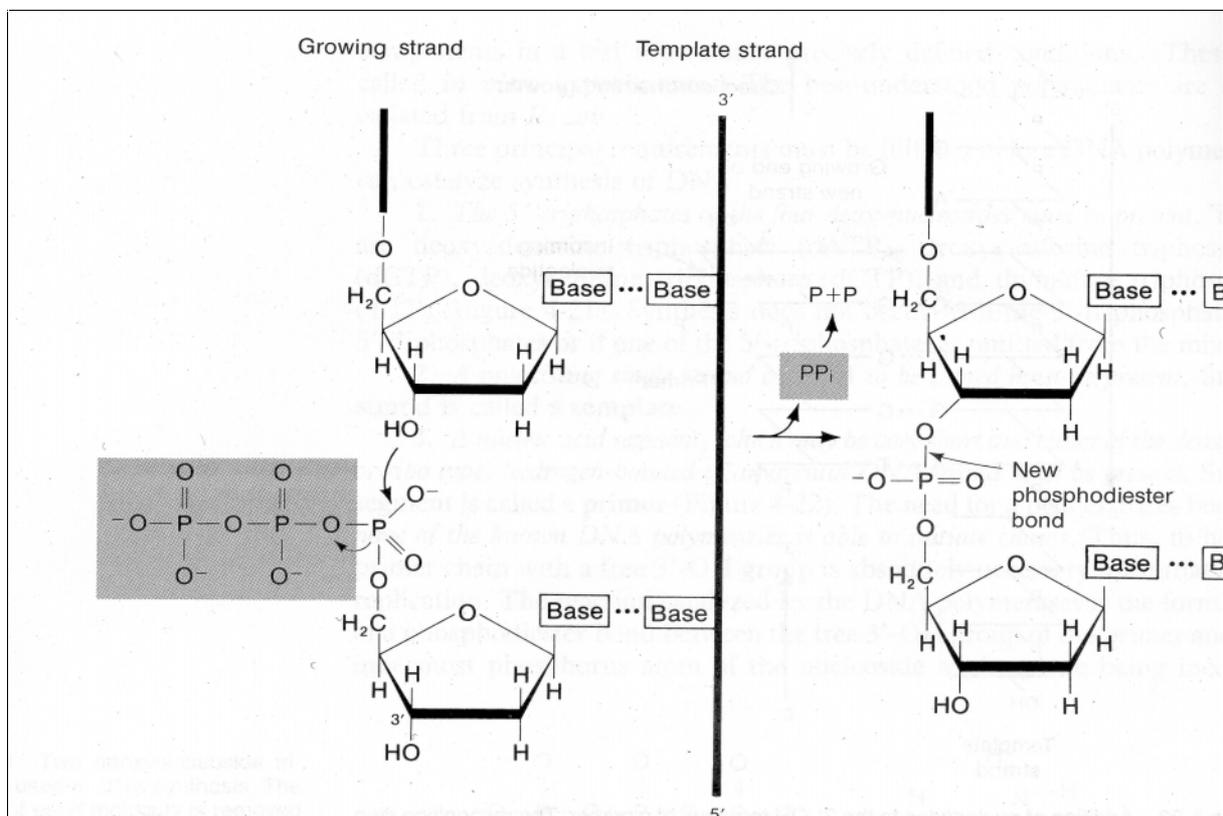
Die Sequenz liest sich von unten nach oben, beginnend beim untersten Band (T) und dann den Pfeilen folgend, also T - C - A - G

Aus AYALA and KIGER 1988

Die Sanger Methode (dideoxy method, chain termination method)

Die Methode basiert auf zwei Eigenschaften der DNS Synthese:

