



Schlussbericht zum Thema

Bereitstellung tierzüchterischer Marker für
die Verbesserung der Züchtung innerhalb der
gefährdeten Rasse DSN zur besonders
tiergerechten und nachhaltigen Produktion
tierischer Erzeugnisse

FKZ: 2815NA010

Projektnehmer: Humboldt-Universität zu
Berlin

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung
und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des
Deutschen Bundestages im Rahmen des
Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau Landwirtschaft (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische und nachhaltige Land- und Lebensmittelwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn in die Praxis umgesetzt. Das Programm untergliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder, den Forschungs- und den Informationsbereich.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter
www.bundesprogramm.de

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel: 0228-6845-3280
E-Mail: boel@ble.de



Abschlussbericht

zum Projekt

Bereitstellung tierzüchterischer Marker für die Verbesserung der Züchtung innerhalb der gefährdeten Rasse DSN zur besonders tiergerechten und nachhaltigen Produktion tierischer Erzeugnisse

Förderungskennzeichen: 2815NA010

Kurztitel: DSN - Deutsches Schwarzbuntes Niederungsgrind

Zuwendungsempfänger: Humboldt- Universität zu Berlin
Albrecht Daniel Thaer- Institut
Unter den Linden 6
10099 Berlin

Projektkoordination: Prof. Dr. Gudrun Brockmann
Tel.: 030 2093 49872
E-Mail: gudrun.brockmann@agrar.hu-berlin.de
Sitz: Invalidenstraße 42, 10115 Berlin

Laufzeit: 1. August 2016 – 31. Dezember 2023

Datum: 19. Januar 2024

Autoren: Dr. Paula Korkuć, Prof. Dr. Gudrun Brockmann



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Kurzfassung

Das Deutsche Schwarzbunte Niederungsrind (DSN) ist eine milchbetonte Zweinutzungsrasse, die auf der Roten Liste der gefährdeten einheimischen Nutztierassen steht. Sie wurde aufgrund ihrer geringeren Milchleistung durch Holstein-Rinder ersetzt. Ziel dieses Projekts war es, züchterisch nutzbare Marker zu identifizieren, die zur Verbesserung der Rasse DSN geeignet sind, um so zur besonders tiergerechten und nachhaltigen Produktion tierischer Erzeugnisse beizutragen.

Mit der Einrichtung einer umfassenden Gewebe-, DNA- und Daten-Bank konnte die genomische Information nahezu der gesamten DSN-Population gesammelt werden. Damit ist die Grundlage für eine geeignete Lernstichprobe gelegt. Die genomischen Informationen haben gezeigt, dass die Inzucht in DSN geringer und die Diversität höher als in Holsteins ist, was auf eine sehr gute Zuchtarbeit schließen lässt. In gesamtgenomischen Analysen wurden genetische Marker zur Milchproduktion, zu Gesundheits- und Fruchtbarkeitsparametern bei DSN-Kühen und Wachstums- und Fleischleistung bei DSN-Schlachtbullen identifiziert. Genetische Marker für Milchproduktion und Fleischansatz sind entscheidend, um die Selektion auf höhere Milchleistung bei Erhaltung des Zweinutzungstyps effizient zu gestalten. Die identifizierten Marker können unterstützend bei der Auswahl von Zuchtbullen aus potentiellen Jungbullen, gezielten Anpaarungsentscheidungen zur Verbesserung der Leistung der Nachkommen und zur Vorhersage der Leistung junger Tiere genutzt werden. Gleichzeitig liegt ein Fokus darauf, Inzucht zu minimieren und die genetische Diversität in dieser kleinen Rasse zu erhalten.

Zusammenfassend ist dieses Projekt ein bedeutender Schritt in Richtung einer verbesserten Zuchtauswahl und einer effizienteren Zucht auf genetischer Grundlage, um das Leistungspotential besser zu nutzen und die Robustheit und Diversität zu erhalten. Die identifizierten Marker sind wertvolle Werkzeuge, um die Zuchtscheidung in der kleinen DSN-Population zu unterstützen.

Abstract

The German Black Pied Lowland Cattle (DSN) is a dairy-orientated dual-purpose breed that is on the Red List of endangered native livestock breeds. Due to their lower milk yield, they were replaced by high-yielding Holstein cattle. The aim of this project was to identify markers that could be used for breeding purposes to improve the DSN breed in order to contribute to the particularly animal-friendly and sustainable production of animal products.

With the establishment of a comprehensive tissue, DNA and data bank, the genomic information of almost the entire DSN population could be collected. This has laid the foundation for a suitable learning sample. The genomic information has shown that inbreeding in the DSN breed is lower and diversity is higher than in Holsteins, which indicates very good breeding work. Whole genomic analyses identified genetic markers for milk production, health and fertility parameters in DSN cows and growth and beef performance in DSN beef bulls. Genetic markers for milk production and those for meat production are crucial for efficient selection for higher milk production while maintaining the dual-purpose type. The identified markers can be used to support the selection of breeding bulls from potential young bulls, targeted mating decisions to improve the performance of the offspring and to predict the performance of young animals. At the same time, the focus is on minimizing inbreeding and maintaining genetic diversity in this small breed.

In summary, this project is a significant step towards improved breeding selection and more efficient breeding on a genetic basis to better utilize performance potential and maintain robustness and diversity. The identified markers are valuable tools to support breeding decisions in the small DSN population.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	1
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Gegenstand des Vorhabens	7
1.2 Ziele und Aufgabenstellung	8
1.2.1 Ziele.....	8
1.2.2 Aufgabenstellung	9
1.2.3 Erweiterung der Ziele um Long-Read Sequenzierungsdaten.....	12
1.3 Planung und Ablauf des Projekts	13
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand	13
3 Materialien und Methoden	14
4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	14
4.1 Aufbau der Gewebe-, Phänotypen- und Genotypen-Datenbanken	14
4.1.1 Gewebeproben und DNA.....	14
4.1.2 Genotypen	15
4.1.3 Phänotypen.....	17
4.2 Imputation der SNP-Chip Genotypen auf die Gesamtgenomsequenz	18
4.3 Genomweite Assoziationsstudien.....	20
4.3.1 Milchleistung.....	20
4.3.2 Wachstums- und Fleischleistungsmerkmale	26
4.3.3 Vergleich der Ergebnisse aus Fleisch- und Milchleistung	30
4.3.4 Klinische Mastitis	31
4.3.5 Fruchtbarkeit, Gesundheitsmerkmale und Endoparasitenresistenz	32
4.4 Ökonomischer Zuchtwert	32
4.5 Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten	33
4.5.1 Übersicht der Sequenzvarianten in DSN.....	33
4.5.2 Reinrassigkeit, Inzucht und Diversität in DSN.....	34
4.5.3 Charakterisierung von Kaseinvarianten	37
4.5.4 Hornlosigkeit.....	39
4.5.5 Holstein Haplotyp 5	41

4.6	Vorschlag von genetischen Markern	41
4.6.1	Verbesserung der Wachstums- und Fleischleistungen.....	41
4.6.2	Verbesserung anderer Merkmale.....	42
4.7	Long-Read Sequenzierung	42
4.8	Wissenstransfer und Praxisseminare.....	44
5	Diskussion der Ergebnisse und Schlussfolgerungen.....	48
5.1	Aufbau der Gewebe-, Phänotypen- und Genotypen-Datenbanken.....	48
5.2	Imputation auf Gesamtgenomsequenz	49
5.3	Genomweite Assoziationsstudien.....	49
5.4	Ökonomischer Zuchtwert	51
5.5	Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten	52
5.6	Vorschlag von genetischen Markern	52
5.7	Long-Read Sequenzierung	53
5.8	Fazit.....	54
5.9	Andere Herausforderungen der DSN-Züchter	54
6	Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und der Verwertbarkeit der Ergebnisse	55
6.1	Genotypen	55
6.2	Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten	55
6.3	Ergebnisse aus der genomweiten Assoziationsanalyse.....	56
6.4	Projekt zur Entwicklung eines genomischer Zuchtwerte für DSN	57
7	Gegenüberstellung der erreichten und der ursprünglich geplanten Ziele; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen.....	58
8	Zusammenfassung.....	62
9	Literaturverzeichnis.....	64
10	Übersicht aller im Berichtszeitraum realisierten Veröffentlichungen zum Projekt, bisherige geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse	66
	Anhang (übergeben an den DSN-Zuchtverband, den RBB und die Betriebsleiter).....	69
	Untersuchungen zu Körpermerkmalen bei weiblichen Rindern der Rasse DSN zum Zeitpunkt der Besamung.....	69

Abkürzungsverzeichnis

50K, 700K	50.000, 700.000 (gemeint ist die Anzahl der SNPs auf einem SNP-Chip)
AG	Arbeitsgruppe
DH	Deutsche Holstein
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. „deoxyribonucleic acid“)
DSN	Deutsches Schwarzbuntes Niederungsrind
DSN200K	DSN-spezifischer SNP-Chip mit ca. 200.000 SNPs
GWAS	genomweite Assoziationsanalyse
HF	Holstein Friesian
HU	Humboldt-Universität
IfN	Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere e.V.
INDEL	Insertion oder Deletion (engl. „INsertion or DEletion“)
kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1.000 Basen)
LA	Laktation
LD	Linkage-Disequilibrium
MAF	Minderheitenallelfrequenz (engl. „minor allele frequency“)
Mb	Megabasenpaare (1 Mb = 1.000.000 Basen)
p_{BH}	p-Wert, der mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur korrigiert wurde
p_{Bonf}	p-Wert, der mit der Bonferroni-Prozedur korrigiert wurde
RBB	Rinderproduktion Berlin-Brandenburg GmbH
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. „single nucleotide polymorphism“)
SV	Strukturelle Variante
vit	Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Agrarbetriebe, von denen DSN-Proben gesammelt wurden	14
Abbildung 2: Überblick der erarbeiteten Pipeline zur Prozessierung der Rohsequenzdaten.....	16
Abbildung 3: 1- und 2-Schritt-Imputation	19
Abbildung 4: Manhattan-Plots für Milchmenge in kg in der 1. und 2. Laktation.....	22
Abbildung 5: Übersicht des Locus auf Chromosom 5.....	24
Abbildung 6: Übersicht der Schlachtdaten.....	26
Abbildung 7: Übersicht der Wiegeungen für DSN- Bullen der Agrargenossenschaft Gräfendorf	27
Abbildung 8: Manhattan-Plot für Geburtsgewicht und Gewicht nach ca. 3 Wochen von DSN-Bullen 28	
Abbildung 9: Gezoomter regionaler Assoziationsplot auf Chromosom 5 für Geburtsgewicht.....	29
Abbildung 10: Kopplung der Loci für Geburtsgewicht und Milchfettgehalt auf Chromosom 5	30
Abbildung 11: Dendrogramm von insgesamt 40 sequenzierten Rinder	35
Abbildung 12: Verwandtschaft zu DSN	36
Abbildung 13: Vergleich des DSN- und Holstein-Anteils in 304 DSN- und 150 Holstein-Tieren	36

Abbildung 14: Die A1- und A2- Variante von β -Kasein.....	38
Abbildung 15: Cluster der vorkommenden Allelvarianten für die einzelnen Rinderrassen innerhalb der Kaseingene	39
Abbildung 16: Haplotypen der Kaseinproteine CSN1S1- CSN2- CSN1S2- CSN3.....	39
Abbildung 17: Mutationen für Hornlosigkeit auf Chromosom 1	40
Abbildung 18: Pipeline des Long-Read Consortiums zur Bearbeitung der Long-Read Sequenzierungsdaten	42
Abbildung 19: Übersicht zu den Read-Längen aus der Long-Read Sequenzierung.....	43
Abbildung 20: Strukturelle Varianten in Bezug zu ihrer Länge in Kb	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Balkendiagramm mit Meilensteinplanung für den Projektzeitraum 2016 – 2019	9
Tabelle 2: Erweiterung der Aufgaben des DSN-Projekts für den Projektzeitraum 2020 – 2021	10
Tabelle 3: Erweiterung der Aufgaben des DSN-Projekts für den Projektzeitraum 2022 – 2023	11
Tabelle 4: Übersicht der gesammelten Proben während des Projektzeitraums 2016 – 2023.....	14
Tabelle 5: Anzahl der DSN-Genotypen je verwendeter Sequenzierungs- oder Genotypisierungstechnik	15
Tabelle 6: Übersicht der durchgeführten GWAS zu Milchleistungsmerkmalen.....	20
Tabelle 7: Signifikant assoziierte SNPs für Milchleistungs-Phänotypen.....	21
Tabelle 8: Die Top assoziierten SNPs aus der GWAS mit Milchproduktionsmerkmalen	23
Tabelle 9: Kandidatengene in Loci, die signifikant mit Milchproduktionsmerkmalen bei DSN-Kühen assoziiert sind.....	25
Tabelle 10: Die Top-SNPs aus der GWAS mit Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen bei DSN-Bullen	28
Tabelle 11: Top-SNPs aus Assoziationsanalyse mit Klinischer Mastitis in DSN-Kühen	31
Tabelle 12: Übersicht des DSN Net Merit und Subindizes für Milch, Fitness und Fleisch für die 10 DSN-Zuchtbullen mit den höchsten und niedrigsten Zuchtwerten.....	33
Tabelle 13: Übersicht des Einflusses der 20,6 Millionen identifizierten Sequenzvarianten auf das Rindergenom	34
Tabelle 14: Vergleich der genomischen Inzucht und genetischen Diversität in DSN und Holstein	37
Tabelle 15: SNPs zur Identifikation der Polled-Allele in keltischen Rassen oder Holstein Friesian	40
Tabelle 16: Top 10 DSN-Kühe des Geburtsjahres 2023 mit den höchsten GenScores für Milchmenge in der 1.-3. Laktation in kg.....	41
Tabelle 17: Auflistung aller Praxisseminare und Konferenzen.....	44

1 Einleitung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Tierzüchterisch besteht im vorliegenden Projekt das Ziel, einen Beitrag zu leisten, die robuste, für Weidehaltung typische, aber weniger leistungsfähige und daher gefährdete Rasse des Deutschen Schwarzbunten Niederungsrinds (DSN) nachhaltig zu verbessern, um sie im Vergleich zu der intensiv auf Milchleistung gezüchteten Hochleistungsrasse Deutsche Holstein (DH) für den ökologischen Landbau sowie bestimmte Standorte und Haltungsbedingungen wirtschaftlich attraktiver zu machen.

DSN ist ein milchbetontes Zweinutzungsrind (Milch/Fleisch), das auf der Roten Liste der gefährdeten einheimischen Nutztierassen unter der Einstufung „Phänotypische Erhaltungspopulation“ steht. Gegenüber den ausschließlich auf Milchleistung gezüchteten Holsteins zeichnet sich die Rasse DSN durch ein anderes Leistungsprofil aus. Während für die Holstein-Population des Landes Brandenburg eine Milchleistung von 10.000 kg anvisiert wird, stehen für die Rasse DSN 7.000 kg zu Buche. DSN sind in der Milchproduktion weniger leistungsstark und damit ökonomisch weniger rentabel. Als solche wurde sie fast vollständig von DH verdrängt. Ihr Erhaltungswert resultiert maßgeblich daraus, dass

1. DSN sehr robust, widerstandsfähig, fruchtbar und langlebig ist und gute Kalbeeigenschaften hat, Merkmale, die in intensiven Hochleistungszuchten lange vernachlässigt wurden und heute aus mehreren Gründen lohnenswert sind zu erhalten,
2. DSN dem Bild der Konsumenten von einer Milchkuh im ökologischen Landbau durch die ausgeweitete Weidehaltung und der nicht auf Höchstleistung selektierten Milchleistung am nächsten kommt,
3. die Vorfahren der DSN den genetischen Ursprung der heutigen DH bilden.

Für die Erhaltung der DSN wurden in Brandenburg, Hessen und Niedersachsen mehrere Fördermittelprogramme realisiert, die den Betrieben eine ökonomisch vertretbare Produktion erlauben.

Im Zuchtgebiet des Zuchtverbands RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg GmbH (RBB) besteht die größte und züchterisch am besten bearbeitete reine DSN-Population. Deshalb, wurden die Untersuchungen maßgeblich in dieser Population durchgeführt. Berücksichtigt wurden jedoch auch Linien des reinen Zuchtbestands Frankenhausen in Hessen. In weitere bestehende DSN-Bestände wurden in der Zuchtgeschichte andere Rassen eingekreuzt, wodurch der Genpool gemixt wurde.

Neben der Erhaltung der Rasse als tiergenetische Ressource spielen ökonomische Überlegungen bei der züchterischen Bearbeitung der Rasse eine Rolle. Mit dem in Ansätzen skizzierten Leistungsprofil eignen sich die Tiere dezidiert für Produktionsbedingungen, die weniger intensiv gegeben oder gestaltet sind. Insbesondere der Ökologische Landbau verlangt nach Milchkühen, die z.B. unter einem verminderten Einsatz von hochkonzentrierten Futtermitteln und unter Nutzung natürlicher Haltungsformen (Weidegang) in den jeweiligen Betrieben ökonomisch und ökologisch erfolgreich gehalten werden können.

Der Gegenstand des Vorhabens ist es, genetische Untersuchungen von DSN-Tieren mit dem Ziel durchzuführen, bessere Selektionsparameter für die Züchtung innerhalb der kleinen reinrassigen DSN Population zu erhalten, um darauf aufbauend Zuchtstrategien zu entwickeln, die es ermöglichen, züchterisch die Rasse so zu verbessern, dass sie ein sehr passendes Produkt für ökologisch arbeitende Milchviehbetriebe, für bestimmte Standorte und Haltungsverfahren darstellt.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung

1.2.1 Ziele

Das Vorhaben ist der angewandten Forschung und Entwicklung zuzuordnen. Die genetische Ausstattung der DSN soll umfassend charakterisiert werden, um bedeutsame funktionelle Sequenzvarianten in der aktuellen Zuchtpopulation zu finden, die potentiell mit typischen positiven Eigenschaften von DSN, aber auch nachteiligen Merkmalen assoziiert sein können, und die als genetische Marker für die Zucht in der kleinen reinrassigen DSN-Population genutzt werden können. Dabei soll untersucht werden, wie hoch die Variabilität von Sequenzvarianten innerhalb der reinrassigen DSN-Population ist. Die Daten geben Auskunft über Variabilität und Inzucht innerhalb der Population. Die Kenntnis des genomischen Repertoires ist notwendig, damit DSN mit anderen Rassen verglichen werden kann. Des Weiteren soll untersucht werden, welche genomische Ausstattung für die Rasse DSN typisch ist, um DSN mit anderen Rassen wie den DH vergleichen zu können und genomische Unterschiede zu identifizieren. Die identifizierten Sequenzvarianten sollen funktionell annotiert werden und es soll untersucht werden, ob diese Sequenzvarianten mit Merkmalen von DSN assoziiert sind. So sollen Sequenzvarianten als genetische Marker getestet werden, die innerhalb der Population zur selektiven Verbesserung der DSN-Leistung bei Sicherung der Robustheit geeignet sein könnten.

Vorgesehen waren (1) gesamtgenomische Sequenzierungen von reinrassigen DSN-Tieren, um DSN-spezifische Genvarianten zu finden, (2) der Aufbau einer Gewebe- und DNA-Datenbank aller weiblichen DSN-Tiere in Brandenburg über mehrere Generationen und (3) die Nutzung der Datenbank als umfangreiche Referenzpopulation für die Schätzung von Alleleffekten und als Grundlage für genomisch basierte Zucht- und Anpaarungsentscheidungen. Obwohl die beabsichtigten Untersuchungen und die aktuellen Populationsgröße nicht ausreichen, um eine sichere Schätzformel für eine genomische Selektion in der kleinen Population zu entwickeln, werden doch in diesem Projekt entscheidende Vorarbeiten geleistet und Voraussetzungen geschaffen, eine ausreichend große Lernstichprobe für die sichere Schätzung von Alleleffekten für die nachfolgende genomische Selektion zu etablieren.

Aufgrund von mehreren Projektverlängerungen wurden die Ziele erweitert. Neben Genotypisierungen mit SNP-Chips (SNP, engl. „Single Nucleotide Polymorphism“, dt. Einzelnukleotidpolymorphismus) wurden auch Sequenzdaten generiert, so dass mit imputierten Daten hoher Dichte genomweite Assoziationsanalysen (GWAS) durchgeführt werden konnten. In den GWAS sollten genomische Marker identifiziert werden, die mit Milchleistungsmerkmalen assoziiert sind. Die identifizierten Marker können benutzt werden, um die Milchleistung in DSN zu verbessern und DSN als Nischenprodukt besser marktfähig zu machen.

Bei der Rasse DSN handelt es sich um eine Zweinutzungsrasse. Daher ist es wichtig, nicht nur die Milchleistung, sondern auch die Wachstums- und Fleischleistungen im Blick zu haben. Um genetische Loci für die Wachstums- und Fleischleistungen zu finden, wurde das Projekt erneut verlängert. Dafür war es notwendig, neben den weiblichen Tieren auch die männlichen Tiere zu untersuchen. Insbesondere waren die Genotyp-Daten und auch die Mast- und Schlachtleistung von Bullen zu erfassen. Die Ergebnisse aus GWAS mit Wachstums- und Fleischleistungsdaten soll mit denen der Milchleistung verglichen werden, um Einzeleffekte aber auch mit Milchleistung gekoppelte Effekte zu identifizieren. Darauf aufbauend sollte ein Konzept zur Erhaltung der DSN als Doppelnutzungsrasse erstellt werden.

Genetische Marker für Milchproduktion und solche für Fleischansatz können helfen, die Selektion auf den Zweinutzungstyp durch genomische Informationen besser als bisher zu unterstützen, um gleichzeitig die typischen Eigenschaften von DSN-Rindern als Milch- und Fleischrind zu sichern oder sogar noch zu verbessern und dabei Inzucht zu minimieren und die genetische Diversität in der kleinen Rasse zu erhalten. Mit der gesamten Information soll eine mögliche negative Beeinflussung der Fleischigkeit von DSN bei Selektion auf eine höhere Milchmenge oder umgekehrt, eine negative Beeinflussung der Milchleistung bei stärkerer Berücksichtigung der Fleischigkeit vermieden werden. Der Doppelnutzungstyp der DSN soll erhalten bleiben. Dies ist konform mit dem angestrebten Zuchtziel der DSN-Betriebe.

