

Forschungsbericht

Nr. 129

Fruchtbarkeitsforschung: Untersuchung von Markergenen bei Ebern auf deren Beitrag zur männlichen Fruchtbarkeit

Projektleitung: Prof. Dr. K. Schellander

Projektbearbeitung: PD Dr. K. Wimmers,
PD Dr. S. Ponsuksili
Dr. E. Tholen
Dr. D. Jennen
Dr. C. Lin

Institut für Tierwissenschaften
Professur für Tierzucht und Tierhaltung

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228/73 2285; Fax.: 0228/73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, August 2005

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. Karl Schellander

Projektbearbeitung: PD Dr. Klaus Wimmers,
PD Dr. Siriluck Ponsuksili
Dr. agr. Ernst Tholen
Dr. Danyel Jennen
Dr. Cailu Lin

Institut für Tierwissenschaften
Professur für Tierzucht und Tierhaltung
Endenicher Allee, 53115 Bonn
Tel.: 0228/73 9328; Fax.: 0228/73 2284

Kooperation: Besamungsstation Ascheberg, GFS
Zum Pöpping 29, 59387 Ascheberg
Tel.: 02593/913 21; Fax.: 02593/913 50

Zitiervorschlag:

JENNEN, D.; LIN, C.; PONSUKSILI, S.; THOLEN, E.; WIMMERS, K. UND K. SCHELLANDER (2005): Fruchtbarkeitsforschung: Untersuchung von Markergenen bei Ebern auf deren Beitrag zur männlichen Fruchtbarkeit. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, Nr. 129, 71 Seiten.

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Problemstellung/Wissensstand | 1 |
| 1.1.1 | Reproduktive Physiologie des Ebers | 2 |
| 1.1.2 | Molekulargenetischer Ansatz zur Verbesserung der Eberreproduktion | 3 |
| 1.1.3 | Kandidatengenanalyse | 6 |
| 1.2 | Zielstellung | 9 |
| 2 | Material und Methoden | 11 |
| 2.1 | Material | 11 |
| 2.1.1 | Tiermaterial | 11 |
| 2.1.2 | Phänotypen | 11 |
| 2.2 | Methoden | 11 |
| 2.2.1 | DNA Isolierung aus Sperma | 11 |
| 2.2.2 | Primer Design | 12 |
| 2.2.3 | Polymerasekettenreaktion | 12 |
| 2.2.4 | Sequenzierung der PCR Fragmente | 13 |
| 2.2.4.1 | PCR Produkt Reinigung | 13 |
| 2.2.4.2 | Ligation | 13 |
| 2.2.4.3 | Transformation | 13 |
| 2.2.4.4 | Screening auf Transformanten | 14 |
| 2.2.4.5 | M13 PCR | 14 |
| 2.2.4.6 | Sequenzierung M13 Fragmente | 15 |
| 2.2.4.7 | Direkte Sequenzierung | 15 |
| 2.2.5 | Screening auf Polymorphismen an Loci <i>ACTN1</i> , <i>ACTN4</i> und <i>ACTB</i> | 15 |
| 2.2.6 | Entwicklung der Methoden zur Genotypisierung | 16 |
| 2.2.7 | Genotypisierung mit SBE | 16 |
| 2.2.7.1 | PCR Amplifikation | 16 |
| 2.2.7.2 | SBE | 16 |
| 2.2.8 | Genotypisierung mit PCR-RFLP | 17 |
| 2.2.8.1 | PCR Amplifikation | 17 |
| 2.2.8.2 | Restriktionsenzym-Verdauung | 17 |
| 2.2.8.3 | Detektion der DNA Fragmente | 17 |
| 2.2.9 | Genotypisierung mit PCR-SSCP | 18 |
| 2.2.9.1 | PCR Amplifikation | 18 |
| 2.2.9.2 | Elektrophorese | 18 |
| 2.2.10 | Genotypisierung mit Mikrosatelliten | 18 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.10.1 | PCR Amplifikation | 19 |
| 2.2.10.2 | Elektrophorese | 19 |
| 2.3 | Statistische Analyse | 20 |
| 3 | Ergebnisse | 21 |
| 3.1 | Genotypisierung von Kandidatengenen | 21 |
| 3.1.1 | Detektion von Polymorphismen im <i>ACTN1</i> und <i>ACTN4</i> Gen | 21 |
| 3.1.2 | Detektion von Polymorphismen im <i>ACTB</i> Gen | 22 |
| 3.1.3 | Determination der Genotypen | 23 |
| 3.2 | Effekt der Kandidatengene auf reproduktive Merkmale der Eber | 23 |
| 4 | Diskussion | 26 |
| 4.1 | Hardy-Weinberg Gleichgewicht | 27 |
| 4.2 | Kandidatengeneffekte | 28 |
| 4.3 | Das Fehlen von Kandidatengeneffekten | 36 |
| 5 | Zusammenfassung | 38 |
| 6 | Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis | 40 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 41 |
| 8 | Anhang | 55 |
| 9 | Konsequenzen für eventuelle weitere Forschungsaktivitäten | 72 |
| 10 | Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation | 73 |
| 11 | Kurzfassung | 74 |

1 Einleitung

1.1 Problemstellung/Wissensstand

Fruchtbarkeit ist eines der wichtigsten ökonomischen Merkmale in der Schweineproduktion. Reproduktive Leistungen werden in der Regel im hohen Maße von der Umwelt beeinflusst, aber auch von der genetischen Veranlagung der Sau, des Ebers und der Nachkommen kontrolliert. Die Einführung der künstlichen Besamung (KB) in der Schweineproduktion erlaubt eine bessere Selektion der Eber auf Produktionsmerkmale. Gleichzeitig betont es jedoch die Bedeutung der individuellen Reproduktionsleistung der Eber und erfordert eine konsequente Bewertung des Fruchtbarkeitspotentials einer Samenprobe.

Malmgren und Larsson (1984) schlugen vor, dass die Beurteilung der Samenqualität als ein Indikator zur Bestimmung der Fruchtbarkeit von Ebern verwendet werden könnte. Spermakonzentration, Motilität und die normale Spermienrate werden gewöhnlich als Kriterien für die Beurteilung der Samenqualität verwendet (Colenbrander et al. 1993). Jedoch sind eine Vielzahl von Labortests, welche zelluläre Merkmale von Sperma untersuchen, noch immer nicht in der Lage, die Fruchtbarkeit von Spermaproben beständig vorauszusagen (Braundmeier und Miller 2001).

Linville et al. (2001) schlugen vor mittels einer Kandidatengenanalyse einzelne Gene zu identifizieren, die Merkmale mit ökonomischer Bedeutung beeinflussen.

Spermatogenese ist ein komplexer Prozess, der von einer Vielzahl von Genen gesteuert wird. Hormone und ihre Rezeptoren werden als geeignete Kandidatengene für reproduktive Merkmale diskutiert (Vincent et al. 1998a). In dieser Untersuchung wurden die Kandidatengene Gonadotropin-Releasing Hormonrezeptor (*GnRHR*), Follikel-stimulierendes Hormon Beta (*FSHB*), Luteinisierendes Hormon Beta (*LHB*), Follistatin (*FST*), Inhibin Alfa (*INHA*), Inhibin Beta A (*INHBA*) und Inhibin Beta B (*INHBB*), Relaxin (*RLN*), Prolaktin (*PRL*) und Prolaktin Rezeptor (*PRLR*), Androgen Rezeptor (*AR*), Retinolbinde-Protein 4 (*RBP4*), Acrosin (*ACR*), Actin Gamma (*ACTG*), Actinin Alfa 1 (*ACTN1*) and Actinin Alfa 4 (*ACTN4*) als direkte funktionale Kandidatengene für die Assoziation mit Merkmalen der Spermaqualität und der Fruchtbarkeit von Ebern untersucht.

Das Ziel dieser Untersuchung ist es, den Effekt von diesen direkten, funktionellen Kandidatengenen auf die Merkmale Spermakonzentration (SCON), Spermienbeweglichkeit (MOT), Samenvolumen je Ejakulat (VOL), Plasmatröpfchenrate (PDR) und abnormale Spermienrate (ASR) zu quantifizieren. Zusätzlich wurden diese Gene ebenfalls auf eine Assoziation mit Fruchtbarkeitsmerkmalen der Eber wie z.B. Non-Return-Rate (NRR) und Anzahl lebend geborener Ferkel (NBA) getestet, welche die Erfolgsrate der künstlichen Besamung widerspiegeln.

1.1.1 Reproduktive Physiologie des Ebers

Die Spermatogenese bei Ebern startet in den meisten Schweinerassen in einem Alter von 4 bis 6 Monaten. Sie könnte aber in einigen früh reifenden Rassen, wie der chinesischen Rasse der Meishan, vor einem Alter von 100 Tagen beginnen (Borg et al. 1993). Spermaqualität und -quantität steigen dann mit zunehmender Hodenentwicklung, Testosteronproduktion und Libido bis zur sexuellen Reife von 6 bis 8 Monaten stetig an. Anschließend werden im geringem Maßen Verbesserungen erreicht bis die Eber ihre endgültige Körpergröße erreicht haben (Hafez und Hafez 2000). Ein paralleler Anstieg der männlichen akzessorischen Drüsen (Samenblase, Prostata und Bulbo-Urethral Drüsen), welche 95% des Seminalplasmas produzieren, steigert das Volumen des Ejakulates. Die sexuelle Aktivität wird durch gonadotrope Hormone kontrolliert. Follikel-stimulierende Hormone (FSH) stimulieren die Steroid-Hormon- (Testosteron, aber auch andere Steroide wie Androstenon) Synthese und Sekretion durch die testinalen Leydig-Zellen. Die Aktivität von LH ist abhängig von der FSH Induktion der LH Rezeptoren der Leydig-Zellen (Knox 2003). Das Eberejakulat ist durch sein großes Volumen (etwa 300 ml im Durchschnitt) und die große Anzahl an Spermien (80 bis 120 Billionen, bei einmaliger Sammlung pro Woche) gekennzeichnet. Charakteristisch sind die Spermareserven und die starke Spermaproduktion von 10 bis 20 Billionen Spermatozoa pro Tag (Hafez und Hafez 2000). Die Anzahl an Spermien pro Ejakulat sinkt jedoch ständig wenn der Eber mehr als einmal pro Woche abgesamt wird. 50 ml Sperma und 3 Billionen Spermien werden üblicherweise als minimale Anforderungen für die künstliche Besamung betrachtet. Gefrorenes Ebersperma kann erfolgreich eingesetzt werden, aber es führt zu sehr viel geringeren Konzeptionsraten und einer geringeren Wurfgröße als beim Einsatz von frischem Sperma (Thurston et al. 2002). Folglich ist der kommerzielle Gebrauch von tiefgefrorenem Sperma normalerweise sehr begrenzt. Dieser Nachteil limitiert die Anwendung der künstlichen Besamung und damit die Kapazität für die Weitergabe von favorisierten Genen in Zuchtprogrammen.

1.1.2 Molekulargenetischer Ansatz zur Verbesserung der Eberreproduktion

Molekulare Techniken erlauben die Detektion von Variationen oder Polymorphismen, welche zwischen Individuen in einer Population für spezifische Regionen der DNA existieren. Diese Polymorphismen können verwendet werden, um genetische Karten zu erstellen. Darüber hinaus können Unterschiede zwischen Markern in der Expression der Reproduktionsmerkmale festgestellt werden, welche einen direkten Effekt auf Differenzen in Zeiten der genetischen Determination der Merkmale induzieren. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann jedoch das Ausmaß der Kopplung von QTL und Marker nachgewiesen werden (Montaldo und Meza-Herrera, 1998).

Der Kandidatengenansatz wurde bei Merkmalen der Eberreproduktion erstmals von Hardge et al. (1995) aufgeführt. Es wurde gezeigt, dass das Hitzeschock Protein 70.2 Gen (*HSP70.2*) (Huang et al. 2001), das Steroid 21-Hydroxylase Gen (*CYP2*) (Kmiec et al. 2002), das Ryanodin Rezeptor 1 Gen (*RYR1*) (Urban and Kuciel 2001), das Retinoic-Bindeprotein 4, der Prolactin Rezeptor (*PRLR*) und das Osteopontin (*OPN*) (Steinheuer et al. 2002, 2003) Gen signifikant mit Merkmalen der Spermaqualität oder der reproduktiven Entwicklung von verschiedenen Eberassen assoziiert sind (Table 1.1). Für die Entscheidung, einen vorhandenen genetischen Marker zur Selektion (MAS) zu berücksichtigen, müssen Informationen über die additiven und dominanten Effekte jedes Markers in der Population gesammelt werden.

Der einzige aufgeführte QTL für männliche Sexualentwicklung wurde aus Wägungen der Genitaltrakte nach Kastration oder Schlachtung in Meishan \times Large White Kreuzungen (Bidanel et al. 2001, Rohrer et al. 2001) und in Meishan \times Duroc (Sato et al. 2003) gefunden. Diese signifikanten Assoziationen wurden auf 7 verschiedenen Chromosomen identifiziert (Tabelle 1.2).

Tab. 1.1: Übersicht der Kandidatengene, die mit Merkmalen der Spermaqualität und der Eberfruchtbarkeit assoziiert sind

| Autor | Eberpopulation | | Locus | Signifikanter Effekt auf Spermaqualität oder Eberfruchtbarkeit ² |
|------------------------|--------------------|-----------------|----------------|---|
| | Breed ¹ | n | | |
| Huang et al. 2001 | DU LR | 55 | <i>HSP70.2</i> | MOT ($P \leq 0.05$); VOL ($P \leq 0.05$) |
| | Y | | | TSN ($P \leq 0.05$) |
| Huang et al. 2002 | DU | 37 | <i>EGF</i> | VOL ($P \leq 0.01$); NSR ($P \leq 0.01$); PPD ($P \leq 0.01$) |
| | | | <i>PTGS2</i> | VOL ($P \leq 0.01$); NSR ($P \leq 0.01$); PPD ($P \leq 0.05$); SCON ($P \leq 0.05$) |
| | | | <i>PRLR</i> | VOL ($P \leq 0.01$); MOT ($P \leq 0.05$); NSR ($P \leq 0.01$); PPD ($P \leq 0.01$) |
| Kmiec et al. 2002 | MIX ³ | 88 | <i>CYP2</i> | NSR ($P \leq 0.01$); NLS ($P \leq 0.01$); NSID ($P \leq 0.01$) |
| Urban and Kuciel 2001 | LW | 59 | <i>RYR1</i> | VOL ($P \leq 0.05$); MOT ($P \leq 0.01$); ASR ($P \leq 0.01$); NID ($P \leq 0.01$) |
| | LR | | | |
| Steinheuer et al. 2002 | DLR | ng ⁴ | <i>OPN</i> | NBA (allele 148): -1.496±0.489 ($P \leq 0.01$) |
| | | | <i>PRLR</i> | NBA: a=-0.289±0.529 ($P > 0.05$) d=-1.399±0.672 ($P < 0.05$) |
| Steinheuer et al. 2003 | DLR | 51 | <i>RBP4</i> | NBA: a=-0.472±0.112 ($P < 0.001$) d=0.577±0.141 ($P < 0.001$) |

¹LW: Large White, DU: Duroc, Y: Yorkshire, LR: Landrasse, DLR: Deutsche Landrasse

²VOL: Spermavolumen (cm³), SCON: Spermakonzentration (mln/cm³), NSR: Normozoospermien (%), NLS: Lebende Spermien im Ejakulat (bln), NSID: Spermien je Spermaportion (bln), NID: Anzahl Spermienportionen, MOT: Spermienmotilität (%), PPD: Prozent der Spermien mit proximalen Plasmatröpfchen, TSN: Totale Spermienanzahl pro Ejakulat

³MIX: Polnische Landrasse, Polnische Large White, Pietrain; Duroc × Pietrain, Hampshire × Pietrain, Duroc × Hampshire, Polnische Synthetische Linie 990, PIC: Pig Improvement Company

⁴Nicht angegeben

Tab. 1.2: Übersicht über QTL für Merkmale der Eberreproduktion, die in Kreuzungsrassen identifiziert wurden

| Autor | Population ¹ BC F ₃ / F ₂ | SSC ² | Position | Genomweite Signifikanz | Merkmal ³ | Varianz |
|---------------------|---|------------------|----------|---------------------------|----------------------|---------|
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 1 | - | <0.05 | SVWT | 4-5% |
| Rohrer et al. 2001 | M×WC | 3 | 49 | 4.8×10 ⁻² | FSH | - |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 3 | 39 | <0.001 | SVWT | 4-5% |
| Sato et al. 2003 | M×Du | 3 | 33 | <0.001 | TEWT | - |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 4 | 75 | <0.05 | SVWT | 4-5% |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 7 | 86 | <0.05 | LBUG | - |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 7 | 66 | <0.05 | TEWT | 3-7% |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 7 | 143 | <0.05 | EPWT | - |
| Rohrer et al. 2001 | M×WC | 8 | 16 | 2.9×10 ⁻¹ | FSH | - |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 10 | 140 | <0.05 | TEWT | 3-7% |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 10 | 137 | <0.05 | EPTW | - |
| Rohrer et al. 2001 | M×WC | 10 | 101 | 3.0×10 ⁻³ | FSH | - |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | 13 | - | <0.01 | TEWT | 3-7% |
| Rohrer et al. 2001 | M×WC | 18 | - | - | FSH | - |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | X | 88 | <0.001 | SVWT | 22% |
| Bidanel et al. 2001 | M×LW | X | 89 | <0.001 | TEWT | - |
| Rohrer et al. 2001 | M×WC | X | 80 | 2.5×10 ⁻¹⁵ | FSH | - |
| Rohrer et al. 2001 | M×WC | X | 80 | 2.5×10 ⁻¹⁵ | TESZ | 20% |
| Ford et al. 2001 | M×WC | X | - | <0.01 | TEWT | - |
| Ford et al. 2001 | M×WC | X | - | <0.01 | ENPR | - |

¹M: Meishan, WC: White Composite (gleiche Beiträge von Chester White, Landrace, Large White und Yorkshire), LW: Large White, Du: Duroc

²SSC: Sus scrofa Chromosom

³ENPR: Endokrine Profile, TESZ: Hodengröße, FSH: Follikel-stimulierendes Hormon, BUGL: Länge der Bulbourethraldrüsen (mm), EPWT: Epididymis Gewicht (g), SVWT: Samenblasengewicht (g), TEWT: Hodengewicht (g)

Die signifikantesten Ergebnisse wurden auf Chromosom X nahe des Androgen-Rezeptor Gens festgestellt. Der gefundene QTL hatte positive Meishan Allele und erklärte 20 und 22 % der Varianz des Hoden- und Samenblasengewichtes. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls von Ford et al. (2001) bestätigt. Drei andere QTL auf Chromosom 1 und 4 beeinflussen das Gewicht der Samenblase. Jeder QTL erklärte 4-5 % der Merkmalsvarianz. Die Effekte der Meishanallele waren auf Chromosom 3 positiv, auf Chromsom 4 negativ und familienabhängig auf Chromsom 1. Gleichmaßen erklärten drei auf Chromosom 7, 10 und 13 lokalisierte QTL 3-7 % der phänotypischen Varianz des Hodengewichtes mit positiven Effekten der Meishanallele auf Chromosom 13, aber negativen Effekten in den beiden anderen Fällen. Signifikante dominante Effekte wurden nur auf Chromosom 13 nachgewiesen.

1.1.3 Kandidatengenanalyse

Kandidatengene sind Genorte, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit interessante Merkmale beeinflussen. Mit anderen Worten, diese Gene sind eine nützliche Quelle für Assoziationsanalysen. Um die Hypothese zu belegen, dass ein definiertes Gen ein bestimmtes Merkmal beeinflussen könnte, werden Analysen durchgeführt, bei denen die untersuchte Variationen der Allele eines Kandidatengenortes als unabhängige Variable verwendet wurden. Damit wurde ermöglicht, den Effekt eines Kandidatengens auf einen speziellen Phänotypen statistisch zu belegen (Wimmers et al. 2002a). Kandidatengene können basierend auf das Wissen von Physiologie und Biochemie eines Merkmals identifiziert werden (direkter Kandidatengenansatz). Der am häufigsten angewendete Ansatz ist die Identifizierung von Genen durch positionelles Klonieren, bei dem die Vererbung eines Merkmals mit einer großen Anzahl an Markergenen verglichen wird. Dadurch wird die Region lokalisiert, in der das für ein Merkmal verantwortliche Gen liegt. Dieser Ansatz wurde erfolgreich von Andersson et al. (1994) angewandt, um QTL für Rückenspeck und abdominales Fett auf Chromosom 4 zu finden. Aktuell veröffentlichte Resultate aus einem QTL Scan wurden von Milan et al. (2000) konsequent genutzt, um das RN Gen zu identifizieren. Andere in jüngster Vergangenheit publizierte Ansätze, basieren auf der Analyse von Unterschieden der Expressionsprofile von speziellen Gewebezellen und/oder Individuen mit bestimmten Phänotypen. Es handelt sich hierbei um funktionelle Kandidatengene, deren Expression zeitlich und räumlich begrenzt ist. Die Identifikation von exprimierten Sequenzabschnitten, ESTs, wird potentielle Kandidaten liefern, die für interessante Merkmale innerhalb der QTL Regionen von Bedeutung sind und die komparative Kartierung erleichtern. Der positionelle Kandidatenansatz kombiniert Informationen der Kopplungsanalyse für ein spezielles

Merkmal und die Kartierungsinformation eines direkten oder indirekten Kandidatengens innerhalb der homologen oder heterologen Spezies (komparative Kartierung) miteinander.

Genmutationen beeinflussen die Genexpression (Geldermann 1996) oder die Enzymaktivität (Milan et al. 2000). Folglich führen solche Genmutationen zu Veränderungen der Struktur und/oder Expressionslevel des Proteins. Das Prinzip molekulargenetischer Marker basiert auf Klonierung/Sequenzierung (Mikrosatelliten (Tautz 1993), Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) (Brookes, 1999), Sequenzdefinierte Loci (STS) (Olson et al. 1989) und exprimierte Sequenzabschnitte (EST) (Adams et al. 1991)) sowie DNA-Fingerprint Techniken (Random amplified polymorphic DNA (RAPD) oder AFLP basiert (Williams et al. 1990)). Insbesondere Mikrosatellitenmarker wurden ein wichtiges Instrument für die Kartierung von Chromosomen und Analyse von Kopplungsbeziehungen. Sie sind somit grundlegend für die Untersuchung der molekularen Evolution und der Populationsgenetik (Brinkmann et al. 1998).

In dieser Untersuchung wurden 18 direkte funktionelle Kandidatengene aufgrund ihrer biologischen und/oder physiologischen Funktion in der männlichen Reproduktion ausgewählt (Tabelle 1.3).