1. Wenn eine Einzelstrang Vorlage (ein bestimmter Abschnitt des DNS) mit den 4 Deoxy-Nukleotiden (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), einem Primer, der mit einer Sequenz zu Beginn der Vorlage hybridisiert und mit DNS-Polymerase zusammengegeben werden, dann synthetisiert die DNS-Polymerase vom Primer weg einen zur Vorlage komplementären DNS Strang (PCR – Methode)
2. Wenn neben den normalen Deoxy-Nukleotiden auch einige Dideoxy-Nukleotide hinzugefügt werden (*di* dATP etc.), dann bricht die Synthese des Komplementärstranges ab, sobald ein solches Dideoxy-Nukleotid eingebaut wird, weil diesem Nukleotid an der 3' Position eine OH-Gruppe fehlt, die nötig ist, um die Verbindung zum nächsten Nukleotid herzustellen. Der normale Vorgang bei der Verbindung der Nukleotide (Phosphodiesterbond), wie nachstehend illustriert, funktioniert nicht mehr, weil den Dideoxy-Nukleotiden die OH-Gruppe fehlt. Die Sanger Methode wird auch „chain termination method“ genannt, weil die Synthese immer dann abbricht, wenn ein Dideoxy-Nukleotid eingebaut wird.

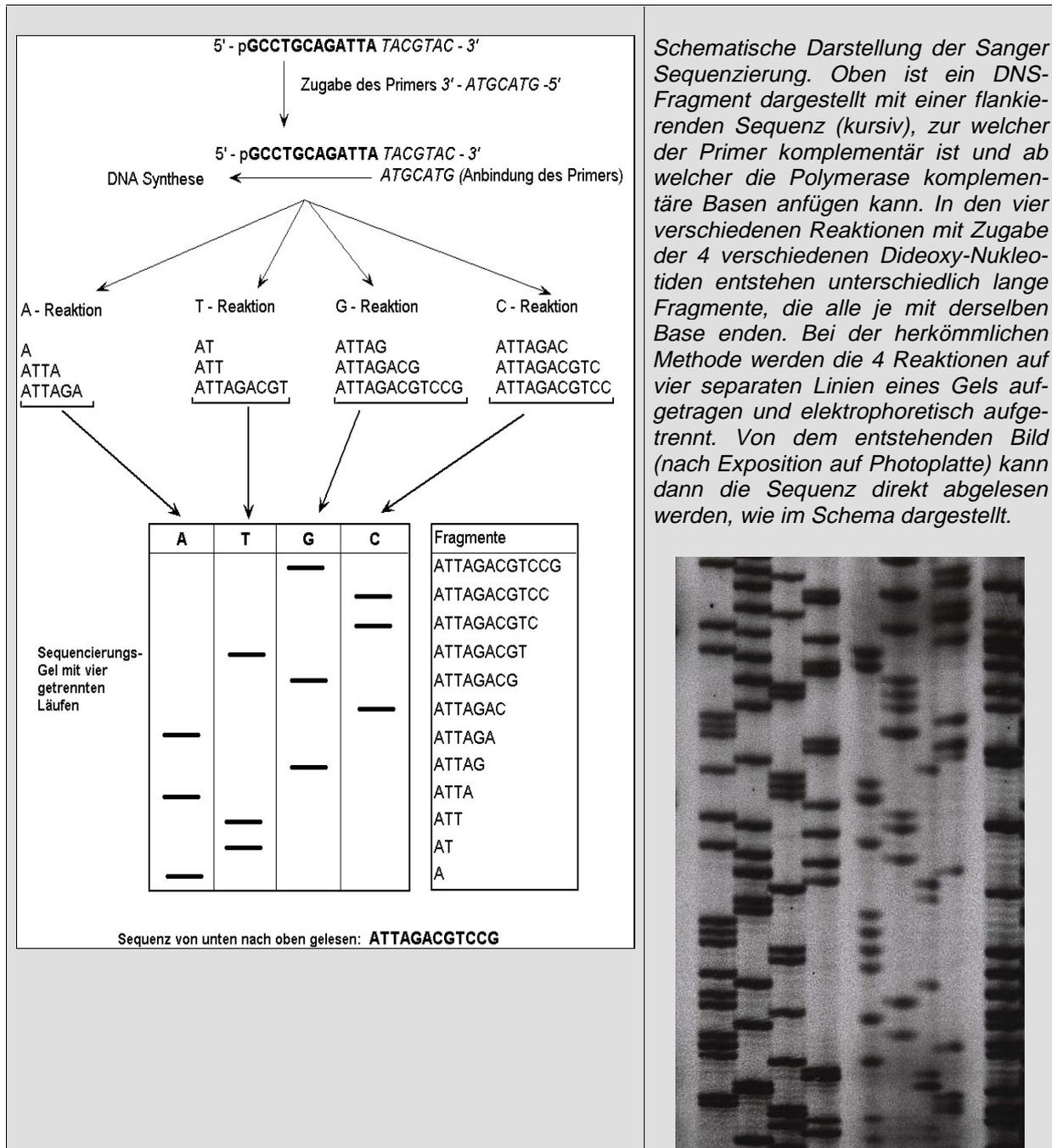


Aus HARTL et al. 1988

Bei der Sanger Methode werden bei der klassischen Methode vier verschiedene Reaktionsgefäße verwendet, die folgende Komponenten enthalten:

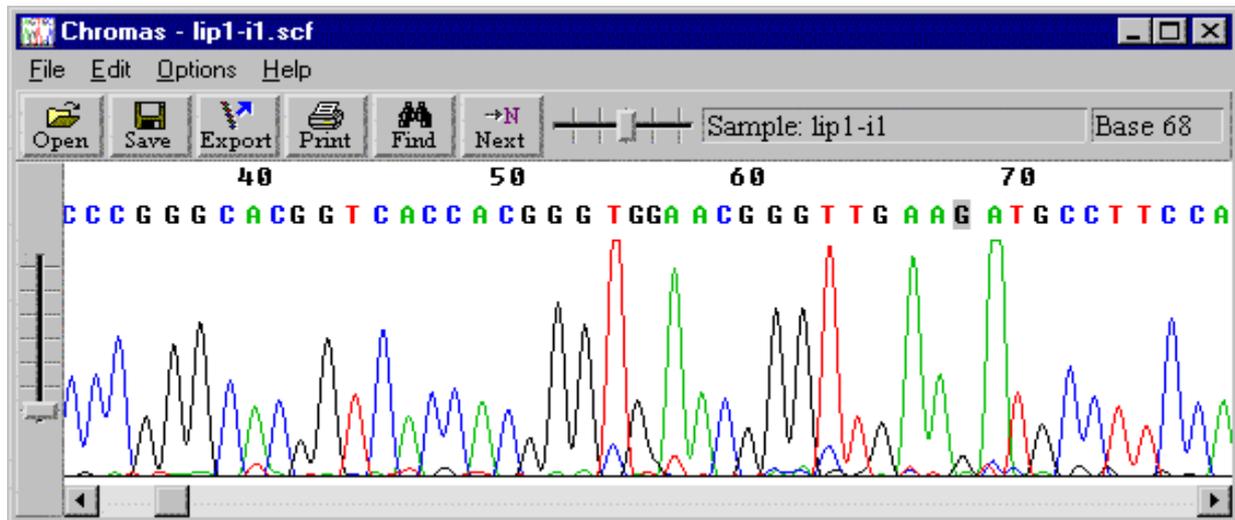
1. Das DNS Fragment, welches sequenziert werden soll
2. eine Primer-Sequenz, die zu den Anfangssequenzen des Abschnittes komplementär ist
3. DNS-Polymerase
4. alle vier normalen Nucleotide im Überschuss
5. je Gefäß ein markiertes (radioaktiv oder mit fluoreszenten Markern) Dideoxy-Nucleotid d.h. für die A-Reaktion *di* dATP, für die T-Reaktion *di* dTTP, für die G-Reaktion *di* dGTP und für die C-Reaktion *di* dCTP im Verhältnis 1 auf 100 normale Nucleotide

Der Einbau dieser Dideoxy-Nukleotide während der Polymerisation erfolgt nun rein zufällig, was zur Folge hat, dass die Synthese zufällig d.h. an verschiedensten Stellen abbricht, sobald ein solches Nukleotid eingebaut wird. Dadurch entstehen bei der Polymerisation Fragmente von unterschiedlichen Längen, die im selben Reaktionsgefäß alle mit derselben Base aufhören (in der A-Reaktion alle mit A, in der T-Reaktion alle mit T usw.). Nachdem die Fragmente von der Vorlage durch Denaturieren getrennt worden sind, können sie - separat je Reaktion - auf einem Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Photoplatte (radioaktiver Label!) sichtbar gemacht werden. Von dieser Platte kann die Sequenz direkt gelesen werden. Die folgenden Darstellung illustriert die Methode schematisch:



Heute werden automatische „Sequencer“ verwendet, in denen die Reaktion nicht mehr in vier verschiedenen Gefäßen, sondern in einer einzigen Reaktion durchgeführt werden kann,

weil die vier Dideoxy-Nukleotide nicht mehr mit einem radioaktiven Label sondern mit vier verschiedenen farbigen Fluoreszenzmarkern markiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung wird zudem nicht mehr mit Hilfe eines Gels, sondern mittels einer Glaskapillare durchgeführt, was viel schneller geht. Weil die 4 Dideoxy-Nukleotide mit vier verschiedenen Fluoreszenzmarkern versehen sind, können alle vier Reaktionen in der gleichen Kapillare aufgetrennt werden. Ein Laser induziert die Fluoreszenz und erfasst das Erscheinen der Farblabels (Peaks) am Beginn der Kapillare; Computerprogramme zeichnen diese Sequenzen auf und übersetzen sie in die Basenabfolge wie folgendes Beispiel illustriert:



Die *di* dCTP sind blau gelabelt, die *di* dGTP schwarz, die *di* dTTP rot und die *di* dATP grün, so dass an der Abfolge der farbigen „peaks“ die Abfolge der Basen direkt bestimmt werden kann. Die Möglichkeit zu dieser Automatisierung ist der Grund, weshalb sich die Sanger Methode durchgesetzt hat.

Isoenzyme als Genmarker

Isoenzyme sind strukturell verschiedene Molekülformen eines Enzyms mit gleicher oder ähnlicher katalytischer Funktion im Stoffwechsel. Als **Alloenzyme** bezeichnet man Isoenzyme, die durch verschiedene Allele eines Genortes kodiert werden. Der Nachweis von Isoenzymen erfolgt mittels Auftrennung in einem elektrischen Feld (**Elektrophorese**) und anschließender Sichtbarmachung durch Anfärben (spezifische chemische Reaktion mit dem Enzym, die zu einer Farbveränderung führt und den Ort des Enzyms auf dem Gel sichtbar macht). Auf diese Weise entstehen Bandenmuster oder sogenannte **Zymogramme**. Die quartäre Struktur der Polypeptide entscheidet über die Anzahl Bandenmuster bei heterozygoten Individuen.

Vorteile von Isoenzymen:

- Sie sind unabhängig von der Umwelt
- Sie sind meist kodominant vererbt d.h. heterozygote Individuen lassen sich erkennen
- Sie haben gleiche Ausprägung in verschiedenen Entwicklungsstadien
- Sie zeigen relativ viel Variation innerhalb von Baumpopulationen
- Für ihre Untersuchung reichen kleine Gewebeproben
- Sie sind relativ einfach, schnell, billig und routinemässig zu erheben und eignen sich für die Beprobung grosser Probenmengen (Serienuntersuchungen)

Zwei heute gebräuchliche DNS – Genmarker

- **Restriktionslängen-Polymorphismen** (RFLP = restriction fragment length polymorphism)
- **Mikrosatelliten-Polymorphismen** (SSRP = simple sequence repeat polymorphism)

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl verwandter, ähnlicher molekulargenetischer Techniken, die alle die genannten Basistechniken (Elektrophorese, Denaturierung, Hybridisierung, Restriktionsenzyme und PCR) anwenden. Hier sollen nur die beiden oben genannten Techniken kurz vorgestellt werden.