1.2.2 Aufgabenstellung

Das Projekt startete mit einer Laufzeit von 3 Jahren am 1.05.2016 (Zuwendungsbescheid vom 13.04.2016). Aufgrund verspäteter Personaleinstellung war der tatsächliche Projektbeginn am 1.08.2016. Die Aufgabenstellung im Projektzeitraum ist in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Balkendiagramm mit Meilensteinplanung für den Projektzeitraum 2016-2019. A: Sequenzierung der 25 DSN-Tiere ist abgeschlossen, B: Sequenzvarianten innerhalb DSN und zwischen DSN und DH sind identifiziert, C: Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten ist abgeschlossen/putative funktionelle genetische Marker werden vorgeschlagen, D: Assoziationsanalyse mit ca. 1500 Tieren, E: Wissenstransfer und F: Publikation. HUB= Humboldt-Universität zu Berlin, RBB= Rinderproduktion Berlin-Brandenburg GmbH, IfN = Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere e.V.

Arbeitsaufgaben Jahr	Zeittafel (Quartale)											
	2016		2017				2018				2019	
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
1. Sequenzierung der 25 DSN-Tiere												
1.1 Auswahl repräsentativer Tiere (RBB, HUB)	■											
1.2 Bereitstellung der Blut-Proben (RBB)	■											
1.3 Vorbereitung der DNA-Proben (HUB)	■											
1.4 Sequenzierung (an der Technischen Universität München)		■										
1.5 Übernahme der Rohdaten (HUB)			■									
2. Auswertung der Sequenzdaten (HUB)												
2.1 Qualitätscheck, Identifizierung von Sequenzvarianten				■	■							
2.2 Allelfrequenzen innerhalb DSN				■	■							
2.3 Sequenzvarianten zw. DSN und anderen Rassen						■	■					
3. Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten (HUB)												
3.1 Annotation von Genfunktionen							■	■				
3.2 Vorschlag von genetischen Markern									■			
4. Anlegen einer Gewebedatenbank der DSN												
4.1 Anschaffung der Tiefkühltechnik, Aufbau der Logistik (HUB)	■											
4.2 Probensammlung von ca. 3000 Tieren (RBB) DNA- Präparation (HUB), DNA- Langzeitlagerung (IfN)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.3 Bereitstellung von Phänotypen	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.4 Genotypisierung: 10 Marker, ca. 1500 Tiere (HUB)												
4.4. Assoziationsanalyse von SNPs mit Merkmalen (HUB)											■	
5. Wissenstransfer, Praxisseminare												
5.1 Jährliche Treffen von HUB, RBB und IfN, DSN-Züchtertagung 2017/18, Grüne Woche (RBB, HUB)		■		■		■		■		■		■
5.2 Workshops (alle)									■			■
6. Publikationen in Praxis- und Fachzeitschriften												
z.B. für „Blickpunkt Rind“, Flyer (HUB)										■		■

Das Projekt wurde bis zum 31.12.2021 verlängert (Zuwendungsbescheide vom 11.11.2019 und 7.04.2020). Die Arbeitsaufgaben wurden für diesen Zeitraum erweitert und sind in Tabelle 2 zu finden. Dabei wurden Arbeitsaufgaben aus dem ersten Förderzeitraum wie das Sammeln von Gewebe- und DNA-Proben und der Wissenstransfer fortgeführt, während die Arbeitsaufgabe zur Analyse der Genotyp- und Sequenzdaten angepasst und erweitert wurde. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass die Arbeit am Projekt durch die Maßnahmen der Corona-Pandemie erschwert wurden. Im Zeitraum vom 16.03. - 08.06.2020 war der Zugang zum Büro untersagt und das Arbeiten im Homeoffice nur sehr schwer möglich.

Tabelle 2: Erweiterung der Aufgaben des DSN-Projekts für den Projektzeitraum 2020 – 2021.

Arbeitsaufgaben	Zeittafel (Quartale)								
	Jahr	2020				2021			
		Quartal	1	2	3	4	1	2	3
7. Gewebe- und DNA-Bank mit dazugehörigen Phänotypen									
7.1 Sammeln von weiteren Gewebeproben und DNA-Isolierung		x	x	x	x	x	x	x	x
7.2 Aktualisierung von Phänotypen und Sammeln neuer Phänotypen (Totgeburten, Fleischleistung)		x	x	x	x	x	x	x	x
8. Bearbeitung der Sequenz- und SNP-Chip-Daten									
8.1 Anpassung der bisherigen Datensätze und Überarbeitung der Programme an das neue Update des 1000-Bullengenom-Projekts		x							
8.2 Integration der in 2019 erhaltenen Genotyp-Daten in die vorhandenen Datensätze		x							
8.3 Qualitätscheck, Identifizierung von Sequenzvarianten der 75 neu sequenzierten DSN		x	x						
8.4 Auswahl von weiteren 150 DSN-Tieren für die Sequenzierung zur Abbildung der Population basierend auf genetischer Diversität, Leistungs- und Verwandtschaftsanalysen und Integration in den bisherigen Datensatz + Wiederholung von 8.3 für die 150 neu sequenzierten DSN-Tiere		x	x	x					
8.5 Imputation der 50k SNP-Chip-Daten auf Sequenzlevel für alle Tiere				x	x				
9. Analysen der Genotyp-Daten									
9.1 Untersuchung der Allelfrequenzen und Diversität mit neuem unikalen umfassenden Datensatz innerhalb der DSN-Population und Vergleich mit anderen Rassen				x	x	x			
9.2 Qualitätstestung der aktualisierten Phänotypen und Vorbereitung für Assoziationsstudien				x	x	x			
9.3 Wiederholte genomweite Assoziationsanalyse mit aktualisierten Phänotypen (Milchleistung, Exterieur, Fruchtbarkeit, Krankheiten, etc.)					x	x	x		
9.4 Genetische Marker werden funktionell annotiert und Regionen quantitativer Merkmale (QTL, „Quantitative Trait Locus“) auf Kandidatengene untersucht						x	x	x	x
9.5 Vorschlag von genetischen Markern (a) zur Verbesserung der Milchleistung und (b) zur Erhaltung der Diversität in DSN							x	x	
9.6 Genotypisierung von 10 funktionellen Markern in ca. 1500 Tieren der DSN- Population mit KASP-Assays + anschließende Assoziationsstudie								x	x
10. Wissenstransfer, Praxisseminare									
10.1 Jährliche Treffen von HUB, RBB und IfN (DSN-Züchtertagung)					x				x
10.2 Nationale und internationale Konferenzen (DGfZ, EAAP)					x		x		
10.3 Organisation und Durchführung einer Veranstaltung mit Vertretern von Doppelnutzungsgrinderrassen aus Deutschland und ggfls. auch aus dem europäischen Ausland							x	x	x

Das Projekt wurde nochmals bis zum 31.12.2023 verlängert (Zuwendungsbescheide vom 20.10.2021 und 11.03.2022). In diesem Zeitraum wurden weitere Proben von DSN-Kühen und Bullen gesammelt und genetische Loci für die Wachstums- und Fleischleistung in DSN Bullen gesucht. Das Projekt wurde um drei neue Arbeitsaufgaben für diesen Zeitraum erweitert (Tabelle 3). Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Aufgaben erfolgt unter nachfolgender Tabelle 3.

Tabelle 3: Erweiterung der Aufgaben des DSN-Projekts für den Projektzeitraum 2022 – 2023.

Arbeitsaufgaben	Zeittafel (Quartale)								
	Jahr	2022				2023			
		Quartal	1	2	3	4	1	2	3
11. Sammeln von Gewebeproben, Phänotypen und Genotypen									
11.1 Sammeln von weiteren Gewebeproben und DNA-Isolierung (m/w)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11.2 Aktualisierung von Phänotypen, Sammeln und Aufarbeitung neuer Phänotypen zur Fleischleistung	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11.3 Genotypisierung von 384 Tieren mit dem DSN-spezifischen SNP-Chip					x				
11.4 Qualitätscheck und Integration der neuen Genotypen mit den vorhandenen Genotypen + Imputation der Genotypen auf Sequenzlevel					x	x			
12. Assoziationsanalysen									
12.1 Qualitätstestung der aktualisierten Phänotypen und Vorbereitung für Assoziationsstudien		x			x				
12.2 Genomweite Assoziationsanalyse mit aktualisierten Phänotypen der Fleischleistung der DSN-Kühe und DSN-Bullen		x	x	x	x	x			
12.3 Genetische Marker werden funktionell annotiert und Regionen quantitativer Merkmale (QTL, „Quantitative Trait Locus“) auf Kandidatengene untersucht					x	x	x	x	
12.4 Vergleich der Ergebnisse aus Fleischleistung mit denen aus Milchleistung						x	x		
12.5 Vorschlag von genetischen Markern zur Verbesserung der Fleischleistung									x
13. Wissenstransfer/ Praxisseminare									
13.1 Jährliche Treffen von HUB, RBB und IfN (DSN- Zuchtverbandsjubiläum)				x					x
13.2 Nationale und internationale Konferenzen (DGfZ, EAAP)			x				x		
13.3 Konzept für optimale Erhaltung der Population + Verfassen des Abschlussberichts									x

Arbeitsaufgabe 11 - Sammeln von Gewebeproben und Phänotypen: Hierbei handelt es sich um eine Fortführung der Arbeitsaufgabe 7 aus Tabelle 2. In der geplanten Verlängerung sollten weiterhin Haar- und Gewebeproben von Schlachtbullen und Kühen der DSN-Population gesammelt werden. Die DNA aus den Proben wird isoliert, um die bestehende DNA-Datenbank der DSN zu erweitern. Derzeit werden neben den Schlachtdaten von Kühen, Fleischleistungsphänotypen von DSN-Slachtbullen von dem größten DSN-Betrieb Gräfendorf erhoben. Diese beinhalten die Schlachtgewichte und die Fleischigkeits- und Fettklassen der Schlachtkörper. Die Erfassung der Schlachtdaten erfolgt im Gegensatz von Milchleistungsphänotypen nicht routinemäßig. Hierfür werden die Abrechnungsdaten aus den Schlachtbetrieben verwendet. Die Daten müssen manuell erarbeitet und in eine Datenbank eingetragen werden. Insgesamt 384 DSN-Slachtbullen sollen phänotypisiert und mit dem DSN-spezifischen SNP-Chip genotypisiert werden, die Genotyp-Daten sollen dann auf Sequenzniveau imputiert werden.

Arbeitsaufgabe 12 - Genomweite Assoziationsanalysen: Mit den Fleischleistungsphänotypen der DSN-Bullen und DSN-Kühe sollen GWAS durchgeführt werden. Während alle Bullen genotypisiert werden müssen, liegen für die Kühe die Genotypen bereits vor. Wir erwarten, dass in der GWAS eine Effektgröße von 4% mit einer statistischen Sicherheit von 90% bei einer Stichprobengröße von 350 Tieren nachweisbar ist. Die identifizierten Marker sollen auf mögliche negativ Korrelationen zwischen Milchleistung und Fleischleistung untersucht werden, um eine optimale Marker-gestützte Züchtung auf den Doppelnutzungscharakter der DSN zu gewährleisten. Insbesondere soll nach Haplotypen gesucht werden, in denen Marker für Milchleistung und Fleischleistung genetisch gekoppelt vererbt werden.

Arbeitsaufgabe 13 - Wissenstransfer/ Praxisseminare: Hierbei handelt es sich um die Fortführung von Arbeitsaufgabe 10 aus Tabelle 2. Mit den jährlichen Projekttreffen können die Ergebnisse anschaulich an den Zuchtverband und die DSN-Züchter vermittelt werden. Zudem kann ein wissenschaftlicher Diskurs auf Konferenzen die Sichtbarkeit des Projekts erhöhen und das Projekt weiter voranbringen. Letztendlich, soll ein Konzept für die optimale Erhaltung der Zweinutzungsrasse DSN basierend auf den Ergebnissen aus den GWAS mit Milch- und Fleischleistungsphänotypen erstellt werden. Wünschenswert ist die Erweiterung der Datenlage so, dass in Zukunft auch für die kleine Rasse DSN eine sichere genomische Zuchtwertschätzung möglich wird. Anhand der Genotypen junger DSN-Tiere könnten dann Vorhersagen über die Leistung und den Typ eines Tieres gemacht werden. Dies kann den Betrieben in der Entscheidung zur Auswahl optimaler Besamungsbullen und zum Ausschluss von besonders nachteiligen Kühen für Anpaarungen helfen. Dafür speziell wurde ein Folgeantrag bei der BLE im Bundesprogramm zur Förderung der Nutztierhaltung eingereicht und als förderwürdig eingestuft. Aufgrund von Budget-Kürzungen kann das Projekt zur Zeit nicht umgesetzt werden.

1.2.3 Erweiterung der Ziele um Long-Read Sequenzierungsdaten

Zusätzlich hatten wir im Aufstockungsantrag vom 8.11.2022 unser Vorhaben zur Long-Read-Sequenzierung erläutert. Mit den vollständigeren Genomdaten aus der Long-Read Sequenzierung möchten wir die Qualität der Gesamtgenominformation der DSN substantiell verbessern. Insbesondere sollen über die neue Technologie der Sequenzierung Lücken in der genomischen Sequenz geschlossen und DNA-Strukturvarianten als weitere funktionell bedeutsame genetische Marker gefunden werden. Das Ziel besteht darin, weitere, bisher unbekannte funktionelle Marker zur phänotypischen Verbesserung der kleinen Population und zur Kontrolle der Diversität zu identifizieren. Die vorliegenden Gesamtgenomdaten basierten bis zur Long-Read-Sequenzierung auf kurzen 150 Basenpaar langen sequenzierten DNA-Ketten. Hiermit konnten sehr gut SNPs (Einzelbasenmutationen) gefunden werden, die auch für einen DSN-spezifischen SNP-Chip verwendet wurden, der zur Genotypisierung eingesetzt wurde. Andere Arten von Mutationen wie strukturelle DNA-Varianten (lange Deletionen und Insertionen, Inversionen, Duplikationen, Transversionen) konnten mit den kurzen DNA-Stücken nahezu nicht gefunden werden.

In der Long-Read Sequenzierung werden lange DNA-Ketten von über 10.000 Basenpaaren in einem Stück lückenlos gelesen. Dadurch gelingt die Identifizierung von drastischen strukturellen Varianten (SVs) wie langen Deletionen, Insertionen, Inversionen, Duplikationen und Transversionen, die mit kurzen DNA-Fragmenten einfach nicht erkennbar sind.

Durch die zunehmende Anwendung der Long-Read Sequenzierung in führenden Gruppen weltweit konnte inzwischen mehrfach gezeigt werden, dass solche drastischen strukturellen DNA-Varianten die Ursache für Merkmalsunterschiede sind. Durch die Aufklärung von strukturellen Sequenzvarianten in DSN wollen wir ebenfalls die Voraussetzungen schaffen, die ursächlichen Mutationen (SNPs und SVs)

für Merkmale zu finden, für die wir bereits genetische Assoziationen zwischen Genotyp und Merkmal gezeigt haben (z.B. Milchmenge und -zusammensetzung, Mastitis, Endoparasiten, Fruchtbarkeit). Damit kann eine direkte Selektion auf ursächliche Mutationen erfolgen, was die genomische Selektionsgenauigkeit erhöht, was besonders für kleine Populationen signifikant ist. Das ist für DSN selbst von Nutzen, aber auch für die Rasse Holstein, zu der DSN beigetragen hat.

1.3 Planung und Ablauf des Projekts

Das Projekt begann am 1.08.2016 mit einer viermonatigen Verzögerung aufgrund späterer Personaleinstellung. Zusätzliche Verzögerungen traten aufgrund von Einschränkungen während der Corona-Pandemie auf. Trotz dieser Herausforderungen wurden mit jeder Verlängerung des Zeitraums zusätzliche Arbeitsaufgaben erfolgreich abgeschlossen. Bis zum Abschluss des Projekts am 31.12.2023 konnten alle Verzögerungen ausgeglichen und sämtliche Projektziele und Arbeitsaufgaben erfolgreich erfüllt werden.

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Die Zuchtgeschichte der DSN geht auf das 16. Jahrhundert zurück. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde ein milchbetontes Zweinutzungs- und Milchleistungsrind angestrebt. Europäische Auswanderer nahmen Schwarzbunte Rinder in die USA mit und entwickelten dort „Holstein-Friesian“ (HF) als eine eigenständige Rasse. Aufgrund der hohen Milchleistung wurden HF-Rinder Mitte der 1960er Jahre wieder zurück nach Mitteleuropa importiert, wo sie massiv in die alten Schwarzbunten (das alte DSN-Rind) eingekreuzt wurden, wodurch sie diese bis auf eine kleine Restpopulation weitgehend verdrängten (Kräußlich and Claus, 1981; Sambras, 2011). Heute stehen die meisten reinrassigen DSN-Rinder in Brandenburg. Der Bestand ist gefährdet, da sich die DSN bei geringerem Milchleistungspotenzial mit den DH messen müssen. Höchst problematisch erweist sich die Tatsache, dass sich die Produktion mit DSN-Tieren derzeit nur rentiert, weil hierfür durch das Land Brandenburg staatliche Fördermittel bereitgestellt werden. Bei Wegfall oder Kürzung dieser Mittel ist zu befürchten, dass die Tierzahl weiter sinkt.

Die vom RBB koordinierte Zucht erfolgt mit dem Ziel, eine Genreserve mit lebenden Tieren zu sichern, die Inzucht stark zu begrenzen und die Population mit modernen Zuchtwertschätzverfahren weiter zu entwickeln. Bei den DSN wird eine gute Milchleistung in allen Haltungsformen sowie eine gute Schlachtkörperqualität männlicher und weiblicher Tiere angestrebt. Die Kühe haben ein genetisches Leistungspotential von 7.000 bis über 8.000 kg Milch bei 4,30% Fett und 3,70% Eiweiß. Die Milchleistung soll zu $\frac{3}{4}$ aus Grundfutter realisiert werden. Die Kühe erreichen ein Lebendgewicht von ca. 650 kg Lebendmasse bei einer Größe (Kreuzbeinhöhe) von 138 cm. Für Bullen ist ein Lebendgewicht von 1.100 kg bei einer Größe von 150 cm angestrebt. Die Mastbullen sollen tägliche Zunahmen von 1.000 – 1.300 g pro Tag erzielen (RBB, 2023).

Die Rasse gilt als einer der genealogischen Vorfahren aller heutigen Schwarzbunten Milchrinder. Die Zuchtarbeit hat das Ziel, die vorhandenen Gene (Rinder, Spermata und Embryonen) dieser Rasse im Sinne einer Genreservehaltung zu sichern und die Inzucht zu begrenzen. Eine Zufuhr von Genen aus anderen Populationen derselben Rasse ist möglich. Für die Rassebezeichnung DSN mit dem Rassecode 10 werden maximal 10% Holstein-Gene toleriert.

Bisher waren keine genomweiten Informationen über DSN verfügbar, mit denen zielgerichtete Analysen zur Identifizierung von züchterisch anwendbaren DSN-typischen Markern durchgeführt werden konnten. Um dies zu ermöglichen wurden im Rahmen dieses Projekts erstmals DSN-Rinder genotypisiert und sequenziert sowie genomweite Assoziationsanalysen durchgeführt.

3 Materialien und Methoden

Zu Beginn wurden 25 DSN-Tiere gesamtgenomisch sequenziert, was das "initiale genomische Grundrepertoire" der Rasse dokumentiert und als Basis für weitere Forschungsarbeiten diente. Diese erste Sequenzierung ermöglichte, grundlegende Fragen zur Genealogie, zur genomischen Charakterisierung und zur Identifikation von rassespezifischen Markern zu klären. Im weiteren Verlauf des Projekts wurden insgesamt 304 DSN-Tiere sequenziert und mehr als 4.000 DSN-Tiere mit verschiedenen SNP-Chips genotypisiert. Die hinzugefügten Sequenz- und SNP-Chip-Daten aus diesem und anderen Projekten wurden für genomweite Assoziationsanalysen und funktionelle Annotationen genutzt. Diese Arbeiten legten nicht nur die Grundlagen für direkt verwertbare Ergebnisse, sondern schufen auch eine solide Basis für eine belastbarere Lernstichprobe in der Zukunft. Aufgrund des Umfangs der Materialien und Methoden werden diese in den jeweiligen Abschnitten der Ergebnisse im Detail erklärt.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.1 Aufbau der Gewebe-, Phänotypen- und Genotypen-Datenbanken

4.1.1 Gewebeprobe und DNA

Zu Beginn des Projekts im Jahr 2016 wurden 2.028 Ohrstanzproben von nahezu der gesamten damals existierenden DSN-Population gesammelt. Danach haben wir im Laufe des Projekts jährlich durchschnittlich 578 Proben erhalten (Tabelle 4). Zum Projektabschluss am 31.12.2023 umfasste unsere Sammlung 6.075 Proben, die aus neun Zuchtbetrieben in Brandenburg und Hessen stammen (Abbildung 1). Die meisten Proben stammen aus dem größten DSN-Betrieb in Brandenburg, der Agrargenossenschaft Gräfendorf eG.

Tabelle 4: Übersicht der gesammelten Proben während des Projektzeitraums 2016-2023.