Tab. 1.3: Biologische Beziehung und/oder physiologische Funktion der Kandidatengene in der männlichen Reproduktion

| Gene | Biologische Beziehung/physiologische Funktion | Autor |
|--------------|--|--|
| <i>GnRHR</i> | Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism | Layman et al. 1997 |
| <i>FSHB</i> | Spermatogenese Testikularmorphologie und Funktion | Zanella et al. 1999 Li et al. 1998 |
| <i>LHB</i> | Testikularmorphologie ; Spermaparameter | Wu et al. 1999 |
| <i>RLN</i> | mit Spermamotilität im Schwein korreliert | Sasaki et al. 2001 |
| <i>PRL</i> | Effekt der spermatogenen Zellen (Ratte) Akzessorische Sexualdrüsen (Schwein) | Hondo et al. 1995 Rothschild et al. 1997 |
| <i>PRLR</i> | mRNA Expression während Spermatogenese | Hondo et al. 1995 |
| <i>FST</i> | Coexprimiert mit <i>INHBA</i> Modulation der Activin Aktion Störungen der Spermatogenese | Muttukrishna et al. 2001 Mather et al. 1993 Kaipia et al. 1992 |
| <i>INHA</i> | Scrotale Ausdehnung; FSH Konzentration LH Puls Amplitude; Marker Spermatogenese | McKeown et al. 1997 Matorras et al. 1998 |
| <i>INHBA</i> | Absinkende Expression während der Entwicklung der Sertoli Zellen | Kaipia et al. 1992 |
| <i>INHBB</i> | Starke Expression in Spermatogonia, runde Spermatozyten, Sertoli Zellen | Marchetti et al. 2003 |
| <i>AR</i> | Idiopathische Unfruchtbarkeit | Hiort et al. 2000 |
| <i>ACR</i> | Spermafertilisierungskapazität Expression hat Effekt auf Spermatogenese | Cechova et al. 1984 O'Brien et al. 1996 |
| <i>RBP4</i> | Transporter und Puffer von Vitamin A (Eber) | Syntin et al. 1996 |
| <i>OPN</i> | Spermienmotilität (Ratte) Fertilitäts-assoziiertes Protein (Bulle) | Siiteri et al. 1995 Cancel et al. 1999 |
| <i>ACTB</i> | Verteilte acrosomal/postacrosomale Regionen | Casale et al., 1988 Castellani-Ceresa et al. 1993 |
| <i>ACTG</i> | Exprimierte Spermatogenese (Maus) Verteilte acrosomal/postacrosomale Regionen | Waters et al. 1985 Casale et al. 1988 |
| <i>ACTN1</i> | Spermienfunktion | Yagi und Paranko 1995 |
| <i>ACTN4</i> | Bauweise der Stereozilien | Hofer und Drenckhahn 1996 |

1.2 Zielsetzung

Das Projekt zielt auf die nachhaltige, züchterische Verbesserung der Fruchtbarkeit beim Schwein.

Fruchtbarkeit ist gleichermaßen eine substantielle Eigenschaft zur Spezieserhaltung, ein ökonomisch wichtiges Produktionsmerkmal als auch ein funktionelles Merkmal, das die Fitness und das Wohlbefinden eines Tieres charakterisiert. Reproduktion steht unter genetischer Kontrolle, die Komponenten der maternalen, paternalen und individuellen Genoms umfasst. Die komplexen Vorgänge der Reproduktion werden auch von der Umwelt und dem Betriebs-/Haltungsmanagement beeinflusst; daraus resultiert eine vergleichsweise geringe Heritabilität von Reproduktionsmerkmalen. Nachhaltige züchterische Fortschritte in der Verbesserung der Fruchtbarkeit sind daher kaum zu verzeichnen. Eine effektive Züchtung auf Fruchtbarkeit ist erst möglich, wenn die genetischen Komponenten dieses Merkmalskomplexes erkannt und ihre Funktionen und Interaktionen verstanden sind. Hierbei sind folgende grundlegende genetische und physiologische Eigenschaften zu beachten:

- (1) Komplexität der Reproduktionsprozesse, die impliziert, dass eine große Anzahl an Genen an der Ausprägung von Fruchtbarkeitsmerkmalen beteiligt sind; die Beiträge der einzelnen Gene zum Phänotyp sind also klein
- (2) Große Bedeutung von Heterosis für Fruchtbarkeitsmerkmale
- (3) Innerhalb der hormonellen Regelkreise besteht vielfach ein negatives Feedback, d.h., dass von der Erhöhung einzelner Komponenten des Regelkreises keine positive Wirkung zu erwarten ist, vielmehr das Zusammenspiel der Komponenten optimiert werden muss
- (4) Genetische Kontrolle der Fruchtbarkeit wird durch paternale, maternale und individuelle Komponenten beeinflusst

Zum tiefergehendem Verständnis dieser Vorgänge leistet das Projekt einen Beitrag, indem es explizit Kandidatengene hinsichtlich ihrer Bedeutung für den väterlichen Beitrag zur Fruchtbarkeit untersucht.

Die paternale Komponente der Fruchtbarkeit innerhalb der Spezies Schwein hat bisher wenig Berücksichtigung gefunden. Sie gewinnt aber mit zunehmender Verbreitung der künstlichen Besamung an Bedeutung.

Ein Besamungseber trägt im starken Ausmaß zum Genpool der nächsten Generation bei. Das

erlaubt die Erhöhung der Selektionsintensität auf der väterlichen Seite. Diese hohe Selektionsintensität sollte nicht durch individuelle Schwächen in Merkmalen der Spermaqualität und Befruchtungsfähigkeit eingeschränkt werden. Zugleich gilt es sicherzustellen, dass der genetische Beitrag des Vatertiers zur nächsten Generation in möglichst allen Merkmalskomplexen – auch der Fruchtbarkeit – ein positiver ist.

Das Projekt beleuchtet die paternalen genetischen Einflüsse auf die Reproduktion beim Schwein, wobei der Effekt einer Reihe von direkten biologischen Kandidatengen auf Merkmale der Spermaqualität und Fruchtbarkeit in der Schweineproduktion bestimmt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermaterial

In unserer Untersuchung wurden reinrassiger Pietraineber (PI) (n=244) und die Kreuzungseber Pietrain × Hampshire (PI×HA) (n=112) aus einer Besamungsstation verwendet. Diese Eber wurden zwischen 1990 und 1999 geboren und in kommerziellen Herden hauptsächlich in Nord-West Deutschland eingesetzt.

2.1.2 Phänotypen

Die Spermaqualität wurde mit Hilfe der Merkmale Spermienkonzentration (SCON [$\times 10^8$ /ml]), Spermavolumen je Ejakulat (VOL [ml]), Spermienmotilität (MOT [%]), Plasmatröpfchenrate (PDR [%]) und abnormale Spermienrate (ASR [%]) beurteilt. Jedes Ejakulat wurde lichtmikroskopisch entsprechend der Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) untersucht. Von jedem Eber standen wiederholte Messwerte für die Merkmale der Spermienqualität zur Verfügung.

Die am Paarungspartner gemessenen Fruchtbarkeitsdaten Non Return Rate [NRR] und Anzahl der lebend geborenen Ferkel [NBA] wurden von jedem Eber als Abweichung von dem Populationsmittel unter Berücksichtigung der Einflussfaktoren einschließlich Rasse, Wurfnummer der Sau, Betriebs- und Saisoneffekte erfasst. Diese Daten wurden hauptsächlich in kommerziellen Ferkelproduktionsbetrieben in Nord-West Deutschland gesammelt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA Isolierung aus Sperma

Zur DNA Isolierung aus Sperma wurde die Standardmethode verwendet. Die DNA wird dabei zunächst aus Zellen freigesetzt und in Lösung gebracht. Durch Zugabe von Chloroform bzw. Phenol-Chloroform entsteht eine Phasentrennung, so dass die Überführung des wässrigen Überstandes, welcher die DNA enthält, in ein neues Gefäß ermöglicht wird. Nach der Ausfällung der DNA kann sie schließlich in einen Tris-EDTA-Puffer (TE) gelöst werden. Bei der Verwendung von Sperma treten zwischen den Tieren Unterschiede bezüglich der Spermiedichte auf. Daher werden alle Proben zunächst bei 5000cfp/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird soweit abgegossen, bis er zum Pellet am Boden in

einem Verhältnis von 1:1 vorliegt. Durch diesen Schritt wird die Spermiedichte in den verschiedenen Spermaproben einander angeglichen. Anschließend resuspendiert man das Pellet am Boden. Von dieser Probe werden 300 µl mit einem speziellen Puffer gemischt und anschließend 5 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Dieser Waschvorgang wird zweimal wiederholt. Anschließend wird das nach der Zentrifugation und dem Dekantieren des Überstandes im Reaktionsgefäß zurückbleibende Pellet zur Lyse und Zerstörung der Proteine mit einem Lysispuffer und mit 1,4-Dithiothreitol (DTT) versetzt. Nach gründlichem Mischen gibt man Natriumperchlorat hinzu und inkubiert das Gemisch über Nacht bei 37°C. Nach der Lyse pipettiert man eisgekühltes Chloroform zur Extraktion der Nukleinsäure zu der Lösung und mischt sie gründlich. Durch die Zugabe einer Silicat-Lösung wird die Interphase sichtbar, so dass die Überführung der oberen wässrigen Phase, die die DNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß möglich ist. Diese DNA-haltige Lösung wird mit eisgekühltem Ethanol (100%) versetzt. Die kurze Ausfällung in der Gegenwart von einer hohen Salzkonzentration reduziert die RNA-Menge in der Lösung. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 15000 cfg/min wird die DNA gewonnen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet zweimal in 70% Ethanol gewaschen. Es ist wichtig, das Pellet gründlich zu waschen, um verbleibendes Salz und Chloroform zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation muss das Pellet an der Luft getrocknet werden, um eine Beeinflussung der folgenden PCR Reaktionen durch Ethanolreste zu vermeiden. Das Pellet wird in 1× Tris-EDTA gelöst. Die DNA Lösung ist für kurze Zeit bei 4°C und langfristig bei -20°C stabil.

2.2.2 Primer Design

Insgesamt wurden 7 Primerpaare aus der publizierten Sequenz (*Sus scrofa*) mit der Primer Express Software (Version 2.0, ABI) abgeleitet, um Amplikonlängen zwischen 220 und 2750 bp mit 45% bis 70% GC Gehalt und einer Schmelztemperatur zwischen 56°C und 65°C zu amplifizieren.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die PCR Amplifikation wurde in 25 µl Reaktionsvolumen in 1× PCR Puffer (GeneCraft oder Sigma) mit 2 µl der 100 ng genomischen DNA Probe, 0,5 µl von jedem Primer (10 µM), 0,5 µl jeder dNTPs (10 mM) und 0,5 U der *Taq* Polymerase (GeneCraft oder Sigma) durchgeführt. Die PCR Reaktionen wurden in einem Thermocycler ausgeführt. Die verwendeten Temperatur-Zyklus Programme waren abhängig vom Primer, Länge der Amplifikationsfragmente, 'GC' Gehalt und Struktur der Fragmente. Für jeden Genort war das

PCR Profil 93-95°C für 3 min, gefolgt von 35× (94°C für 30s, 63-65°C für 30s, und 72°C für 1-1.5 Min) und am Schluss Extension bei 72°C für 5 Min.

Fünf µl des PCR Produktes wurden mit einer Elektrophorese in 1% (w/v) Agarosegelen in 1× TAE mit Ethidiumbromid überprüft und dokumentiert.

2.2.4 Sequenzierung der PCR Fragmente

Die Sequenzierung der PCR Fragmente bestand aus der PCR Produktreinigung, Ligation, Transformation, Screening auf Transformanten, M13 PCR und Sequenzierung der M13 PCR Fragmente oder die gereinigte PCR Produkte wurden direkt sequenziert.

2.2.4.1 PCR Produktreinigung

Die PCR Reaktion (20 µl) wurde durch Elektrophorese in 1% (w/v) Agarosegelen in 1× TAE-Puffer mit 0.8 µg/ml Ethidiumbromid getrennt. Die PCR Fragmente wurden aus den Gelen geschnitten und in 600 µl des TE Puffers homogenisiert. Sechshundert µl Phenolchloroform wurden hinzugefügt und vermischt. Nach der Zentrifugation mit 14,000 g für 10 min bei 4°C wurde die obere wässrige Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1:10 Volumen des Natriumacetat (3.0 M, pH 5.2) und entsprechendes Volumen des gekühlten Ethanol wurden hinzugefügt. Die Lösung wurde vorsichtig geschüttelt und bei – 80°C für 30 min aufbewahrt. Das DNA Pellet wurde durch Zentrifugation mit 14,000 g für 30 min bei 4°C ausgefällt, mit 75% Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 10 µl Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.2 Ligation

Die Ligation der PCR Fragmente in den Plasmid Vektor pGEM[®]-T (Promega) wurde in 5 µl der Volumenreaktion mit 2.5 µl 2 x Rapid Ligationpuffer, 0.5 µl (25ng) Vector, 0.5 µl T4 DNA Ligase (3 Units/µl) und 1.5 µl PCR Produkt durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.4.3 Transformation

Hoch effiziente kompetente Zellen (DH5α *E. coli*) wurden für die Plasmidtransformation verwendet. Drei µl der Ligationmischung und 60 µl der aufgetauten kompetenten Zellen wurden auf Eis für 30 min inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock der Zellen für 1.5 min in einem Wasserbad bei exakt 42°C mit anschließender sofortiger Kühlung auf Eis für 2 min. Dann

wurde 650 µl des LB-Broth-Ampicillin hinzugefügt und das Gemisch für 1 h 30 min bei 37°C schüttelnd (~110 rpm) inkubiert. Danach wurden die transformierten Kulturen in doppelter Ausführung auf vorher präparierte LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platten, welche 20 µl einer X-Gal Lösung und 20 µl einer IPTG Lösung enthielten, ausgebracht. Die Platten wurden dann bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.4.4 Screening auf Transformanten

Screening von Transformanten für Inserts wurde durch Selektion der weißen Kolonien durchgeführt, weil das erfolgreiche Klonieren eines Inserts in den pGEM[®]-T Vektor die kodierende Sequenz des β-Galactosidase Gens ausschaltet. Es wurden zwei weiße Kolonien von jeder Platte genommen und in 30 µl von 1× PCR Puffer (Amersham Pharmacia oder Sigma) Lösung für die M13 PCR zur weiteren Bestätigung des Transformationserfolges gegeben.

2.2.4.5 M13 PCR

Die M13 PCR wurde durchgeführt, um den Transformationserfolg festzustellen und die Klone mit Insert zu identifizieren. Vier unabhängige weiße Kolonien, bei denen das Vorhandsein eines Inserts erwartet wird, wurden für jede Probe zusammen mit zwei blauen Kolonien als Kontrolle entnommen, in 30 µl einer 1× PCR Puffer (Amersham Pharmacia oder Sigma) Lösung überführt und 15 min bei 95°C kochen gelassen. M13 PCR wurde in 20 µl Reaktion durchgeführt, welche 1 µl 10×Buffer, 0.5 µl dNTP (10 mM), 0.5 µl vorwärts Primer (10 µM) (5'-GCTATTACGCCACTGGCGAAAGG-3'), 0.5 µl rückwärts Primer (10 µM) (5'-CCCCAGGCTTTACTTTATGCTTCC-3'), 0.5 U Taq Polymerase und 10 µl des Kolonielysates enthielt. Die Reaktion wurde bei 94°C für 3 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen bei 94°C für 30 sec, 65°C für 30 sec, 70°C für 1 min und einem finalen Extensionsschritt für 5 min bei 70°C durchgeführt.

Die PCR Produkte wurden auf 1% (w/v) Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1× TAE Puffer aufgetragen. Das Gel wurde unter einem UV Transilluminator fotografiert. Von den weißen Kolonien, die längere Fragmente als die blauen Kolonien enthielten, wurde jeweils eine Probe für die Sequenzierung selektiert.

2.2.4.6 Sequenzierung M13 Fragmente

Die positiven Klone der M13 Fragmente wurden entsprechend der Dideoxy Ketten-Terminations-Methode (Sanger et al. 1977) mit einem SequiTherm Excel™ II DNA Sequenzier Kit (Epicentre Technologies, Biozym) sequenziert. Es wurden 4 Sequenzierreaktionen der verschiedenen Terminationsgemische (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) für jedes PCR Fragment aufgebaut. Jede Reaktion bestand aus 1 µl Terminationsmix und 2 µl Premix Lösung (3.6 µl Sequenzierpuffer, 0.8 pM 700 IRD-markierter SP6 Primer (5'-TAAATCCACTGTGATATCTTATG-3'), 0.8 pM 800 IRD-markierter T7 Primer (5'-ATTATGCTGAGTGATATCCCGCT-3'), 1.5 µl M13 PCR Produkt und 2.5 Einheiten *Taq* Polymerase) und die PCR wurde bei 32 Zyklen bei 95°C für 30 sec, 59 °C für 30 sec und 70 °C für 60 sec durchgeführt. Die Sequenzierreaktion wurde mit 1.5 µl des Stopp-Puffers gestoppt, bei 85°C für 5 min denaturiert und auf 41 cm 6% Sequagel-XR (National Diagnostics, Biozym) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde auf einem LI-COR Model 4200 automatischen DNA Sequenzer in 1× TBE Puffer bei 50 °C, 50 W und 1500 V durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Image Analysis Programms, Version 4.10 (LI-COR Biotechnology) analysiert.

2.2.4.7 Direkte Sequenzierung

Die direkte Sequenzierung von gereinigten PCR Produkten wurde mit dem direkt-sequenzier-kit (Quick Start Kit DTCS) von Beckman Coulter, durchgeführt, wobei die Anweisungen im Beckman Coulter Protokoll befolgt wurden. Für die Sequenzierung wurden entweder der vorwärts oder der rückwärts Primer des PCR Fragmentes verwendet. Die Sequenz wurde auf einem CEQ8000 Sequenzer (Beckman Coulter) analysiert.

2.2.5 Screening auf Polymorphismen an Loci *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB*

Zur Identifizierung von Polymorphismen auf den porcinen *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB* Genen wurden Primer für die PCR Amplifikation, basierend auf den EST Sequenzen des Schweins (BF442592, BI338543 und AY550069) aus der GenBank abgeleitet. Genomische DNA von 2 Schweinerassen (Pietrain und Pietrain × Hampshire) wurde als DNA Probe für die PCR Amplifikation verwendet. Die PCR Reaktionen wurden mit dem PCR Standard Protokoll durchgeführt. *ACTN1* und *ACTN4*: 95°C für 3 min, gefolgt von 35 × (94°C für 30 sec, 63-65°C für 30 sec, und 72°C für 1-1.5 min) und einer finalen Extension bei 72°C für 5 min. *ACTB*: 95°C für 5 min, gefolgt von 35 × (94°C für 1 min, 62°C für 1 min, und 72°C für 2

min) und einer finalen Extension bei 72°C für 5 min. Die amplifizierte Fragmentlängen betragen 900 bp, 504 bp und 1102 bp.

Die DNA Sequenzen der Schweinerassen wurden mit der Software BLAST (Altschul et al. 1997) oder der Software Multalin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) analysiert, um Polymorphismen innerhalb dieser Sequenzen zu finden.

2.2.6 Entwicklung der Methoden zur Genotypisierung

Die gefundenen Polymorphismen des *ACTN1* und *ACTN4* Gens wurden mit der Software Webcutter 2.0 analysiert. Für die Polymorphismen des *ACTB* Gens wurden spezifische Primer entwickelt, um sie mit Hilfe von Single Base Extension (SBE) zu analysieren. Es wurden PCR- und Sequenzierungstechniken verwendet, um die Genorte *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB* zu genotypisieren als auch um Protokolle für die Genotypisierung der Tierproben in großem Umfang zu etablieren.

2.2.7 Genotypisierung mit SBE

SBE wurde verwendet, um Polymorphismen am Genort *ACTB* zu analysieren.

2.2.7.1 PCR Amplifikation

Die PCR Amplifikation für den Genort *ACTB* wurde mit dem Standard PCR Protokoll durchgeführt. Das PCR Profil war 95°C für 5 min, gefolgt von 35 × (94°C für 1 Min, 62°C für 1 Min, und 72°C für 2 Min) und einer finalen Extension bei 72°C für 5 min.

2.2.7.2 SBE

Primers für SNP-Genotypisierung wurden abgeleitet von den erhaltenen Sequenzen:

SNP1: 5'-TTTTTAGAAAGGGCGTGGCAAAGAG-3'

SNP2: 5'-TTTTTTTTTCTCTCTGCATGTCCCCAGTC-3'

SNP3: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTCGGCTTCCCGAGGGTGACAG-3'

SNP4: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAGCAGGAGATGGCCAC-3'

Die PCR Fragmente wurden enzymatisch gereinigt: 5 µl PCR Produkt wurden mit 1 µl ExoSAP-IT (USB) versetzt und inkubiert bei 37°C für 30 min, 80°C für 15 min. Eine mehrfache SBE wurde ausgeführt in 10 µl Reaktionsvolumen. Das Gemisch enthielt 2 µl des gereinigtes PCR Produkts, 2 µl des Primer Extension Kits (Beckman Coulter), 4 µl von jedem Primer (1 µM), und 2 µl ddH₂O. Das Reaktionsprofil war 25 × (96°C für 10 sec, 50°C für 10

sec, 72°C für 30 sec). Die SBE Produkte wurden ebenso enzymatisch gereinigt: 2.5 µl Produkt wurden mit 1 µl SAP (USB) versetzt und inkubiert bei 37°C für 30 min, 80°C für 10 min. Die Genotypen wurden auf einen CEQ8000 Sequenzer (Beckman Coulter) bestimmt.

2.2.8 Genotypisierung mit PCR-RFLP

Die PCR-RFLP wurde verwendet, um Polymorphismen an den Genorten *FSHB*, *PRL*, *PRLR*, *INHA*, *RBP4*, *OPNin6*, *ACTN1* und *ACTN4* zu identifizieren. Ihre Primer wurden in publizierter Literatur beschrieben oder aus veröffentlichten porcinen Gensequenzen abgeleitet.

2.2.8.1 PCR Amplifikation

Die PCR Amplifikation für die Gene *FSHB*, *PRL*, *PRLR*, *RBP4*, *INHA*, *OPNin6*, *ACTN1* und *ACTN4* wurde mit dem Standard PCR Protokoll durchgeführt. Das PCR Profil war 95°C für 3 min, gefolgt von 35 × (94°C für 30 sec, 54-65°C für 30 sec, und 72°C für 30 sec -3 min) und eine finale Extension bei 72°C für 5 min. Fünf µl des PCR Produktes wurden in 1% (w/v) Agarosegel in 1× TAE mit Ethidiumbromid elektrophorisiert und dokumentiert.