Restriktionslängen-Polymorphismen (RFLP)

Methode:

- Extraktion der DNS
- Schneiden mit Restriktionsenzymen
- Trennen der DNS-Fragmente nach ihrer Molekülgröße mittels Elektrophorese
- Denaturierung der DNS
- Übertragung auf einen Filter (Blotting)
- Hybridisierung mit markierten (z.B. radioaktive Nukleotide) DNS-Proben (Gensonden)
- Sichtbarmachung durch Film oder unter UV-Licht

Mit der RFLP-Technik lässt sich genetische Variation quantifizieren resp. Mutationen der DNS feststellen. Das nachfolgende Beispiel soll illustrieren, wie Mutationen erkannt werden können:

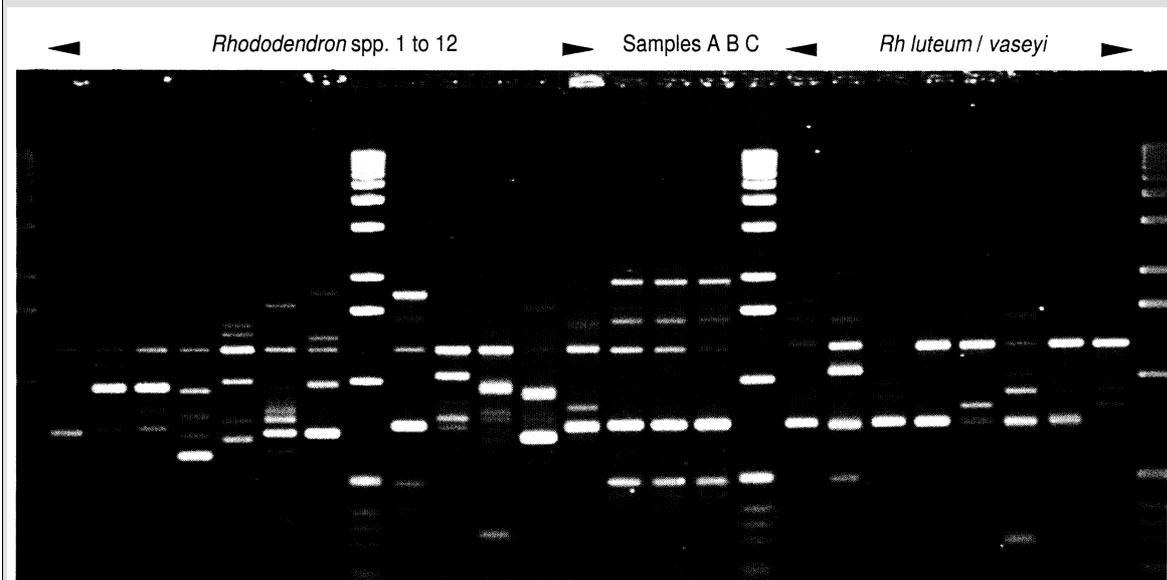
Interpretation of results

■ Target site for probe
 ✂ Restriction site
 ▼ Insertion

- 1: Ursprünglicher Typ
- 2: Eine Mutation innerhalb des untersuchten Abschnittes hat zu einer neuen Restriktionsstelle geführt. Die Restriktionsenzyme schneiden daher auch innerhalb des Abschnittes, so dass zwei Stücke (Bänder) erscheinen
- 3: Eine Mutation innerhalb des flankierenden Bereiches führt zu einem Schnitt bevor das Ende erreicht ist und deshalb zu einem kürzeren Stück
- 4: Insertion einer DNS-Sequenz innerhalb des flankierenden Bereiches führt zu einem längeren Stück
- 5: Deletion einer DNS-Sequenz innerhalb des flankierenden Bereiches führt zu einem kürzeren Stück
- 6: Eine der flankierenden Restriktionsstellen ist durch Mutation oder Deletion verloren gegangen, so dass das Restriktionsfragment fehlt