Jahr	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Proben pro Jahr	2.028	260	361	276	718	646	707	1.079
Proben gesamt	2.028	2.288	2.649	2.925	3.643	4.289	4.996	6.075

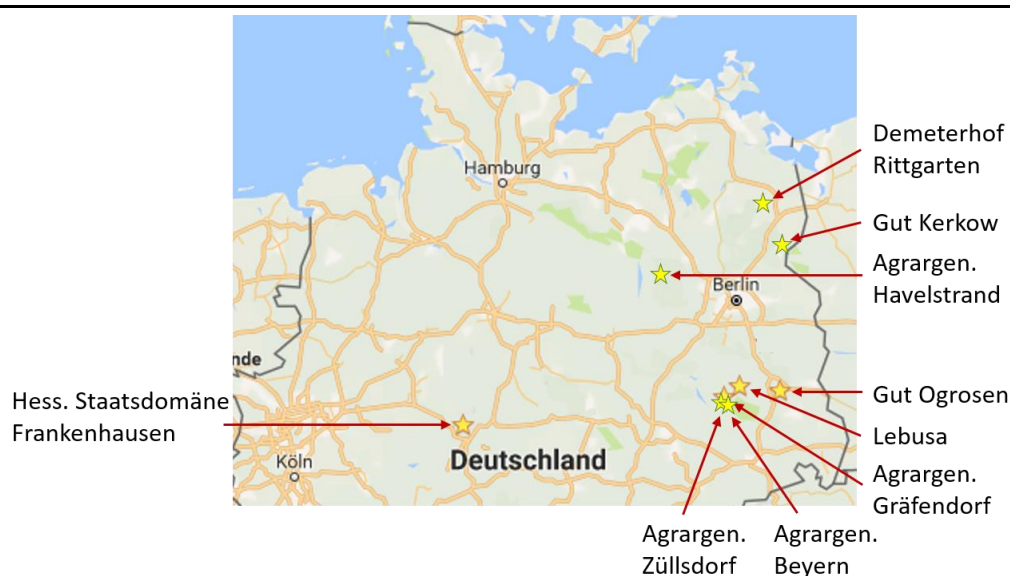


Abbildung 1: Übersicht der Agrarbetriebe, von denen DSN-Proben gesammelt wurden.

Die gesammelten Proben stammen hauptsächlich von DSN-Kühen. Es wurden aber auch Proben von männlichen Kälbern, Schlachtbullen und Zuchtbullen und einige Proben von Totgeburten gesammelt. Die Proben wurden als Ohrstanzproben genommen, die direkt beim Einziehen der Ohrmarken entnommen wurden. Diese Methode erzeugt keinen zusätzlichen Stress, ist effizient und ermöglicht eine einfache Zuordnung der Probe zum entsprechenden Tier. Neben Ohrstanzproben haben wir für einige Tiere (Zucht-Bullen) auch Sperma-, Haar- und Blutproben verwendet.

Die DNA aus allen gesammelten Proben wurde in hoher Qualität isoliert. Dies ist ein entscheidender Faktor für die Generierung präziser und aussagekräftiger Daten, die eine hohe Zuverlässigkeit unserer genetischen Analysen ermöglichte. Rückstellproben der Gewebe- und DNA-Proben werden am Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere e.V. (IfN) in Schönow und an der HU Berlin gelagert.

Für die Long-Read Sequenzierung haben wir aus dem Pedigree 10 Schlüssel-Tiere im Pedigree herausgesucht, die repräsentativ für die Population sind und von denen 3 Tiere zu einem Trio gehören (Vater, Mutter Kind). Die extrem reine und hochmolekulare DNA wurde aus Sperma- und Blutproben gewonnen, wobei sich Blut als geeignetstes Material erwies. Die Anforderungen an die DNA-Qualitätsparameter (molekulare Größe, Reinheit, Menge) für die Long-Read Sequenzierung sind extrem hoch. Für die Gewinnung der entsprechenden DNA aus bovinem Material musste zunächst ein Protokoll etabliert werden. Ein Standardprotokoll gab es auch international nicht. Die Prozedur war molekularbiologisch höchst aufwendig und bedurfte wiederholter Tests. Wegen unzureichender Qualität der zur Sequenzierung eingesandten DNA, mussten diese wiederholt präpariert werden. Das von uns letztendlich erfolgreich etablierte Protokoll haben wir anderen Gruppen zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Genotypen

Insgesamt wurden Genotypen von allen 6.075 DSN-Tieren während des Projektzeitraums generiert (Tabelle 5). Die Genotypen stammen aus der Gesamtgenomsequenzierung, vom Illumina BovineHD BeadChip, Thermo Fisher Scientific DSN200K-Chip, Illumina BovineSNP50 BeadChip, Eurogenomics EuroG MD Chip und aus der Long-Read Sequenzierung. Die Genotypen von insgesamt 4.634 DSN-Tieren wurden innerhalb dieses Projekts finanziert. Weitere Genotypen stammen aus der Kooperation mit der Justus-Liebig-Universität Gießen oder aus einem anderen DSN-Projekt zur Erzeugung eines DSN-spezifischen SNP-Chips. Ausführliche Informationen zur Verwendung der Genotypen werden nachfolgend erklärt.

Tabelle 5: Anzahl der DSN-Genotypen je verwendeter Sequenzierungs- oder Genotypisierungstechnik. Zum Teil stammen Genotypisierungen aus Kooperationen. Mit den Long-Read Sequenzdaten konnten 44.337 strukturelle Varianten (SVs) identifiziert werden.

Technik	Anzahl SNPs/SVs	Anzahl DSN gesamt	Anzahl DSN aus diesem Projekt
Sequenzierung des gesamten Genoms	~21 Mio.	304	100
Illumina BovineHD BeadChip	~777.000	47	0
Thermo Fisher Scientific DSN200K-Chip	~182.000	1.500	432
Illumina BovineSNP50 BeadChip	~54.000	1.850	1.728
Eurogenomics EuroG MD Chip	~62.000	2.364	2.364
Long-Read Sequenzierung	~21 Mio. SNPs/ 44.337 SV	10	10
	Gesamt	6.075	4.634

Für die Gesamtgenomsequenzierung wurden repräsentative Tiere aus der DSN-Population ausgewählt, darunter alle mit Spermaproben verfügbaren DSN-Zuchtbullen und wichtige DSN-Kühe, die maßgeblich zur Population beigetragen haben. Die ausgewählten Tiere kamen aus unterschiedlichen Abstammungen und stammten aus unterschiedlichen Betrieben. Die Identifizierung der Sequenzvarianten (SNPs und INDELS) erfolgte basierend auf der Pipeline des 1.000-Bullengenom-Projekts (Abbildung 2). Die Gesamtgenomsequenzdaten wurden benutzt, um Sequenzvarianten in den DSN funktionell zu annotieren. Des Weiteren dienen die Gesamtgenomsequenzdaten zur Imputation von Gesamtgenom-Sequenzvarianten in die Genotypen geringer Dichte, die mit den SNP-Chips erhalten wurden. Detaillierte Informationen zur funktionellen Annotation und zur Imputation werden in den entsprechenden Abschnitten erläutert.

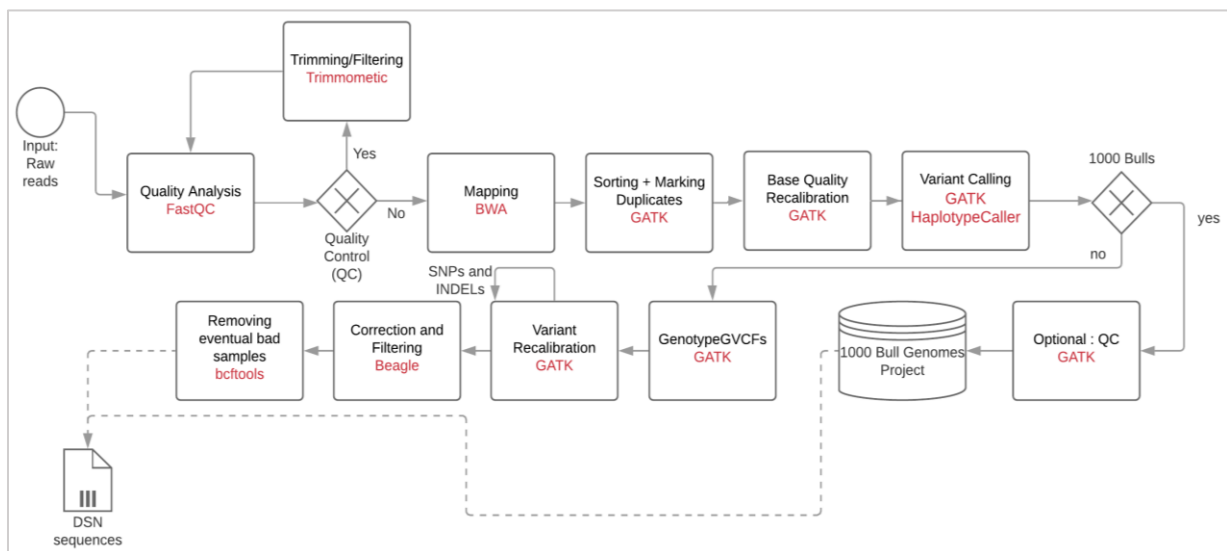


Abbildung 2: Überblick der erarbeiteten Pipeline zur Prozessierung der Rohsequenzdaten.

Die Gesamtgenomsequenzdaten von insgesamt 56 DSN-Tieren wurden an das 1.000-Bullengenom-Projekt weitergegeben, um Zugriff auf die Sequenzvarianten von über 5.000 Rindern aus über 50 verschiedenen Rinderrassen zu erhalten, darunter auch Holstein. Diese Daten aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt wurden für die Studie zur besten Imputationsstrategie, zu vergleichenden Analysen zwischen DSN und anderen Rassen und für das Design des DSN200K-Chips verwendet.

Bei dem Thermo Fisher Scientific DSN200K-Chip handelt es sich um einen DSN-spezifischen SNP-Chip, der im Jahr 2020 basierend auf einem Kooperationsprojekt zwischen der Humboldt-Universität (HU) zu Berlin und der Justus-Liebig-Universität Gießen entwickelt wurde. Grundlage waren Genotypen aus Gesamtgenomsequenzdaten von 304 DSN-Tieren, die repräsentativ für die DSN-Population sind. Der DSN200K-Chip beinhaltet insgesamt 182,154 hoch-informative Sequenzvarianten, darunter DSN-spezifische SNPs aus genomweiten Assoziationsstudien in DSN (mit z.B. Milchleistungsmerkmalen), SNPs, die nur in DSN und nicht in anderen Rinderrassen vorkommen und hoch-informative SNPs, die in DSN signifikant Proteine verändern. Zusätzliche wurde sichergestellt, dass die ausgewählten SNPs das Rindergenom uniform abdecken und der DSN200K-Chip mit den vorhandenen Illumina BovineSNP50 BeadChip Genotypisierungen vereinbar ist.

Die Ergebnisse zu dem Kooperationsprojekt wurden wie folgt veröffentlicht:

- Neumann, G. B., Korcuć, P., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., Reißmann, M., ... & Brockmann, G. A. (2021). Design and performance of a bovine 200 k SNP chip developed for endangered German Black Pied cattle (DSN). *BMC genomics*, 22(1), 905.

- Korkuć, P., Neumann, G. B., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2022, December). Improved genome-wide associations using a breed-specific 200K SNP chip for German Black Pied (DSN) cattle. In Proceedings of 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP) Technical and species orientated innovations in animal breeding, and contribution of genetics to solving societal challenges (pp. 1567-1570). Wageningen Academic Publishers.

In den ersten Jahren des DSN-Projekts wurde hauptsächlich mit dem Illumina BovineSNP50 BeadChip genotypisiert, da dieser Chip eine gängige und kostengünstige Option darstellte und mit Genotypen aus anderen Ressourcen kompatibel war. Im Jahr 2022 haben wir angefangen, DSN-Tiere mit dem Eurogenomics EuroG MD zu genotypisieren. Der Eurogenomics EuroG MD beinhaltet geringfügig mehr SNPs (~62K SNPs) als der Illumina BovineSNP50 BeadChip (~54K SNPs), ist kostengünstiger und wird vor allem routinemäßig vom zentralen Informationsdienstleister für Tierhaltung und Tierzucht „Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V.“ (vit) benutzt. In Rücksprache mit allen Beteiligten (Betriebe, RBB, vit) wurde dieser Chip gegenüber dem Illumina BovineSNP50 BeadChip bevorzugt, da die bestehende Pipeline umfangreich und routinemäßig bei Holsteins genutzt wird. Die Zuchtbetriebe können dadurch schneller auf die Genotypen zugreifen und die Abstammung kann dementsprechend schneller nachverfolgt und gegebenenfalls korrigiert werden.

Die Long-Read-Sequenzierungsdaten wurden benutzt, um strukturelle Varianten (SVs) in DSN zu identifizieren.

Diese Diversität in den Analysemethoden zur Charakterisierung des Gesamtgenoms bereichert unsere Forschung und ermöglicht es uns, ein breites Spektrum an genetischen Informationen von DSN zu erfassen.

Während des Projektzeitraums wurde das Rindergenom auf eine neue Version aktualisiert. Die bisherige Version UMD3.1, die über 7 Jahre benutzt wurde, wurde im Jahr 2018 von der Version ARS_UCD1.2 abgelöst. Dadurch mussten alle bis dato gesammelten Genotyp-Daten auf an das neue *Bos taurus* Referenzgenom angepasst und die bisher generierten Pipelines überarbeitet werden. Alle Angaben zu genomischen Positionen in diesem Bericht beziehen sich auf das Referenzgenom ARS_UCD1.2.

4.1.3 Phänotypen

Abstammungsdaten und Phänotypdaten zu Milchleistung und anderen Phänotypen wie Exterieur und Gesundheit wurden während des Projektzeitraums mehrfach vom vit und RBB zur Verfügung gestellt, zuletzt in 2022. Die Phänotypen der Milchleistung sind als 305-Tage Leistung für die 1. bis 3. Laktation (LA) gegeben. Darunter die Merkmale Milchmenge in Kilogramm, Eiweißmenge in Kilogramm, Eiweißgehalt in Prozent, Fettmenge in Kilogramm und Fettgehalt in Prozent und waren für alle laktierenden DSN-Kühe verfügbar.

Da es sich bei DSN um eine Zweinutzungsrasse handelt, hat sich das DSN-Projekt im Zeitraum 2022 - 2023 auf die Fleischleistung konzentriert. Zum einen standen dafür bereits in den Jahren 2020 - 2021 für andere Projekte gesammelte Schlachtdaten zur Verfügung. Durch direkte Kontakte zu einem Schlachthof und einem Händler über die Agrargenossenschaft Gräfendorf konnten wir die Schlachtdaten direkt von den Schlachthöfen beziehen, wodurch ein personeller Mehraufwand für den Betrieb für die Bereitstellung der Daten umgangen werden konnte.

Die Daten aus dem Schlachthof beinhalten die ID des Tieres, das Schlachtkörpergewicht, die Fettklasse und Fettunterklasse, die Fleischigkeitsklasse und die Fleischigkeitsunterklasse. Diese Informationen mussten manuell aus PDF-Dokumenten extrahiert werden. Insgesamt wurden die Schlachtdaten von

2.978 DSN-Tieren gesammelt. Viele davon sind Kühe, deren Schlachtleistungen zwar vorhanden sind, aber der Analyse wenig dienen, da Kühe nicht wie Schlachtbullen bei Erreichung eines gewissen Gewichts oder Schlachalters vom Betrieb abgehen. Stattdessen können die Abgangsgründe für Kühe divers sein und das Schlachtkörpergewicht und auch die Fett- und Fleischigkeitsklasse auf unkontrollierbare Art beeinflussen. Wegen der damit verbundenen Ungenauigkeit wurden Assoziationsanalysen mit Schlachtdaten von Kühen bislang nicht durchgeführt. Bei der Analyse der Schlachtdaten von Schlachtbullen ist wiederum das Vorhandensein von Probenmaterial für die Genotypisierung nicht gegeben, sofern nicht extra beprobt wurde oder zufällig Proben von männlichen Kälbern vorhanden waren.

Des Weiteren konnten wir auf einzelne Wiegungen von DSN-Slachtbullen zugreifen, die von der Agrargenossenschaft Gräfendorf routinemäßig nach der Geburt, im Alter von ca. 3 Wochen, 7 Monaten und 1,5 Jahren (kurz vor der Schlachtung) gemacht wurden. Insgesamt sind Wiege-Daten von 1.165 DSN-Tieren vorhanden.

4.2 Imputation der SNP-Chip Genotypen auf die Gesamtgenomsequenz

Durch die *in silico* Imputation der Genotypinformationen in einer Zielpopulation von einer geringen Dichte (z.B. Genotypen vom Illumina BovineSNP50 BeadChip mit ca. 54K SNPs) auf eine höhere Dichte (z.B. Gesamtsequenzdaten mit ca. 20 Mio. SNPs) können wir schnell und kostengünstig die Anzahl der Tiere mit hoher SNP-Dichte für nachfolgende GWAS erhöhen. Damit die imputierten Genotypen richtig sind, wird eine hohe Imputationsgenauigkeit gebraucht. Da bisher publizierte Imputationsstrategien (Brøndum et al., 2014; Kreiner-Møller et al., 2015; Pausch et al., 2017; Sargolzaei et al., 2014; van Binsbergen et al., 2015; VanRaden et al., 2013; Wang and Chatterjee, 2017) nicht uneingeschränkt für unsere kleine DSN-Population nutzbar waren, haben wir umfangreiche Analysen durchgeführt, um die optimale Imputationsstrategie für unsere DSN-Population zu finden.

Zu dem Zeitpunkt der Studie in den Jahren 2017- 2018 waren insgesamt 2.145 sequenzierte Rinder aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt verfügbar, darunter unsere 30 sequenzierten DSN-Tiere und insgesamt 541 Tiere der Rasse HF. Für die Bestimmung der Imputationsgenauigkeit wurden die Genotypen der 30 DSN auf die Genompositionen des Illumina BovineSNP50 BeadChips SNP-Chips herunter gerechnet, um sie dann wieder auf Gesamtgenomsequenzlevel zu imputieren. Folgende Ergebnisse bezüglich der Imputationsgenauigkeit wurden beobachtet:

- Das Phasing der Genotypen in der Ziel- und Referenzpopulation: Es bestehen Unterschiede in der Imputationsgenauigkeit in Abhängigkeit vom Phasing. Diese waren jedoch nur gering und abhängig von der verwendeten Software. Die höchste Imputationsgenauigkeit wurde erreicht, wenn die Ziel- und Referenzpopulation mit der Software Beagle „gephased“ wurden.
- Software zur Imputation: Die Softwaretools Beagle 4.1 und Minimac 3 wurden verglichen. Eine höhere Imputationsgenauigkeit wurde mit Beagle erreicht. Beagle war zudem 24-mal schneller bei der Imputation eines Tieres mit der Referenzpopulation bestehend aus allen Tieren des 1.000-Bullengenom-Projekts.
- 1-Schritt-Imputation im Vergleich zur 2-Schritt-Imputation: In der 1-Schritt-Imputation werden die Genotypen von 50k direkt auf Sequenzlevel imputiert. Bei der 2-Schritt-Imputation wird zuerst von 50K nach 700K imputiert, danach von 700K auf Sequenzlevel (Abbildung 3). Wir haben gezeigt, dass die 2-Schritt-Imputation nur sinnvoll ist, wenn eine hohe Anzahl von Tieren für den 1. Imputationsschritt und eine geringere Anzahl von Tieren für den 2. Imputationsschritt vorhanden ist. Wenn nur eine geringe Anzahl von Tieren für die Referenzpopulation im 1.Schritt vorhanden

ist, dann ist der Imputationsfehler hoch und die Fehler aus dem 1. Imputationsschritt werden in den 2. Imputationsschritt übertragen, so dass sich der Fehler akkumuliert.

- Größe und Komposition der für die Imputation verwendeten Referenzpopulation: Zwei verschiedene Referenzpopulationen (reference panel) wurden benutzt: Die eine Referenzpopulation beinhaltet nur die 30 sequenzierten DSN-Tiere („30 DSN“), die zweite beinhaltet alle verfügbaren Rinder aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt („1000 bulls“). Die Genauigkeit ist höher, wenn DSN-Tiere mit einer großen Referenzpopulation imputiert werden, auch wenn diese aus vielen verschiedenen Rinderrassen besteht, im Vergleich zu einer kleinen Referenzpopulation, auch wenn diese nur aus der Zielrasse besteht. Folglich sind sowohl Größe als auch Komposition der Referenzpopulation entscheidend für eine hohe Imputationsgenauigkeit.

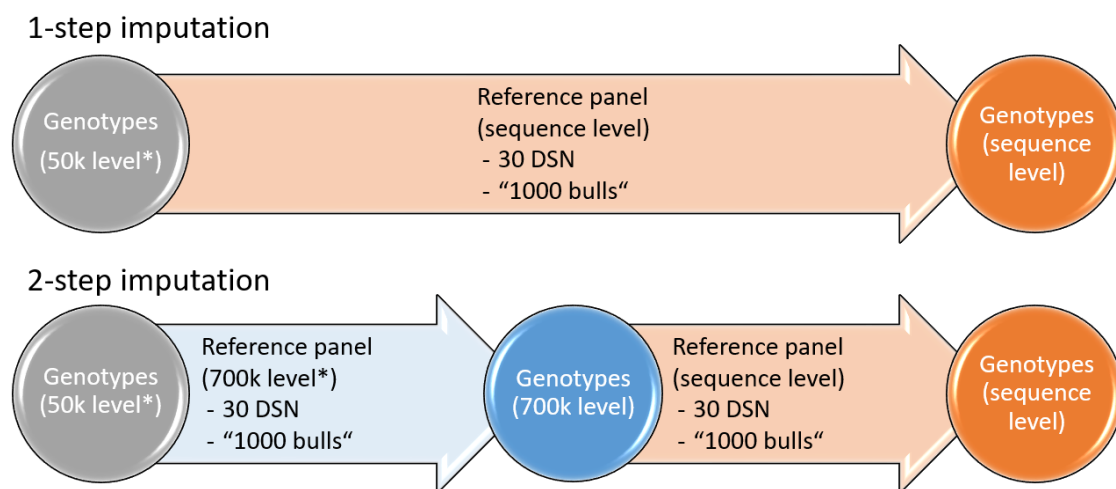


Abbildung 3: 1- und 2-Schritt-Imputation. Zwei verschiedene Referenzpopulationen (reference panel) wurden benutzt: Die eine Referenzpopulation beinhaltet nur die 30 sequenzierten DSN („30 DSN“), die zweite beinhaltet alle verfügbaren Rinder aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt („1000 bulls“). Auf 50K oder 700K herunterskalierte Genotypen sind mit einem Sternchen („*“) versehen. Gleiche Farben deuten auf Genotypen mit 50K- (grau), 700K- (blau) oder Sequenzlevel (orange).