2.2.8.2 Restriktionsenzym-Verdau

Nach der Überprüfung der PCR Produkte wurden die positiven PCR Produkte zur RFLP Analyse verwendet. Die Restriktionsenzym Digestion wurde in 15 µl des Reaktionsgemischs jeder Probe ausgeführt, welches 10 µl PCR Produkt, 1.5 µl Puffer (10×) und 0.15 µl BSA enthielt. Die Reaktionen wurden über Nacht (mindestens 4 Stunden) bei 30°C-60°C inkubiert.

2.2.8.3 Detektion der DNA Fragmente

Die Restriktions-Längen Polymorphismen (RFLP) von *FSHB*, *PRL*, *OPNin6*, *ACTN1* und *ACTN4* wurde durch Elektrophorese in 1-3% (w/v) Agarosegel in 1× TAE-Puffer mit 0.8 µg/ml Ethidiumbromid nachgewiesen. Für *PRLR*, *RBP4* und *INHA* wurden die Restriktions-Fragment-Längen Polymorphismen mit 12% nicht-denaturierendem PAA Gel in 1× TBA Puffer detektiert, welches 1-1.5 Stunden bei 450 Volt lief. Die DNA Banden wurden mit der Silber-Färbemethode sichtbar gemacht. Die DNA in dem Polyacrylamidgel wurde kurz in 10% (v/v) Essigsäure für 10 min, 1% (v/v) Salpetersäure für 10 min fixiert und zweimal mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde für 20 min in 0.2% (v/w) Silbernitrat Lösung inkubiert und wieder mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde 2-3 mal mit Silberfärbelösung gewaschen

und inkubiert bis die DNA Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10% Essigsäure für 1 min gestoppt und das Gel dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel im Geltdrockner (BioRad) bei 80°C für 2 h getrocknet. Die Genotypen der Tierproben wurden aufgeschrieben.

2.2.9 Genotypisierung durch PCR-SSCP

In dieser Untersuchung wurde die PCR-SSCP Methode angewandt, um Polymorphismen von *GnRHR*, *RLN* und *LHB* Genen zu analysieren. Die Polymorphismen der Genorte *GnRHR* und *LHB* wurden von Jiang et al. (2001) und Ezashi et al. (1990) beschrieben, ihre Primersequenzen wurden aus den veröffentlichten Schweinesequenzen AF227686 und D00579 abgeleitet. Die Polymorphismen, Primersequenzen und PCR Konditionen des *RLN* Genortes wurden von Wimmers et al. (2002b) beschrieben.

2.2.9.1 PCR Amplifikation

Die PCR Amplifikation für *GnRHR*, *RLN* und *LHB* wurde in 10 µl Reaktionsmix durchgeführt, welcher 1.0 µl 10× PCR Puffer (Sigma), 1 µl 50 ng genomische DNA Proben, 0.2 µl jedes Primers (10 µM), 0.2 µl jedes dNTPs (10 mM), und 0.2U der *Taq* Polymerase (Sigma) enthält. Das PCR Profil war 95°C für 3 min, gefolgt von 35 × (94°C für 30 sec, 60-65°C für 30 sec und 72°C für 1 min) und schließlich die Extension bei 72°C für 5 min.

2.2.9.2 Elektrophorese

Die PCR Produkte wurden 1:10 mit SSCP-Ladepuffer gemischt, bei 95 °C für 5 min denaturiert sofort auf Eis gekühlt. Die Produkte wurden auf 12% nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetragen und die Elektrophorese in 0.5× TBE bei konstanten 12 W für 3-4 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Elektrophorese für das *GnRHR* Gen wurde jedoch für 6-7 h bei 4°C durchgeführt. Die DNA Banden wurden durch die Silberfärbemethode sichtbar gemacht.

2.2.10 Genotypisierung mit Mikrosatelliten

Mikrosatelliten an den Genorten *AR*, *FST*, *INHBA*, *INHBB*, *ACR*, *ACTG* und *OPNpro* wurden in der veröffentlichten Literatur oder GenBank beschrieben. Primersequenzen von *AR*, *FST* und *INHBA* wurden von Trakooljul et al. (2000), Ellegren et al. (1993) und Campbell et al. (2001) beschrieben.

2.2.10.1 PCR Amplifikation

Im Wesentlichen wurde die Genotypisierung mit Locus-spezifischen Primern durchgeführt. Es wurden 18-24 Nukleotidprimer verwendet, um Fragmente von einer Länge zwischen 93-228 bp zu amplifizieren. Ein Primer war am Ende mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP markiert. Die PCR Reaktionen wurden in 10 μl Reaktionsvolumen mit 1.0 μl 10x PCR Puffer (Sigma), 1 μl Proben der 50 ng genomischen DNA, 0.5 μl jedes Primers (10 μM), 0.25 μl jedes dNTPs (10 mM), und 0.5 U *Taq* Polymerase (Sigma) angesetzt. Das PCR Profil war 95°C für 3 min, gefolgt von 35 \times (94°C für 30 sec, 56-66°C für 30 sec und 72°C für 1 min) und schließlich die Extension bei 72°C für 5 min.

2.2.10.2 Elektrophorese

Beide Glasplatten wurden zweimal mit Wasser und Ethanol (75%) gereinigt und mit Papiertüchern getrocknet. 100 μl Haftsilan wurde auf den Bereich einer Platte aufgetragen, auf den später der Kamm eingesetzt wurde. Diese Glasplatten und die Spacer wurden zusammengebaut und mit Plastikschienen zusammengehalten. Die Gellösung, die 15 ml Sequa Gel XR (SQG-XR-842 MWG, National Diagnostics), 3.75 ml Sequa Gel Complete Puffer Reagenz (National Diagnostics), 200 μl DMSO (Carl Roth GmbH) und 150 μl 10% APS enthielt, wurde vorsichtig verrührt und rasch zwischen die Platten gegossen. Der Kamm wurde in das Gel, also zwischen die Platten geschoben, die Platten wurden horizontal gelagert, so dass das Gel für eine halbe bis eine Stunde polymerisieren konnte.

Anschließend wurden die PCR Produkte 1:10 (oder 1:15) mit Dextranblue-Puffer gemischt und auf das 6% Polyacrymidgel aufgetragen. Gleichzeitig wurden drei Standardmarker auf beide Seiten und in die Mitte des Gels aufgetragen, welche verschiedene Längen (von 75, 100, 105, 120, 145, 175, 200, 204, 230, 255, 300, 320 bp) mit IDR 700 und IDR 800 beinhalten. Die Elektrophorese wurde in 1 \times TBE Puffer bei 50 °C, 50 W, 40 mA und maximal 1500 V in dem DNA Sequenzer (Li-COR, GENE READ 4200, MWG-BIOTECH) durchgeführt. Die Gelbilder wurden mit der One-Dscan Software (Scanalytics, Division of CSPI, USA) analysiert. Zunächst wurden die Standardmarker im Gel kalibriert, anschließend wurden die entsprechenden Allele dieser Kandidatengene determiniert.

Die gefundenen Genotypen der Tierproben wurden aufgezeichnet und in eine Microsoft Excel Tabelle überführt.

2.3 Statistische Analyse

Um Einflussfaktoren auf die Spermaqualität (SCON, MOT, VOL, PDR und ASR) statistisch abzusichern, wurden die Varianz mittels "PROC MIXED" des SAS Software Paketes (SAS System für Windows, Ausgabe 8.02) analysiert. Das zugrundeliegende gemischte, statistische Modell umfasst die fixen Effekte Rasse, Saison (acht Klassen innerhalb von zwei Jahren), Alter (Covariabe), Genotyp des Ebers und den zufälligen permanenten Effekt des Ebers (Wiederholbarkeitsmodell). Zusätzlich waren die Fruchtbarkeitsmerkmale von NRR [%] und NBA [pro Wurf] nur als ein Durchschnittswert der angepaarten Sau vorhanden. Das statistische fixe Modell beinhaltet die Effekte Rasse, Geburtsjahr des Ebers und Genotyp. Diese Analysen wurden mit dem "PROC GLM" Verfahren des SAS Software Paketes durchgeführt. Alle Assoziationsanalysen wurden sowohl herkunftsübergreifend als auch innerhalb der Herkünfte vorgenommen.

Seltene Genotypen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Additive (a) und dominante (d) Effekte wurden für SNP Marker berechnet, wobei drei Genotypen entsprechend der Gleichung $a=1/2(BB-AA)$ und $d=AB-1/2(AA+BB)$ analysiert wurden. Für Mikrosatellitenmarker mit mehr als 3 Allelvarianten wurde der Allelsubstitutionseffekt mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse mit unterschiedlichen Covariablen (Allelfrequenzen mindestens 5%) berechnet.

Weiterhin wurde das Hardy-Weinberg Gleichgewicht mit Hilfe eines Chi-square Tests für die SNP Marker (Nei, 1987) für Mikrosatelliten berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung von Kandidatengen

3.1.1 Detektion von Polymorphismen im *ACTN1* und *ACTN4* Gen

Polymorphismen in *ACTN1* und *ACTN4* wurden in verschiedenen Schweinerassen durch komparative Sequenzierung der DNA Fragmente gefunden. Einfache Protokolle, die auf PCR Techniken basieren, wurden anstelle der Genotypisierung von Tierproben etabliert.

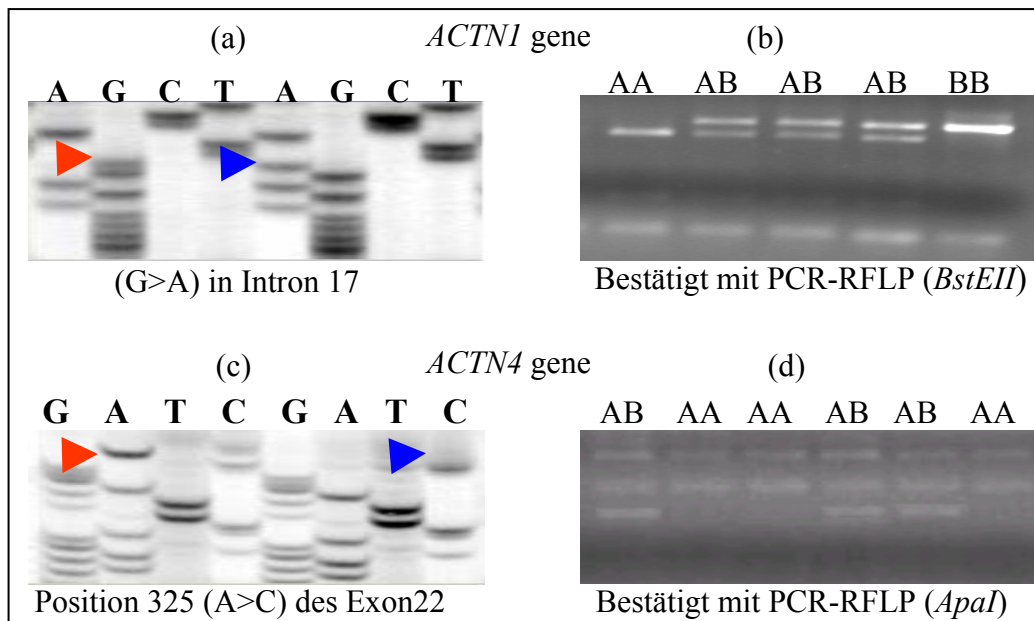


Abb. 3.1: Sequenzanalyse des *ACTN1* und *ACTN4* Gens mit Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs)

Alle ESTs der Actinin alpha 1 und Actinin alpha 4 Gene des Schweins aus der GenBank (<http://pigest.genome.astate.edu/query>) wurden verwendet, um Polymorphismen zu detektieren. In Übereinstimmung mit den Schweinesequenzen BF442592 und BI338543 erhielt man zwei Fragmente aus der genomischen DNA aus Schweinesperma von verschiedenen individuellen Ebern der Rassen Pietrain und Hampshire. Ein Polymorphismus im Intron 18 des *ACTN1* Gens wurde gefunden. Der SNP war eine Transition von Guanin (G) zu Adenin (A) und konnte durch eine PCR-RFLP mit dem Restriktionsenzym *BstEII* bestätigt werden (Abbildung 3.1a, b). Der andere Polymorphismus an der Position 359 im 3'-UTR des porcinen *ACTN4* wurde ebenfalls detektiert. Der SNP war eine Transition von Adenin (A) zu Cytosin (C) und konnte durch eine PCR-RFLP mit dem Restriktionsenzym *ApaI*, dargestellt werden (Abbildung 3.1c,d).

3.1.2 Detektion von Polymorphismen im *ACTB* Gen

Komparative Sequenzierung von DNA Fragmente verschiedener Schweinerassen wurde angewendet, um die Polymorphismen in *ACTB* zu finden. In einem 1102 bp großen DNA Fragment, das einen Teil von Exon 3, Intron 3, Exon 4, Intron 4 und einen Teil von Exon 5 enthält, wurden vier SNPs gefunden (Abbildung 3.2). Alle SNPs waren eine Transition von Thymin (T) zu Cytosin (C).

```

GAACCCCAAAGCCAACCGTGAGAAGATGACATCAGGTCAGTGGCCCACTGGGC
TCTCTCGCGGGCGGCCGCCCTCCTCTCTTGCC(T/C)CTCTTTGCCACGCCCTTCT
CACTTGTTCTTTCTTCTGCCATTTTCTAGGACTTTTCTTCTCTGACCTGAGTCTCCTT
TGAAACTCTGCAGGTTCTATTTGCTTTTCCCCAGCTGGAGTCTTCTCGTGTGGCCT
TTCTGACTAGGTGTTAAAAGCATAAGGTGCTGTGGGTGTATAGGTAACAACACTGGC
TCGTGTGACAAAGCCGACGAGGCTGCCGTAAGGGGCCTCGGAGTGTGTATCCCCG
TAGGTGCACAGTAGGTCTGACGTGACTCCCCGACCTGGGGTCCCCAGCACACTTAG
CCGTGTTCCCTGCACTCTCTGCATGTCCCCAGTC(T/C)GGCCTGACTGCCCCCGGC
GGCTTCCCGAGGGTGACAG(T/C)GTCCCTCCCTCCCTCCAGATCAGGTTGGAGAC
CTTCGACACCCCAGCCATGTAGGTGGCCATCCAGGCGGTGCTGTCCCTGTACG
CCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGAGACGGGGTCACCCAC
ACGGTGCCCATCTACGAGGGGTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTGGA
CCTGGCTGGCCGGGACCTGACCGACTACCTCATGAAGATCCTGACGGAGCGGG
GCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCGGGAGATCGTGCGGGACATCAAGGA
GAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAGATGGCCAC(T/C)GCCG
CGTCCTCCTCCTCCCTGGATGAAGAGCTACGAGCTGCCCGACGGCCAGGTCAT
CACCATCGGCAACGAGCGCTTCCGCTGCCCCGAGGCGCTCTTCCAGCCCTCCTT
CCTGGGTGAGGACGCAGCCCTGGCCCTGCCTTCCCCCGCCCCCTGGCTCACC
CGGTGGTGGCCACAGCGGAAGCTCAGTCGGGCTTCTCTCCCCCTCAGGCATGGA
ATCCTGCGGCATCCACCAAACCTTCAACTCCATCATGAAGTGCGACGTCG
ACATCCGCAAGGACCTCTACG

```

Abb. 3.2: Sequenzanalyse des *ACTB* Gens mit SNPs
 Das 1102 bp große DNA Fragment enthält einen Teil von Exon 3, Intron 3, Exon 4, Intron 4 und einen Teil von Exon 5.
 In Kursiv sind die Introns angegeben und in Klammern die SNPs. Die Primer des PCR Produkts sind unterstrichen.

In Intron 3 des *ACTB* Gens wurden an den Positionen 87, 427 und 465 drei SNPs gefunden. Der vierte SNP an der Position 807 lag in Exon 4. In einer mehrfachen SBE Reaktion konnten die Genotypen der SNPs bestimmt werden.

3.1.3 Determination der Genotypen

Insgesamt wurden 19 Kandidatengen Genorte in die Untersuchung einbezogen. Acht Kandidatengene *FSHB*, *PRL*, *PRLR*, *INHA*, *RBP4*, *OPNin6*, *ACTN1* und *ACTN4* wurden durch Mittelwerte der PCR-RFLP analysiert. Drei Kandidatengene *GnRHR*, *LHB* und *RLN* wurden mit der PCR-SSCP genotypisiert und in sieben Mikrosatellitenmarkern *AR*, *FST*, *INHBA*, *INHBB*, *ACR*, *ACTG*, *OPNpro* wurden die Längenpolymorphismen der repetitiven Sequenzen mit Hilfe eines LI-COR DNA Sequenzer Model 4200 determiniert. Die vier SNPs des *ACTB* Gens wurden mittels SBE auf einem CEQ8000 Sequenzer analysiert. Haplotypen wurden mit der SNP HAP Software (Version 1.2) (<http://archimedes.well.ox.ac.uk/pise/snp hap-simple.html>) konstruiert.

3.2 Effekt der Kandidatengene auf reproduktive Merkmale der Eber

Die Assoziationsanalyse zwischen diesen Kandidatengenen und den Merkmalen der Spermienqualität ergab, dass die Genorte *ACTB*, *ACTN1*, *ACR* und *OPNin6* signifikant mit Fruchtbarkeitsmerkmalen der Eber und die Genorte *ACTB*, *FSHB*, *PRL*, *ACR*, *INHA*, *INHBA*, *INHBB*, *FST*, *RLN*, *ACTG*, *GnRHR*, *RBP4*, *OPNin6*, *AR* und *OPNpro* signifikant mit Spermaqualität assoziiert sind. Die Genorte *LHB*, *PRLR* und *ACTN4* hatten keinen signifikanten Effekt auf ein reproduktives Merkmal der Eber.

Im Einzelnen:

1. Das *ACTB*-Gen zeigte eine Assoziation zur NBA, MOT und ASR. Der Haplotyp CTCT hatte signifikant mehr NBA ($p < 0.05$), Haplotyp TTTC hatte signifikant höhere MOT ($p=0,0188$) und signifikant niedrigere ASR ($p < 0.05$) sowie Haplotyp CTTT hatte signifikant niedrigere ASR ($p < 0.05$).
2. Kandidatengen *ACTN1* beeinträchtigte signifikant ($p < 0.05$) die NRR in der PI&PI×HA Population und in der PI Population. Additive Effekte ($p < 0.01$) und dominante Effekte ($p < 0.05$) waren signifikant auf NRR.

3. Locus *OPNin6* war signifikant ($p < 0.05$) mit NBA in der PI&PI×HA Population und in der PI Population assoziiert. Jedoch war nur der additive Effekt in beiden Populationen signifikant ($p < 0.05$). Dieser Locus war ebenfalls signifikant ($p \leq 0.05$) mit MOT in der PI&PI×HA Population assoziiert, aber additive und dominante Effekte waren nicht signifikant.
4. Kandidatengen *ACR* hatte einen signifikanten Effekt ($p < 0.05$) auf NRR in der PI&PI×HA Population und der PI Population. Aber nur Allel '208 bp' hatte einen signifikanten Allelsubstitutionseffekt ($p < 0.05$) auf die NRR in der PI Population. Der Genort *ACR* beeinflusste ebenfalls *SCON* in der PI×HA Population signifikant ($p \leq 0.01$). Die Allele '208 bp' und '218 bp' hatten signifikante Allelsubstitutionseffekte ($p < 0.05$) auf *SCON*. Dieser Genort hatte einen signifikanten Effekt ($p < 0.01$) auf MOT in der PI&PI×HA Population und in der PI Population. Jedoch wurden keine Allelsubstitutionseffekte auf MOT gefunden.
5. Genort *ACTG2* war signifikant mit VOL in der PI Population ($p < 0.01$) assoziiert. Aber nur Allel '109 bp' hatte einen signifikanten Allelsubstitutionseffekt auf das VOL. Dieser Marker war signifikant ($p < 0.05$) mit MOT in der PI×HA Population assoziiert, während kein signifikanter Allelsubstitutionseffekt auf MOT beobachtet wurde.
6. Genort *FSHB* war signifikant ($P \leq 0.01$) mit *SCON* in der PI Population assoziiert. Nur der additive Effekt war signifikant ($p < 0.05$) auf *SCON*, der dominante Effekt war nicht signifikant.
7. Der *GnRHR* Marker war signifikant mit MOT in der PI&PI×HA Population assoziiert ($p < 0.05$), ebenso in der PI Population ($p < 0.01$) signifikant ($p < 0.01$) mit PDR in der PI Population assoziiert, ebenfalls signifikant war *GnRHR* ($p < 0.05$) mit ASR in der PI&PI×HA Population und in der PI Population assoziiert.
8. Genort *PRL* war signifikant ($p < 0.01$) mit *SCON* in der PI×HA Population assoziiert. Jedoch nur der dominante Effekt zwischen Allel A und Allel C war signifikant ($p < 0.01$) auf *SCON*, es wurden keine signifikanten additiven Effekte zwischen Allel A und C gefunden.
9. Genort *RLN* beeinflusst signifikant ($p < 0.05$) das VOL in der PI×HA Population.

10. Das Kandidatengen *RBP4* hatte einen signifikanten Effekt ($p < 0.05$) hinsichtlich MOT in der PI Population.
11. Der Locus *INHA* war signifikant ($p < 0.05$) mit ASR in der PI Population und in der PI×HA Population assoziiert. Additive und dominante Effekte waren in beiden Populationen nicht signifikant.
12. Der Genort *FST* beeinflusste VOL in der PI Population signifikant ($p < 0.01$). Aber nur Allel `142 bp` hatte einen signifikanten Allelsubstitutionseffekt ($p < 0.05$) auf VOL.
13. Der Locus *INHBA* war signifikant ($p < 0.05$) mit PDR in der PI&PI×HA Population assoziiert. Es wurde jedoch kein Allelsubstitutionseffekt auf PDR gefunden. Dieser Genort war signifikant mit ASR in der PI&PI×HA Population ($p < 0.01$), in der PI Population ($p < 0.05$) und in der PI×HA Population ($p < 0.05$) assoziiert. Jedoch wurde kein signifikanter Substitutionseffekt auf ASR gefunden.
14. Der Genort *INHBB* war signifikant mit SCON in der PI&PI×HA Population ($p < 0.05$) und in der PI Population ($p < 0.01$) assoziiert, wobei kein signifikanter Allelsubstitutionseffekt auf SCON gefunden wurde.
15. Locus *OPNpro* beeinflusste signifikant ($p < 0.05$) ASR in der PI Population, jedoch hatten keine Allele signifikante Allelsubstitutionseffekte auf ASR.
16. Das Kandidatengen *AR* war signifikant ($p < 0.05$) mit ASR in der PI&PI×HA Population assoziiert.