Aus FORD-LLOYD and PAINTING 1996

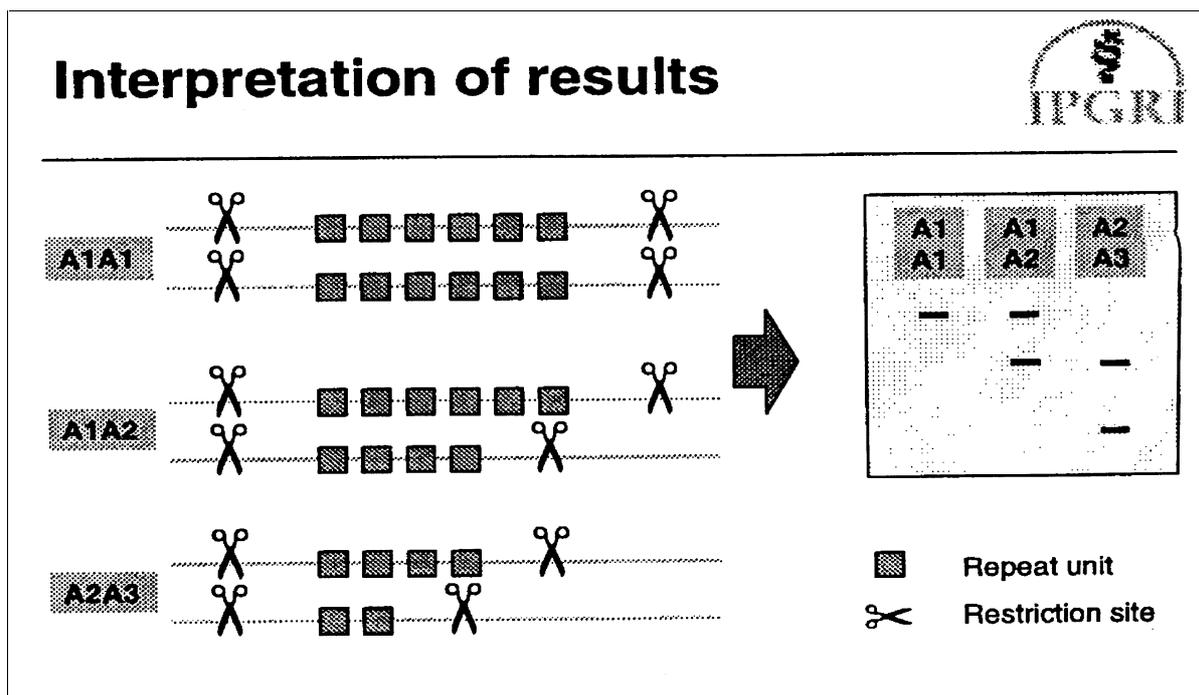
Beispiel eines Zymogramms:



Aus KARP et al. 1997

Mikrosatelliten-Polymorphismen (SSRP)

Eingestreut in das Genom der höheren Organismen finden sich Abschnitte mit hoch repetitiven DNS-Sequenzen. Es gibt zwei Klassen solcher repetitiver Sequenzen: **Mikrosatelliten** (oder einfach wiederholte Sequenzen = SSR's) bei denen die wiederholte Einheit zwischen 2 bis 8 Basenpaare lang ist und **Minisatelliten**, bei denen die wiederholten Einheiten länger sind (16 bis 100 Basenpaare). Diese repetitiven Sequenzen sind hoch variabel. Die Variation ist vor allem auf Unterschiede in der Anzahl Wiederholungen der Grundeinheiten zurückzuführen. Mikrosatelliten sind kodominante Genmarker d.h. es lassen sich heterozygote Zustände feststellen wie im folgenden Beispiel zu sehen ist:



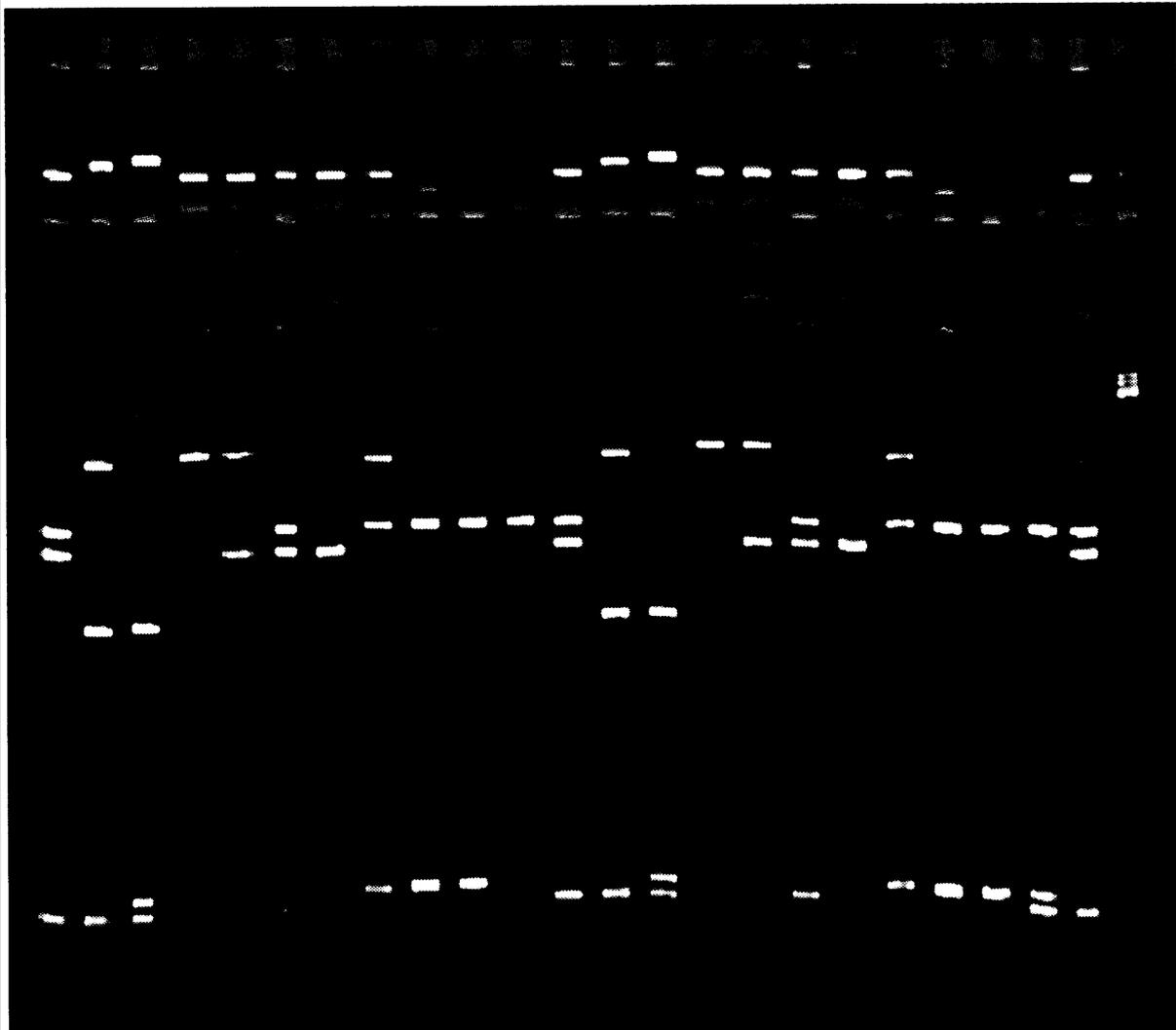
Aus KARP et al. 1997

Dank der hohen Variation von Mikrosatelliten (bis zu 32 Allele pro Locus) können diese Marker sehr gut für Elternschaftsanalysen verwendet werden (*siehe unter den Beispielen: Q. macrocarpa*). Der Einsatz von Mikrosatelliten verlangt jedoch einen hohen Entwicklungsaufwand, weil zunächst die Primer entwickelt werden müssen, was sehr arbeitsintensiv ist. Erschwerend kommt hinzu, dass diese Primer nicht universell eingesetzt werden können, sondern für jede Art eigens entwickelt werden müssen. Das Verfahren ist zudem teuer und eignet sich noch nicht für Serienuntersuchungen.

Methode:

- Extraktion der DNS
- Polymerase-Kettenreaktion unter Zugabe von spezifischen Primern, die nichtkodierende, hochrepetitive Sequenzen flankieren
- Elektrophorese und Anfärben der PCR-Produkte mit Ethidiumbromid
- Fotografie unter UV-Licht

Beispiel eines Zymogramms:



Aus KARP et al. 1997