Mit Hilfe dieser Studie konnten wir entscheiden, wie wir die Imputierung optimal durchführen. Vor der Imputation müssen die Genotypen „gephased“ werden. Für die Imputation wurde die Software Beagle benutzt, die auch die vorgeschlagene Software des 1.000-Bullengenom-Projekt-Consortiums ist. Da zu Beginn der Studie nur 30 sequenzierte DSN vorlagen und kaum Genotypen mittlerer SNP-Dichte, haben wir folglich keine Imputation in zwei Schritten, sondern nur in einem Schritt durchgeführt. Ab Projektmitte standen die Sequenzdaten von 304 DSN-Tieren und ca. 1.500 Genotypen vom DSN200K-Chip zur Verfügung, so dass eine Imputation in zwei Schritten von 50K-Daten auf 200K und nachfolgend auf Gesamtgenomsequenz durchgeführt werden konnte.

Die Ergebnisse aus dieser Studie wurden wie folgt veröffentlicht:

- Korcuć, P., Arends, D., Scheper, C., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2018). 1-step versus 2-step imputation: a case study in German Black Pied cattle. Proc. 11th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Auckland, New Zealand, 11-16.
- Korcuć, P., Arends, D., & Brockmann, G. A. (2019). Finding the optimal imputation strategy for small cattle populations. Frontiers in genetics, 10, 52.

4.3 Genomweite Assoziationsstudien

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) bei DSN können bedeutende Einblicke in die genetischen Grundlagen von wichtigen Merkmalen wie Milchproduktion, Fleischqualität und Krankheitsresistenz erbringen. Durch die Analyse der Assoziation von Merkmal und SNPs über das gesamte Genom können bei DSN-Rindern spezifische genetische Variationen identifiziert werden, die mit diesen Merkmalen korrelieren. Solche Erkenntnisse liefern neue Perspektiven für die Zucht von DSN-Rindern und können zur Entwicklung von genetischen Tests beitragen, die eine gezieltere und effizientere Zuchtauswahl ermöglichen. Dies kann wiederum die Produktivität und Nachhaltigkeit der Produktion von DSN-Rindern maßgeblich fördern.

4.3.1 Milchleistung

Während des Projektzeitraum wurden wiederholt GWAS mit Milchleistungsmerkmalen aus der 305-Tage-Leistung durchgeführt (Tabelle 6). Für die GWAS aus den Berichtsjahren 2017-2018 waren Genotypen von zu wenigen DSN-Kühen verfügbar, so dass die Ergebnisse aus der GWAS suggestiv und die geschätzten Alleleffekte sehr unsicher waren. Die Ergebnisse dazu werden daher hier nicht gezeigt. Bevor Empfehlungen gegeben werden konnten, war es daher erforderlich, die statistische Sicherheit der identifizierten genomischen Regionen zu verbessern und an einer größeren Stichprobe zu verifizieren. Durch die weitere Genotypisierung aller DSN-Kühe in 2019, von denen auch Milchleistungsdaten vorlagen, konnte die statistischen Power erhöht werden und bisher suggestive SNPs wurden signifikant und die Alleleffekte genauer geschätzt. Für Phänotypen, die bisher noch nicht signifikant mit SNPs assoziiert waren, konnten signifikante Marker identifiziert werden. Zudem wurden weitere DSN-Tiere sequenziert oder mit dem DSN200K-Chip genotypisiert und die Imputation auf das Gesamtgenomsequenzierungsniveau durchgeführt. Dies ermöglichte es die Regionen, die die Milchleistung beeinflussen, genauer zu charakterisieren und potenzielle Kandidatengene aufzuzeigen. Die GWAS wurden nur mit DSN-Kühen durchgeführt, die Milchleistungsdaten für die ersten drei Laktationen hatten, und nicht mit allen DSN-Tieren, die bisher genotypisiert wurden. Demzufolge wurden männliche Tiere und jüngere Kühe ohne Laktationsdaten nicht einbezogen. Eine weitere Filterung der Kühe erfolgte aus statistischen Gründen. Die Milchleistungsdaten werden in den Assoziationsmodellen mit diversen Kofaktoren korrigiert, um Effekte rauszurechnen, die z.B. auf den Betrieb, die Abstammung oder das Geburtsjahr zurückzuführen sind. Hierbei ist es wichtig, dass die Tieranzahl pro Kofaktor eine minimale Größe hat, damit es nicht zu Verzerrungen der Effekte in den statistischen Modellen kommt. Daher haben wir nur Kühe aus Betrieben mit mindestens 20 Kühen, von Vätern mit mindestens 20 Nachkommen und aus Geburtsjahren mit mindestens 20 Kühen für die GWAS verwendet.

Tabelle 6: Übersicht der durchgeführten GWAS zu Milchleistungsmerkmalen.

Jahr	Anzahl DSN	Genotypen	Ergebnisse/Publication
2017	449	Illumina BovineSNP50	Suggestive Ergebnisse, nicht publiziert
2018	657	Illumina BovineSNP50	Suggestive Ergebnisse, nicht publiziert
2020	1.490	Illumina BovineSNP50	Signifikante Ergebnisse, publiziert als Korkuč et al. (2021). Genomic loci affecting milk production in German Black Pied cattle (DSN). <i>Frontiers in Genetics</i> , 12, 640039.
2021	2.099	DSN200K-Chip	Signifikante Ergebnisse, nicht publiziert
2022	2.160	Gesamtgenomsequenz	Signifikante Ergebnisse, publiziert als Korkuč et al. (2023). Whole-Genome Sequencing Data Reveal New Loci Affecting Milk Production in German Black Pied Cattle (DSN). <i>Genes</i> , 14(3), 581.

4.3.1.1 GWAS mit 1.490 DSN-Kühen

Unter Verwendung der Genotypen vom Illumina BovineSNP50 BeadChip wurde eine genomweite Assoziationsstudie mit Milchleistungsdaten von 1.490 DSN-Kühen durchgeführt. Die für die Analysen benutzten DSN-Kühe stammen aus fünf Betrieben in Brandenburg. Als Milchphänotypen wurden untersucht: Milch kg, Fett kg, Protein kg, Fett % und Protein % in der 1.-3. Laktation, das Laktationsmittel der 1.-3. Laktation, Leistung bei unterschiedlichen Tagen in Laktation 1 (100-Tage, 200-Tage und 305-Tage). Die GWAS wurden mit einem linearen Model durchgeführt, das in der Programmiersprache R implementiert wurde.

Insgesamt wurden 41 signifikante (Tabelle 7) und 20 suggestive SNPs für Milchphänotypen identifiziert. Die signifikantesten Effekte für Milchmenge wurden auf den Chromosomen 1, 6, und 20 gefunden (Abbildung 4). Die Region auf Chromosom 6 liegt in der Nähe des Kasein-Clusters und der dazugehörige Haplotyp überlappt mit dem CSN3 Gen (Kappa-Kasein). Das Kasein-Cluster ist dafür bekannt, die Milchmenge und -zusammensetzung in anderen Rinderrassen wie z.B. Holstein zu beeinflussen. Assoziationen für Fett- und Proteinmenge wurden auch gefunden. Zusätzlich wurden 15 SNPs für Protein % identifiziert, die aber weniger zuverlässig sind, da die P-Werte eine hohe Inflation aufwiesen.

Tabelle 7: Assoziierte SNPs für Milchleistungsmerkmale. Jeder SNP ist mit der chromosomalen (Chr) Position (bp), der SNP-ID, dem Allel auf dem Vorwärtsstrang des Referenzgenoms (Ref), dem alternativen Allel (Alt), dem Minderheitenallel (MA) und der Frequenz des MA (MAF) aufgelistet. Des Weiteren sind das assoziierte Merkmal, die Anzahl der in der Analyse benutzten Kühe (n), der Substitutionseffekt des MA (β), der Standardfehler (SE) und der P-Wert nach Bonferroni-Korrektur (P_{BF}) gegeben. $P_{BF} < 0.05$ und $P_{BF} < 0.01$ wurden als signifikant oder hoch signifikant (dick gedruckt) betrachtet.

Chr	Position (bp)	SNP-ID	MA	MAF	Merkmal	n	β	SE(β)	P_{BF}
1	77.049.090	rs110516247	C	0,11	Milk kg (LA3)	846	-515	100	0,00679
					Protein kg (LA3)	844	-16,3	3,3	0,02351
					Milk kg (LA3)	856	-390	76	0,00020
	79.757.250	rs43246393	T	0,34	Protein kg (LA3)	854	-13,2	2,5	0,00007
					Protein kg (LAm)	679	-10,3	2,2	0,02641
					Fat kg (LA3)	857	-13,4	3,1	0,01868
	115.539.332	rs42347234	T	0,11	Milk kg (LA1)	1355	336	70	0,03846
					Protein kg (LA1)	1357	11,9	2,4	0,01140
	128.503.005	rs109686415	C	0,49	Fat % (LA2)	1115	-0,082	0,016	0,00357
					Fat % (LAm)	660	-0,082	0,016	0,01599
	143.812.919	rs41255272	A	0,50	Milk kg (LA1)	1367	204	41	0,01478
					Protein kg (LA1)	1369	6,6	1,4	0,04613
2	123.100.345	rs110278850	C	0,45	Protein kg (200d)	1436	3,5	0,8	0,04941
3	15.947.663	rs110565504	T	0,24	Fat % (200d)	1458	0,056	0,019	0,03398
4	47.674.986	rs110143001	G	0,42	Fat % (LA3)	844	0,086	0,019	0,04275
	91.071.208	rs42753220	C	0,40	Milk kg (LA1)	1370	213	44	0,01390
5	83.959.138	rs41660560	G	0,35	Protein kg (LA2)	1160	9,4	2,1	0,01767
					Milk kg (LA1)	1357	220	71	0,02814
	114.935.739	rs41652414	T	0,19	Milk kg (200d)	1452	141	46	0,00923
					Protein kg (LA1)	1359	7,2	2,4	0,04450
					Protein kg (200d)	1457	4,1	1,4	0,02288
6	62.988.117	rs42436495	G	0,30	Milk kg (LA1)	1370	225	49	0,01789
					Milk kg (200d)	1469	136	32	0,03921
	63.010.380	rs42436482	G	0,29	Milk kg (LA1)	1368	220	52	0,04884
					77.688.509	rs41652041	G	0,35	Milk kg (200d)
	80.530.130	rs110291935	T	0,41	Milk kg (LA1)	1370	-209	42	0,01362
					Milk kg (100d)	1474	-71	14	0,00519
	80.626.467	rs109872424	T	0,33	Milk kg (200d)	1469	-132	27	0,00655
					Milk kg (200d)	1468	-124	30	0,02416
86.112.142	rs109592101	A	0,42	Milk kg (LA1)	1372	-193	41	0,01990	
				Milk kg (100d)	1476	-78	14	0,00009	

					Milk kg (200d)	1471	-119	26	0,04162
	87.266.808	rs41591365	C	0,46	Protein kg (100d)	1473	2,1	0,4	0,03608
8	53.663.120	rs41793393	T	0,19	Milk kg (LA3)	847	-356	115	0,00508
					Milk kg (LAm)	673	-316	97	0,03554
	53.867.972	rs109542652	A	0,14	Milk kg (LA3)	846	-489	101	0,02538
	59.101.606	rs43550935	G	0,19	Protein kg (LAm)	685	-9,1	3,2	0,02661
9	10.638.013	rs133869947	A	0,38	Milk kg (LAm)	645	-270	60	0,04397
10	3.611.602	rs42697353	C	0,49	Fat % (200d)	1449	-0,061	0,013	0,03506
12	66.340.756	rs41629344	G	0,39	Fat % (200d)	1452	0,06	0,013	0,00380
16	30.668.830	rs43041491	G	0,11	Fat % (LA3)	835	0,153	0,031	0,02338
					Fat % (LA2)	1134	-0,061	0,015	0,02776
	40.391.486	rs41804404	G	0,46	Fat % (200d)	1446	0,058	0,012	0,04642
	46.773.225	rs43719805	C	0,47	Protein kg (100d)	1472	1,9	0,4	0,04084
18	53.596.284	rs109907036	T	0,37	Fat % (LA2)	1136	0,086	0,017	0,00477
20	50.879.180	rs41948928	T	0,10	Fat % (200d)	1445	-0,118	0,023	0,00777
					Milk kg (LA2)	1137	484	86	0,00040
	71.448.297	rs110353352	C	0,13	Protein kg (LA2)	1143	15	2,9	0,00503
					Fat kg (LA2)	1137	17,3	3,5	0,01434
24	16.789.760	rs110860585	T	0,41	Milk kg (LA3)	862	-348	72	0,01192
					Protein kg (LA1)	1355	-7	1,5	0,01207
	30.250.034	rs110476141	G	0,36	Protein kg (200d)	1453	-4,1	0,9	0,03475
					Fat kg (LA1)	1348	-8,5	1,7	0,02349
25	7.944.597	rs109583598	C	0,29	Fat % (200d)	1456	0,065	0,016	0,01082
					Fat kg (LA1)	1368	10,8	3,5	0,00392
	9.711.895	rs110469759	A	0,17	Fat kg (200d)	1467	5,7	2	0,02959
	1.1019.450	rs109027867	G	0,48	Milk kg (200d)	1445	-128	26	0,03396
29	50.217.955	rs109241029	A	0,44	Fat % (LA2)	1137	0,076	0,016	0,04229
					Fat % (LA2)	1118	-0,082	0,016	0,00338
	50.326.170	rs110740589	A	0,41	Fat % (LA2)	1113	-0,09	0,016	0,00022
X	12.896.716	rs109188619	T	0,18	Milk kg (LA3)	860	546	122	0,02488
					Protein kg (LA3)	851	-13,5	2,7	0,01321

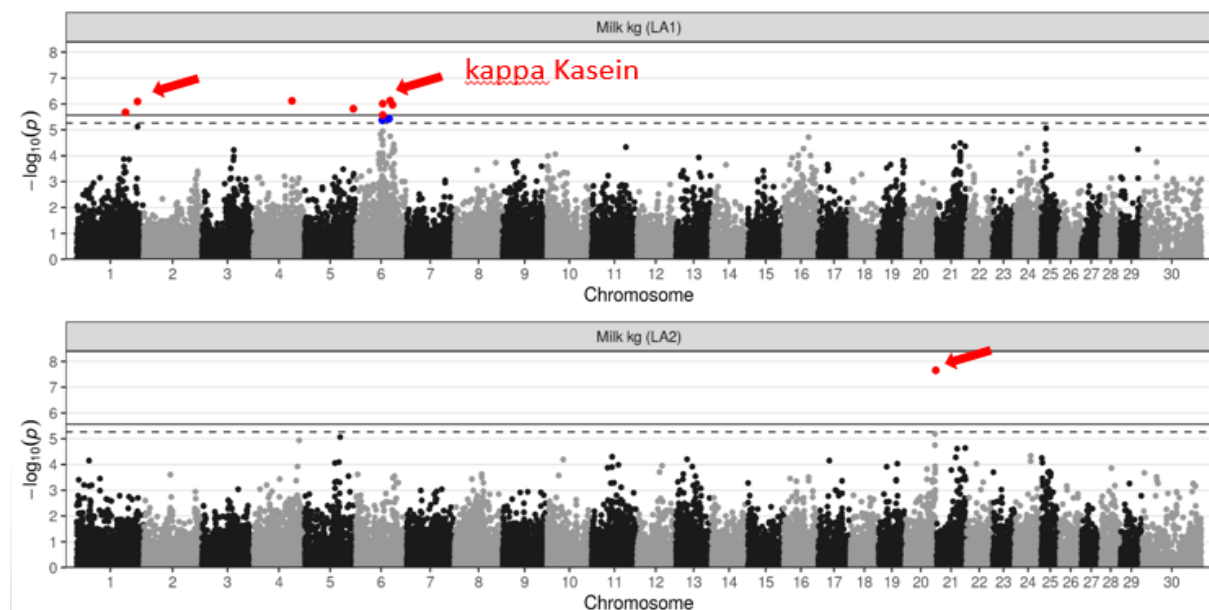


Abbildung 4: Manhattan-Plots für Milchmenge in kg in der 1. und 2. Laktation. Signifikante SNPs ($p_{BF} < 0.05$, durchgezogene Linie) sind rot und suggestive SNPs ($p_{BF} < 0.1$, gestrichelte Linie) sind blau gekennzeichnet. Die signifikantesten Regionen befinden sich auf den Chromosomen 1, 6, und 20, wobei sich die Region auf Chromosom 6 in nächster Nähe zum Gen CSN3 (Kappa-Casein) befindet, das dafür bekannt ist in vielen Rinderrassen die Milchmenge und -zusammensetzung zu beeinflussen.

Diese genomweite Assoziationsstudie zur Milchleistungsdaten mit 1.490 DSN-Kühen wurde mit imputierten Gesamtgenomsequenzdaten wiederholt (Ergebnisse nicht gezeigt). Insgesamt konnten so 2.093 weitere SNPs identifiziert werden. Diese SNPs stehen in hoher Kopplung zu den initial identifizierten SNPs und weisen daher nicht auf neue assoziierte Regionen. Allerdings können sie tatsächlich kausale Mutationen widerspiegeln, die nur auf Sequenzlevel zu finden sind und nicht auf dem Illumina BovineSNP50 BeadChip abgebildet werden. Die 41 SNPs aus der initialen Studie und die 2.093 SNPs aus der Studie mit den imputierten Gesamtgenomsequenzdaten wurden beim Design des DSN-spezifischen SNP-Chips (DSN200K-Chip) berücksichtigt.

4.3.1.2 GWAS mit 2.160 DSN-Kühen

Mit den aktualisierten Milchleistungsdaten wurde eine erneute GWAS durchgeführt. Bei dieser wurden 2.160 DSN-Kühe berücksichtigt und imputierte Gesamtgenomsequenzdaten (11,7 Millionen SNPs) verwendet. Die Imputation der SNP-Chip Daten wurde mittels der Gesamtgenomsequenzdaten von 304 repräsentativen DSN-Rindern durchgeführt. Die 305-Tage-Leistung der Merkmale Milch kg, Fett kg, Protein kg, Fett % und Protein % in der 1.-3. Laktation und dem Laktationsmittel der 1.-3. Laktation wurden untersucht.

In dieser GWAS konnten wir 1.980 assoziierte Sequenzvarianten ($-\log_{10}(p) \geq 6,8$) in 13 genomischen Loci auf 9 Chromosomen (1, 3, 5, 6, 8, 10, 20, 21 and 27) identifizieren (Tabelle 8).

Tabelle 8: Die Top assoziierten SNPs aus der GWAS mit Milchproduktionsmerkmalen. rsID=SNP-ID, Chr=Chromosom, MA=Minderheitenallel, MAF=Frequenz des Minderheitenallels, β_{MA} =Allelsubstitutionseffekt von MA und Standardfehler (SE). $-\log_{10}(p) \geq 6,8$, $\geq 7,1$ und $\geq 7,8$ sind suggestiv, signifikant bzw. hoch signifikant.

Merkmal (LA)	rsID	Chr	Position	MA	MAF	β_{MA}	SE(β_{MA})	$-\log_{10}(p)$
Protein kg (LA3)	rs379781684	1	75.187.853	C	0.15	-16,8	2,7	7,96
Fat kg (LA3)	rs379781684	1	75.187.853	C	0.15	-19,4	3,4	7,03
Milk kg (LA3)	rs209578598	1	83.272.783	A	0.36	-349	77	7,82
Protein % (LA2)	rs876040025	3	11.592.760	C	0.05	-0,098	0,015	7,34
Protein % (LA3)	rs41586418	3	13.915.936	G	0.18	-0,068	0,012	7,18
Fat % (LAm)	rs134606936	5	90.406.099	T	0.44	-0,113	0,024	7,78
Fat % (LA1)	rs211210569	5	93.516.066	T	0.23	-0,151	0,033	11,93
Fat % (LA3)	rs209372883	5	93.518.685	C	0.21	-0,186	0,051	8,26
Fat % (LA2)	rs207994397	5	93.525.076	T	0.23	-0,226	0,043	10,91
Protein % (LA3)	rs41604619	5	95.098.733	T	0.29	0,061	0,011	8,26
Protein % (LA3)	rs382685419	6	85.371.484	T	0.50	-0,054	0,013	8,03
Protein % (LA2)	rs378558630	6	85.373.205	A	0.49	-0,055	0,011	8,47
Protein % (LA1)	rs378558630	6	85.373.205	A	0.49	-0,035	0,01	7,41
Protein % (LAm)	rs378558630	6	85.373.205	A	0.49	-0,047	0,013	7,13
Milk kg (LA3)	rs385677618	8	56534074	T	0.33	-346	114	8,04
Protein kg (LA3)	rs432948152	8	56568636	G	0.33	-8,5	3,9	6,84
Protein kg (LAm)	rs210911072	8	59917537	G	0.23	-6,4	4,6	7,53
Milk kg (LAm)	rs797297575	8	60079367	G	0.14	-280	226	8,03
Protein % (LA2)	rs211239920	10	44.746.907	T	0.34	0,054	0,015	10,48
Protein % (LA3)	rs208655317	10	44.746.980	G	0.29	0,065	0,02	8,13
Protein % (LAm)	rs208655317	10	44.746.980	G	0.29	0,075	0,021	7,95
Protein % (LA1)	rs137281406	20	33.314.537	C	0.07	-0,089	0,012	7,19
Milk kg (LA2)	rs211525696	21	66.634.034	A	0.22	338	64	7,35
Milk kg (LAm)	rs385070122	21	68.335.947	A	0.09	486	84	7,42
Fat kg (LA1)	rs42120938	27	25.539.379	A	0.42	-9,4	2,4	8,95

Der signifikanteste Locus wurde für den Milchfettgehalt auf Chromosom 5 identifiziert (Tabelle 8, Abbildung 5a-b). Dieser Effekt war über alle Laktationen hinweg signifikant, wobei der Effekt mit der höchsten Signifikanz in der 1. Laktation gefunden wurde. Das Minderheitenallel T des Top-SNPs hatte eine Häufigkeit von 0,23 und war unvorteilhaft, da es den Milchfettgehalt um 0,151%-Punkte reduzierte. Derselbe Locus hatte auch einen hochsignifikanten Effekt auf den Proteingehalt in Laktation 3 (Tabelle 8, Abbildung 5b). Im Gegenteil zum Effekt auf den Fettgehalt, war der Effekt des Minderheitenallels T des Top-SNPs auf den Proteingehalt vorteilhaft und erhöhte diesen um 0,061%-Punkte. Der Top-SNP, der mit dem Fettgehalt in der 1. Laktation assoziiert ist, befand sich in Intron 1 des Gens *MGST1* (microsomal Glutathion-S-Transferase 1). Darüber hinaus deckten die Sequenzdaten von DSN zwei Missense-Varianten in *MGST1* auf, beide mit tolerierten Auswirkungen auf die Proteinfunktion. *MGST1* wurde bereits in zahlreichen GWAS mit verschiedenen Rinderrassen als Kandidatengen für den Milchfettgehalt identifiziert. Obwohl wir in DSN auch *MGST1* als das wichtigste Kandidatengen für den Milchfettgehalt auf Chromosom 5 priorisieren, können wir Effekte der benachbarten Gene nicht vollständig ausschließen, da in den Nachbargenen ebenfalls signifikant assoziierte SNPs liegen. Die Gene *LMO3* und *SLC15A5* stehen in Kopplung mit *MGST1* und könnten auch ursächliche Mutationen enthalten. Argumente, die für *MGST1* als kausales Gen sprechen, sind, dass ein starker eQTL-Effekt für die *MGST1*-Expression im Eutergewebe von Milchkühen gefunden wurde (Littlejohn et al., 2016), dass die Expression von *MGST1* in Adipozyten in der menschlichen Brust angereichert ist und *MGST1* zu vielen Stoffwechselwegen, darunter auch zum Östrogenstoffwechsel, beiträgt (www.proteinatlas.org). Die Ausschaltung von *MGST1* bei Mäusen führte zu niedrigeren Cholesterinkonzentrationen im Plasma (www.mousephenotype.org), was wiederum ein Marker für die negative Energiebilanz bei früh laktierenden Kühen ist. Daher könnte *MGST1* über die Regulierung von Energie und/oder Fettsäuren für die Produktion von Milchfett in der Milchdrüse zum Milchfett beitragen.