Eine detaillierte Beschreibung der Ergebnisse ist im Anhang vorhanden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung sind die analysierten KB Eber solche, die auch für die künstliche Besamung selektiert wurden, d.h. sie repräsentieren Tiere, die positive Produktionsleistungen vererben.

Die Eberfruchtbarkeit ist ein Merkmal mit einer niedrigen Heritabilität ($h^2 \approx 0.01-0.06$; See, 2000), welches stark von Umwelteinflüssen und genetischen Effekten des Ebers, dem Muttertier und der Nachkommen beeinflusst wird. Daher werden die Effekte von einzelnen Genorten als gering angesehen und eine größere Anzahl von Tieren wird zur Identifikation benötigt (Long und Langley 1999). Im Gegensatz dazu haben Merkmale der Spermaqualität geringe bis mittlere Heritabilitäten ($h^2 \approx$ um 0.2; See, 2000), sie sind jedoch aufwändig zu erfassen.

Markerinformationen können gemeinsam mit additiv genetischen Effekten in Form einer Marker-Assistierten Selektion (MAS) zur Verbesserung der Wurfgröße in beiden Geschlechtern des Schweins genutzt werden (Cassady et al. 2001). Simulationsstudien haben die potenziellen Vorteile von MAS gezeigt (Zhang und Smith 1992, 1993, Edwards und Page 1994). Die Effizienz von MAS in Vergleich zur phänotypischen Selektion ist am höchsten bei niedrigen Heritabilitäten und geschlechtslimitierten Merkmalen (Lande und Thompson 1990).

Kandidatengenanalysen für die Eberfruchtbarkeit wurden von Steinheuer et al. (2002, 2003) beschrieben. Merkmale der Spermaqualität wurden von Hardge et al. (1995), Huang et al. (2001, 2002), Urban und Kuciel (2001), Kmiec et al. (2002) und Mackowski et al. (2004) ausgeführt. Weiter wurden QTL sowohl für die geschlechtliche Entwicklung des Ebers und FSH Konzentration im Serum, als auch für die tägliche Spermaproduktion identifiziert (Bidanel et al. 2001, Rohrer et al. 2001, Ford et al. 2001, Sato et al. 2003).

Für die Anwendung eines Kandidatengenansatzes zur Identifikation von Loci, mit der die Eberreproduktionsleistung assoziiert ist, ist es wichtig, Kandidatengene anhand ihrer bekannten Funktion (biologische und physiologische Funktion) und/oder anhand von Informationen aus genetischen Karten (Kopplungskarten, physische Karten, vergleichende Karten, QTLs oder ESTs) abzuleiten.

In die Untersuchung wurden 18 Kandidatengene (*GnRHR*, *FSHB*, *LHB*, *RLN*, *PRL*, *PRLR*, *FST*, *INHA*, *INHBA*, *INHBB*, *AR*, *ACR*, *RBP4*, *OPN*, *ACTG2*, *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB*) anhand ihrer bekannten physiologischen Funktion in der männlichen Reproduktion

ausgewählt. Das *AR* Gen ist ebenfalls ein positionelles Kandidatengen für Merkmale der Eberreproduktion (Bidanel et al. 2001). Diese direkten Kandidatengene wurden durch unterschiedliche Autoren auf den Schweinechromosomen lokalisiert (Tabelle 4.1). Die Position von *ACTN1* wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmals bestimmt.

Tab. 4.1: Übersicht der Kandidatengene und ihre Position auf die Schweine Chromosomen

| Gen | Chromosom | Autor |
|--------------|--------------------|----------------------------|
| <i>RLN</i> | 1q2.8-2.9 | Chowdhary et al. 1994 |
| <i>FSHB</i> | 2p1.6-2p1.2 | Mellink et al. 1995 |
| <i>ACTB</i> | 3 | Thomsen et al. 1998 |
| <i>ACTG2</i> | 3 | Kratzsch et al. 1999 |
| <i>ACR</i> | 5p1.5 | Rettenberger et al 1995 |
| <i>ACTN4</i> | 6q1.2 | Martins-Wess et al. 2003 |
| <i>LHB</i> | 6q2.1 | Mellink et al. 1995 |
| <i>ACTN1</i> | 7 | - |
| <i>PRL</i> | 7p1.1-1.2 | Vincent et al. 1998b |
| <i>GnRHR</i> | 8q1.1-1.2 | Rohrer 1999a |
| <i>OPN</i> | 8q2.7 | Alexander et al. 1996 |
| <i>RBP4</i> | 14 | Messer et al. 1996 |
| <i>INHA</i> | 15 | Rettenberger et al. 1996 |
| <i>INHBB</i> | 15 | Nonneman and Rohrer 2003 |
| <i>PRLR</i> | 16q1.4, 16q2.2-2.3 | Vincent et al. 1997 |
| <i>FST</i> | 16q1.4 | Lahbib-Mansais et al. 2000 |
| <i>INHBA</i> | 18q2.4 | Lahbib-Mansais et al. 1996 |
| <i>AR</i> | Xp1.1-q1.1 | Rohrer 1999b |
| | Xq1.3 | Seifert et al. 1999 |

4.1 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Die Genorte *FSHB*, *ACTN1*, *ACTN4*, *GnRHR*, *RLN*, *LHB* und *INHBA* befinden sich in beiden untersuchten Eberpopulationen in einem Hardy-Weinberg Gleichgewicht. Per Definition bedeutet dies, dass eine Population mit konstanten Allel- und Genotypfrequenzen folgende Voraussetzungen aufweist: Zufallspaarung; unendliche Populationsgröße; keine Selektion, Mutation und Migration (keine Allelverluste/-zunahme); getrennte, aufeinander folgende Generationen (keine Anpaarungen zwischen unterschiedlichen Generationen).

Selektion und genetische Drift bewirken eine Änderung der Allelfrequenz. In der Vergangenheit wurden Pietrain und Hampshire Schweine als Folge der Zuchtziele auf Fleischqualität und -beschaffenheit ohne Berücksichtigung der Fruchtbarkeit selektiert (Schwark et al. 1975, Rothschild und Ruvinsky 1998). Für die Genorte *PRL*, *PRLR*, *INHA*, *RBP4* und *OPNin6*, die sich nicht in einem Hardy-Weinberg Gleichgewicht befinden, ist es vorstellbar, dass die Selektion auf diese Merkmale eine Änderung in der Allelfrequenz verursacht hat. In der Abwesenheit von Selektion ist die Auswirkung der genetischen Drift abhängig von der Allelfrequenz und der effektiven Populationsgröße. Nach dem Beginn der Drift wird sich vermutlich die Allelfrequenz langfristig gleichgerichtet (Zu- oder Abnahme) weiter verändern (Falconer und Mackay 1996).

Die signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht der Mikrosatellitenmarker *FST*, *INHBB*, *ACR*, *ACTG2* und *OPNpro* kann unterschiedliche Gründe haben. Ein negativer *Fis*-Wert wird durch gezielte Selektion verursacht; ein positiver *Fis*-Wert kann sich aus Null-Allelen eines Markers, Inzucht oder der Existenz von Subpopulationen innerhalb einer Population (Weir 1996) ergeben. Durch Inzucht oder Hybridisierung soll die Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht gleichzeitig an mehreren Genorten in ähnlicher Größe erscheinen. Der Einfluss der Selektion auf die Allelfrequenz eines Markers ist unabhängig von der zugrunde liegenden Population. Trotz vergleichbarer Zuchtziele sind in den beiden untersuchten Populationen jedoch die Abweichungen für die unterschiedliche Genorte *FST*, *INHBB*, *ACR*, *ACTG2* und *OPNpr* nicht konsistent. Obwohl keine eindeutigen Beweise für Selektionseffekte oder die Anwesenheit von Null-Allelen für diese Mikrosatelliten in den Eberpopulationen vorliegen, kann bezweifelt werden, ob die untersuchten Eber die Allelfrequenzen ihrer Population in ausreichendem Maße repräsentieren.

4.2 Kandidatengeneffekte

Die Entwicklung von porcinen Genomkarten ermöglichten die Identifizierung individueller Gene, die die Reproduktion steuern. Die Vorteile einer MAS werden umso größer, je enger Marker und Merkmal assoziiert sind (Rothschild, 1998).

Offensichtlich hat die weibliche Fruchtbarkeit einen größeren Einfluss auf die Merkmale der Reproduktionsleistung als die männliche Fruchtbarkeit. Deswegen wurde die genetische Steuerung der weiblichen Fruchtbarkeit intensiver untersucht und eine größere Anzahl von QTL Regionen identifiziert (Rothschild et al. 1996, Rathje et al. 1997, Wilkie et al. 1999, Rohrer et al. 1999c, Rohrer 2000, Wada et al. 2000, Braunschweig et al. 2001, Cassady et al. 2001, Jiang et al. 2001, Hirooka et al. 2001, King et al. 2003, Campbell et al. 2003, Sato et al.

2003). Die Identifizierung von QTL Regionen für männliche Reproduktionsmerkmale beim Schwein, Rind, Mensch und Maus waren Gegenstand der Untersuchungen von Rohrer et al. 2001; Bidanel et al. 2001; Ford et al. 2001; Sato et al. 2003 (Schwein), Casas et al. 2004; Schrooten et al. 2004 (Rind), Martin et al. 2001 and 2002 (Mensch) sowie Rocha et al. 2004; Storchova et al. 2004 (Maus).

GnRHR Gen

In der vorliegenden Untersuchung wird erstmals gezeigt, dass der *GnRHR* Genort signifikant mit MOT, PDR und ASR assoziiert ist. Heterozygote Tiere hatten eine höhere Spermienmotilität und neigten zu einer geringeren Rate abnormaler und immaturer Spermien. Der untersuchte Polymorphismus in der 3'-UTR des *GnRHR* Gens könnte Genexpressionsraten direkt beeinflussen und/oder ein Marker für potenziell gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf Proteinstrukturen und/oder Expressionsraten sein. Im Menschen sind *GnRHR* Mutationen signifikant mit männlicher Unfruchtbarkeit assoziiert (Layman et al. 1997). Desweiteren zeigen Rohrer et al. (2001), dass QTL Regionen auf verschiedenen Chromosomen, einschließlich SSC8 (Position 19cM), den Serum FSH Spiegel von Meishan × Large White Ebern beeinflussen. Jedoch wurde *GNRHR* dem SSC8q1.1-1.2 zugeordnet (Rohrer 1999a), d.h. in einer weiteren Entfernung zum genannten QTL für die FSH Serumkonzentration. Darüber hinaus wurden QTL für Wachstums- und Fruchtbarkeitsmerkmale wie Alter bei Eintritt in die Geschlechtsreife, pränatale Überlebensraten und Ovulationsraten in der Nähe von *GNRHR* identifiziert, genauso wie QTL für andere (Casas-Carrillo et al. 1997, Milan et al. 2002, Cassady et al. 2001, King et al. 2003, Rathje et al. 1997). Aus unseren Ergebnissen lassen sich ähnliche Schlussfolgerungen ziehen. Die auch in unserer Untersuchung herausgearbeitete wichtige Bedeutung des *GnRHR*-Locus für das Fruchtbarkeitsmerkmal wird durch unsere Untersuchungsergebnisse ebenfalls unterstützt.

PRL Gen

Der Polymorphismus im *PRL* Genort beeinflusst - wie die Ergebnisse unserer Studie erstmals aufzeigen - die Spermienkonzentrationen in PI×HA Ebern. Der untersuchte Polymorphismus liegt in Intron 2 des *PRL* Gens und könnte das Genexpressionsniveau beeinflussen und/oder ein Marker für potenziell gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf Proteinstrukturen und/oder Expressionsraten sein. Die Arbeiten von Aiman et al. (1998) zeigen eine signifikante Korrelation zwischen der Prolaktinkonzentration im Seminalplasma des Mannes und der Spermienkonzentration sowie der Motilität. Darüber hinaus ergibt sich aus der Assoziation des *PRL* Gens mit der Spermaqualität auch ein positioneller Hinweis aus einer QTL Region mit Einfluss auf männliche Entwicklungsmerkmale (Hodengewicht, Nebenhodengewicht und

Länge der Bulbourethraldrüsen) bei Meishan × Large White Ebern, die sich an Position 66 *cM*, 86*cM*, 143 *cM* von SSC7 befindet (Bidanel et al. 2001). Die genaue Lokalisation des *PRL* Gens ist Position 68 *cM* von SSC7 (<http://www.thearkdb.org/>).

PRLR Gen

Der untersuchte SNP befindet sich innerhalb der kodierenden Region des *PRLR* Gens (Vincent et al. 1997). Huang et al. (2002) berichteten, dass der *PRLR* Genort bei 34 Duroc Ebern signifikant mit der Spermienmotilität ($p < 0.05$) und der PDR ($p < 0.01$) assoziiert war. Steinheuer et al. (2003) zeigten, dass der Polymorphismus des *PRLR* Genortes einen signifikanten Effekt auf die NBA bei 51 Ebern der Deutschen Landrasse hatte. Funktionale Beweise für die Assoziation des *PRLR* Gens ergeben sich aus Knock Out Experimenten, die eine verringerte Fertilität bei männlichen Mäusen zeigten (Goffin et al 1999). In unserer Studie wurde kein signifikanter Effekt des *PRLR* Genortes auf Reproduktionsmerkmale bei Ebern der PI und PI×HA Population beobachtet. Die Alleleffekte unterscheiden sich aufgrund der genetischen Herkunft in verschiedenen Populationen. Unterschiedliche Kopplungsphasen zwischen den Markern und zufälligen Mutationen aufgrund von Rekombination können die Unterschiede in den verschiedenen Populationen erklären. Außerdem könnten weitere, noch unbekannte merkmalsbeeinflussende QTL mit dem Gen gekoppelt sein (Linville et al. 2001).

FSHB Gen

Die untersuchte Mutation befindet sich in Intron 1 des *FSHB* Gens und könnte ein Marker für potenziell gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf die β -Faltblattstruktur von FSH und/oder dessen Expressionsraten sein. In dieser Studie war der Polymorphismus des *FSHB* Genortes signifikant mit der Spermienkonzentration assoziiert. Der funktionale Assoziationsbeweis des *FSHB* Gens ergibt sich aus Knock Out Experimenten, die zeigten, dass die Ausschaltung des *FSHB* Gens zu einer Verringerung der Spermienkonzentration von 85% auf 75% führt (Layman 2000). Ford et al. (1997) berichteten, dass in ausgewachsenen Meishan Ebern eine negative Beziehung zwischen FSH Sekretion und Hodengröße besteht, begleitet von einer verringerten täglichen Spermienproduktion. Seminales FSH und Testosteronkonzentrationen waren beim Mann positiv mit der Spermienproduktion korreliert (Vasquez et al. 1986). FSH beeinflusste die Spermatogenese beim Eber (Zanella et al. 1999). Hodengröße und -gewicht korrelierte mit der täglichen Spermienproduktion und Gesamtspermienreserven (Huang and Johnson 1996). Das *FSHB* Gen ist auf SSC2 lokalisiert, bisher gibt es bezüglich der Position keine Hinweise auf eine Kopplung mit diesen Merkmalen.

LHB Gen

Der untersuchte Polymorphismus in Exon 2 des *LHB* Gens ist eine stille Mutation, die als Marker für möglicherweise gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf die Struktur des luteinisierenden Hormons und/oder dessen Expressionsrate dienen könnte. In dieser Studie wurden keine signifikanten Effekte des *LHB* Genortes auf Spermaqualitätsmerkmale und Eberreproduktionsmerkmale gefunden. Der mögliche Grund hierfür ist, dass Eberreproduktionsmerkmale komplexe Merkmale sind, die durch mehrere Gene und ihre Interaktion beeinflusst werden. Aufgrund von Epistasie könnte der Polymorphismus im *LHB* Gen nur einen geringen Effekt auf die Variation des Phänotyps haben. Außerdem könnten Kopplungsungleichgewichte der Grund für die fehlenden Auswirkungen auf die untersuchten Merkmale in diesen Eberpopulationen sein.

FST Gen

Der Mikrosatellitenpolymorphismus des *FST* Gens beeinflusste das Spermavolumen in dieser Studie signifikant. Der untersuchte Polymorphismus in Intron 1 des *FST* Gens ist ein Marker für möglicherweise gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf die Proteinstruktur und/oder den Expressiongrad von Follistatin. Follistatin moduliert die Sekretion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) beim Schwein (Shimonaka et al. 1991, Mather et al. 1993, Hafez and Hafez 2000). FSH reguliert die Spermatogenese (Zanella et al. 1999, Lunstra et al. 1997). Dies liefert den funktionellen Beweis für die Assoziation des Markergenortes *FST* mit Merkmalen der Spermaqualität. Der *FST* Genort liegt auf SSC16, über die genaue Lokalisation gibt es jedoch bisher keine Informationen.

INHA, *INHBA* und *INHBB* Gen

Die Inhibine sind heterodimere Glykoproteine bestehend aus einer alpha-Untereinheit (α) und einer von zwei beta-Untereinheiten (βA oder βB). Sie werden von Sertolizellen produziert und über die Lymphe sekretiert, die zur endokrinen Regulation der Reproduktion beiträgt (Hafez und Hafez 2000). Daher wurden *INHA*, *INHBA* und *INHBB* als Kandidatengene für die für Merkmale der Eberreproduktionsleistung analysiert.

Der untersuchte Polymorphismus im *INHA* Gen ist eine stille Mutation, die als Marker für potenziell gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf die α -Proteinstruktur und/oder die Expressionsrate von Inhibin dienen könnte. Es gibt einige funktionale Hinweise für signifikante Assoziationen des *INHA* Gens mit Spermaqualitätsmerkmalen. Die Aktivierung des *INHA* Gens während der Hodenentwicklung ist korreliert mit der histologischen Reifung des Hodens und dem Erwerb der männlichen Fruchtbarkeit (Seok et al. 2004). Die Überexpression des *INHA* Gens führt zu einer Störung des normalen Inhibin-Aktivin-

Verhältnisses und zu einer Verringerung der Reproduktionsleistung (Cho et al. 2001). Das *INHA* Gen wird SSC15 zugeordnet, aber der positionelle Beweis für die Assoziation des *INHA* Genortes steht noch aus.

Der Polymorphismus des *INHBA* war in dieser Studie signifikant mit der PDR und ASR assoziiert. Der untersuchte Polymorphismus befindet sich innerhalb der 3'-UTR des porzinen *INHBA* Gens und könnte als Marker für möglicherweise gekoppelte Polymorphismen mit Auswirkungen auf die Inhibin beta A Proteinstruktur und/oder die Expressionsrate dienen. Kaipia et al. (1992) berichteten, dass die Expression von Inhibin beta A in unterschiedlichen Stadien des epithelialen Zyklus der Tubuli seminiferi die Spermatogenese reguliert. Weitere Beweise wurden nicht gefunden.

In dieser Studie wurde erstmals eine signifikante Assoziation des *INHBB* Genortes mit SCON Merkmalen aufgezeigt. Der untersuchte Mikrosatellitenpolymorphismus ist in der 3'-UTR lokalisiert. Dieser Marker ist möglicherweise mit Polymorphismen, die Auswirkungen auf die Inhibin β -Proteinstruktur und/oder das Expressionslevel haben könnte, gekoppelt. Serum Inhibin B wurde als Marker für die Spermienproduktion und die Unfruchtbarkeit beim Menschen und Affen vorgeschlagen (Hu and Huang 2002, Plante and Marshall 2001).

RBP4 Gen

Steinheuer et al. (2003) berichteten, dass der *RBP4* Genort bei 51 Ebern der Deutschen Landrasse signifikant mit den Zuchtwerten Anzahl lebend geborener Ferkel und Anzahl abgesetzter Ferkel assoziiert ist. Additive Effekte und Dominanzeffekte unterschieden sich signifikant von Null. In der von uns untersuchten Eberpopulation wurde kein Effekt des *RBP4* Genortes auf Eberreproduktionsmerkmale festgestellt. Die Alleleffekte unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlichen genetischen Herkunft. Unterschiedliche Kopplungsphasen zwischen Makern und einer zufälligen Mutation aufgrund von Rekombinationen können als Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen den Populationen dienen. Außerdem könnten noch unbekannte QTL mit einem Effekt auf die Merkmale mit dem Gen gekoppelt sein (Drögemüller et al. 2001).

Der Effekt des *RBP4* Genortes auf Spermaqualitätsmerkmale wurde in unserer Studie erstmals ermittelt. Es zeigte sich, dass der Genort signifikant mit der Spermienmotilität assoziiert ist. Einen funktionalen Beweis liefert der von Kato et al. 1985 publizierte Hinweis, dass zelluläres retinolbindendes Protein im Hoden und Nebenhoden lokalisiert ist, wo Retinol eine wichtige Rolle in der Spermienausbildung und -reifung spielen könnte. Der *RBP4* Genort

befindet sich auf SSC14; bezüglich Eberreproduktionsmerkmalen wurde bisher keine QTL Region auf diesem Chromosom gefunden.

AR Gen

In dieser Untersuchung beobachteten wir, dass der *AR* Genmarker mit Spermaqualitätsmerkmalen assoziiert ist. Der getestete Polymorphismus befindet sich in der 5'-UTR des *AR* Gens, das ein Marker für potenziell gekoppelte Polymorphismen mit Einfluss auf die Proteinstruktur und/oder die Expressionsrate des Androgenrezeptors sein könnte. Im humanen *AR* Gen beispielsweise können mehr als 300 verschiedene Mutationen (Missense-Mutationen) Ursache für eine fehlende Androgensensitivität sein (Patterson et al. 1994). Männer mit kurzen CAG Wiederholungen im *AR* Gen haben die höchste Spermienproduktion (Von Eckardstein et al. 2001).

Eine QTL Region auf SSCX nahe des *AR* Gens beeinflusst bei Ebern FSH, Hodengröße und –gewicht, Nebenhodengewicht und Samenblasendrüsengewicht signifikant (Bidanel et al. 2001, Rohrer et al. 2001). Ford et al. (2001) berichteten, dass ein/mehrere Gen/e, die die Hodenentwicklung und pubertäre FSH und LH Konzentrationen regulieren, sich auf Chromosom X befinden könnten. Sie untersuchten chinesischen Meishan × Large White Eber und zeigten, dass Eber, die X-gekoppelte Allele der Meishanrasse besaßen, kleinere Hoden und eine verringerte tägliche Spermienproduktion hatten. Dies könnte als Beweis für die Assoziation des *AR* Genmarkers mit der ASR dienen.

RLN Gen

Der Polymorphismus (C>A) an Position 1 von Codon 8 (Nukleotid 22) im ersten Exon des *RLN* Gens führte zum Austausch einer Aminosäure (L8I). In dieser Studie konnte erstmals eine signifikante Assoziation des *RLN* Gens mit dem Spermavolumen gezeigt werden. Andere Untersuchungen wiesen nach, dass der Relaxinspiegel im Seminalplasma die Spermienmotilität bei Ebern signifikant beeinflusste (Bagnel et al. 1993, Sasaki et al. 2001). Das *RLN* Gen befindet sich auf SSC1 (<http://www.thearkdb.org>), eine QTL Region auf SSC1 nahe des *RLN* Gens wirkt sich beim Schwein signifikant auf das Alter bei Eintritt der Geschlechtsreife (Rohrer et al. 1999c). Weitere Beweise einer Assoziation des *RLN* Gens mit anderen porzinen Reproduktionsmerkmalen wurden noch nicht gefunden.

ACR Gen

In dieser Studie zeigte sich eine signifikante Assoziation des *ACR* Gens mit der Spermienkonzentration und Motilität und mit dem Eberfruchtbarkeitsmerkmal NRR. Der Polymorphismus des *ACR* Gens beeinflusst möglicherweise die Expressionsrate von Akrosin

mit Auswirkungen auf die Spermaqualität und Fruchtbarkeitsleistung. Die Aktivität von Akrosin ist ein wichtiger Index für die Bewertung männlicher Fruchtbarkeit (Cui et al. 2000). Akrosin wurde beim Menschen als molekularer Marker für die Fruchtbarkeit herangezogen (Braundmeier and Miller 2001). Das Fehlen von Akrosin im Sperma in Kombination mit Modifikationen der Zona Pellucida (ZP) kann die Fertilität bei Mäusen beeinflussen (Nayernia et al. 2002). Bei der In-Vitro-Lagerung bovinen Spermas könnte der Verlust von Akrosin für die verringerte Fruchtbarkeit verantwortlich sein (Miller et al. 1988). Beim Eber sind die Gehalte an Proakrosin und Akrosin mit der Befruchtungsfähigkeit der Spermien korreliert (Cechova et al. 1984). Die Transkriptionsprodukte des *ACR* Gens spielen beim Schwein als Proteine bei der Vermittlung der Bindung von Spermium und Eizelle während der Befruchtung eine kritische Rolle (Howes and Jones 2002). Schwankungen der Akrosinaktivität könnten im Zusammenhang stehen mit den Auswirkungen hoher Temperaturen im Sommer während der Spermatogenese und Parametern der Samenqualität (Spermakonzentration, Ejakulatvolumen und Anzahl der Spermien) (Ciereszko et al. 2000). Die Akrosinaktivität kann genutzt werden um die Samenqualität beim Eber zu beurteilen (Glogowski et al. 1998). Das *ACR* Gen befindet sich auf SSC5. Obwohl Cassady et al. (2001) berichteten, dass sich an Position 131 *cM* von SSC5 eine QTL Region für das Merkmal Anzahl tot geborener Ferkel beim Schwein befindet, konnte bisher kein positioneller Beweis für die Kopplung dieser Eberreproduktionsmerkmale gefunden werden.

OPN Gen

Der Mikrosatellitenmarker in der Promoterregion des *OPN* Gens ist bei Ebern der Deutschen Landrasse signifikant mit Fruchtbarkeitsmerkmalen assoziiert (Steinheuer et al. 2003). Jedoch konnte ein Effekt dieses Markers auf Eberreproduktionsmerkmale in der von uns untersuchten Pietrain und Pietrain \times Hampshire Population nicht beobachtet werden. Hingegen beeinflusste der andere Polymorphismus in Intron 6 des *OPN* Gens das Merkmal Anzahl lebend geborener Ferkel signifikant. Daher könnte der Polymorphismus des *OPN*_{in6} Genortes als Marker für die möglicherweise gekoppelten Kausalmutationen dienen, die Auswirkungen auf die Proteinstruktur oder die Expressionsrate von Osteopontin haben und damit die Eberfruchtbarkeit beeinflussen. Osteopontin, eines der fertilitätsassoziierten Proteine, wurde als molekularer Indikator für die Fruchtbarkeit beim Menschen in Betracht gezogen (Braundmeier and Miller 2001).

Desweiteren zeigte dieses Experiment zum ersten Mal, dass der *ONPin6* Genort signifikant mit der Spermienmotilität assoziiert ist und der *OPNpro* Genort die ASR signifikant beeinflusst. Der zuletzt genannte Polymorphismus könnte auch ein Marker für potenziell gekoppelte Polymorphismen mit Auswirkungen auf die Proteinstruktur und/oder die

Expressionsrate von Osteopontin sein. Es gibt einige funktionale Beweise für die Assoziation dieser Loci mit Spermaqualitätsmerkmalen. Das *OPN* Gen wird im Hoden, den Ductuli efferenti und im Nebenhoden exprimiert und reguliert (Luedtka et al. 2002). Die Anwesenheit von *OPN* mRNA und Protein im Hoden und Nebenhoden sowie auf der Oberfläche von epididymalen Spermien könnte eine Rolle bei der testikulären Zelladhäsion während der Spermatogenese und/oder der epididymalen Reifung spielen, obwohl auch andere Funktionen im männlichen Reproduktionstrakt möglich sind (Siiteri et al. 1995).

Das *OPN* Gen befindet sich an Position 120.2 *cM* von SSC8 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>). King et al. (2003) berichteten von einer QTL Region für Wurfgröße an Position 127 *cM* von SSC8 (QTL span 92.4-127.7 *cM*). Dies könnte ein positioneller Hinweis für die Assoziation des *OPN* Gens mit Fruchtbarkeitsmerkmalen sein. Desweiteren zeigten Rohrer et al. (2001), dass eine QTL Region mit Einfluss auf die Serumkonzentration von FSH bei Meishan × Large White Ebern auf unterschiedlichen Chromosomen einschließlich SSC8 (Position 19 *cM*) liegt. Leider ist das *OPN* Gen nicht in dieser QTL Region lokalisiert.

ACTN1 Gen

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass das *ACTN1* Gen mit den Eberfruchtbarkeitsmerkmalen NNR (PI&PI×HA und PI) und NBA (PI&PI×HA und PI×HA) assoziiert ist. Die Bewertung der additiven Effekten auf die NNR wurde für Allel A des *ACTN1* Gens durchgeführt. Schätzungen der Dominanzeffekte zeigten die Überlegenheit der Heterozygoten im Vergleich zum Mittelwert der zwei Homozygoten. Negative Effekte von Allel A wurden bei der Rasse PI beobachtet, während Allel B günstige Effekte zeigte. Der untersuchte SNP befindet sich innerhalb des Intron 18 des *ACTN1* Gens, das ein Marker für möglicherweise gekoppelte Polymorphismen mit Auswirkungen auf die Proteinstruktur und/oder das Expressionslevel von α -Aktinin 1 sein könnte. Das Kandidatengen *ACTN1* wird in Spermien exprimiert und ist möglicherweise in Membranveränderungen während der Akrosomreaktion involviert und hätte damit wichtige Auswirkungen auf die Spermienfunktion (Yagi and Paranko 1992). Bisher konnten keine weiteren Beweise für dieses Ergebnis gefunden werden.

Das *ACTN1* Gen beeinflusste Eberreproduktionsmerkmale nur in einer Eberpopulation signifikant. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass der Polymorphismus im untersuchten Gen das Merkmal indirekt beeinflusst. Der Polymorphismus könnte als Marker dienen, der mit Kausalmutationen innerhalb des Gens oder eng verbundenen Genen gekoppelt ist.

Unterschiedliche Kopplungsbeziehungen könnten ein Grund für die verschiedenen Geneffekte in den Eberpopulationen sein (Linville et al. 2001).

Zwischen den Genotypen des *ACTN1* Genortes und Spermaqualitätsmerkmalen konnten keine signifikanten Beziehungen beobachtet werden.

ACTN4 Gen

Das *ACTN4* Gen hatte in unserer Studie keinen signifikanten Effekt auf Eberreproduktionsmerkmale und Spermaqualitätsmerkmale. Der untersuchte Polymorphismus in der 3'-UTR des *ACTN4* Gens könnte jedoch als Marker dienen, der mit Kausalmutationen innerhalb des Gens oder mit diesem in Zusammenhang stehenden Genen mit ungünstigen Kopplungsungleichgewichten gekoppelt ist. Der funktionale Beweis ergibt sich aus der Expression des *ACTN4* Gens im Sperma und seiner möglichen Beteiligung an Membranveränderungen während der Akrosomreaktion mit Auswirkungen auf die Spermienfunktion (Yagi and Paranko 1992).

ACTG2 Gen

In der jetzigen Untersuchungen wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das *ACTG2* Gen VOL in der PI und MOT in der PI×HA Population beeinflusst. Studien der Aktinisoformen zeigten, dass das Gamma Aktin Protein in Eberjakulat vorkommt (Casale et al. 1988) und dass das *ACTG2* mRNA während die Spermatogenese differentiell exprimiert ist (Waters et al. 1985). Der getestete Polymorphismus des *ACTG2* Gens hat möglicherweise keinen direkten Einfluss auf Spermaqualitätsmerkmale, aber es könnte ein Marker sein, der in direktem Zusammenhang mit einer Kausalmutation innerhalb des *ACTG2* Gens oder eines gekoppelten Gens steht. Die Kausalmutation hat Einfluss auf die Gamma Aktin Proteinstruktur und/oder das Expressionsniveau.

Die unterschiedlichen Zusammenhänge zwischen den beiden Eberpopulationen kann eine Ursache dafür sein, dass in der einen aber nicht in der anderen Population signifikante Effekte des Polymorphismus auf die Spermaqualitätsmerkmale gefunden wurden.

ACTB Gen

Die Ergebnisse zeigen verschiedene Effekte des *ACTB* Gens auf Spermaqualitätsmerkmale, aber nicht auf Fruchtbarkeitsmerkmale. Die Fruchtbarkeitsmerkmale haben eine niedrige Heritabilität ($h^2 \approx 0.014-0.06$; See, 2000) die durch umweltbedingte und genetische Effekte von Eber, Sau und Nachkommen beeinflusst wird. Deswegen wird erwartet, dass die Effekte von einzelnen Genorten niedrig sind und eine große Anzahl von Tieren benötigt werden um sie zu identifizieren (Long and Langley, 1999).

Die in dieser Untersuchung getesteten SNPs befanden sich in Intron 3 und als stille Mutante in Exon 4. Es ist möglich, dass diese Polymorphismen/Haplotypen sich in einem Kopplungsungleichgewicht mit einem noch nicht identifizierten anfälligen Gen/Polymorphismus befinden, möglicherweise ist hierdurch die beobachtete signifikante Assoziation zu erklären. Weiterhin ist die zusätzliche Komplexität einer heterogenen Interaktion wichtig, die innerhalb diese Haplotypen beobachtet wurde (Zee et al. 2005).

4.3 Das Fehlen von Kandidatengeneffekten

Das Fehlen von Kandidatengeneffekten kann viele mögliche Gründe haben. Aus der vorliegenden Untersuchung könnten zwei denkbare Ursachen genannt werden. Zum einen ist es möglich, dass kein Kandidatengen einen signifikanten Effekt auf die hier untersuchten Merkmale der Eberfruchtbarkeit ausübt, zum anderen könnte es sein, dass ein Kandidatengen die Merkmale in einer Eberpopulation signifikant beeinflusst, aber keine signifikanten Effekte in einer anderen Eberpopulation gefunden wurden.

Merkmale der Eberreproduktion sind komplexe Merkmale und vermutlich ist eine Interaktion vieler Gene mitverantwortlich für die phänotypische Ausprägung (Geldermann 1996). Folglich kann der Einfluss eines einzelnen Genortes aufgrund des geringen Effektes auf den Phänotyp nicht signifikant sein. Epistasieeffekte anderer Gene und Interaktionen dieser Gene mit den Markern können ebenfalls dazu führen, dass sich die Geneffekte in verschiedenen Eberpopulationen unterscheiden. Wenig ist über die Ausmaße von Epistasieunterschieden in den hier untersuchten Merkmalen bekannt. Aber sollte Epistasie vorhanden sein, hängt der Effekt spezieller Allele von ihrer Frequenz und der Frequenz von Allelen an anderen Genorten ab. Aufgrund der Epistasie können Polymorphismen für ein Gen einen geringen Effekt in einer Reinzucht-Population haben, während ein bedeutende Anteil der Varianz in Kreuzungspopulationen erklärt werden kann.

Ein anderer möglicher Grund für die unterschiedliche populationensspezifische Wirkung von Genen ist das unterschiedliche Kopplungsungleichgewicht innerhalb der Populationen. Der Polymorphismus in den untersuchten Genen beeinflusst diese Merkmale möglicherweise indirekt. Diese Polymorphismen könnten Marker sein, die mit kausalen Mutationen innerhalb der Gene gekoppelt sind. Unterschiedliche Kopplungsbeziehungen sind möglicherweise der Grund, warum sich der Geneffekt zwischen den Eberpopulationen unterscheidet.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um Assoziationen von 18 Kandidatengenen mit Merkmalen der Spermaqualität zu untersuchen. Zusätzlich wurden diese Gene auf Assoziationen mit Fruchtbarkeitsmerkmalen der Ebern getestet, welche die Erfolgsrate der künstlichen Besamung widerspiegeln. Diese direkten funktionellen Kandidatengene Gonadotropin Releasing Hormonrezeptor (*GnRHR*), Follikel-stimulierendes Hormon beta (*FSHB*), Luteinizing-Hormon beta (*LHB*), Relaxin (*RLN*), Prolactin (*PRL*), Prolactin Rezeptor (*PRLR*), Androgen Rezeptor (*AR*), Follistatin (*FST*), Inhibin Alpha (*INHA*), Beta-Inhibin A und B (*INHBA*, *INHBB*), Retinol-Bindeprotein 4 (*RBP4*), Acrosin (*ACR*), Osteopontin (*OPN*), Actin Beta (*ACTB*), Actin Gamma (*ACTG2*) und Alpha-Actinin 1 und 4 (*ACTN1*, *ACTN4*) wurden basierend auf ihren physiologischen Funktionen in der männlichen Gonadotropin-Achse ausgewählt.

Als Tiermaterial wurden in dieser Studie reinrassige Pietraineber (PI) (n=244) und Kreuzungseber Pietrain × Hampshire (PI×HA) (n=112) aus einer Besamungsstation verwendet, die zwischen 1990 und 1999 geboren und hauptsächlich in kommerziellen Herden in Nord-West Deutschland eingesetzt wurden. Die Spermaqualitätsmerkmale umfassen Spermienkonzentration (SCON), Spermavolumen je Ejakulat (VOL), Spermienmotilität (MOT), Plasmatröpfchenrate (PDR) und abnormale Spermienrate (ASR) und wurden von jedem Ejakulat mit einem Lichtmikroskop entsprechend der Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation abgeleitet. Die Fruchtbarkeitsmerkmale Non-Return-Rate (NRR) und Anzahl lebend geborener Ferkel (NBA) wurden mit Hilfe der Wurfleistungen der angepaarten Eber in kommerziellen Herden zwischen 1991 und 1999 abgeleitet.

Spermaproben wurden von Januar 2000 bis Dezember 2001 gesammelt und bis zur DNA-Isolierung bei -20°C aufbewahrt. Genomische DNA wurde aus den Spermaproben der einzelnen Eber mit dem Standardprotokoll mit Mecoethanol Behandlung und ProteinaseK Verdau gefolgt von Phenol/Phenolchloroform Extraktion und Ausfällung mit Isopropanol gewonnen.

Um Polymorphismen innerhalb der *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB* Gene zu untersuchen, wurden Oligonukleotidprimer in Übereinstimmung mit dem porcinen *ACTN1* (BF442592), dem porcinen *ACTN4* (BI338543) und dem porcinen *ACTB* entwickelt. Die PCR Fragmente stammten aus genomischer DNA. Durch vergleichende Sequenzierung von Tieren der Rassen Piètrain und Hampshire wurden Polymorphismen in Intron 18 (G>A) des porcinen *ACTN1*, in 3'-UTR (A>C) des porcinen *ACTN4* und in Intron 3 (3 SNPs) und Exon 4 (1 SNP) (T>C) des

porcinen *ACTB* identifiziert. Die Polymorphismen in den Genen *ACTN1* und *ACTN4* wurden durch PCR-RFLP mit den Restriktionsenzymen *BstEII* und *ApaI* bestätigt. Die Polymorphismen im *ACTB* Gen wurden mit SBE genotypisiert.

Die Genotypen von 356 Ebern wurden für die 18 Genorte mit Hilfe von PCR-RFLP, PCR-SSCP, Mikrosatelliten oder SBEs analysiert.

Assoziationsanalysen ergaben, dass die Genorte *ACTN1*, *ACTB*, *ACR* und *OPNin6* signifikant mit der Eberfruchtbarkeit assoziiert waren und die Genorte *FSHB*, *PRL*, *ACR*, *INHA*, *INHBA*, *INHBB*, *FST*, *RLN*, *ACTB*, *ACTG2*, *GnRHR*, *RBP4*, *OPNin6*, *AR* und *OPNpro* signifikant mit der Spermaqualität in Abhängigkeit von der Rasse des Ebers assoziiert waren. Die Genorte *LHB*, *PRLR* und *ACTN4* hatten keinen signifikanten Effekt auf reproduktive Merkmale der Eber.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen Unterschiede in der Bestätigung von Kandidatengeneffekten. Alleleffekte unterscheiden sich zwischen den Linien oder Populationen aufgrund des spezifischen genetischen Hintergrundes. Unterschiedliche Kopplungsphasen zwischen den Markern können die beobachteten Unterschiede zwischen den Eberpopulationen erklären. Auch könnten noch unbekannte QTL, die einen Effekt auf die Reproduktionsmerkmale des Ebers ausüben, mit diesen Genen verbunden sein. Die Kandidatengenmethode kann verwendet werden, um den väterlichen und mütterlichen Beitrag zur Fruchtbarkeit spezifisch aufzuklären sowie Genaktivitäten wie Prägung zu erklären. Die Nutzung von Markerinformationen in Zusammenhang mit traditioneller Selektion erlaubt eine schnellere Verbesserung der männlichen Fruchtbarkeit, und gleichzeitig kann ein optimaler Fortschritt für andere ökonomisch wichtige Produktionsmerkmale erreicht werden. Die Selektionsstrategie sollte für jede Linie separat bestimmt werden.

6 Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

Merkmale der Spermaqualität sind insbesondere im Zusammenhang mit dem aus züchterischen, ökonomischen und hygienischen Gründen steigenden Einsatz der künstlichen Besamung (derzeit ca. 70% der Besamungen) in der Schweineproduktion untersucht worden. Sie umfassen u.a. Ejakulatvolumen, Spermienzahl, -motilität, -morphologie und -vitalität und beeinflussen den Befruchtungserfolg. Während die Einhaltung von strengen Mindestanforderungen hinsichtlich der Spermaqualität genau überwacht wird und Grundvoraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit ist, wird von der Praxis kritisiert, dass die Befruchtungsfähigkeit bestimmter Eber unbefriedigend ist, obwohl sie Spermachargen hinreichender Qualität liefern. Die routinemäßig erfassten Kriterien der Spermaqualität erweisen sich hier also als unzureichende diagnostische und prädikative Mittel für die Befruchtungsfähigkeit. Da im Projekt sowohl die Routinemerkmale der Spermaqualität als auch die Reproduktionsmerkmale in landwirtschaftlichen Betrieben erfasst wurden, erlaubt das Projekt eine nähere physiologische und genomische Betrachtung des Zusammenhangs zwischen diesen Merkmalskomplexen. Die Identifizierung genomischer Ursachen für die Merkmalsausprägungen hinsichtlich Spermaqualität und Befruchtungsfähigkeit und den daraus abgeleiteten prädikativen Test der Befruchtungsfähigkeit erlauben darüber hinaus die Selektion potentieller Besamungseber bereits vor ihrer Geschlechtsreife. Angesichts der hohen Kosten für die Aufzucht und Haltung von Testebern bedeutet eine frühzeitige Selektion erhebliche Einsparungen für die Zuchtunternehmen und Besamungsstationen.

Von den 18 Kandidatengenen zeigten 15 Gene eine Assoziation mit bis zu drei der untersuchten Spermaqualitäts- und Fruchtbarkeitsmerkmalen. Da keines der Kandidatengene mit allen sieben Merkmalen assoziiert ist, ist eine Kombination von Markern für eine frühzeitige Selektion erforderlich. Die Frage, welche Kombination und wie viele Marker tatsächlich notwendig sind, bleibt weiteren Zuchtplanungsberechnungen vorbehalten.