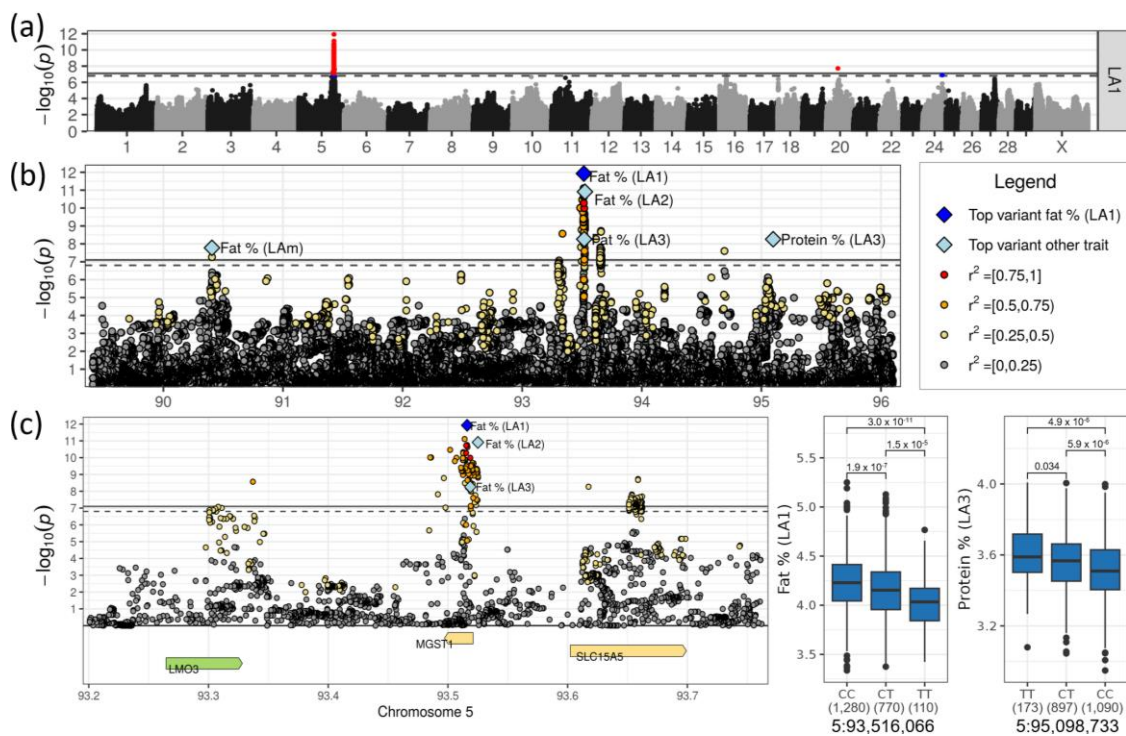


Abbildung 5: Übersicht des Locus auf Chromosom 5. (a) Manhattan-Plot für den Milchfettgehalt in Laktation 1 ($p < 0,1$: gestrichelte Linie, $p < 0,05$: durchgezogene Linie). (b) Regionaler Assoziationsplot für den Locus. (c) Gezoomter regionaler Assoziationsplot mit Genen und Effektplots für die Top-SNPs für den Milchfettgehalt in Laktation 1 und den Proteingehalt in Laktation 3. Gene, die Varianten mit geringen oder mäßigen Auswirkungen auf Gentranskripte enthalten, sind grün bzw. gelb gefärbt.

Auch für die Loci auf den anderen Chromosomen wurden interessante Kandidatengene identifiziert (Tabelle 9). Schlüsselgene, die den Eiweißgehalt beeinflussen, waren *CSN1S1* (α -S1 Casein) auf Chromosom 6 und die Region um *GNG2* (G protein subunit γ 2) auf Chromosom 10. Darüber hinaus weisen wir auf die Bedeutung von *FGF12* (fibroblast growth factor 12) auf Chromosom 1 für die Protein- und Fettmenge, *HTR3C* (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor) auf Chromosom 1 für die Milchmenge, *TLE4* (TLE family member 4, transcriptional corepressor) auf Chromosom 8 für die Milch- und Proteinmenge und *TNKS* (tankyrase) auf Chromosom 27 für die Milch- und Fettmenge hin.

In dieser GWAS hat sich auch wiederholt bestätigt, dass anders als bei Holstein, die kausale *DGAT1* Genvariante (Alanin-Protein-Variante) in DSN fixiert ist (Frequenz=0,97) und daher mit keinem Merkmal assoziiert werden konnte. Diese Proteinvariante steht bei Holstein Kühen für eine hohe Milch- und Eiweißleistungen. Weil diese Variante in DSN fixiert ist, kann *DGAT1* hier zu keiner weiteren Erhöhung beitragen, sondern hat schon sein Potential entfaltet und zum bekannten guten Fett- und Eiweiß-Wert in DSN beigetragen.

Tabelle 9: Kandidatengene in Loci, die signifikant mit Milchproduktionsmerkmalen bei DSN assoziiert sind. Die Länge der Regionen ist in Megabasenpaaren (Mb) angegeben. Priorisierte Kandidatengene sind fett markiert.

Top SNP	Locus start	Locus stop	Länge	Gennamen (Anzahl der Gene)
1:75.187.853	75.045.795	75.397.280	0,35	FGF12 (1)
1:83.272.783	83.066.360	83.334.688	0,27	<i>HTR3C</i> , <i>ENSBTAG00000039011</i> , <i>ABCC5</i> , <i>ENSBTAG00000052825</i> , <i>PARL</i> , <i>MAP6D1</i> , <i>YEATS2</i> (7)
3:11.592.760	11.579.114	11.630.952	0,05	<i>CD1E</i> (1)
3:13.915.936	13.915.389	13.919.145	0,01	<i>ARHGEF11</i> (1)
5:93.516.066	93.300.498	93.662.363	0,36	<i>LMO3</i> , MGST1 , <i>SLC15A5</i> (3)
6:85.373.205	84.782.659	85.442.084	0,66	<i>ENSBTAG00000053282</i> , <i>ENSBTAG00000053565</i> , <i>ENSBTAG00000015047</i> , <i>ENSBTAG00000004040</i> , <i>SULT1B1</i> , <i>ENSBTAG00000038214</i> , <i>SULT1E1</i> , CSN1S1 (8)
8:56.534.074	55.472.873	56.898.488	1,43	TLE4 (1)
8:60.079.367	59.912.308	60.102.002	0,19	<i>GBA2</i> , <i>RGP1</i> , <i>MSMP</i> , <i>NPR2</i> , <i>SPAG8</i> , <i>HINT2</i> , <i>FAM221B</i> , <i>TMEM8B</i> , <i>OR13E1</i> , <i>OR13E10</i> , <i>OR13J1C</i> , <i>OR13J1F</i> (12)
10:44.746.907	43.852.505	47.828.666	3,98	<i>TRIM9</i> , <i>ENSBTAG00000053552</i> , <i>TMX1</i> , <i>FRMD6</i> , <i>GNG2</i> , <i>RTRAF</i> , <i>NID2</i> , <i>ENSBTAG0000001423</i> , <i>PTGDR</i> , <i>PLEKHO2</i> , <i>PIF1</i> , <i>RBPM52</i> , <i>OAZ2</i> , <i>ZNF609</i> , <i>TRIP4</i> , <i>PCLAF</i> , <i>CSNK1G1</i> , <i>ENSBTAG00000049725</i> <i>ENSBTAG00000049412</i> , <i>PPIB</i> , <i>SNX22</i> , <i>SNX1</i> , <i>CIAO2A</i> , <i>DAPK2</i> , <i>HERC1</i> , <i>FBXL22</i> , <i>USP3</i> , <i>ENSBTAG00000052707</i> , <i>ENSBTAG00000051076</i> , <i>ENSBTAG00000054388</i> , <i>ENSBTAG00000050908</i> , <i>ENSBTAG00000019474</i> , <i>CA12</i> , <i>APH1B</i> , <i>RAB8B</i> , <i>RPS27L</i> , <i>LACTB</i> , <i>TPM1</i> , <i>ENSBTAG00000040590</i> , <i>TLN2</i> (40)
20:33.314.537	33.313.093	33.329.684	0,02	<i>C6</i> (1)
21:66.634.034	66.620.652	66.634.034	0,01	- (0)
21:68.335.947	68.328.315	69.356.368	1,03	<i>ZFYVE21</i> , <i>PPP1R13B</i> , <i>ATP5MJ</i> , <i>TDRD9</i> , <i>RD3L</i> , <i>ASPG</i> , <i>KIF26A</i> , <i>C21H14orf180</i> , <i>TMEM179</i> , <i>ENSBTAG00000054250</i> , <i>ENSBTAG0000007187</i> , <i>ADSS1</i> , <i>SIVA1</i> , <i>AKT1</i> , <i>ZBTB42</i> , <i>CEP170B</i> , <i>PLD4</i> (17)
27:25.539.379	25.489.516	25.563.491	0,07	TNKS (1)

4.3.2 Wachstums- und Fleischleistungsmerkmale

Da von den Schlachtbullen nicht routinemäßig Ohrstanzproben gesammelt wurden, gibt es nur 565 Schlachtbullen, von denen sowohl Genotypen als auch Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen vorliegen. Diese Bullen stammen alle von dem größten DSN-Betrieb in Gräfendorf. Die Auswertung von Daten aus Züllsdorf wurde nicht durchgeführt, da nur wenige Daten in Züllsdorf erhoben wurden und diese aufgrund von personellen Engpässen im Betrieb unvollständig blieben und dadurch schlecht auszuwerten waren. Um die Analysen in der GWAS nicht durch ungewollte (unbekannte) Variation negativ zu beeinflussen, wurden die Daten aus Züllsdorf nicht in die jetzige Analyse aufgenommen.

Die Schlachtdaten aus Gräfendorf beinhalten die Merkmale Schlachtkörpergewicht in Kilogramm, die Fleischigkeitsklasse basierend auf dem EUROP-System („E“- vorzüglich, „U“- sehr gut, „R“- gut, „O“- mittel, „P“- gering) und die Fettklasse („1“ - sehr gering bis „5“ - sehr stark) der Schlachtkörper. Die Merkmale Fleischigkeits- und Fettklasse wurden jeweils in weitere Unterkategorien (mit „-“ oder „+“ gekennzeichnet) unterteilt. Bei Betrachtung des Schlachtkörpergewichts sieht man, dass das Alter kaum noch eine Rolle spielt (Abbildung 6, links). Bezüglich der Fleischigkeits- und Fettklassen, ist zu erkennen, dass die Fettklasse kaum mit dem Schlachtkörpergewicht korreliert (Korrelation $r=0.08$ bzw. $r=0.14$, wenn die Unterkategorien berücksichtigt werden) (Abbildung 6, oben mittig und rechts) Die Fleischigkeitsklasse und das Schlachtkörpergewicht korrelieren mittelmäßig ($r=0.41$ bzw. $r=0.47$, wenn die Unterkategorien berücksichtigt werden). Je höher das Schlachtkörpergewicht desto besser die Fleischigkeitsklasse („E“ - vorzüglich) (Abbildung 6, unten mittig und rechts).

Aus den Wiegungen der DSN-Schlachtbullen standen Geburtsgewichte und Körpergewichte im Alter von ca. 3 Wochen, 7 Monaten und ca. 1,5 Jahren (kurz vor der Schlachtung) zur Verfügung (Abbildung 7). Aus der Differenz des Geburtsgewichts und des Gewichts vor der Schlachtung wurde die Gewichtszunahme in Kilogramm pro Tag berechnet werden. Die Schlachtbullen nahmen durchschnittlich 1,27 kg pro Tag zu. Das Alter der Tiere in Tagen beeinflusst das Schlachtkörpergewicht daher stark. Daher mussten bei der GWAS Einflussfaktoren wie das z.B. das Alter berücksichtigt werden. Die signifikanten Einflussfaktoren wurden im Model berücksichtigt.

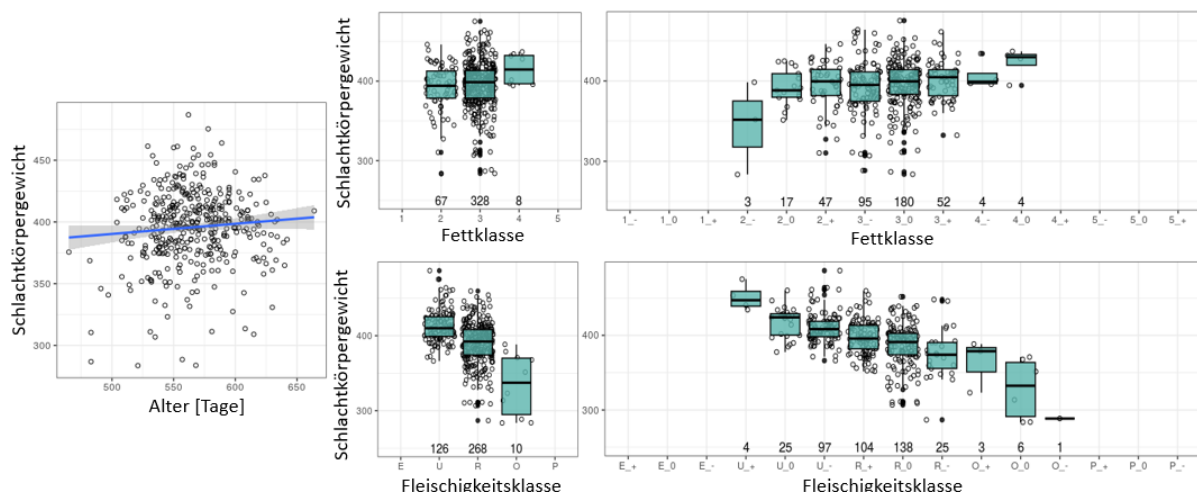


Abbildung 6: Übersicht der Schlachtdaten. Schlachtkörpergewicht, Fettklasse und Fleischigkeitsklasse und deren Unterklassen von DSN-Bullen aus dem Betrieb Gräfendorf. Verteilung der Schlachtkörpergewichte (links), Fleischigkeitsklasse im Bezug zum Schlachtkörpergewicht (oben mittig und rechts) und Fettklasse im Bezug zu Schlachtkörpergewicht (unten mittig und rechts).

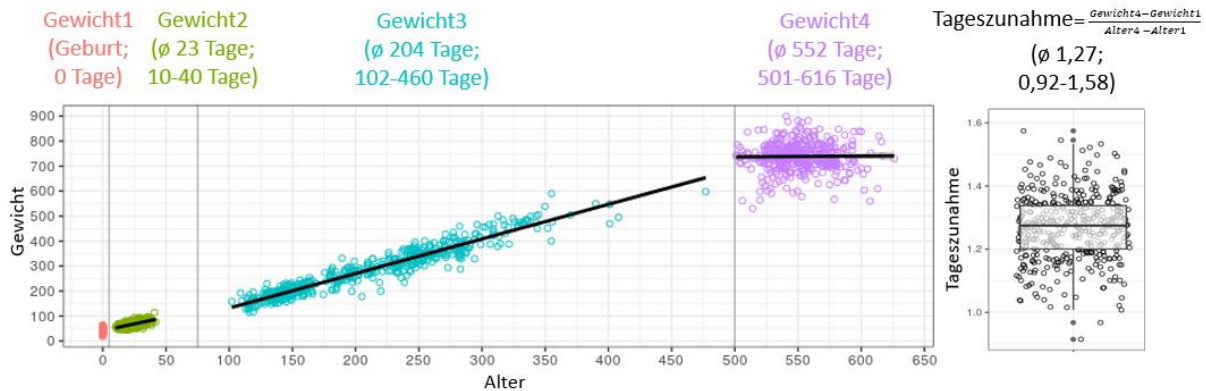


Abbildung 7: Übersicht der Wiegeungen für DSN- Bullen der Agrargenossenschaft Gräfendorf in Abhängigkeit vom Alter in Tagen. DSN-Schlachtbullen wurden direkt nach der Geburt, im Alter von ca. 3 Wochen (Ø 23 Tage), 7 Monaten (Ø 204 Tage) und ca. 1,5 Jahren (Ø 552 Tage, kurz vor der Schlachtung) gewogen.

Eine umfassende Überprüfung aller Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen wurde durchgeführt, um deren Plausibilität sicherzustellen und eine gründliche Qualitätskontrolle zu gewährleisten. Dieser Prozess umfasste mehrere Schritte, darunter die Integration von Daten aus verschiedenen Ressourcen, den Abgleich von Abgangsdaten mit Schlachtdaten sowie die Visualisierung der Phänotypen mithilfe von Histogrammen. Zudem wurden statistische Filter angewendet, die eine Bereinigung der Daten ermöglichten, indem Werte außerhalb des Bereichs von Mittelwert ± 3 Standardabweichungen entfernt wurden. Diese sorgfältige Qualitätskontrolle gewährleistete die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Phänotypdaten für nachfolgende statistische Analysen.

Auf Anregung der RBB und der AG Gräfendorf wurde von der HU Berlin eine Studie durchgeführt, die das Ziel hatte, im DSN-Bestand der Agrargenossenschaft Gräfendorf einen Überblick zur Gewichtsentwicklung und zu Körpermaßen bei DSN-Färsen zu erarbeiten. Vorinformationen dazu gab es keine. Für die Analysen standen die Daten von 275 einmalig vermessenen und gewogenen Färsen zur Verfügung. Die Anzahl der Tiere reichte jedoch nicht aus, um alle im Zusammenhang mit Körpermerkmalen möglichen Fragestellungen ausreichend beantworten zu können. Die Ergebnisse dazu sind im Anhang (Seite 69).

GWAS wurden für Phänotypen der Fleischleistung in DSN-Schlachtbullen durchgeführt. Phänotyp- und Genotyp-Daten standen für 565 DSN Bullen aus dem Betrieb Gräfendorf zur Verfügung. Die Genotypen von 396 Bullen stammen vom DSN200K-Chip. Für die Genotypisierung mit diesem Chip wurden extra Haarproben von Schlachtbullen gesammelt. Die anderen 160 Genotypisierungen stammen vom Eurogenomics EuroG MD Chip, mit dem männliche Kälber genotypisiert wurden, die mittlerweile Schlachtdaten haben. Unter Benutzung von Gesamtgenomsequenzdaten wurden die Genotypen auf Gesamtgenomsequenz imputiert und für die GWAS benutzt. Nach Filterung für biallelische Varianten mit einer Minderheitenallelfrequenz (MAF) von 5% standen 11,8 Millionen SNPs zur Verfügung.

In dem Modell für die GWAS wurden die folgenden fixen Effekte berücksichtigt, sofern sie zur Erklärung der phänotypischen Varianz im Modell beitrugen (mit einem Sternchen „*“ gekennzeichnet):

$$Y = \text{Populationsstruktur}^* + \text{Geburtsjahr}^* + \text{Geburtssaison}^* + \text{Schlachtjahr}^* + \text{Schlachtsaison}^* + \text{Vater}^* + \text{Abgangsgrund}^* + \text{Alter}^* + \text{Genotyp} + \text{Restfehler}$$

Der Akaike Informationskriterium wurde benutzt um zu testen, ob die im Modell aufgeführten fixen Effekte den Phänotyp signifikant beeinflussen. Um die Signifikanz der Assoziationen zwischen genetischem Marker und Merkmal zu ermitteln, wurden die p-Werte zuerst auf einen maximalen Inflationsfaktor $\lambda=1,2$ korrigiert. Anschließend wurden die p-Werte auf die Anzahl der unabhängigen Tests ($n=415.781$) mit der Bonferroni-Methode korrigiert. Die Signifikanzschwellen wurden als $-\log_{10}(p)=6,9$ für signifikante Assoziationen ($p<0,05$) und $-\log_{10}(p)=6,6$ für suggestive Assoziationen ($p<0,1$) ermittelt.