7 Literaturverzeichnis

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF (1991): Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656

Aiman J, McAsey M, Harms L (1998): Serum and seminal plasma prolactin concentrations in men with normospermia, oligospermia, or azospermia. *Fertil Steril* 49, 133-137

Alexander LJ, Troyer DL, Rohrer GA, Smith TP, Schook LB, Beattie CW (1996): Physical assignments of 68 porcine cosmid and lambda clones containing polymorphic microsatellites. *Mamm Genome* 7, 368-372

Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edford-Lilja I, Fredholm M, Hansson I, Hakansson J, Lundström K (1994): Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263, 1771-1774

Bagnel CA, Zhang Q, Downey B, Ainsworth L (1993): Sources and biological actions of relaxin in pigs. *J Reprod Fertil* 48 (Suppl), 127-138

Bidanel JP, Prunier A, Iannuccelli N and Milan D (2001): Detection of quantitative trait loci for male and female reproductive traits in Meishan \times LargeWhiteF2 pigs. 52nd Annual meeting of the EAAP, Budapest, Hungary, August 26-29, 2001

Borg KE, Lunstra DD, Christenson RK (1993): Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan, fengjing, and minzhu boars. *Biol Reprod* 49, 515-521

Braundmeier AG and Miller DJ (2001): The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci* 84, 1915-1925

Braunschweig MH, Paszek AA, Weller JI, Da Y, Hawken RJ, Wheeler MB, Schook LB, Alexander LJ (2001): Generation and exploration of a dense genetic map in a region of a QTL affecting corpora lutea in a Meishan \times Yorkshire cross. *Mamm Genome* 12, 719-723

Brinkmann B, Klitschar M, Neuhber F, Huhne J, Rolf B (1998): Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J hum Genet* 62, 1408-1415

Brooks LD (1999): The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186

Campbell EMG, Fahrenkrug SC, Valet JL, Smith TPL, Rohrer GA (2001): An updated linkage and comparative map of porcine chromosome 18. *Anim Genet* 32, 375-379

Campbell EM, Nonneman D, Rohrer GA (2003): Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8. *J Anim Sci* 81, 1706-1714

Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. (1999): Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod* 60, 454-460

Casale A, Camatini M, Skalli O, Gabbiani G (1988): Characterization of actin isoforms in ejaculated boar spermatozoa. *Gamete Res* 20, 133-144

Casas E, Lunstra DD, Stone RT (2004): Quantitative trait loci for male reproductive traits in beef cattle. *Anim Genet* 35, 451-453

Casas-Carrillo E, Prill-Adams A, Price SG, Clutter AC, Kirkpatrick BW (1997): Mapping genomic regions associated with growth rate in pigs. *J Anim Sci* 75, 2047-2053

Cassady JP, Johnson RK, Pomp D, Rohrer GA, Van Vleck LD, Spiegel EK, Gilson KM (2001): Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. *J Anim Sci* 79, 623-633

Castellani-Ceresa L, Mattioli M, Radaelli G, Barboni B, Brivio MF (1993): Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Mol Reprod Dev* 36, 203-11

Cechova D, Zelezna B, Petelikova J, Pavlok A. (1984): Boar proacrosin correlation between total proacrosin content and sperm fertilizing capacity. *Andrologia* 16, 169-174

Cho BN, McMullen ML, Pei L, Yates CJ, Mayo KE (2001): Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit gene. *Endocrinology* 142, 4994-5004

Chowdhary BP, de la Sena CA, Gustavsson I (1994): In situ hybridization mapping in pigs: a summary of results from Uppsala. The 11th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Aug 2-5, 1994; Copenhagen, pp17-19

Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J (2000): Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim Reprod Sci* 64, 89-96

Colenbrander B, Feitsma H, Grooten HJ (1993): Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J Reprod Fertil Suppl* 48, 207-215

Cui YH, Zhao RL, Wang Q, Zhang ZY (2000): Determination of sperm acrosin activity for evaluation of male fertility. *Asian J Androl* 2, 229-232

Drögemüller C, Hamann H, Distl O (2001): Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *J Anim Sci* 79, 2565-2570

Edwards MD, Page NJ (1994): Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor Appl Genet* 88, 376

Ellegren H (1993): Abundant (A)_n (T)_n mononucleotide repeats in the pig genome: linkage mapping of the porcine APOB, FSA, ALOX12, PEPN and RLN loci. *Anim Genet* 24, 367-372

Ezashi T, Hirai T, Kato T, Wakabayashi K, Kato Y (1990): The gene for the beta subunit of porcine LH: clusters of GC boxes and CACCC elements. *J Mol Endocrinol* 5, 137-46

Falconer DS, Mackay TFC (1996): *Introduction to Quantitative Genetics* (Fourth edition), Published by Addison-Wesley, Longman Press, New York

Ford JJ, Wise TH, Lunstra DD (1997): Negative relationship between blood concentrations of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. *J Anim Sci* 75, 790-795

Ford JJ, Wise TH, Lunstra DD, Rohrer GA (2001): Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with Pituitary gonadotropins and testicular size. *Biology of Reproduction* 65, 906-912

Geldermann H (1996): Analyse von Genwirkungen auf Leistungsmerkmale. *Dtsch tierärztl Wschr* 103, 378-383

Glogowski J, Demianowicz W, Piros B, Ciereszko A. (1998): Determination of acrosin activity of boar spermatozoa by the clinical method: optimization of the assay and changes during short-term storage of semen. *Theriogenology* 50, 861-872

Goffin V, Binart N, Clement-Lacroix P, Bouchard B, Bole-Feysot C, Edery M, Lucas BK, Touraine P, Pezet A, Maaskant R, Pichard C, Helloco C, Baran N, Favre H, Bernichtein S, Allamando A, Ormandy C, Kelly PA (1999): From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genetic Analysis* 15: 189-201

Hafez ESE, Hafez B (2000): *Reproduction in Farm Animals*. (7th edition), ISBN: 0-683-30577-8, Pub Date: March 2000

Hardge T, Scholz A, Gregor G (1995): The influence of *RYRI* genotype on male fertility in pigs. In: 46th Annual Meeting of the EAAP. Prague, September 4-7, 1995, session P2.11, Pig Production, Abstracts, p 268

Hiort O, Holterhus PM, Horter T, Schulze W, Kremke B, Bals-Pratsch M, Sinnecker GH (2000): Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2810-2815

Hirooka H, de Koning DJ, Harlizius B, van Arendonk JA, Rattink AP, Groenen MA, Brascamp EW, Bovenhuis H (2001): A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs. *J Anim Sci* 79, 2320-2326

Hofer D, Drenckhahn D (1996): Cytoskeletal differences between stereocilia of the human sperm passageway and microvilli/stereocilia in other locations. *Anat Rec* 245, 57-64

Hondo E, Kurohmaru M, Sakai S, Ogawa K, Hayashi Y (1995): Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biol Reprod* 52: 1284-1290.

Howes L, Jones R (2002): Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol* 53, 181-192

Huang SY, Chen MY, Lin EC, Tsou HL, Kuo YH, Ju CC, Lee WC (2001): Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Anim Reprod Sci* 70, 99-109

Huang SY, Song HL, Lin EC, Kuo YH, Tsou HL, Lee WC (2002): A candidate gene approach for identifying genes associated with semen quality traits in boars. The 7th WCGALP, Aug. 19-23, 2002; Montpellier, France

Huang YT, Johnson RK (1996): Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits. *J Anim Sci* 74, 750-760

Hu YA, Huang YF (2002): A serum marker of spermatogenesis inhibin B. *Zhonghua Nan Ke Xue* 8, 57-60

Jiang ZH, Gibson JP, Archibald AL, Haley CS (2001): The porcine gonadotropin-releasing hormone receptor gene (GNRHR): genomic organization, polymorphisms, and association with the number of corpora lutea. *Genome* 44, 7-12.

Kaipia A, Penttila TL, Shimasaki S, Ling N, Parvinen M, Toppari J (1992): Expression of inhibin beta A and beta B, follistatin and activin-A receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 131, 2703-2710

Kato M, Sung WK, Kato K, Goodman DS (1985): Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinol-binding protein in rat testis and epididymis. *Bio Reprod* 32, 173-189

King AH, Jiang Z, Gibson JP, Haley CS, Archibald AL (2003): Mapping quantitative trait loci affecting female reproductive traits on porcine chromosome 8. *Bio Reprod* 68, 2172-2179

Kmiec M, Zimemak J, Dybus A, Matusiak S (2002): Analysis of relations between polymorphism in steroid 21-hydroxylase gene (*CYP21*) and quantitative and qualitative characters of boar semen. *Czech J Anim Sci* 47, 174-199

Knox RV (2003): The anatomy and physiology of sperm production in Boars. <http://www.traill.uiuc.edu/swinerepronet/publications/extension/BoarA&P.pdf>

Kratzsch A, Stricker C, Gmur C, Rieder S, Jorg H, Ossent P, Burgi E, Zimmermann W, Stranzinger G, Vogeli P (1999): Congenital progressive ataxia and spastic paresis, a hereditary disease in swine, maps to chromosome 3 by linkage analysis. *Mamm Genome* 10, 1036-1038

Lahbib-Mansais Y, Yerle M, Pinton P, Gellin J (1996): Chromosomal localization of homeobox genes and associated markers on porcine chromosomes 3, 5, 12, 15, 16 and 18 comparative mapping study with human and mouse. *Mamm Genome* 7, 174-179

Lahbib-Mansais Y, Leroux S, Milan D, Yerle M, Robic A, Jiang Z, Andre C, Gellin J (2000): Comparative mapping between humans and pigs: localization of 58 anchorage markers

(TOASTs) by use of porcine somatic cell and radiation hybrid panels. *Mamm Genome* 11, 1098-1106

Lande R, Thompson R (1990): Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124, 743-756

Layman LC, Peak DB, Xie J, Sohn SH, Reindollar RH, Gray MR (1997): Mutation analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 68, 1079-1085

Layman LC (2000): Mutations in the Follicle stimulating hormone beta (*FSHB*) and FSH receptor genes in mice and human. *Seminars in Reproductive Medicine* 18, 5-10

Li MD, Macdonald GJ, Wise T, Ford JJ (1998): Positive association between expression of follicle-stimulating hormone beta and activin betaB-subunit genes in boars. *Biol Reprod* 59, 978-982

Linville RC, Pomp D, Johnson RK, Rothschild MF (2001): Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J Anim Sci* 79, 60-67

Long AD, Langley CH (1999): The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res* 9, 720-731

Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, Hermo L, (2002): Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biol Reprod* 66, 1437-1448

Lunstra DD, Ford JJ, Klindt J, Wise TH (1997): Physiology of the Meishan boar. *J Reprod Fertil* 52 (Suppl), 181-193

Mackowski M, Switonski M, Maćkowska J, Perz W (2004): Polymorphism of the GPX-5 gene and characteristics of boar semen. *Archiv fur Tierzucht* 47, 165-171

Malmgren L, Larsson K (1984): Semen quality and fertility after heat stress in boars. *Acta Vet Scand* 25, 425-435

Marchetti C, Hamdane M, Mitchell V, Mayo K, Devisme L, Rigot JM, Beauvillain JC, Hermant E, Defossez A (2003): Immunolocalization of inhibin and activin alpha and betaB subunits and expression of corresponding messenger RNAs in the human adult testis. *Biol Reprod* 68, 230-235

Martin LJ, Blangero J, Rogers J, Mahaney MC, Hixson JE, Carey KD, Morin PA, Comuzzie AG (2001): A quantitative trait locus influencing estrogen levels maps to a region homologous to human chromosome 20. *Physiol Genomics* 5, 75-80

Martin LJ, Mahaney MC, Almasy L, Hixson JE, Cole SA, MacCluer JW, Jaquish CE, Blangero J, Comuzzie AG (2002): A quantitative trait locus on chromosome 22 for serum leptin levels adjusted for serum testosterone. *Obes Res* 10, 602-607

- Martins-Wess F, Rohrer G, Voß-Nemitz R, Drögemüller C, Brenig B, Robic A, Yerle M, Milan D, Leeb T (2003): Generation of a 5.5-Mb BAC/PAC contig of pig chromosome 6q1.2 and its integration with existing RH, genetic and comparative maps. *Cytogenet Genome Res* 102, 116-120
- Mather JP, Roberts PE, Krummen LA (1993): Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissue-specific manner. *Endocrinology* 136, 2732-2734
- Matorras R, Genolla J, Mendoza R, Uruena J, Corcostegui B, Fombellida JC, Neyro JL, Rodriguez-Escudero FJ (1998): Total immunoreactive alpha-inhibin in human seminal plasma, sperm quality, and in vitro fertilization rates. *Int J Fertil Womens Med* 43, 171-176
- McKeown RM, O'Callaghan D, Roche JF, Boland MP (1997): Effect of immunization of rams against bovine inhibin alpha 1-26 on semen characteristics, scrotal size, FSH, LH and testosterone concentrations. *J Reprod Fertil* 109, 237-245
- Mellink C, Lahbib-Mansais Y, Yerle M, Gellin J (1995): PCR amplification and physical localization of the genes for pig FSHB and LHB. *Cytogenetics and Cell Genetics* 70, 224-227
- Messer L, Wang L, Yelich J, Pomp D, Geisert R, Rothschild MF (1996): Linkage mapping of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene to porcine Chromosome 14. *Mamm Genome* 7, 396
- Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paulö S, Lannuccelli N, Rask L, Ronne H, Lundstrom K, Reinsch N, Gellin J, Kalöm E, Roy PL, Chardon P, Andersson L (2000): A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288, 1248-1251
- Milan D, Bidanel JP, Iannuccelli N, Riquet J, Amigues Y, Gruand J, Le Roy P, Renard C, Chevalet C (2002): Detection of quantitative trait loci for carcass composition traits in pigs. *Genet Sel Evol* 34, 705-728
- Miller BJ, Graves CN, Lodge JR (1988): Effect of in vitro storage of bovine spermatozoa on acrosomal integrity, proteolytic activity, binding, and initiation of penetration of oocytes. *Gamete Res* 20, 53-65
- Montaldo HH, Meza-Herrera CA (1998): Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic Journal of Biotechnology* Vol.1 No.2
- Muttukrishna S, Farouk A, Sharma S, Evans L, Groome N, Ledger W, Sathanandan M (2001): Serum activin A and follistatin in disorders of spermatogenesis in men. *Eur J Endocrinol* 144, 425-429
- Nayernia K, Adham IM, Shamsadin R, Muller C, Sancken U, Engel W (2002): Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol Hum Reprod* 8, 434-440
- Nei M (1987): *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

Nonneman D, Rohrer GA (2003): Molecular cloning of the porcine inhibin-betaB gene and reassignment to chromosome 15. *Anim Genet* 34, 213-215

O'Brien DA, Welch JE, Goulding EH, Taylor AA JR, Baba T, Hecht NB, Eddy EM (1996): Boar proacrosin expressed in spermatids of transgenic mice does not reach the acrosome and disrupts spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 43, 236-247

Olson M, Hood L, Cantor C, Boststein D (1989): A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245, 1434-1435

Patterson MNH, Gottlieb B, Pinsky L (1994): The androgen receptor gene mutations database. *Nucleic Acids Res* 22, 3560-3562

Plante TM, Marshall GR (2001): The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev* 22, 764-786

Rathje TA, Rohrer GA, Johnson RK (1997): Evidence for quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. *J Anim Sci* 75, 1486-1494

Rettenberger G, Adham IM, Engel W, Klett C, Hameister H. (1995): Assignment of the porcine acrosin gene, ACR, to chromosome 5p15 by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mamm Genome* 6, 60-61

Rettenberger G, Bruch J, Archibald AL, Fries R, Hameister H (1996): Assignment of 19 porcine type I loci by somatic cell hybrid analysis detects new regions of conserved synteny between human and pig. *Mamm Genome* 7, 275-279

Rocha JL, Eisen EJ, Siewerdt F, Van Vleck LD, Pomp D (2004): A large-sample QTL study in mice: III. Reproduction. *Mamm Genome* 15, 878-886

Rohrer GA (1999a): Mapping four genes from human chromosome 4 to porcine chromosome 8 further develops the comparative map for an economically important chromosome of the swine genome. *Anim Genet* 30, 60-62

Rohrer GA (1999b): Androgen Receptor (AR) Maps to Xp1.1-q1.1 in the porcine genome. *J Anim Sci* 77, 499-500

Rohrer GA, Ford JJ, Wise TH, Vallet JL, Christenson RK (1999): Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multi-generation Meishan-White composite swine population. *J Anim Sci* 77, 1385-1391

Rohrer GA (2000): Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of back fat and weight in a Meishan- White Composite resource population. *J Anim Sci* 78, 2547-2553

Rohrer GA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ (2001): Identification of genomic regions controlling plasma FSH concentrations in Meishan-White composite boars. *Physiol Genomics* 6, 145-151

Rothschild M, Jacobson C, Vaske D, Tuggle C, Wang L, Short T, Eckardt G, Sasaki S, Vincent A, McLaren D, Southwood O, van der Steen H, Mileham A, Plastow G (1996): The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc Natl Acad Sci* 93, 201-205

Rothschild MF, Messer LA, Vincent A (1997): Molecular approaches to improved pig fertility. *J Reprod and Fertil (Supplement)* 52, 277-236

Rothschild MF (1998): Identification of quantitative trait loci and interesting candidate genes in the pig: Progress and prospects. The 6th WCGALP, Jan. 11-16, 1998; Armidale, Australia 26: 403-409

Rothschild F, Ruvinsky A (1998): *The Genetics of the Pig*. University Press. Cambridge

Sasaki Y, Kohsaka T, Kawarasaki T, Sasada H, Ogine T, Bamba K, Takahara H (2001): Immunoreactive relaxin in seminal plasma of fertile boars and its correlation with sperm motility characteristics determined by computer-assisted digital image analysis. *Int J Androl* 24, 24-30

Sato S, Oyamada Y, Atsugi K, Nade T, Sato S, Kobayashi E, Mitsuhashi T, Nirasawa, Komatsuda A, Saito Y, Terai S, Hayashi T, Sugimoto Y (2003): Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan x Duroc F2 resource population. *J Anim Sci* 81, 2938-2949

Schrooten C, Bink MC, Bovenhuis H (2004): Whole genome scan to detect chromosomal regions affecting multiple traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87, 3550-3560

Schwark HJ, Zebrowski Z, Ovsjannikov VN (1975): *Internationals Handbuch der Tierproduktion: Schweine*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin

See MT (2000): Selection for AI Stud traits. Record of Proceedings National Swine Improvement Federation. Conference and Annual Meeting, Dec. 7-8, 2000 NSIF 25

Seifert JN, Larsen NJ, Marklund S, Hu ZL, Rohrer GA, Rothschild MF (1999): Genetic linkage and physical mapping of the porcine androgen receptor (AR) gene. *J Anim Sci* 77, 785-786

Seok OS, Ahn JM, Mayo KE, Cho BN (2004): Developmental changes in inhibin-alpha gene expression in the mouse testis. *Mol Cells* 17, 67-72

Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N (1991): Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology* 128, 3313-3315

Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW (1995): Identification of osteopontin (*OPN*) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev* 40, 16-28

Steinheuer von R, Drögemüller C, Hamann H, Götz K-U, Distl O (2002): Schätzung von Kandidatengeneffekten auf die Anzahl lebend geborener Ferkel bei Sauen und Ebern der Deutschen Landrasse. *Züchtungskunde* 74, 276-287

Steinheuer von R, Drögemüller C, Hamann H, Götz K-U, Distl O (2003): Einfluss von Kandidatengeneffekten auf die Anzahl lebend geborener und aufgezogener Ferkel bei Besamungsebern der Deutschen Landrasse. *Züchtungskunde* 75, 204-213

Storchova R, Gregorova S, Buckiova D, Kyselova V, Divina P, Forejt J (2004): Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mamm Genome* 15, 515-524

Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL (1996): Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 55, 956-974

Tautz D (1993): Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequence. *EXS* 67, 21-28

Thomsen PD, Wintero AK, Fredholm M (1998): Chromosomal assignments of 19 porcine cDNA sequences by FISH. *Mamm Genome* 9, 394-396

Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV (2002): Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod* 66, 545-554

Trakooljul N, Ponsuksili S, Schellander K, Wimmers K (2000): A highly polymorphic repetitive polypyrimidine/polypurine (CCTTT)_n sequence in the 5' untranslated sequence of the porcine androgen receptor gene. *Anim Genet* 31, 288-289

Urban T, Kuciel J (2001): The effect of point mutation in RYR1 gene on the semen quality traits in boars of Large White and Landrace breeds. *Czech J. Anim. Sci.*, 46 (10)

Vasquez JM, Ben-Nun I, Greenblatt RB, Mahesh VB, Keel BA (1986): Correlation between follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, and testosterone with sperm cell concentration and motility. *Obstet Gynecol* 67, 86-90

Vincent AL, Wang L, Tuggle CK, Robic A, Rothschild MF (1997): Prolactin receptor maps to pig chromosome 16. *Mamm Genome* 8, 793-794

Vincent AL, Evans G, Short TH, Southwood OI, Plastow GS, Tuggle CK, Rothschild MF (1998a): The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. In: *Proc. 6th WCGALP* 27, 15-18

Vincent AL, Wang L, Tuggle CK, Rothschild MF (1998b): Linkage and physical mapping of prolactin to porcine chromosome 7. *Anim Genet* 29, 27-29

- Von Eckardstein S, Syska A, Gromoll J, Kamischke A, Simoni M, Nieschlag E (2001): Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2585-2590
- Wada Y, Akita T, Awata T, Furukawa T, Sugai N, Inage Y, Ishii K, Ito Y, Kobayashi E, Kusumoto H, Matsumoto T, Mikawa S, Miyake M, Murase A, Shimanuki S, Sugiyama T, Uchida Y, Yanai S, Yasue H (2000): Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan × Gottingen cross population. *Anim Genet* 31, 376-84
- Waters SH, Distel RJ, Hecht NB (1985): Mouse testes contain two size classes of actin mRNA that are differentially expressed during spermatogenesis. *Mol Cell Biol* 5, 1649-1654
- Weir BS (1996): *Genetic Data analysis II, Methods for discrete population genetic data.* Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts
- Wilkie PJ, Paszek AA, Beattie CW, Alexander LJ, Wheeler MB, Schook LB (1999): A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. *Mamm Genome* 10, 573-578
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531-6535
- Wimmers K, Ponsusili S, Hardge T, Schellander K (2002a): Detection of candidate genes for functional traits in pigs. *Genomics and biotechnology in Livestock breeding*, Shaker Verlag Aachen 2002, p69-77
- Wimmers K, Chomdej S, Schellander K, Ponsusili S (2002b): Linkage mapping of SNPs in the porcine relaxin gene. *Anim Genet* 33, 323-324
- Wu X, Faqi AS, Yang J, Ding X, Jiang X, Chahoud I (1999): Male reproductive toxicity and beta-luteinizing hormone gene expression in sexually mature and immature rats exposed to 2-bromopropane. *Hum Exp Toxicol* 18, 683-690
- Yagi A, Paranko J (1992): Localization of actin, alpha-actinin, and tropomyosin in bovine spermatozoa and epididymal epithelium. *Anat Rec* 233, 61-74
- Yagi A, Paranko J (1995): Actin, alpha-actinin, and spectrin with specific associations with the postacrosomal and acrosomal domains of bovine spermatozoa. *Anat Rec* 241, 77-87
- Zanella E, Ford JJ, Wise TH, Hamernik DL (1996): Pituitary relationship of gonadotropins and messenger ribonucleic acid for gonadotropin subunits in white composite and Meishan boars. *Bio Reprod* 54, 154-159
- Zanella E, Lunstra D, Wise T, Kinder J, Ford J (1999): Testicular morphology and function in boars differing in concentration of plasma follicle-stimulating hormone. *Bio Reprod* 60, 115-118

Zee RY, Cook NR, Reynolds R, Cheng S, Ridker PM (2005): Haplotype analysis of beta-2 adrenergic receptor gene and risk of myocardial infarction. *Genetics* 169, 1583-1587

Zhang W, Smith C (1992): Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theoretical and Applied Genetics* 83, 813-820

Zhang W, Smith C (1993): The use of marker-assisted selection with linkage disequilibrium: the effect of several additional factors. *Theoretical and Applied Genetics* 86, 492-496

8 Anhang

In den Tabellen 8.1 bis 8.32 sind die statistischen Auswertungen aufgelistet. Es handelt sich hierbei um Least Square Means (LSMs) und deren Standardfehler (SE), Genotypeneffekte, Additiv- (a) und Dominanzeffekte (d) sowie Allel- und Haplotypsubstitutionseffekte für die untersuchten Loci und Merkmale.