Insgesamt wurden 101 signifikante und 68 suggestive SNPs für das Geburtsgewicht und das Gewicht im Alter von 3 Wochen identifiziert. Diese liegen auf den Chromosomen 2, 5, 8, 11, 12, und 18, wovon die Regionen auf Chromosom 5, 12 und 18 signifikant waren (Tabelle 10, Abbildung 8). Die Top-SNPs befinden sich entweder zwischen zwei Genen (intergenisch) oder in Introns von den Genen *NXPH2* (Neurexophilin-2) und *ENSBTAG00000047383* (keine Annotation vorhanden). *NXPH2* liegt auf Chromosom 2, ist an der synaptischen Übertragung beteiligt, spielt eine Rolle bei der Entwicklung und Funktion des Nervensystems und wird in verschiedenen Gehirnregionen exprimiert.

Tabelle 10: Die Top-SNPs aus der GWAS mit Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen bei DSN-Bullen. Chr=Chromosom, MA=Minderheitenallele, β_{MA} =Allelsubstitutionseffekt des Minderheitenallels und Standardfehler (SE). SNPs mit $-\log_{10}(p) \geq 6,6$ sind suggestiv. Zusätzliche Information über Lokalisation im Genom und gegebenenfalls dazugehörigem Gen sind angegeben.

Phänotyp	Chr	Position	MA	β_{MA}	SE(β_{MA})	LOD	Lage	Gen
Geburtsgewicht	2	58,371,353	T	-2.51	0.78	6.78	Intron	<i>NXPH2</i>
Geburtsgewicht	5	92,970,239	T	-1.33	0.58	8.85	Intergenisch	
Geburtsgewicht	8	21,860,994	C	2.85	0.89	6.83	Intergenisch	
Gewicht (3 W.)	11	8,543,280	C	3.95	0.72	6.85	Intergenisch	
Geburtsgewicht	12	70,215,395	A	1.19	0.75	7.10	Intron	<i>ENSBTAG00000047383</i>
Geburtsgewicht	18	42,909,805	A	2.79	0.49	7.16	Intergenisch	

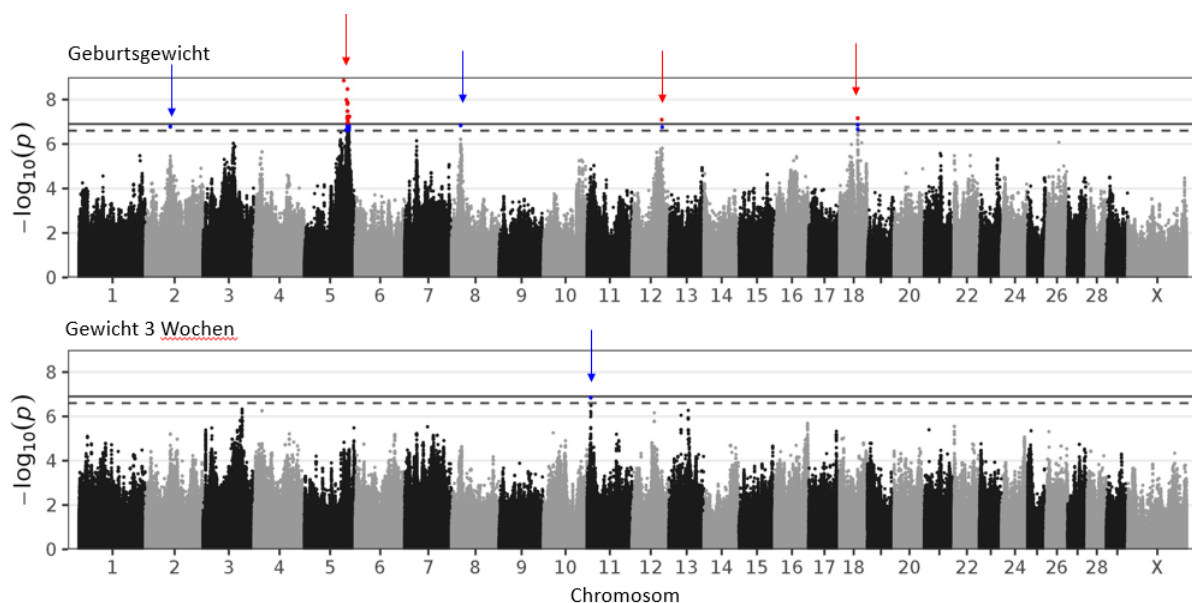


Abbildung 8: Manhattan-Plot für Geburtsgewicht und Gewicht nach ca. 3 Wochen von DSN-Bullen. Suggestive Assoziationen ($-\log_{10}(p)=6,6$; gestrichelte Linie) sind blau und signifikante Assoziationen ($-\log_{10}(p)=6,9$; durchgezogene Linie) sind rot gekennzeichnet.

Weitere interessante Kandidatengene sind in den assoziierten Regionen lokalisiert. Auf Chromosom 5 wurde ein signifikanter Locus für Geburtsgewicht gefunden, dessen Top-SNP nur 0,5 Mb vor dem Gen *MGST1* liegt (Abbildung 9). Ein weiterer SNP mit der zweithöchsten Signifikanz liegt 8,2 Mb hinter dem Gen *MGST1*. Diese Region um *MGST1* wurde von uns bereits in der GWAS mit Milchfettgehalt bei DSN-Kühen hochsignifikant assoziiert (Korkuć et al., 2023). Die Assoziation von *MGST1* mit dem Milchfettgehalt wurde zuerst bei Holsteins gefunden (Littlejohn et al., 2016). Interessanterweise wurde diese Region um *MGST1* aber auch schon mit Körpergewicht und Gewichtszunahme in Hereford (Saatchi et al., 2014) und Angus (Zhang et al., 2020) assoziiert (Vergleich zu cattleQTLdb). Und eine verstärkte Expression von *MGST1* wurde auch im Fettgewebe gezeigt (www.proteinatlas.org).

In der suggestiven Region auf Chromosom 8 befindet sich das Gen *DMRTA1* (Doublesex and mab-3-related transcription factor A1). Dieses Gen ist an der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems und der Fortpflanzungsorgane beteiligt. Es wird in verschiedenen Geweben während der Embryonalentwicklung und im Erwachsenenstadium exprimiert. Das Gen *DMRTA1* hat eine erhöhte Spezifität für Adipozyten (Adipozyten subkutan, Adipozyten viszeral) (www.proteinatlas.org). Die Region um *DMRTA1* wurde bereits mit Schlachtkörpergewicht bei Holstein in Verbindung gebracht (Doran et al., 2014).

In der suggestiv assoziierten Region auf Chromosom 11 liegt das Gen *POU3F3* (POU class 3 homeobox 3), das mit dem Gewicht der DSN-Bullen im Alter von 3 Wochen assoziiert wurde. *POU3F3* spielt eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Entwicklung und wird in bestimmten Regionen des Gehirns, aber auch in basalen Prostatazellen exprimiert. Beim Menschen wird *POU3F3* als ein prognostischer Marker für Endometriumkarzinome (www.proteinatlas.org) verwendet.

Die signifikante Region auf Chromosom 12 weist mehrere Gene ohne Annotation auf.

In der signifikanten Region auf Chromosom 18, die mit Geburtsgewicht assoziiert ist, ist das Gen *ZNF507* (Zinc finger protein 507) lokalisiert. *ZNF507* ist ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedenen Geweben einschließlich des Gehirns exprimiert wird, was auf eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung oder Funktion schließen lässt (www.proteinatlas.org). Die Region um *ZNF507* wurde bereits mit dem „Tenderness score“ von Rindfleisch assoziiert (Leal-Gutiérrez et al., 2020).

Die Diskussion zu den Ergebnissen befindet sich im Abschnitt 5 „Diskussion der Ergebnisse und Schlussfolgerungen“.

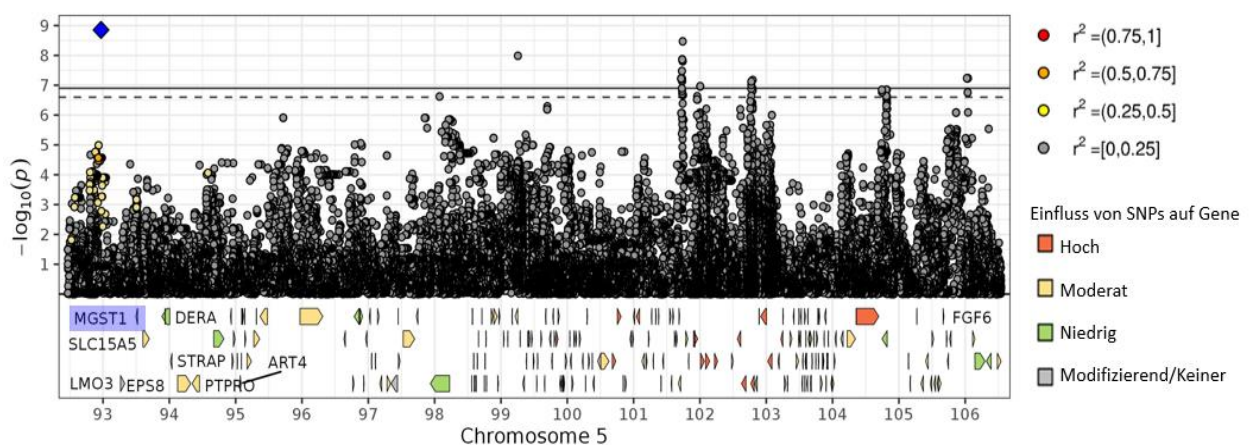


Abbildung 9: Gezoomter regionaler Assoziationsplot auf Chromosom 5 mit assoziierten Markern für das Geburtsgewicht in DSN-Schlachtbullen. Das Gen *MGST1* (violett markiert) wurde bereits mit Milchfettgehalt bei DSN-Kühen assoziiert. Direkt links neben *MGST1* bei 93,0 Mb ($r^2 = 0,02$; $D' = 0,33$ zu Top-SNP von *MGST1*) und auch 8,2 Mb rechts von *MGST1* bei 101,7 Mb ($r^2 = 0,07$, $D' = 0,67$ zu Top-SNP von *MGST1*) liegen die beiden am signifikantesten mit Geburtsgewicht assoziierten SNPs.

4.3.3 Vergleich der Ergebnisse aus Fleisch- und Milchleistung

Aus den Ergebnissen der Assoziationsanalyse geht hervor, dass wir einen Genlocus auf Chromosom 5 identifiziert haben, der eng mit dem Geburtsgewicht gekoppelt ist. Interessanterweise liegt dieser Locus in unmittelbarer Nähe des bereits zuvor für Milchfettgehalt identifizierten Locus am *MGST1*-Gen. Bei den anderen identifizierten Genloci, die mit Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen assoziiert sind, fanden wir keine Überlappung mit den Loci, die für Milchleistungsphänotypen signifikant sind. Das weist darauf hin, dass die Gene mit großem signifikantem Einfluss auf die Wachstums- und Fleischleistungen oder auf die Milchleistung zum großen Teil nicht gekoppelt sind und damit unabhängig voneinander vererbt werden. Das bedeutet gleichzeitig, dass der Milchtyp und der Fleischigkeitstyp im Doppelnutzungscharakter der DSN vorrangig durch verschiedene unabhängig voneinander vererbte Gene determiniert sind.

Bezüglich des Locus um *MGST1* auf Chromosom 5 haben wir Untersuchung zur Kopplung der Loci für Geburtsgewicht und Milchfettgehalt durchgeführt. Unsere Analyse ergab, dass der Top-SNP links von *MGST1* bei 93,0 Mb eine Kopplung von $r^2 = 0,02$ und $D' = 0,33$ zu Top-SNP für Milchfett von *MGST1* aufweist und der Top-SNP rechts von *MGST1* bei 191,2 Mb eine Kopplung mit einem r^2 -Wert von 0,07 und einem D' -Wert von 0,67 aufweist. Besonders interessant ist die Untersuchung der Haplotyp-Frequenzen, die Aufschluss darüber gibt, wie häufig bestimmte Allele beider Genloci (Loci von *MGST1* und Loci bei 101,2 Mb für Geburtsgewicht) gemeinsam vererbt werden oder nicht (Abbildung 10). Das positive Allel T des Locus für Geburtsgewicht (hohes Geburtsgewicht) zeigt eine Frequenz von 0,72. Das positive Allel C für hohen Milchfettgehalt hat eine Frequenz von 0,71. Das Allel T für hohes Geburtsgewicht und das Allel C für hohen Milchfettgehalt treten mit einer Häufigkeit von 45,3% zusammen auf einem Chromosom auf. Im Gegensatz dazu treten die negativen Allele C des Locus für Geburtsgewicht und T des Locus für Milchfettgehalt mit einer Frequenz von 2,7% nur äußerst selten gemeinsam auf und werden dementsprechend selten gemeinsam vererbt.

Indem wir die Frequenz des Haplotyps, der die beiden vorteilhaften Allele trägt, in der Population erhöhen, können wir sowohl das Geburtsgewicht als auch den Milchfettgehalt steigern. Dieses Wissen eröffnet neue Möglichkeiten für die gezielte Zucht von DSN, um sowohl die spätere Fleisch- als auch die Milchleistung gleichzeitig zu verbessern. Jedoch muss geklärt werden, ob schwerere Kälber aufgrund ihrer Robustheit vorteilhafter sind oder ob die höheren Geburtsgewichte zu schweren Geburtsverläufen beitragen.

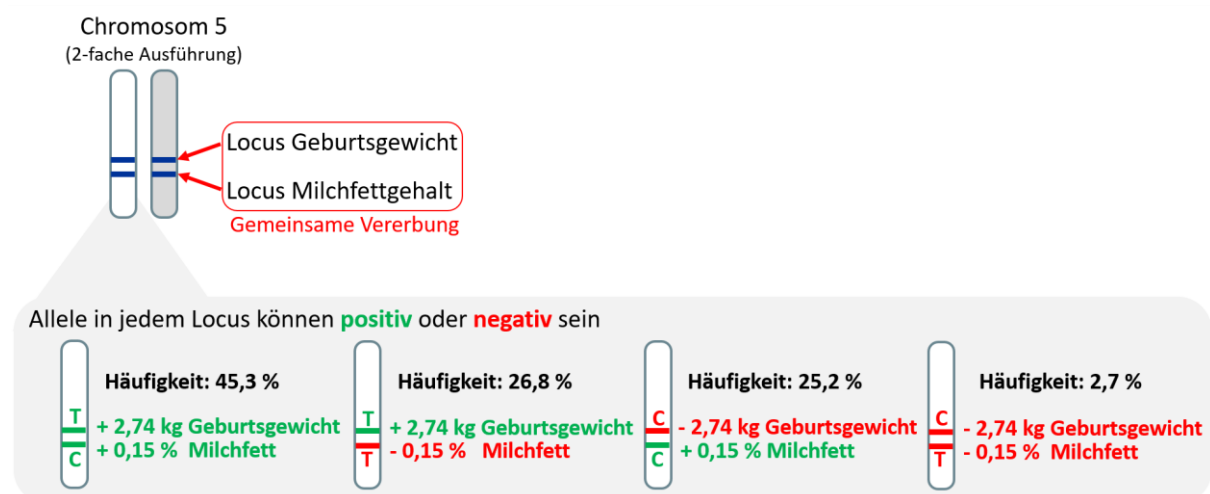


Abbildung 10: Kopplung der Loci für Geburtsgewicht und Milchfettgehalt auf Chromosom 5. Die Top-SNPs der beiden Loci (5:92.970.239 und 5:93.516.066) haben eine Kopplung von $r^2 = 0,07$ und $D' = 0,67$.

4.3.4 Klinische Mastitis

Unter Verwendung der Genotypen vom Illumina BovineSNP50 BeadChip-Genotyp-Daten wurde im Jahr 2019 eine genomweite Assoziationsstudie mit Gesundheitsdaten von ca. 1.000 Tieren der zwei größten DSN-Betriebe durchgeführt. Der Fokus wurde auf Mastitis gelegt, weil Mastitis auch bei DSN eine der häufigsten Erkrankungen ist. Neben den gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Kühe werden auch ökonomische Verluste aufgrund von geringerer Milchleistung kranker Kühe, Behandlungskosten und vorzeitigen Abgängen verzeichnet. Das Ziel dieser Studie war es, genomische Marker zu identifizieren, die mit der Anfälligkeit von Kühen für Mastitis in der Rinderrasse DSN assoziiert sind.

Für die genomweite Assoziationsstudie wurden die Mastitis-Erstdiagnosen der 1.-3. Laktation in frühe (< 50 Tage nach Kalbung) und späte (≥ 50 nach der Kalbung) aufgeteilt. Außerdem wurden die Populationsstratifikation und die Einflussfaktoren Betrieb, Kalbesaison, Kalbejahr und Geburtsjahr berücksichtigt. Die genomweiten Assoziationsstudien wurden unter der Benutzung eines univariaten linearen gemischten Modells mit der Software GEMMA durchgeführt.

Insgesamt wurden fünf Marker identifiziert, die signifikant mit klinischer Mastitis assoziiert waren (Tabelle 11). Ein Marker befindet sich in der intragenischen Region vom Gen *NEURL1* auf Chromosom 26, die anderen vier in intergenischen Regionen auf den Chromosomen 3, 6, und 9. In den identifizierten genomischen Regionen liegen 24 positionelle Kandidatengene, darunter das Gen *BMPRI1B* auf Chromosom 6, das bereits mit klinischer Mastitis in anderen Milchrindrassen assoziiert wurde. Die Ergebnisse aus dieser Studie wurden wie folgt veröffentlicht:

- Meier, S., Arends, D., Korcuć, P., Neumann, G. B., & Brockmann, G. A. (2020). A genome-wide association study for clinical mastitis in the dual-purpose German Black Pied cattle breed. *Journal of dairy science*, 103(11), 10289-10298.

Tabelle 11: Top-SNPs aus Assoziationsanalyse mit Klinischer Mastitis in DSN-Kühen. Chr=Chromosom, MAF=Minderheitenallelfrequenz, β_{MA} =Allelsubstitutionseffekt des Minderheitenallels und Standardfehler (SE). Werte $-\log_{10}(p) \geq 5,2$ und $\geq 5,5$ sind suggestiv und signifikant. Die Positionen entsprechen dem bovinen Referenzgenom ARS-UCD1.2.

Merkmal	Chr	Position	MAF	β	SE(β)	$-\log_{10}(p\text{-value})$
Klinische Mastitis LA1 (total)	3	104.278.203	0,04	0,37	0,08	5,21
Klinische Mastitis LA1 (total)	3	106.373.841	0,04	0,40	0,08	5,78
Klinische Mastitis LA1 (spät)	6	29.642.427	0,33	-0,12	0,03	5,27
Klinische Mastitis LA1 (total)	9	3.037.955	0,01	0,25	0,05	6,04
Klinische Mastitis LA2 (früh)	26	24.093.102	0,03	0,36	0,07	6,38

Diese genomweite Assoziationsstudie zur klinischen Mastitis wurde mit imputierten Gesamtgenomsequenzdaten wiederholt (Ergebnisse nicht gezeigt). Insgesamt konnten so zusätzlich 53 SNPs identifiziert werden, die eine höhere Signifikanz hatten als die SNPs, die in der oben gezeigten Studie mit dem Illumina BovineSNp50 BeadChip gefunden wurden. Die fünf SNPs aus der initialen Studie und die 53 SNPs aus der Studie mit Gesamtgenomsequenzdaten wurden bei dem Design des DSN-spezifischen SNP-Chips (DSN200K) berücksichtigt.

4.3.5 Fruchtbarkeit, Gesundheitsmerkmale und Endoparasitenresistenz

Mit den Genotyp-Daten aus diesem DSN-Projekt hat die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sven König an der Justus-Liebig-Universität Gießen GWAS mit Fruchtbarkeits- und Gesundheitsmerkmalen von ca. 1.900 DSN Kühen durchgeführt. Die untersuchten Phänotypen waren Zwischenkalbezeit, Non-Return-Rate nach 56 Tagen, somatische Zellzahl, Fett-Protein-Verhältnis und Endoparasitenresistenz. Genotypen auf Sequenzniveau wurden verwendet. In dieser Studie wurden 40 assoziierte Sequenzvarianten mit Fruchtbarkeitsmerkmalen und 61 mit Gesundheitsmerkmalen identifiziert und dazugehörige Kandidatengene und Stoffwechselwege aufgezeigt. Insgesamt wurden 200 Kandidatengene für Endoparasitenresistenz gefunden, die zu 16 Stoffwechselwegen der direkten Immunantwort gehören. Die Ergebnisse dazu wurden wie folgt publiziert:

- Wolf, M. J., Yin, T., Neumann, G. B., Korcuć, P., Brockmann, G. A., König, S., & May, K. (2021). Genome-wide association study using whole-genome sequence data for fertility, health indicator, and endoparasite infection traits in German black pied cattle. *Genes*, 12(8), 1163.

4.4 Ökonomischer Zuchtwert

Basierend auf dem ökonomischen Zuchtwert in Euro für Holstein wurde ein ökonomischer Zuchtwert für DSN-Bullen entwickelt. Unser Ziel war es, diesen Lebenszeit-Nettozuchtwert für die Zweinutzungsrasse DSN anzupassen, wobei zusätzlich zur Milchleistung und Fitnessseigenschaften auch die Fleischproduktion berücksichtigt wird.

Für die Generierung des DSN-Nettozuchtwerts (DSN Net Merit) verwendeten wir die geschätzten Zuchtwerte von DSN-Bullen. Zusätzlich entwickelten wir einen Zuchtwert für Schlachtgewicht und -qualität, der auf den Schlachtgewichten der Nachkommen basiert. Außerdem passten wir die Margengewinne pro Standardabweichung der deutschen Holsteins, die zur Berechnung der geschätzten Zuchtwerte verwendet werden, auf DSN-spezifische Werte an.

Der entwickelte „DSN Net Merit“ setzt sich aus den drei Teilindizes „DSN Net Milk“ für die Milchleistung, „DSN Net Fitness“ für die Gesundheit und „DSN Net Beef“ für die Fleischleistung zusammen, die mit 52,8%, 43,4% bzw. 3,8% zum DSN Net Merit beitragen. Der DSN Net Merit und seine Subindizes wurden im Jahr 2019 für 33 DSN-Zuchtbullen berechnet und lagen zwischen -1.114 € und +709 € (Meier et al., 2021). Im Jahr 2021 wurden die Werte für 37 DSN-Zuchtbullen berechnet und lagen zwischen -1.007 € und +845 € (Tabelle 12). Der durchschnittliche DSN Net Merit lag bei -62 € und korrelierte stark ($r=0.97$) mit dem Gesamtzuchtwertindex (RZG), der durchschnittlich für die 37 DSN-Zuchtbullen bei 96 lag.

Die Implementierung des DSN Net Merit ist für Auswahl von Bullen und Paarungsentscheidungen nützlich. Insbesondere der Teilindex DSN Net Beef, der nicht mit bestehenden Zuchtwerten korreliert, kann verwendet werden, um den Doppelnutzungscharakter der DSN zu erhalten und gleichzeitig die Milchleistung moderat zu verbessern. Die berechneten Werte wurden an den RBB und die Betriebe weitergeben. Der Ansatz kann leicht auf andere Zweinutzungsrasen angepasst werden. Die ökonomischen Zuchtwerte brauchen jedoch eine regelmäßige Anpassung an sich verändernde ökonomische Rahmenbedingungen, die über das Projektende hinaus nicht fortgesetzt werden kann.

Die Ergebnisse dazu wurden wie folgt publiziert:

- Meier, S., Arends, D., Korcuć, P., Kipp, S., Segelke, D., Filler, G., & Brockmann, G. A. (2021). Implementation of an economic lifetime net merit for the dual-purpose German Black Pied cattle breed. *Agriculture*, 11(1), 41.

Tabelle 12: Übersicht des DSN Net Merit und Subindizes für Milch, Fitness und Fleisch für die 10 DSN-Zuchtbullen mit den höchsten und niedrigsten Zuchtwerten. Berechnungen wurden auf den Zuchtwerten und den ökonomischen Margengewinnen pro Standardabweichung aus dem Jahr 2021 durchgeführt. Rg= Rang, RZF= Relativer Zuchtwert Gesamt.

Rg	Name	Geburtsjahr	RZG	DSN Net Merit	DSN Net Milk	DSN Net Fitness	DSN Net Beef
1	Martini	2011	123	+845	+635	+184	+26
2	Semper	2005	116	+693	+459	+205	+29
3	Hak	1978	114	+582	+551	+36	-5
4	Jupiter	2004	116	+582	+669	-89	+2
5	Relachs	1999	115	+533	+466	+55	+12
6	Ali	1994	109	+507	+494	-34	+46
7	Landvogt	2013	109	+463	+362	+62	+39
8	Sony	2008	110	+458	+66	+392	+0
9	Hermes	2006	112	+430	+380	+39	+12
10	General	2013	111	+354	+317	+47	-9
28	Anschein	2015	85	-382	-151	-277	+45
29	Nero	1998	89	-404	-615	+218	-7
30	Weingold	2013	83	-468	-525	+26	+31
31	Lord	1995	80	-507	-237	-268	-2
32	Olymp	2013	76	-615	-499	-120	+4
33	Logger	2009	75	-618	-326	-257	-35
34	Taurus	2013	68	-671	-637	-110	+76
35	Prim	1994	76	-744	-794	+50	+0
36	Reinhard	1998	65	-1.012	-749	-241	-22
37	Merlin	2008	69	-1.017	-981	-21	-15

4.5 Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten

4.5.1 Übersicht der Sequenzvarianten in DSN

Mittels der Analyse der Gesamtgenomsequenzdaten von 304 DSN konnten 20,6 Millionen Sequenzvarianten (SNPs und INDELS) identifiziert werden. Diese Sequenzvarianten wurden auf ihren Einfluss auf Gene bzw. Gentranskripte mit dem Ensembl "Variant Effect Predictor" (VEP) untersucht (McLaren et al., 2010). Dieses Software-Tool untersucht den Schweregrad des Einflusses (hoch, moderat, gering, modifizierend) auf die Funktion eines Gens. Einen hohen Einfluss haben Sequenzvarianten zum Beispiel, wenn sie die Länge des Gentranskripts verkürzen und folglich auch die Länge des zu kodierten Proteins und dadurch die Proteinfunktion gestört wird (Tabelle 13). Dies kann zum Beispiel durch „Alternatives Splicing“ (Konsequenz: „Splice donor variant“, „Splice acceptor variant“) oder einen vorzeitigen Einbau eines Stopcodons („Stop gained“) entstehen. Ebenso ist es möglich, dass Gene nicht richtig transkribiert werden, weil das Startcodon („Start lost“) durch die Sequenzvariante verloren wurde oder weil ein Stopcodon fehlt („Stop lost“). Moderaten Einfluss haben Änderungen, die nur eine Position im Gen betreffen und das resultierende Protein somit nur eine andere Aminosäure hat („missense variant“). Sequenzvarianten mit geringem oder modifizierendem Einfluss verändern nicht das resultierende Protein, sondern höchstens die Expressionsmenge, indem sie in regulatorischen Regionen vorkommen. Die meisten Varianten (97,17%) wurden als modifizierend bezeichnet, gefolgt von Sequenzvarianten mit geringem (2,19%), moderatem (0,60%) und hohem Einfluss (0,04%) auf die Gentranskripte.

Vorrangig sind die Sequenzvarianten mit hohem und moderatem Einfluss auf die Gentranskripte interessant. Diese können direkte Information darüber geben, ob resultierende Proteine verändert

sind und deren Funktion möglicherweise sogar gestört wird. Das spielt zum Beispiel bei Genen wie den Kaseingenen eine Rolle, deren Einfluss auf die Milchleistung bereits bekannt ist. Des Weiteren können aber auch bekannte Mutationen, die in anderen Rassen wie HF vorhanden sind, in der DSN-Population überprüft werden. Dazu zählen der Locus für Hornlosigkeit und der „Lethalen Haployp 5“. Die Sequenzinformationen wurden sowohl für die Untersuchung der Sequenzvarianten in den Kaseingenen, als auch die Überprüfung der DSN-Population auf Hornlosigkeit und den „Lethalen Haplotyp 5“ benutzt (siehe nachfolgende Abschnitte).

Die Informationen zum Einfluss der Sequenzvarianten auf die Gentranskripte hat zu der Entwicklung des DSN-spezifischen SNP-Chips (DSN200K-Chip) beigetragen. Sequenzvarianten mit geringem, moderatem und hohem Einfluss wurden bei dem Design berücksichtigt. Zudem wurden aber auch DSN-spezifische Varianten berücksichtigt, die in DSN vorkommen aber nicht in anderen Rassen. Den DSN-spezifischen SNP-Chips haben wir in einem anderen Projekt entwickelt, aber in diesem Projekt verwendet.

Tabelle 13: Übersicht des Einflusses der 20,6 Millionen identifizierten Sequenzvarianten auf das Rindengenom. Bei der Gesamtzahl werden Überschneidungen zwischen den Konsequenzen nicht berücksichtigt.

Einfluss auf Gen	Konsequenz	Absolute Anzahl	Gesamt
Hoch	Transcript ablation	4	8.198
	Splice donor variant	1.625	
	Splice acceptor variant	1.237	
	Stop gained	2.285	
	Frameshift variant	7.613	
	Stop lost	245	
	Start lost	354	
Moderat	Inframe insertion	1.157	131.341
	Inframe deletion	3.108	
	Missense variant	222.690	
	Protein altering variant	107	
Gering	Splice region variant	33.512	581.204
	Synonymous variant	581.196	
	Stop retained variant	264	
	Start retained variant	6	
	Coding sequence variant	590	
	Mature miRNA variant	116	
	5' UTR variant	50.408	
	3' UTR variant	150.827	
	Non-coding transcript exon variant	24.603	
	Modifizierend	Intron variant	
Non-coding transcript variant		331.459	
Upstream gene variant		1.553.307	
Downstream gene variant		1.635.725	
Intergenic variant		12.048.624	

4.5.2 Reinrassigkeit, Inzucht und Diversität in DSN

Unter Benutzung der Sequenzvarianten von 30 DSN-Tieren (25 sequenziert von diesem Projekt und 5 weitere von vit) wurde im 1. Jahr des Projekts 2016 die Verwandtschaft von DSN zu den Rassen Holstein und Angler, von denen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls Sequenzdaten vorhanden waren, in einer phylogenetischen Analyse aufgezeigt. Der phylogenetische Baum (auch Dendrogramm genannt) zeigte deutlich, dass DSN eine eigene Rasse darstellt und nicht mit Holstein- oder Angler-Rindern

clustert (Abbildung 11). Das heißt, dass sich die sequenzierten DSN-Tiere von den Holsteins und Anglern genetisch deutlich unterscheiden und die DSN-Tiere zueinander ähnlicher sind als zu den Tieren der beiden anderen Rassen. Des Weiteren sind auch Verwandtschaftsbeziehungen im Dendrogramm sichtbar (violett hinterlegt). Die Tiere mit hoher Ähnlichkeit (geringste Unähnlichkeit) sind auf direkte Verwandtschaft zwischen Bulle und Tochter zurückzuführen, was mit den Pedigree-Informationen übereinstimmt und der Nachweis für zuverlässige Sequenzdaten und eine verlässliche Identifikation von Sequenzvarianten ist.

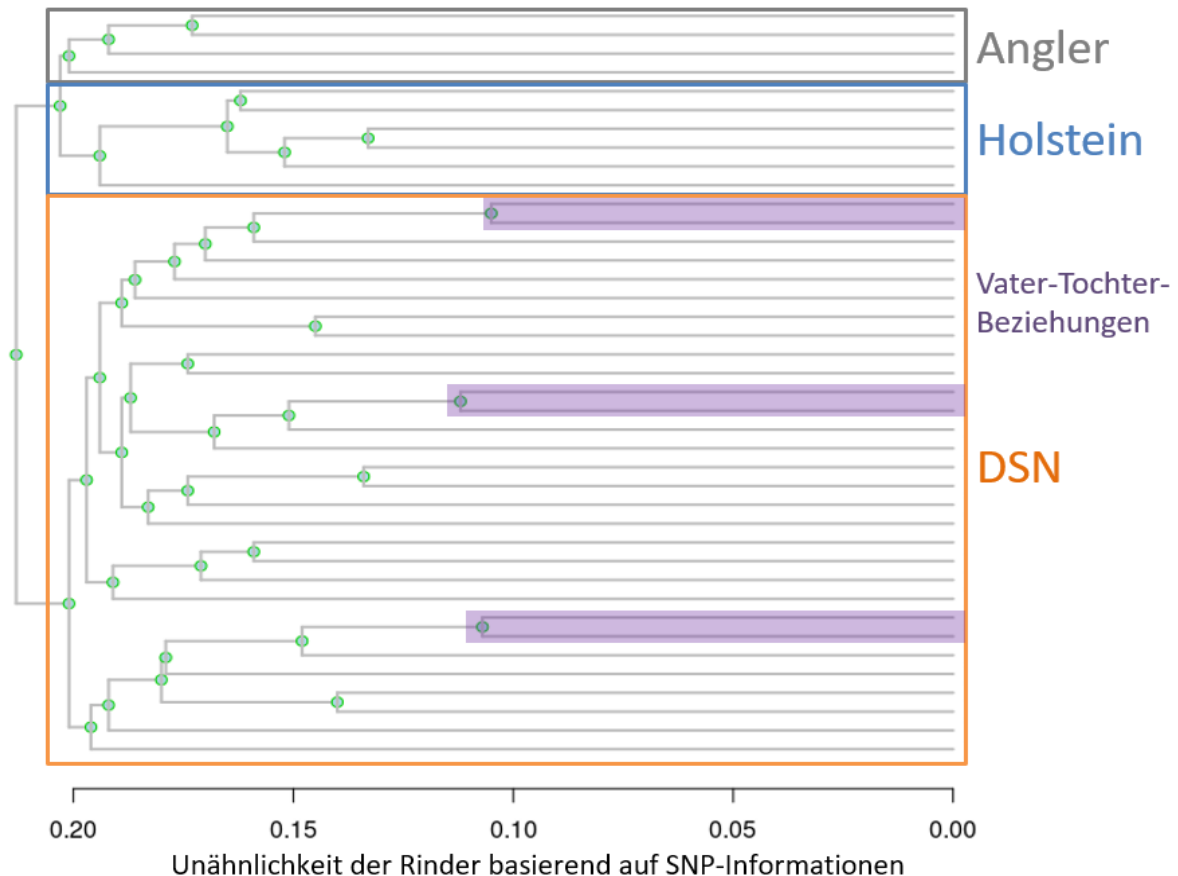


Abbildung 11: Dendrogramm von insgesamt 40 sequenzierten Rinder. Bei diesen handelt es sich um 30 DSN-, 5 Holstein- (aus USA und Kanada) und 5 Angler-Rinder, wobei eines der Angler 12% Holstein-Anteil hat und dadurch mit den Holstein-Rinder zusammen in ein Cluster fällt. Die Cluster sind farblich eingekastelt. Aus dem Pedigree bekannte Vater-Tochter-Beziehungen sind violett hinterlegt.

Unter Verwendung der Gesamtgenomsequenzdaten von insgesamt 304 DSN-Tieren und 68 weiteren Rinderrassen (1.090 Rinder) aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt wurden die phylogenetischen Analysen im Jahr 2022 wiederholt. Diese Analyse bestätigte, dass DSN sich als Rasse von den anderen Rassen abgrenzt, wobei die Rassen Dutch Friesian Red, Dutch Belted, Holstein und Holstein Red die höchste genetische Ähnlichkeit zu DSN aufwiesen (Abbildung 12). Insgesamt stammen alle Rassen mit hoher genetischer Ähnlichkeit zu DSN aus Deutschland, den Niederlanden, Belgien und Ländern um den Nordseeraum. Dies steht im Einklang mit historischen Belegen und ist auch aus geografischer Perspektive stimmig.



Abbildung 12: Verwandtschaft zu DSN. Rassen mit der höchsten Verwandtschaft zu DSN stammen aus Deutschland, den Niederlanden, Belgien und Ländern um den Nordseeraum.

Ein direkter Vergleich der Gesamtgenomsequenzdaten zwischen den 304 DSN-Tieren und 150 Holstein-Tieren, die aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt stammen, zeigte, dass der Anteil von Holstein im Genom bei den meisten sequenzierten DSN zwischen 0% und 10% liegt (Abbildung 13). Dies ist konform zu dem Zuchtziel der RBB, in dem DSN-Rinder einen maximalen Holstein-Anteil von 10% aufweisen dürfen. Eine Ausnahme bilden alte DSN-Kühe aus Frankenhausen, die einen Holstein-Anteil von über 10% zeigten.

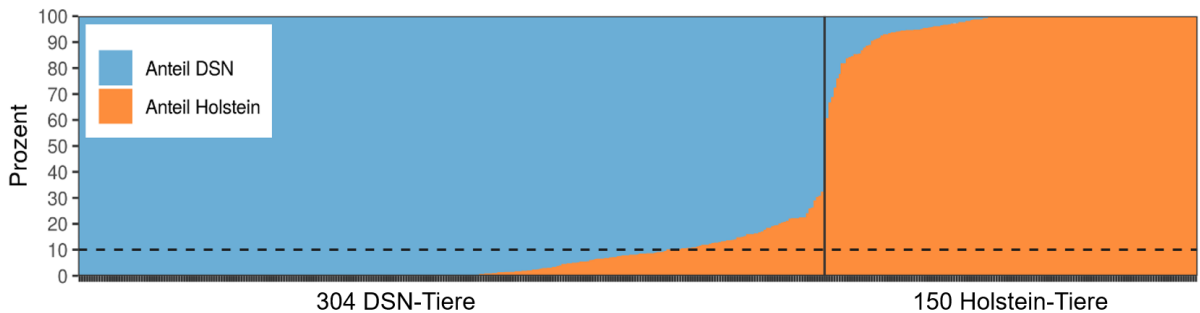


Abbildung 13: Vergleich des DSN- und Holstein-Anteils in 304 DSN- und 150 Holstein-Tieren. Der maximal zulässige Holstein-Anteil von 10% in reinen DSN-Tieren ist als gestrichelte Linie eingezeichnet.

Sequenzinformationen wurden auch benutzt, um die genomische Inzucht und genetische Diversität in den Rassen DSN und Holstein zu berechnen. Die Ergebnisse zeigen, dass DSN im Vergleich zu Holstein eine niedrigere genomische Inzucht (basierend auf dem Überschuss der Homozygotie und auch als Inzuchtkoeffizienten F_{ROH}) und eine höhere Diversität (basierend auf der Nukleotiddiversität und Beobachteten Heterozygotie) aufweist, was die sehr gute Zuchtarbeit im DSN-Zuchtverein belegt (Tabelle 14). Dies unterstreicht die Effektivität und das Engagement der Züchter bei der Bewahrung der genetischen Integrität und Vielfalt dieser spezifischen Rasse.

Unter Benutzung der Sequenzvarianten von 30 DSN-Tieren wurden im 1. Jahr des Projekts 2016 die Allelfrequenzen in DSN und im Vergleich zu Holstein untersucht. Genomische Regionen, in denen die Allelfrequenzen extrem unterschiedlich sind können auf Allele hinweisen, die mit DSN-typischen Eigenschaften assoziiert sind, die für ihre positiven oder negativen Eigenschaften verantwortlich sind. Sie können jedoch ihre Ursache auch in zufälliger genetischer Drift haben. Die Ergebnisse dazu werden hier nicht gezeigt, da im Verlauf des DSN-Projekts GWAS benutzt wurden, um potentielle Sequenzvarianten und Gene zu finden, die mit bestimmten Merkmalen assoziiert sind.

Tabelle 14: Vergleich der genomischen Inzucht und genetischen Diversität in DSN und Holstein.

	302 DSN	150 Holstein
Genomische Inzucht (%)		
Überschuss der Homozygotie (F_{Hom})	2,7 (2,7)	6,4 (7,0)
Inzuchtkoeffizient (F_{RoH}) > 1 Mb	4,8 (2,5)	8,2 (3,5)
> 2 Mb	2,9 (1,9)	5,4 (2,8)
> 4 Mb	1,1 (1,0)	2,5 (1,7)
Genetische Diversität (%)		
Nukleotiddiversität (π_{total})	0,152 (0,012)	0,148 (0,013)
Beobachtete Heterozygotie (H_o)	22,4 (0,9)	21,2 (1,9)

Die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse, Inzucht und Diversität wurden wie folgt publiziert:

- Neumann, G. B., Korcuć, P., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2023). Genomic diversity and relationship analyses of endangered German Black Pied cattle (DSN) to 68 other taurine breeds based on whole-genome sequencing. *Frontiers in Genetics*, 13, 993959.

4.5.3 Charakterisierung von Kaseinvarianten

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ausprägung der Kaseingene und der dazugehörigen Proteine in Rindern die Menge und Zusammensetzung der Milch beeinflusst (Caroli et al., 2009). Die Kaseinvarianten können die Verarbeitungseigenschaften von Milch zu Käse und die Bekömmlichkeit von Milch in Bezug auf die menschliche Verdauung verändern. Da bisher keine genomischen Daten von DSN vorlagen, wurde untersucht, welche Kaseinvarianten in DSN vorhanden sind und ob diese Informationen genutzt werden können, um die Milchleistung und Zusammensetzung in DSN zu verbessern.

Um die Frequenzen der Kaseinvarianten in DSN im Vergleich zu anderen Rinderrassen zu untersuchen, wurden die Sequenzdaten innerhalb der Kaseingene von den zu diesem Zeitpunkt der Studie im Jahr 2019 vorhandenen 30 DSN-Tieren und weiteren 13 Rinderrassen aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt genutzt. Die untersuchten Kaseingene *CSN1S1* (α -Kaseine S1), *CSN2* (β -Kasein), *CSN1S2* (α -Kaseine S2), und *CSN3* (κ -Kasein) bilden auf dem Chromosom 6 ein sogenanntes Kasein-Cluster. Durch ihre enge Nachbarschaft auf dem Chromosom werden die Varianten dieser Kaseingene in der Regel gemeinsam vererbt (als Haplotyp). Deshalb haben wir die Frequenzen der Haplotypen zwischen den Rinderrassen verglichen.

Insgesamt wurden nur wenige der in der Literatur bekannten Proteinvarianten in den 30 sequenzierten DSN-Tieren gefunden. Dieser Teil der Studie wurde allerdings nochmal im Jahr 2022 mit den insgesamt 304 sequenzierten DSN-Tieren wiederholt, um die Frequenzen der Sequenzvarianten genauer zu erfassen.

Aus der Analyse mit 304 DSN resultierten folgende Ergebnisse:

- α -Kaseine S1 und S2: Es gibt keine Sequenzvariation in diesen Genen, d.h. die Proteinvariante B war im α -Kaseine S1 (*CSN1S1*B*) fixiert und die Proteinvariante A war im α -Kaseine S2 (*CSN1S1*A*) fixiert.
- β -Kasein: Basierend auf den Sequenzvarianten konnten 3 Proteinvarianten in unterschiedlichen Frequenzen identifiziert werden: A¹ (83,5%), A² (16,5%) und I (0,7%). Dabei wurde die Proteinvariante A1 mit erhöhtem Risiko für Diabetes und Herzerkrankungen und mit anderen negativen Auswirkungen auf die Verdauung in Verbindung gebracht. Aus der

Kaseinvariante A1 kann während der Verdauung sowie während der Fermentation zu Joghurt und Käse ein spezielles Peptid (Betacasomorphin-7, kurz BCM7) mit bioaktiver Wirkung entstehen (Abbildung 14). Bei der Kaseinvariante A2 hingegen entsteht dieses Peptid nicht, so dass der A2-Variante nachgesagt wird, dass sie besser für die menschliche Gesundheit und die Käseproduktion sei. Die Kaseinvariante I wurde erstmals in DSN identifiziert, auch wenn nur in geringer Frequenz von 0,07%.

- κ-Kasein: Basierend auf den Sequenzvarianten konnten 3 Proteinvarianten in unterschiedlichen Frequenzen identifiziert werden: A (84,9%), B (11,5%) und E (3,1%). Demnach kommt die Proteinvariante A mit der häufigsten Frequenz vor, die Proteinvariante B ist vorteilhaft für die Käseproduktion und die Proteinvariante E ist negativ für die Käseproduktion und kommt auch nur selten vor.