Tab. 8.1: LSM und SE der *ACTN1* Genotypen beim Merkmal NRR (%)

| Genotyp | PI&PI×HA | PI | PI×HA |
|---------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| AA | 0.660±0.482 ^a | 0.476±0.653 ^a | 0.588±0.580 ^a |
| AB | 0.901±0.655 ^a | 0.703±0.770 ^a | 0.780±0.985 ^a |
| BB | -3.313±1.545 ^b | -4.919±1.900 ^b | 2.475±2.511 ^a |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Herkunft unterscheiden sich signifikant voneinander ($p \leq 0.05$)

Tab. 8.2: LSM und SE der *ACR* Genotypen beim Merkmal NRR (%)

| PI&PI×HA [*] | | PI [*] | | PI×Ha ^{ns} | |
|-----------------------|--------------|-----------------|--------------|---------------------|--------------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 202/202 | 3.481±2.054 | 202/202 | 3.248±2.414 | 208/208 | 0.567±1.046 |
| 202/208 | 0.110±0.956 | 202/208 | 0.189±0.993 | 208/218 | 0.741±2.008 |
| 202/214 | -1.154±1.598 | 202/214 | -1.522±1.899 | 208/226 | 0.505±1.023 |
| 202/999 | 3.325±1.569 | 202/999 | 4.334±1.731 | 208/228 | 1.045±0.822 |
| 208/208 | -0.505±0.689 | 208/208 | -0.839±0.778 | 208/999 | -0.466±1.146 |
| 208/214 | 2.681±1.335 | 208/214 | 2.867±1.511 | 218/228 | -0.690±2.171 |
| 208/228 | 1.427±1.054 | 208/999 | 0.787±1.131 | 218/999 | 3.224±2.492 |
| 208/999 | 0.445±0.749 | 214/214 | -2.308±3.078 | 226/999 | 1.831±3.059 |
| 214/214 | -2.617±2.521 | 214/999 | 5.127±3.455 | 228/999 | 2.871±2.192 |
| 214/228 | 6.974±3.057 | | | 999/999 | 0.151±2.225 |
| 228/999 | 0.029±2.148 | | | | |

^{*} Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.3: Additiv- (a) und Dominanzeffekt (d) von *ACTN1* Allelen beim Merkmal NRR (%)

| Effekt | PI&PI×HA | | PI | |
|----------------|--------------|------|--------------|------|
| | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p |
| Additiveffekt | -1.987±0.792 | 0.01 | -2.698±0.985 | 0.01 |
| Dominanzeffekt | 2.227±0.985 | 0.02 | 2.925±1.234 | 0.02 |

Tab. 8.4: Allelsubstitutionseffekte für Allel des Locus *ACR* beim Merkmal NRR (%)

| Allel | PI&PI×HA | | PI | |
|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | LSM ± SE | p-Wert | LSM ± SE | p-Wert |
| 202 bp | -0.103±0.943 | 0.91 | -0.957±1.182 | 0.42 |
| 208 bp | -1.233±0.761 | 0.11 | -2.179±0.996 | 0.03 |
| 214 bp | -0.658±1.002 | 0.51 | -1.371±1.273 | 0.28 |
| 228 bp | 1.104±1.124 | 0.33 | - | - |

Tab. 8.5: LSM und SE der *OPNin6* und *ACTN1* Genotypen beim Merkmal NBA (Schwein/Wurf)

| Locus | Genotyp | PI&PI×HA | PI | PI×HA |
|---------------|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| <i>OPNin6</i> | AA | 0.176±0.068 ^x | 0.209±0.069 ^x | -0.016±0.175 |
| | AB | -0.005±0.054 ^y | 0.001±0.066 ^y | 0.008±0.091 |
| | BB | 0.04±0.047 ^y | -0.009±0.060 ^y | 0.026±0.075 |
| <i>ACTN1</i> | AA | 0.045±0.042 ^a | 0.065±0.053 | 0.070±0.067 ^a |
| | AB | 0.038±0.057 ^a | 0.040±0.062 | 0.133±0.114 ^a |
| | BB | -0.428±1.135 ^b | -0.283±0.154 | -1.010±0.290 ^b |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb Herkunft und Locus unterscheiden sich signifikant voneinander (a, b: $p \leq 0.01$; x, y: $p \leq 0.05$).

Tab. 8.6: Additiv- (a) und Dominanzeffekte (d) von *OPNin6* und *ACTN1* Allelen beim Merkmal NBA (Schwein/Wurf)

| Locus | Effekt | PI&PI×HA | | PI | | PI×HA | |
|---------------|--------|--------------|-------|--------------|------|-------------|-------|
| | | Schätzung | p | Schätzung | p | Schätzung | p |
| <i>OPNin6</i> | a | 0.086±0.038 | 0.03 | 0.109±0.044 | 0.01 | - | - |
| | d | -0.094±0.063 | 0.13 | -0.099±0.077 | 0.20 | - | - |
| <i>ACTN1</i> | a | 0.236±0.069 | <0.01 | - | - | 0.540±0.151 | <0.01 |
| | d | 0.230±0.086 | 0.01 | - | - | 0.603±0.188 | <0.01 |

Tab. 8.7: LSM und SE der *FSHB* und *PRL* Genotypen beim Merkmal SCON ($\times 10^8$ /ml)

| Locus | Genotyp | PI&PI×HA | PI | PI×HA |
|-------------|---------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| <i>FSHB</i> | AA | 2.967±0.041 | 2.878±0.045 ^a | 3.136±0.069 |
| | AB | 3.073±0.063 | 3.081±0.070 ^b | 2.970±0.116 |
| | BB | 3.041±0.154 | 3.299±0.203 ^b | 2.700±0.227 |
| <i>PRL</i> | AA | 3.049±0.073 | 2.879±0.089 | 3.331±0.120 ^a |
| | AB | 2.885±0.076 | 2.817±0.105 | 2.965±0.107 ^b |
| | AC | 2.917±0.057 | 2.905±0.061 | 2.819±0.105 ^b |
| | BC | 3.258±0.251 | 3.196±0.250 | - |
| | CC | 3.119±0.083 | 3.047±0.083 | 3.239±0.219 ^a |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb Herkunft und Locus unterscheiden sich signifikant voneinander (a, b: $p \leq 0.01$; x, y: $p \leq 0.05$).

Tab. 8.8: LSM und SE der ACR Genotypeffekte beim Merkmal SCON ($\times 10^8/\text{ml}$)

| PI&PI \times HA ^{ns} | | PI ^{ns} | | PI \times HA [*] | |
|---------------------------------|-------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| Genotyp | LSM \pm SE | Genotyp | LSM \pm SE | Genotyp | LSM \pm SE |
| 202/202 | 2.972 \pm 0.192 | 202/202 | 3.109 \pm 0.200 | 208/208 | 3.129 \pm 0.133 |
| 202/208 | 3.067 \pm 0.088 | 202/208 | 3.014 \pm 0.081 | 208/218 | 3.334 \pm 0.308 |
| 202/214 | 2.912 \pm 0.150 | 202/214 | 3.017 \pm 0.158 | 208/226 | 3.004 \pm 0.148 |
| 202/214 | 2.687 \pm 0.402 | 202/999 | 2.582 \pm 0.142 | 208/228 | 3.124 \pm 0.095 |
| 202/999 | 2.668 \pm 0.146 | 208/208 | 2.912 \pm 0.063 | 208/999 | 3.131 \pm 0.142 |
| 208/208 | 2.969 \pm 0.065 | 208/214 | 3.015 \pm 0.127 | 218/228 | 3.153 \pm 0.276 |
| 208/214 | 3.083 \pm 0.130 | 208/999 | 2.985 \pm 0.091 | 218/999 | 3.405 \pm 0.307 |
| 208/228 | 3.034 \pm 0.101 | 214/214 | 2.723 \pm 0.253 | 226/999 | 3.060 \pm 0.376 |
| 208/999 | 3.022 \pm 0.073 | 214/999 | 3.050 \pm 0.192 | 228/999 | 3.034 \pm 0.306 |
| 214/214 | 2.618 \pm 0.233 | 999/999 | 2.846 \pm 0.400 | 999/999 | 1.911 \pm 0.268 |
| 214/228 | 3.180 \pm 0.328 | | | | |
| 214/999 | 2.935 \pm 0.403 | | | | |
| 228/999 | 2.993 \pm 0.202 | | | | |
| 999/999 | 3.295 \pm 0.330 | | | | |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.9: Ausgewählte lineare Kontraste zwischen verschiedenen ACR Genotypen beim Merkmal SCON ($\times 10^8/\text{ml}$)

| Population | linearer Kontrast zw. Genotypen | | Schätzung | p-Wert |
|----------------|------------------------------------|---------|-------------------|--------|
| PI \times HA | 208/208 | 999/999 | 1.127 \pm 0.301 | 0.0021 |
| | 208/218 | 999/999 | 1.423 \pm 0.409 | 0.0183 |
| | 208/226 | 999/999 | 1.092 \pm 0.307 | 0.0140 |
| | 208/228 | 999/999 | 1.121 \pm 0.283 | 0.0008 |
| | 208/999 | 999/999 | 1.220 \pm 0.305 | 0.0026 |
| | 218/228 | 999/999 | 1.241 \pm 0.392 | 0.0503 |
| | 218/999 | 999/999 | 1.493 \pm 0.408 | 0.0096 |

Tab. 8.10: LSM und SE der *INHBB* Genotypen beim Merkmal SCON ($\times 10^8$ /ml)

| PI&PI×HA* | | PI* | | PI×HA ^{ns} | |
|-----------|-------------|---------|-------------|---------------------|-------------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 161/163 | 2.689±0.190 | 171/171 | 2.866±0.069 | 159/163 | 3.137±0.256 |
| 161/171 | 2.908±0.134 | 171/173 | 2.841±0.075 | 159/171 | 3.175±0.174 |
| 161/173 | 3.663±0.249 | 171/175 | 3.150±0.079 | 159/173 | 3.163±0.573 |
| 161/175 | 3.048±0.556 | 171/999 | 2.981±0.183 | 159/999 | 3.313±0.332 |
| 163/163 | 3.215±0.392 | 173/173 | 2.843±0.159 | 161/163 | 2.771±0.190 |
| 163/171 | 3.099±0.187 | 173/175 | 2.722±0.114 | 161/171 | 2.990±0.135 |
| 163/173 | 3.241±0.232 | 173/999 | 3.290±0.209 | 161/173 | 3.654±0.286 |
| 163/175 | 2.774±0.232 | 175/175 | 3.225±0.152 | 161/999 | 3.115±0.574 |
| 163/999 | 3.057±0.252 | 175/999 | 2.711±0.226 | 163/163 | 2.505±0.574 |
| 171/171 | 2.963±0.067 | 999/999 | 3.919±0.549 | 163/171 | 3.033±0.407 |
| 171/173 | 2.927±0.070 | | | 171/171 | 3.168±0.140 |
| 163/175 | 3.187±0.087 | | | 171/173 | 3.065±0.139 |
| 163/999 | 3.026±0.165 | | | 171/999 | 2.787±0.335 |
| 173/173 | 2.869±0.152 | | | 173/173 | 2.709±0.405 |
| 173/175 | 2.791±0.125 | | | | |
| 173/999 | 3.063±0.556 | | | | |
| 175/175 | 3.293±0.161 | | | | |
| 175/999 | 3.217±0.324 | | | | |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.11: Additiv- (a) und Dominanzeffekt (d) von *FSHB* und *PRL* Allelen beim Merkmal SCON ($\times 10^8$ /ml)

| Locus | Effekt | PI | | PI×HA | |
|-------------|--------------------|----------------|------|----------------|-------|
| | | Schätzung + SE | p | Schätzung + SE | p |
| <i>FSHB</i> | a | 0.211±0.10 | 0.04 | - | - |
| | d | 0.007±0.12 | 0.96 | - | - |
| <i>PRL</i> | a _(A/C) | - | - | 0.044±0.115 | 0.70 |
| | d _(A/C) | - | - | -0.472±0.146 | <0.01 |

Tab. 8.12: Allelsubstitutionseffekte für Loci *INHBB* und *ACR* beim Merkmal *SCON* ($\times 10^8/\text{ml}$)

| Locus | Allel | PI&PI×HA | | PI | | PI×HA | |
|--------------|-------|--------------|------|--------------|------|-------------|------|
| | | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p |
| <i>INHBB</i> | 161 | -0.080±0.157 | 0.61 | - | - | - | - |
| | 163 | -0.090±0.181 | 0.62 | - | - | - | - |
| | 171 | -0.073±0.149 | 0.63 | -0.153±0.117 | 0.19 | - | - |
| | 173 | -0.133±0.152 | 0.38 | -0.236±0.127 | 0.06 | - | - |
| | 175 | 0.030±0.160 | 0.85 | -0.035±0.126 | 0.78 | - | - |
| <i>ACR</i> | 208 | - | - | - | - | 0.304±0.119 | 0.01 |
| | 218 | - | - | - | - | 0.501±0.219 | 0.02 |
| | 226 | - | - | - | - | 0.151±0.180 | 0.40 |
| | 228 | - | - | - | - | 0.224±0.098 | 0.10 |

Tab. 8.13: LSM und SE der *RLN* Genotypen beim Merkmal *VOL* (ml)

| Genotyp | PI&PI×HA | PI | PI×HA ¹ |
|---------|-------------|-------------|---------------------------|
| | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| CC | 260.60±2.92 | 246.98±3.00 | 275.93±5.65 ^a |
| CA | 251.87±6.51 | 247.87±6.63 | 234.02±15.51 ^b |
| AA | - | - | - |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb Herkunft und Locus unterscheiden sich signifikant voneinander (a, b: $p \leq 0.01$; x, y: $p \leq 0.05$).

Tab. 8.14: LSM und SE der *FST* Genotypeneffekte beim Merkmal VOL (ml)

| PI&PI×HA ^{ns} | | PI [*] | | PI×HA ^{ns} | |
|------------------------|--------------|-----------------|--------------|---------------------|--------------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 142/142 | 266.45±7.26 | 142/142 | 264.74±9.33 | 142/142 | 268.29±12.12 |
| 142/143 | 252.22±45.01 | 142/143 | 244.62±39.86 | 142/147 | 288.28±19.26 |
| 142/147 | 270.72±12.03 | 142/146 | 277.12±22.82 | 142/148 | 268.70±24.95 |
| 142/148 | 279.22±13.01 | 142/147 | 250.51±16.34 | 142/999 | 304.40±25.04 |
| 142/999 | 292.25±15.09 | 142/148 | 284.61±15.05 | 143/143 | 260.54±12.79 |
| 143/143 | 260.17±5.90 | 143/143 | 255.20±6.15 | 143/147 | 275.22±22.11 |
| 143/147 | 267.73±11.56 | 143/146 | 236.63±14.01 | 143/148 | 264.22±19.29 |
| 143/148 | 251.49±6.87 | 143/147 | 259.69±13.22 | 143/999 | 253.89±38.83 |
| 143/999 | 252.33±13.65 | 143/148 | 242.25±6.47 | 144/144 | 264.38±24.20 |
| 144/144 | 258.46±11.61 | 143/999 | 320.04±39.90 | 144/147 | 241.07±38.49 |
| 144/147 | 229.67±15.99 | 144/144 | 250.96±12.57 | 144/999 | 200.12±54.23 |
| 144/148 | 251.13±12.73 | 144/147 | 219.45±16.28 | 147/147 | 253.68±24.57 |
| 144/999 | 272.75±18.36 | 144/148 | 242.72±10.98 | 147/999 | 300.59±38.37 |
| 147/147 | 257.09±8.81 | 144/999 | 280.14±17.72 | 148/148 | 293.60±54.15 |
| 147/999 | 238.71±14.24 | 146/146 | 213.96±17.68 | 999/999 | 303.24±22.12 |
| 148/148 | 241.17±9.90 | 146/148 | 299.46±39.51 | | |
| 148/999 | 240.71±14.42 | 146/999 | 186.08±39.53 | | |
| 999/999 | 257.65±11.22 | 147/147 | 251.26±8.45 | | |
| | | 147/999 | 216.93±13.99 | | |
| | | 148/148 | 230.45±8.63 | | |
| | | 148/999 | 224.89±13.19 | | |
| | | 999/999 | 252.20±19.87 | | |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.15: LSM und SE der *ACTG2* Genotypen beim Merkmal VOL (ml)

| PI&PI×HA ^{ns} | | PI [*] | | PI×HA ^{ns} | |
|------------------------|--------------|-----------------|--------------|---------------------|--------------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 93/93 | 239.64±14.20 | 93/93 | 225.17±15.07 | 93/93 | 256.53±32.11 |
| 93/103 | 250.57±13.24 | 93/103 | 237.15±11.52 | 93/97 | 249.79±32.05 |
| 93/109 | 257.87±7.71 | 93/109 | 235.39±8.70 | 93/109 | 285.54±15.42 |
| 93/111 | 270.91±13.56 | 93/111 | 269.44±15.11 | 93/111 | 262.76±27.82 |
| 93/117 | 230.20±20.09 | 93/117 | 205.99±19.20 | 93/117 | 282.29±55.33 |
| 93/999 | 254.00±16.95 | 93/999 | 243.24±23.24 | 93/999 | 316.18±55.50 |
| 103/103 | 262.76±15.19 | 103/103 | 249.29±13.30 | 97/97 | 164.20±57.22 |
| 103/109 | 249.33±7.14 | 103/109 | 233.11±7.67 | 97/103 | 268.35±22.62 |
| 103/111 | 275.40±10.18 | 103/111 | 261.56±8.70 | 97/109 | 272.17±39.45 |
| 103/117 | 196.44±44.72 | 103/999 | 247.54±13.50 | 97/111 | 268.32±18.48 |
| 103/999 | 261.69±11.24 | 109/109 | 238.08±8.51 | 97/117 | 286.34±55.31 |
| 109/109 | 254.54±8.28 | 109/111 | 240.55±7.39 | 97/999 | 233.15±31.98 |
| 109/111 | 256.64±7.41 | 109/117 | 246.37±14.07 | 103/109 | 266.10±15.37 |
| 109/117 | 259.52±12.41 | 109/999 | 274.27±10.68 | 103/117 | 207.52±55.37 |
| 109/999 | 282.49±10.67 | 111/111 | 265.89±10.36 | 103/999 | 336.82±55.53 |
| 111/111 | 278.97±11.94 | 111/117 | 267.82±14.27 | 109/109 | 274.65±19.66 |
| 111/117 | 276.37±15.20 | 111/999 | 273.28±12.04 | 109/111 | 276.21±18.48 |
| 111/999 | 269.56±9.32 | 117/117 | 308.03±39.82 | 109/117 | 269.46±24.87 |
| 117/117 | 321.85±14.76 | 117/999 | 226.94±23.00 | 109/999 | 287.22±39.27 |
| 117/999 | 248.22±18.23 | 999/999 | 240.94±15.07 | 111/117 | 256.97±55.73 |
| 999/999 | 251.77±12.43 | | | 111/999 | 267.20±32.05 |
| | | | | 117/999 | 258.57±39.12 |
| | | | | 999/999 | 341.66±39.53 |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.16: Allelsubstitutionseffekte für Loci *FST* und *ACTG2* beim Merkmal VOL (ml) in der PI Population

| Locus | Allel | Schätzung ± SE | p | Locus | Allel | Schätzung ± SE | p |
|------------|-------|----------------|------|--------------|-------|----------------|------|
| <i>FST</i> | 142 | 16.11±7.82 | 0.04 | <i>ACTG2</i> | 93 | -16.01±6.99 | 0.02 |
| | 143 | 7.89±7.10 | 0.27 | | 103 | -9.26±6.70 | 0.17 |
| | 144 | 6.16±8.68 | 0.49 | | 109 | -12.85±6.14 | 0.04 |
| | 147 | 2.16±7.97 | 0.79 | | 111 | 3.25±6.39 | 0.61 |
| | 148 | -3.20±7.74 | 0.68 | | 117 | -6.41±9.59 | 0.50 |

Tab. 8.17: LSM und SE der *OPNin6*, *RBP4* und *GnRHR* Genotypen beim Merkmal MOT¹ (%)

| Locus | Genotyp | PI&PI×HA | PI | PI×HA |
|---------------|---------|-------------------------|-------------------------|------------|
| | | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| <i>OPNin6</i> | AA | 84.43±0.26 ^y | 84.74±0.25 | 84.32±0.82 |
| | AB | 85.07±0.21 ^x | 85.49±0.24 | 84.52±0.36 |
| | BB | 85.11±0.11 ^x | 85.36±0.22 | 84.93±0.27 |
| <i>RBP4</i> | AA | 85.42±0.26 | 85.65±0.24 ^x | 84.31±1.17 |
| | AB | 84.89±0.14 | 85.06±0.17 ^y | 84.77±0.21 |
| | BB | - | - | - |
| <i>GnRHR</i> | CC | 84.80±0.15 ^y | 85.05±0.15 ^b | 84.77±0.25 |
| | CG | 85.56±0.28 ^x | 86.48±0.40 ^a | 84.71±0.37 |
| | GG | - | - | - |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb Herkunft und Locus unterscheiden sich signifikant voneinander (a, b: $p \leq 0.01$; x, y: $p \leq 0.05$).

Tab. 8.18: LSM und SE der ACR Genotypen beim Merkmal MOT (%)

| PI&PI×HA* | | PI* | | PI×HA ^{ns} | |
|-----------|------------|---------|------------|---------------------|------------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 202/202 | 84.45±0.69 | 202/202 | 84.66±0.73 | 208/208 | 84.93±0.52 |
| 202/208 | 85.35±0.32 | 202/208 | 85.54±0.29 | 208/218 | 84.48±1.20 |
| 202/214 | 84.72±0.54 | 202/214 | 84.75±0.57 | 208/226 | 84.90±0.58 |
| 202/214 | 86.31±1.46 | 202/999 | 86.61±0.52 | 208/228 | 84.35±0.37 |
| 202/999 | 86.37±0.53 | 208/208 | 84.90±0.23 | 208/999 | 84.89±0.56 |
| 208/208 | 84.83±0.23 | 208/214 | 85.80±0.46 | 218/228 | 85.70±1.07 |
| 208/214 | 85.51±0.47 | 208/999 | 84.75±0.33 | 218/999 | 85.26±1.20 |
| 208/228 | 84.71±0.36 | 214/214 | 87.83±0.92 | 226/999 | 83.30±1.47 |
| 208/999 | 84.75±0.26 | 214/999 | 83.77±1.03 | 228/999 | 86.02±1.19 |
| 214/214 | 87.65±0.84 | 999/999 | 83.26±1.45 | 999/999 | 85.03±1.05 |
| 214/228 | 85.85±1.19 | | | | |
| 214/999 | 82.34±1.46 | | | | |
| 228/999 | 84.86±0.73 | | | | |
| 999/999 | 84.12±1.19 | | | | |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.19: LSM und SE der ACTG2 Genotypen beim Merkmal MOT (%)

| PI&PI×HA ^{ns} | | PI ^{ns} | | PI×HA [*] | |
|------------------------|------------|------------------|------------|--------------------|------------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 93/93 | 84.45±0.66 | 93/93 | 84.32±0.80 | 93/93 | 85.01±1.11 |
| 93/103 | 85.18±0.62 | 93/103 | 85.45±0.61 | 93/97 | 85.88±1.10 |
| 93/109 | 84.78±0.36 | 93/109 | 85.35±0.46 | 93/109 | 84.00±0.53 |
| 93/111 | 83.29±0.63 | 93/111 | 82.74±0.80 | 93/111 | 84.42±0.96 |
| 93/117 | 86.08±0.94 | 93/117 | 86.06±1.05 | 93/117 | 87.07±1.90 |
| 93/999 | 85.01±0.79 | 93/999 | 83.92±1.23 | 93/999 | 85.64±1.91 |
| 103/103 | 83.70±0.71 | 103/103 | 83.96±0.70 | 97/97 | 89.95±1.98 |
| 103/109 | 85.24±0.33 | 103/109 | 85.30±0.40 | 97/103 | 84.67±0.78 |
| 103/111 | 84.93±0.47 | 103/111 | 85.21±0.46 | 97/109 | 83.26±1.36 |
| 103/117 | 86.75±2.08 | 103/999 | 85.27±0.71 | 97/111 | 84.71±0.64 |
| 103/999 | 85.14±0.52 | 109/109 | 85.43±0.45 | 97/117 | 88.91±1.90 |
| 109/109 | 84.98±0.39 | 109/111 | 85.49±0.39 | 97/999 | 84.69±1.10 |
| 109/111 | 85.10±0.34 | 109/117 | 86.05±0.74 | 103/109 | 85.47±0.53 |
| 109/117 | 85.83±0.58 | 109/999 | 85.38±0.56 | 103/117 | 86.67±1.90 |
| 109/999 | 84.67±0.50 | 111/111 | 84.73±0.54 | 103/999 | 87.38±1.91 |
| 111/111 | 84.47±0.56 | 111/117 | 86.60±0.76 | 109/109 | 84.32±0.68 |
| 111/117 | 85.92±0.71 | 111/999 | 84.93±0.64 | 109/111 | 84.48±0.64 |
| 111/999 | 84.53±0.43 | 117/117 | 88.76±2.10 | 109/117 | 85.70±0.86 |
| 117/117 | 88.50±2.08 | 117/999 | 84.50±1.21 | 109/999 | 82.11±1.35 |
| 117/999 | 85.05±0.85 | 999/999 | 86.07±0.80 | 111/117 | 82.16±1.94 |
| 999/999 | 85.94±0.58 | | | 111/999 | 82.25±1.11 |
| | | | | 117/999 | 84.09±1.34 |
| | | | | 999/999 | 86.32±1.37 |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.20: Additiv- (a) und Dominanzeffekte (d) von *OPNin6* Allelen beim Merkmal MOT (%)

| Locus | Effekt | PI&PI×HA | |
|---------------|--------|------------|------|
| | | LSM ± SE | p |
| <i>OPNin6</i> | a | -0.34±0.15 | 0.02 |
| | d | 0.30±0.25 | 0.23 |

Tab. 8.21: Allelsubstitutionseffekte für Loci *ACR* und *ACTG2* beim Merkmal MOT (%)

| Locus | Allel | PI&PI×HA | | PI | | PI×HA | |
|--------------|-------|------------|------|-----------|------|------------|------|
| | | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p |
| <i>ACR</i> | 202 | 0.19±0.33 | 0.55 | 0.40±0.37 | 0.28 | - | - |
| | 208 | -0.08±0.27 | 0.76 | 0.03±0.31 | 0.93 | - | - |
| | 214 | 0.52±0.35 | 0.14 | 0.61±0.40 | 0.13 | - | - |
| | 228 | -0.02±0.41 | 0.96 | - | - | - | - |
| <i>ACTG2</i> | 93 | - | - | - | - | 0.39±0.58 | 0.50 |
| | 103 | - | - | - | - | 0.94±0.67 | 0.16 |
| | 109 | - | - | - | - | 0.03±0.52 | 0.96 |
| | 111 | - | - | - | - | -0.31±0.65 | 0.64 |
| | 117 | - | - | - | - | 1.27±0.81 | 0.11 |

Tab. 8.22: LSM und SE der *GnRHR* Genotypen beim Merkmal PDR (%)

| Genotyp | PI&PI×HA | PI | PI×HA |
|---------|------------------------|------------------------|-----------|
| | LSM ± SE | LSM ± SE | LSM ± SE |
| CC | 6.80±0.07 ^a | 6.69±0.07 ^a | 6.83±0.12 |
| CG | 6.39±0.13 ^b | 6.06±0.19 ^b | 6.69±0.18 |
| GG | - | - | - |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb Herkunft und Locus unterscheiden sich signifikant voneinander (a, b: $p \leq 0.01$; x, y: $p \leq 0.05$).

Tab. 8.23: LSM und SE der *INHBA* Genotypen beim Merkmal PDR (%)

| PI&PI×HA* | | PI ^{ns} | | PI×HA ^{ns} | |
|-----------|-----------|------------------|-----------|---------------------|-----------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 252/252 | 6.65±0.08 | 252/252 | 6.61±0.08 | 252/252 | 6.55±0.14 |
| 252/254 | 6.72±0.11 | 252/254 | 6.62±0.13 | 252/254 | 6.82±0.18 |
| 252/256 | 6.86±0.17 | 252/999 | 6.38±0.22 | 252/256 | 7.06±0.25 |
| 252/999 | 6.43±0.29 | 254/254 | 7.25±0.37 | 252/999 | 7.00±0.36 |
| 254/254 | 7.48±0.35 | 252/999 | 5.45±0.56 | 254/254 | 8.70±0.98 |
| 254/256 | 5.70±0.56 | 999/999 | 6.91±0.70 | 254/256 | 6.04±0.92 |
| 254/999 | 5.57±0.96 | | | 256/256 | 7.95±0.93 |
| 256/256 | 6.67±0.08 | | | 256/999 | 8.30±0.97 |
| 256/999 | 8.26±0.71 | | | | |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.24: Allelsubstitutionseffekte für Locus *INHBA* beim Merkmal PDR (%)

| Locus | Allel | PI&PI×HA | |
|--------------|-------|------------|------|
| | | LSM ± SE | p |
| <i>INHBA</i> | 252 | 0.06±0.27 | 0.82 |
| | 254 | 0.19±0.28 | 0.49 |
| | 256 | 0.21±0.310 | 0.49 |

Tab. 8.25: LSM und SE der *INHA*, *GnRHR* und *AR* Genotypen beim Merkmal ASR (%)

| Locus | Genotyp | PI&PI×HA LSM ± SE | PI LSM ± SE | PI×HA LSM ± SE |
|--------------|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>INHA</i> | AA | 6.78±0.64 | 6.61±0.89 ^{xy} | 6.93±0.91 |
| | AB | 6.80±0.12 | 6.40±0.18 ^y | 7.14±0.17 |
| | BB | 6.89±0.10 | 6.87±0.09 ^x | 6.53±0.22 |
| <i>GnRHR</i> | CC | 6.95±0.09 ^x | 6.84±0.09 ^x | 6.99±0.16 |
| | CG | 6.51±0.17 ^y | 6.23±0.24 ^y | 6.77±0.23 |
| | GG | - | - | - |
| <i>AR</i> | 196 bp | 6.83±0.13 ^y | 6.75±0.10 | 6.80±0.33 |
| | 186 bp | 6.82±0.12 ^y | 6.72±0.20 | 6.89±0.15 |
| | 173 bp | 7.53±0.27 ^{ax} | 7.36±0.28 | 8.11±0.75 |
| | 172 bp | 6.57±0.27 ^b | 6.47±0.25 | - |

LSMs mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb Herkunft und Locus unterscheiden sich signifikant voneinander (a, b: $p \leq 0.01$; x, y: $p \leq 0.05$).

Tab. 8.26: LSM und SE der *INHBA* Genotypeneffekte beim Merkmal ASR (%)

| PI&PI×HA ^A | | PI ^B | | PI×HA ^C | |
|-----------------------|-----------|-----------------|-----------|--------------------|-----------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 252/252 | 6.70±0.10 | 252/252 | 6.72±0.10 | 252/252 | 6.47±0.19 |
| 252/254 | 7.11±0.14 | 252/254 | 6.94±0.17 | 252/254 | 7.39±0.24 |
| 252/256 | 6.77±0.22 | 252/999 | 6.51±0.27 | 252/256 | 6.98±0.33 |
| 252/999 | 6.74±0.36 | 254/254 | 7.43±0.47 | 252/999 | 7.06±0.47 |
| 254/254 | 7.69±0.45 | 252/999 | 5.99±0.72 | 254/254 | 9.24±1.27 |
| 254/256 | 6.27±0.72 | 999/999 | 9.05±0.90 | 254/256 | 7.51±1.22 |
| 254/999 | 6.78±1.24 | | | 256/256 | 7.12±1.23 |
| 256/256 | 7.11±0.88 | | | 256/999 | 8.38±1.26 |
| 256/999 | 9.77±0.91 | | | | |

Signifikanter Effekt des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test: ^A($p \leq 0.01$), ^B($p \leq 0.05$), ^C($p \leq 0.05$)).

Tab. 8.27: Signifikante Unterschiede von LSMs für das Merkmal ASR (%) zwischen *INHBA* Genotypen

| Population | Genotyp | Genotyp | Schätzung | Angepasster p-Wert |
|------------|---------|---------|------------|--------------------|
| PI&PI×HA | 252/252 | 256/999 | -3.07±0.91 | 0.0008 |
| | 252/256 | 256/999 | -3.00±0.93 | 0.0013 |
| | 252/999 | 256/999 | -3.03±0.98 | 0.0019 |

Tab. 8.28: LSM und SE der *OPNpro* Genotypeneffekte beim Merkmal ASR (%)

| PI&PI×HA ^{ns} | | PI* | | PI×HA ^{ns} | |
|------------------------|-----------|---------|------------|---------------------|-----------|
| Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE | Genotyp | LSM ± SE |
| 118/118 | 6.98±0.35 | 118/118 | 6.94±0.34 | 118/138 | 7.06±1.32 |
| 118/142 | 7.05±0.23 | 118/142 | 6.96±0.25 | 118/142 | 7.19±0.50 |
| 118/146 | 7.01±0.45 | 118/146 | 7.83±0.63 | 118/146 | 6.25±0.66 |
| 118/148 | 6.82±0.20 | 118/148 | 6.79±0.21 | 118/148 | 6.71±0.47 |
| 118/999 | 9.12±0.90 | 118/999 | 11.34±1.26 | 126/142 | 7.06±0.77 |
| 142/142 | 6.83±0.23 | 142/142 | 6.78±0.21 | 126/148 | 7.55±0.44 |
| 142/146 | 7.05±0.34 | 142/146 | 6.58±0.51 | 126/999 | 6.03±0.93 |
| 142/148 | 6.85±0.15 | 142/148 | 6.86±0.15 | 138/142 | 7.31±0.60 |
| 142/999 | 7.28±0.39 | 142/999 | 7.98±1.24 | 138/146 | 5.50±1.33 |
| 146/146 | 6.66±0.45 | 146/146 | 6.18±0.56 | 138/148 | 6.71±0.60 |
| 146/148 | 6.07±0.37 | 146/148 | 6.02±0.47 | 142/146 | 7.46±0.47 |
| 146/999 | 5.36±1.28 | 148/148 | 6.51±0.21 | 142/148 | 6.61±0.34 |
| 148/148 | 6.68±0.19 | 148/999 | 6.44±0.62 | 142/999 | 7.41±0.93 |
| 148/999 | 6.98±0.28 | | | 146/146 | 7.43±0.76 |
| 999/999 | 5.97±0.91 | | | 146/148 | 6.00±0.60 |
| | | | | 148/148 | 7.09±0.37 |
| | | | | 148/999 | 6.48±0.77 |

* Signifikanter Effekt ($p \leq 0.05$) des Faktors Genotyp (globaler H_0 -Test)

^{ns} nicht signifikant

Tab. 8.29: Lineare Kontraste zwischen verschiedenen *OPNpro*-Genotypen beim Merkmal ASR (%)

| Population | lineare Kontraste zw. Genotypen | lineare Kontraste zw. Genotypen | Schätzung | p-Wert |
|------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|--------|
| PI | 118/118 | 118/999 | -4.40±1.30 | 0.0407 |
| | 118/142 | 118/999 | -4.38±1.28 | 0.0365 |
| | 118/148 | 118/999 | -4.55±1.28 | 0.0219 |
| | 118/999 | 142/142 | 4.56±1.28 | 0.0213 |
| | 118/999 | 142/146 | 4.76±1.36 | 0.0271 |
| | 118/999 | 142/148 | 4.48±1.27 | 0.0242 |
| | 118/999 | 146/146 | 5.16±1.38 | 0.0114 |
| | 118/999 | 146/148 | 5.32±1.34 | 0.0051 |
| | 118/999 | 148/148 | 4.83±1.28 | 0.0098 |
| | 118/999 | 148/999 | 4.90±1.40 | 0.0282 |

Tab. 8.30: Additiv- (a) und Dominanzeffekt (d) von *INHA* Allelen beim Merkmal ASR (%)

| Locus | Effekt | PI | |
|-------------|--------|------------|------|
| | | LSM ± SE | p |
| <i>INHA</i> | a | 0.13±0.45 | 0.76 |
| | d | -0.35±0.48 | 0.48 |

Tab. 8.31: Allelsubstitutionseffekte beim Merkmal ASR (%) für Loci *INHBA* und *OPNpro*

| Locus | Allel | PI&PI×HA | | PI | | PI×HA | |
|---------------|-------|------------|------|------------|------|------------|------|
| | | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p |
| <i>INHBA</i> | 252 | -0.40±0.34 | 0.24 | -0.07±0.24 | 0.77 | -0.71±0.46 | 0.13 |
| | 254 | 0.01±0.35 | 0.97 | 0.17±0.27 | 0.52 | 0.27±0.49 | 0.58 |
| | 256 | -0.24±0.39 | 0.54 | - | - | -0.21±0.53 | 0.69 |
| <i>OPNpro</i> | 118 | - | - | -0.59±0.54 | 0.27 | - | - |
| | 142 | - | - | -0.70±0.53 | 0.18 | - | - |
| | 146 | - | - | -1.00±0.56 | 0.07 | - | - |
| | 148 | - | - | -0.89±0.53 | 0.10 | - | - |

Tab. 8.32: Effekte der Haplotypsubstitution bei den Merkmalen NBA (Ferkel/Wurf), MOT (%) und ASR (%) beim ACTB Locus in der PI&PI×HA Population

| Haplotyp | Freq. | NBA | | MOT | | ASR | |
|----------|-------|-------------|-------|-------------|-------|--------------|-------|
| | | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p | LSM ± SE | p |
| TTTT | 0.414 | 0.441±0.342 | 0.20 | 1.217±0.758 | 0.11 | -0.441±0.454 | 0.34 |
| CCCT | 0.384 | 0.403±0.350 | 0.25 | 1.203±0.776 | 0.12 | -0.504±0.465 | 0.28 |
| TTCC | 0.076 | 0.234±0.370 | 0.53 | 1.122±0.820 | 0.17 | -0.400±0.492 | 0.42 |
| CTCT | 0.038 | 1.031±0.415 | 0.013 | 1.338±0.936 | 0.15 | -0.494±0.561 | 0.38 |
| CTTT | 0.015 | 0.325±0.483 | 0.50 | 1.728±1.098 | 0.12 | -1.563±0.658 | 0.018 |
| TCCT | 0.022 | 0.315±0.461 | 0.50 | 0.355±0.996 | 0.72 | 0.218±0.596 | 0.72 |
| CTCC | 0.022 | 0.361±0.431 | 0.40 | 1.261±0.948 | 0.18 | -0.298±0.568 | 0.60 |
| TTTC | 0.014 | 0.177±0.545 | 0.75 | 2.950±1.255 | 0.019 | -1.729±0.756 | 0.022 |

9 Konsequenzen für eventuelle weitere Forschungsaktivitäten

Die in der vorliegenden Untersuchung aufgedeckte Assoziation von 15 Kandidatengenen mit Spermaqualitäts- und Fruchtbarkeitsmerkmalen ist die grundlegende Voraussetzung frühzeitiger Markerassistierten Selektion (MAS) von KB Ebern.

Mit der Untersuchung von zwei weiteren Kandidatengenen, dem Prion Protein Gen (*PrnP*) und dem Pyridoxal Kinase Gen (*PKH-T*), wurde bereits angefangen.

PrnP ist hauptsächlich bekannt in Zusammenhang mit der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) und zeigt eine hohe Expression im Gehirn. In der Maus wurde die Expression von *PrnP* mRNA zusätzlich in spermatogenen Zellen angezeigt. *PrnP* ist möglicherweise in der Keimzellendifferenzierung während der Säugetierspermatogenese einbezogen.

PKH-T ist eine testisspezifische Splicevariante des Pyridoxal Kinase Gens in Menschen. Es wird hoch exprimiert im erwachsenen Hoden und in Spermien. *PKH-T* mag eine wichtige Rolle in der Spermatogenese spielen und könnte mit männliche Unfruchtbarkeit in Zusammenhang stehen.

Für sich anschließende zukünftige Projekte ergeben sich folgende Fragestellungen:

Welcher genetische und monetäre Selektionserfolg lässt sich durch die gemeinsame Berücksichtigung von Markerinformationen und additiven Geneffekten bei der paternalen und maternalen Fruchtbarkeitsleistung erreichen?

Bei entsprechenden Planungsberechnungen ist darüber hinaus die Frage zu beantworten, ob zusätzliche Kandidatengene erforderlich sind.

10 Öffentlichkeitsarbeit und Präsentationen

Lin C, Ponsuksili S, Schellander K, Wimmers K (2002): Candidate genes anal for loci affecting spermquality and fertility of boar. DGFZ/GFT-Gemeinschaftstagung, 18./19.09.2002, Halle/Saale, Deutschland

Lin C, Ponsuksili S, Tholen E, Schellander K, Wimmers K (2003): Association of candidate genes with sperm quality and fertility of boar. Proc., International Conference on Pig Production, 9.-12.9.2003, Beijing, China

Lin C, Jennen D, Ponsuksili S, Wimmers K, Schellander K (2004): Polymorphisms of candidate genes associated with sperm quality and fertility of boar. DGFZ/GFT-Gemeinschaftstagung, 29./30.9.2004, Dummerstorf-Rostock, Deutschland

Lin C, Tholen E, Jennen D, Schellander K, Wimmers K (2004): Functional candidate gene approach for identification of loci affecting sperm quality and boar fertility. Center of Swine Control, Sichuan Provincial Bureau of Animal Husbandry and Foodstuff on 30th Dec. 2004

Wimmers K, Lin C, Tholen E, Jennen D, Schellander K, Ponsuksili S (2005): Polymorphisms in candidate genes as markers for sperm quality and boar fertility. *Animal Genetics* 36, 152-155

Lin C, Ponsuksili S, Tholen E, Jennen D, Schellander K, Wimmers K (2005): Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Animal Reproduction Science*. (im Druck)

Lin C, Tholen E, Jennen D, Ponsuksili S, Schellander K, Wimmers K (2005) Evidence for effects of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility traits (Submitted)

Lin C, Tholen E, Tesfaye D, Jennen D, Schellander K, Wimmers K (2005) Haplotype analysis of beta-actin gene for its effects on sperm quality and boar fertility. (Submitted)

11 Kurzfassung

Fruchtbarkeit ist eines der wichtigsten ökonomischen Merkmale in der Schweineproduktion. Die Einführung der künstlichen Besamung (KB) in der Schweineproduktion erlaubt eine verbesserte Selektion der Eber für Produktionsmerkmale, aber gleichzeitig betont sie die Bedeutung der individuellen Reproduktionsleistung der Eber.

Diese Studie zielt darauf ab, den Effekt von 18 direkten funktionellen Kandidatengenomen auf Spermakonzentration (SCON), Spermabeweglichkeit (MOT), Samenvolumen je Ejakulat (VOL), Plasmatröpfchenrate (PDR), abnormale Spermienrate (ASR) und den Fruchtbarkeitsmerkmalen Non-Return-Rate (NRR) und Anzahl lebend geborener Ferkel (NBA) aufzuklären. Insgesamt wurden für die Untersuchung 19 Kandidatengenorte, *GnRHR*, *FSHB*, *LHB*, *RLN*, *PRL*, *PRLR*, *AR*, *FST*, *INHA*, *INHBA*, *INHBB*, *RBP4*, *ACR*, *OPNin6*, *OPNpro*, *ACTG*, *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB* basierend auf deren physiologischer Funktion in der männlichen Reproduktion ausgewählt.

Mit Hilfe der vergleichenden Sequenzierung von Tieren der Rassen Pietrain und Hampshire wurden Polymorphismen in Intron 18 (G>A) des porcinen *ACTN1* (AY837722), in 3'-UTR (A>C) des porcinen *ACTN4* (AY837723) und in Intron 3 (3 SNPs) und Exon 4 (1 SNP) (T>C) des porcinen *ACTB* gefunden.

Eber der Rassen Pietrain (n=244) und Pietrain×Hampshire (n=112) aus einer KB Eberstation wurden für diese SNPs am Locus *ACTN1*, *ACTN4* und *ACTB* sowie an bereits beschriebenen Polymorphismen anderer Genorte genotypisiert.

Varianzanalysen ergaben signifikante Assoziationen zwischen folgenden Kandidatengenomen und Merkmalen: *ACTN1* ($p < 0.05$) und *ACR* ($p < 0.05$) mit NRR; *ACTN1* ($p < 0.01$), *ACTB* ($p < 0.05$) und *OPNin6* ($p < 0.05$) mit NBA; *PRL* ($p < 0.01$), *INHBB* ($p < 0.05$), *ACR* ($p < 0.05$) und *FSHB* ($p < 0.01$) mit SCON; *ACTG* ($p < 0.01$), *RLN* ($p \leq 0.01$) und *FST* ($p < 0.01$) mit VOL. *ACTG* ($p < 0.05$), *RBP4* ($p < 0.05$), *OPNin6* ($p \leq 0.05$), *ACR* ($p < 0.01$), *ACTB* ($p < 0.05$) und *GnRHR* ($p < 0.05$) mit MOT; *GnRHR* ($p < 0.01$) und *INHBA* ($p < 0.05$) mit PDR; *GnRHR* ($p < 0.01$), *INHA* ($p < 0.05$), *INHBA* ($p < 0.05$), *OPNpro* ($p < 0.05$), *ACTB* ($p < 0.05$) und *AR* ($p < 0.05$) mit ASR. Es wurden keine signifikanten Effekte von *ACTN4*, *LHB* und *PRLR* auf eines der untersuchten Merkmale gefunden.