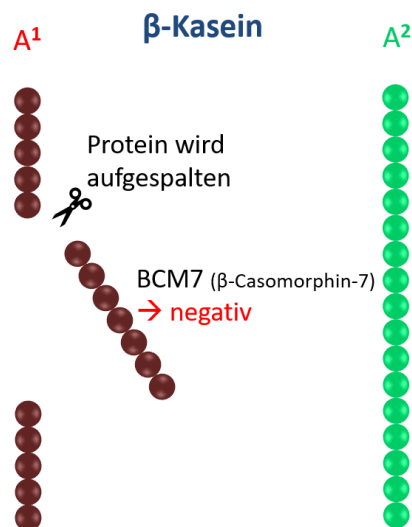


Abbildung 14: Die A1- und A2- Variante von β-Kasein. Die Kaseinvariante β-Kasein*A1 kann während der Verdauung oder der Fermentation zu Joghurt und Käse aufgespalten werden, wobei das Peptid BCM7 (Betacasomorphin-7) entsteht.

Die Sequenzvarianten im gesamten Kasein-Cluster wurden vergleichend zwischen den 30 DSN-Tieren und anderen Rassen aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt untersucht. Dadurch wurden in den Introns der Kaseingene sechs neue Sequenzvarianten identifiziert, deren Funktion bislang unbekannt ist. Die DSN-Allele sind am ähnlichsten zu denen der Rinderrasse Danish Red, Holstein und Hereford (Abbildung 15). Dies unterstreicht die enge Verwandtschaft dieser Rassen. Auch bezüglich der Frequenzen der Proteinvarianten (Haplotypen) sind DSN und Danish Red am ähnlichsten zueinander (Abbildung 16). Jersey, Normande und Montebéliarde weisen eine komplett andere Verteilung der Haplotyp-Frequenzen auf DNA- und Proteinebene auf.

Diese Information könnte benutzt werden, um die vorteilhafte Kaseinvariante in DSN züchterisch anzureichern.

Diese Studie wurde im November 2019 veröffentlicht:

- Meier, S., Korcuć, P., Arends, D., & Brockmann, G. A. (2019). DNA sequence variants and protein haplotypes of casein genes in German Black Pied cattle (DSN). *Frontiers in Genetics*, 10, 1129.

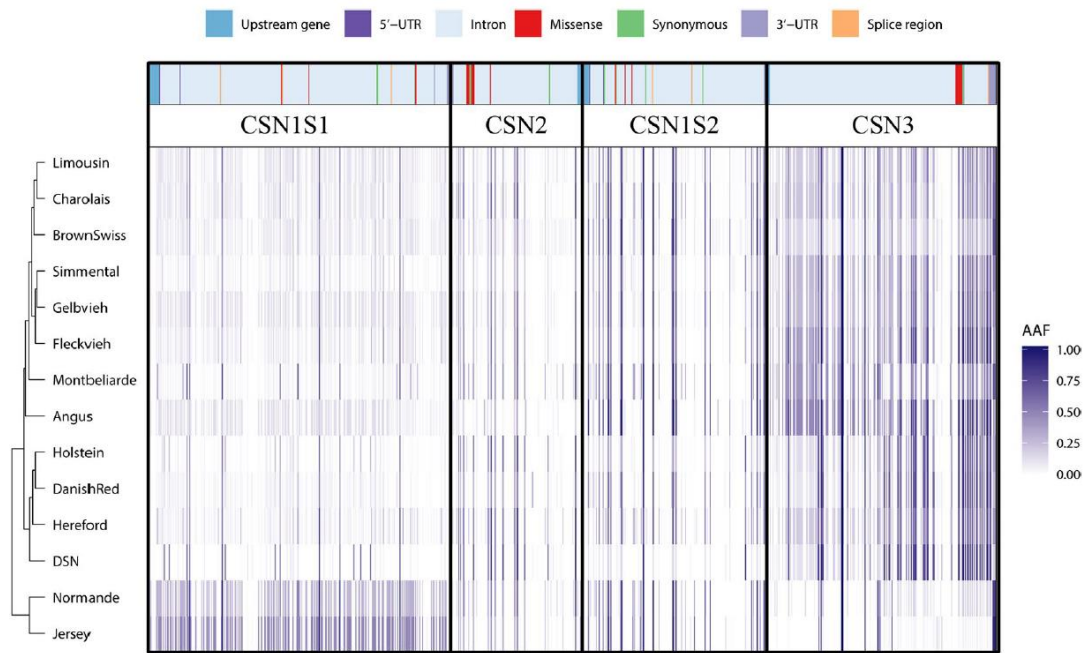


Abbildung 15: Cluster der vorkommenden Allelvarianten für die einzelnen Rinderrassen innerhalb der Kaseingene. Die genomischen Regionen (Upstream des Gens, 5'UTR, Intron, 3'UTR, Splice Region), in denen die Sequenzvarianten auftreten bzw. die Art der Sequenzvariante innerhalb eines Exons (Missense, Synonym) sind ebenfalls dargestellt.

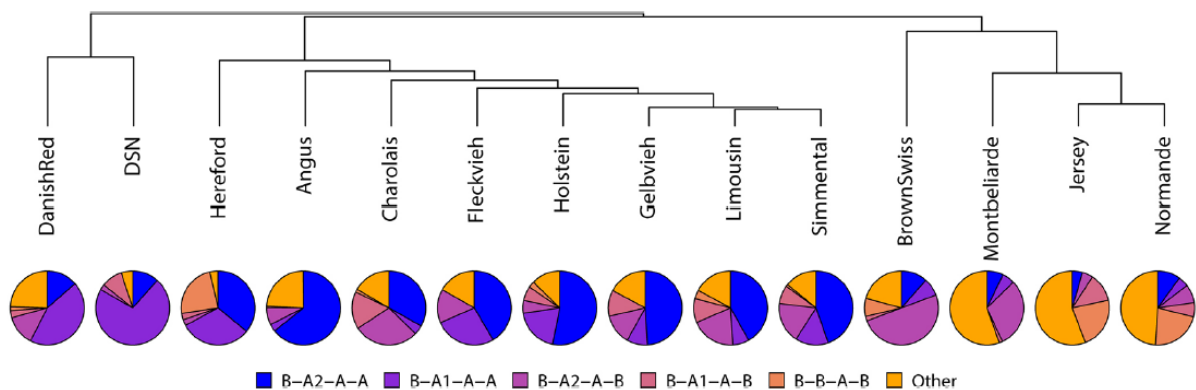


Abbildung 16: Haplotypen der Kaseinproteine CSN1S1- CSN2- CSN1S2- CSN3 (Reihenfolge von Kaseinvarianten wie sie nebeneinander auf einem Chromosom liegen). Die Buchstabenabfolge B-A1/A2- A- A/B gibt die verschiedenen Varianten der Kaseinproteine an. Die Verteilung der Haplotypen unterscheidet sich zwischen den Rassen. Drei Cluster sind erkennbar (1. DSN und Danish Red, 2. Brown Swiss, Montbéliard, Jersey und Normande und 3. alle übrigen Rassen), die ähnliche Haplotyp-Verteilungen aufweisen.

4.5.4 Hornlosigkeit

Die Hornlosigkeit bei Rindern ist ein Merkmal, das sowohl aus Tierwohl- als auch aus praktischen Gründen in der Viehzucht zunehmend an Bedeutung gewinnt. Traditionell wurden Rinderhörner oft entfernt. Die Züchtung von hornlosen Rindern bietet eine alternative Lösung, die das Wohlbefinden der Tiere erhöht und die Sicherheit in der Viehhaltung verbessert.

Die genetische Basis der Hornlosigkeit wird durch bestimmte Gene bestimmt, die in der DNA der Tiere verankert sind. Durch GWAS wurden genomische Regionen identifiziert, die die Hornlosigkeit vererben

(Aldersey et al., 2020). Der Locus für Hornlosigkeit beim Rind („Polled locus“) befindet sich demnach auf Chromosom 1 zwischen 2,4 und 2,8 Mb. Dabei sind verschiedene Mutationen mit komplexen INDEL-Events für Hornlosigkeit gefunden worden. Die bekanntesten Loci sind der „Polled Celtic“, der bei mehreren europäischen Rinderrassen aus keltischen Gebieten festgestellt wurde, und der „Polled Friesian“, der zuerst in Holstein Friesian Rindern identifiziert wurde (Abbildung 17).

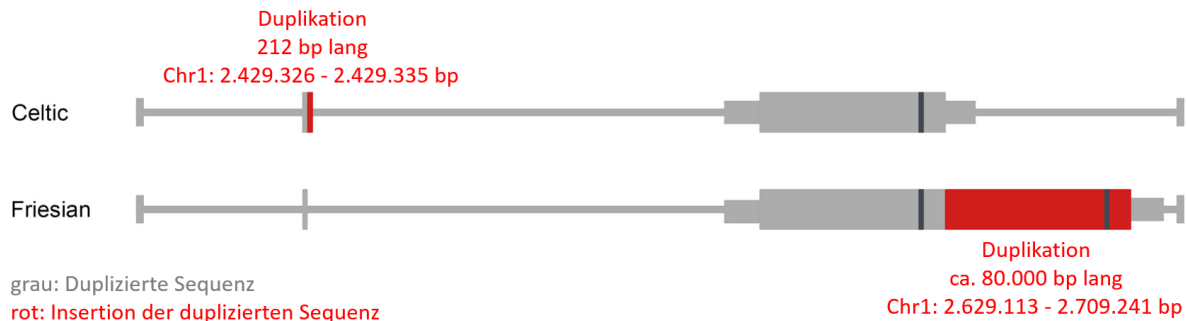


Abbildung 17: Mutationen für Hornlosigkeit auf Chromosom 1. Bei der „Polled Celtic“ handelt es sich um eine 212 bp lange Sequenz, die dupliziert wurde und eine 10 bp lange Sequenz im Genom ersetzt. Beim „Polled Friesian“ handelt es sich um eine ca. 80.000 bp große Duplikation, die ca. 200.000 bp hinter dem „Polled Celtic“ liegt.

Da es sich bei beiden Mutationen um lange strukturelle Varianten handelt, können diese nur schlecht mit Gesamtgenomsequenzdaten, die aus kurzer Read-Länge stammen, nachgeprüft werden. Daher werden einzelne SNPs benutzt, die mit diesen Mutationen gekoppelt sind, um die „Polled Celtic“ oder „Polled Friesian“ Mutationen zu identifizieren. Aktuell gibt es 10 SNPs (Tabelle 15), die mit diesen Mutationen gekoppelt und deshalb in derzeitigen Tests auf Hornlosigkeit (poll testing assay) inkludiert sind (Randhawa et al., 2020).

Tabelle 15: SNPs zur Identifikation der Polled-Allele in keltischen Rassen oder Holstein Friesian.

Chr	Position	rsID	Polled Variante
1	2.372.456	rs801127025	Polled Friesian
1	2.377.687	rs799187101	Polled Friesian
1	2.378.745	rs800947704	Polled Friesian
1	2.407.338	rs798116945	Polled Friesian
1	2.429.319	rs383143898	Polled Celtic
1	2.486.811	rs799403053	Polled Friesian
1	2.491.161	rs210350155	Polled Friesian
1	2.578.598	rs797088784	Polled Friesian
1	2.629.115	rs800767839	Polled Friesian
1	2.748.715	rs799920960	Polled Friesian

Da die „Polled“-Mutationen dominant vererbt wird, reicht ein Allel aus, damit die Hornlosigkeit bei dem entsprechenden Rind vorkommt. Hornlose Tiere wurden in DSN nicht gesehen. Deshalb war auch nicht zu erwarten, dass eins der bekannten Mutationen segregiert. Jedoch können Wechselwirkungen im Genom gelegentlich zu Abweichungen führen. Die Untersuchung der Gesamtgenomsequenzdaten von allen 304 DSN-Tieren hat bestätigt, dass diese 10 SNPs in allen Tieren homozygot zum Referenzallel und demnach je zwei Allele für Hörner aufweisen. Das heißt im Umkehrschluss, dass keines der 304 sequenzierten DSN-Tiere eine Mutation bezüglich der Hornlosigkeit trägt. Gelegentlich können aber spontan weitere neue Mutationen entstehen, die zur Hornlosigkeit führen können und es gilt zu beachten, dass die Loci für Hornlosigkeit noch nicht 100%-ig aufgeklärt wurden.

4.5.5 Holstein Haplotyp 5

Gleichermaßen wie bei der Hornlosigkeit wurde das Vorhanden des letalen „Holstein Haplotyp 5“ (HH5) mit Hilfe der Gesamtgenomsequenzdaten in DSN untersucht. Dieser Haplotyp wurde als kausale Ursache für einen vorzeitigen Abbruch der Trächtigkeit in Holstein entdeckt (Schütz et al., 2016). HH5 wird durch eine Deletion von 138 kb verursacht, die sich auf Chromosom 9 bei 93 Mb befindet und nur das Gen *TFB1M* (Dimethyl-Adenosin-Transferase 1) enthält. Auch diese Deletion wurde basierend auf gekoppelten SNPs nicht in DSN gefunden.

4.6 Vorschlag von genetischen Markern

4.6.1 Verbesserung der Wachstums- und Fleischleistungen

In GWAS wurden genetische Marker identifiziert, die signifikant mit verschiedenen Milchleistungsmerkmalen (wie Milchmenge, Fettmenge, Eiweißmenge, Fettgehalt und Eiweißgehalt) bei DSN-Kühen und Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen (wie Geburtsgewicht und Gewicht im Alter von 3 Wochen) bei DSN-Bullen assoziiert sind. Die Effekte der signifikanten Marker haben wir genutzt, um einen genetischen Score (GenScore) zu berechnen, der die Zuchtwertschätzung unterstützt und die Selektion von Tieren mit überlegenen Milchleistungseigenschaften erleichtert. Dieser Ansatz ähnelt der Berechnung des Polygenic Risk Scores (PRS) beim Menschen. Er ersetzt nicht genomische Zuchtwerte.

Für jeden mit einem Merkmal assoziierten SNP wurde ein Effektgrößenwert (β) bestimmt, der eine relative Größe (Abweichung zum normalisierten Mittelwert der untersuchten Population) und eine Richtung (positiv oder negativ) auf das Merkmal hat. Der GenScore für jedes Tier wurde aus der Summe der Geneffekte aller signifikanten Loci für ein Merkmal berechnet. Der Geneffekt bei jedem signifikanten Locus wurde anhand des Top-Markers berechnet, indem die Anzahl (0,1,2) der vorhandenen Allelvariante (Referenz-Allel und alternatives Allele) mit dessen Effektgröße (β absolut) und Richtung des Effektes (+1, -1) multipliziert wurde. Für jeden signifikanten Locus wurde nur ein einzelner SNP (der Top-SNP) als repräsentativer Marker benutzt, um Koppelung der SNPs aufgrund von einem hohen Linkage-Disequilibrium (LD) auszuschließen. LD bezeichnet die Nicht-Zufälligkeit der Assoziation von Allelen an verschiedenen Loci, was bedeutet, dass die Auswahl eines einzelnen SNPs in einem Bereich hoher LD Informationen über benachbarte genetische Variationen liefern kann. Ein höherer GenScore deutet auf eine bessere genetische Prädisposition für hohe Milch- oder Wachstums- und Fleischleistungen hin (Tabelle 16). Dieser GenScore unterstützt die Auswahl von Zuchtbullen und potentiellen Bullenmüttern, um Tiere mit hohem genetischem Potenzial zu identifizieren und gezielt in der Zucht einzusetzen.

Tabelle 16: Top 10 DSN-Kühe des Geburtsjahres 2023 mit den höchsten GenScores für Milchmenge in kg in der 1. Laktation. Die Werte sind Mengenangaben über dem Populationsmittelwert.

ID	Milch kg	Eiweiß kg	Eiweiß %	Fett kg	Fett %	Geburtsgewicht
Kuh Nr.1	492	21.0	0.136	-28.2	1.018	-3.1
Kuh Nr.2	492	2.0	0.196	-20.0	0.228	9.6
Kuh Nr.3	492	27.2	-0.032	-41.4	0.790	-7.0
Kuh Nr.4	492	24.4	0.344	-12.2	1.190	8.5
Kuh Nr.5	492	18.2	0.082	-33.2	0.356	-1.3
Kuh Nr.6	492	4.8	0.178	-28.2	0.004	-3.7
Kuh Nr.7	0	40.6	0.064	-33.2	1.010	-4.3
Kuh Nr.8	0	21.0	0.082	-15.0	1.018	1.4
Kuh Nr.9	0	7.2	-0.102	21.6	0.920	-14.4
Kuh Nr.10	0	24.4	0.344	11.6	1.176	1.6

Die Entwicklung und Anwendung des GenScores basierend auf GWAS-Ergebnissen ist ein Hilfsansatz zur Verbesserung der Milch-, Wachstums- und Fleischleistungsmerkmale solange keine gesicherten genomischen Zuchtwerte berechnet werden können.

4.6.2 Verbesserung anderer Merkmale

In gleicher Weise wurde ein GenScore für die klinische Mastitis entwickelt, da Mastitis eine der häufigsten Krankheiten bei Kühen darstellt. Tiere mit einer höheren genetischen Resistenz gegen Mastitis sind besonders vorteilhaft für die Zucht.

Für die anderen untersuchten Merkmale wäre die Berechnung eines solchen GenScores grundsätzlich möglich, sofern signifikante GWAS-Ergebnisse vorliegen. Für die Nutzung in den Betrieben haben wir jedoch nach Gesprächen mit allen Beteiligten davon abgesehen, GenScores für weitere Merkmale für die Betriebe vorzubereiten. Vielmehr geht es um die Reduktion der Komplexität. Zu viele Selektionsparameter können verwirren und die Zuchtentscheidung im Zuchtverfahren erschweren. Die Konzentration auf Gewichts-, Wachstums- und Fleischleistung war das primäre Ziel des Projekts und wurde erfolgreich erreicht.

4.7 Long-Read Sequenzierung

Mit Long-Read Sequenzierungen können neue bislang nicht sichtbare genetische Marker gefunden werden, die mit den bereits untersuchten Merkmalen zusätzlich assoziiert sein können oder die selbst ursächliche Mutationen für schon identifizierte Effekte sind. Die Long-Read Sequenzierungsdaten der 10 DSN-Tiere lagen vollständig im Juli 2023 vor. Für eine Datenanalyse auf höchstem Niveau des gegenwärtigen Wissens haben wir die Zusammenarbeit mit dem „Long Read Consortium“ gefestigt, in dem wir aktiv an der Etablierung einer Analysestrategie mitarbeiten. Um die strukturellen Varianten (SVs) zu identifizieren, mussten die Sequenzdaten in einer Pipeline prozessiert werden (Abbildung 18).

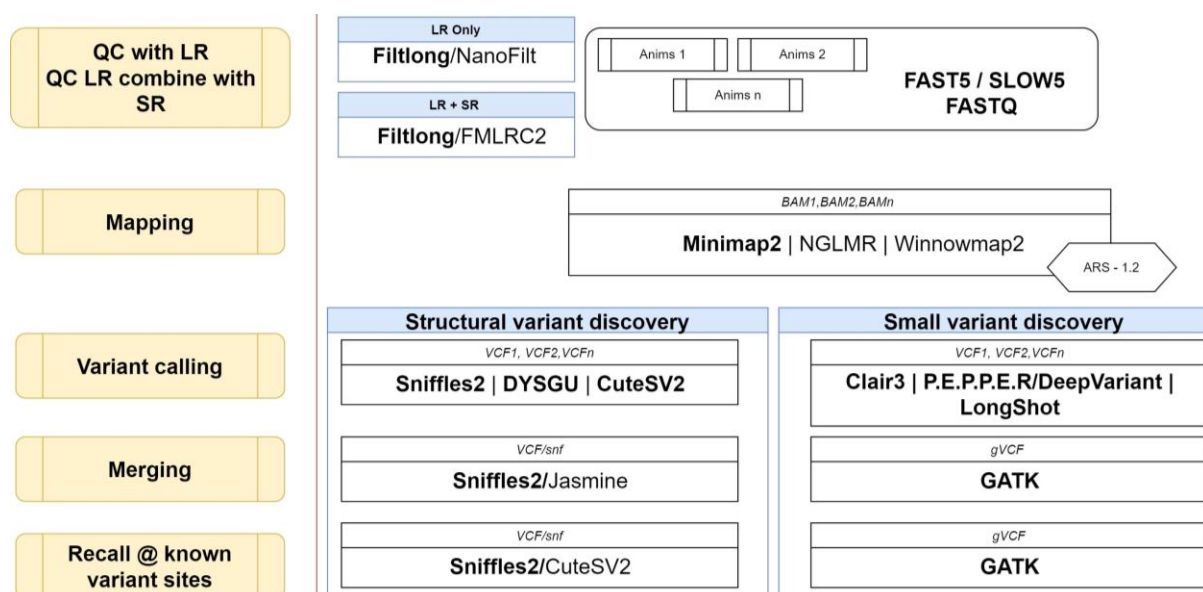


Abbildung 18: Pipeline des Long-Read Consortiums zur Bearbeitung der Long-Read Sequenzierungsdaten.

Die durchschnittliche Länge der Reads aus den Long-Read Sequenzierungsdaten für unsere 10 DSN-Tiere ist mit 15 kb sehr lang und somit für die Detektion von SVs wie langen Deletionen, Insertionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen geeignet (Abbildung 19). Um sicherzustellen, dass die Long-Read Sequenzdaten von hoher Qualität sind, wurden Validierungsschritte durchgeführt. Dabei wurde die Long-Read Sequenzierungsdaten zunächst benutzt, um SNPs zu identifizieren. Es waren 5 DSN-Tiere vorhanden, die sowohl mit Long-Reads als auch Short-Reads sequenziert wurden. Die Konkordanz zwischen den identifizierten SNPs aus Long-Reads und Short-Reads betrug 96.0%, was darauf schließen lässt, dass die Long-Read Sequenzdaten zuverlässig sind.

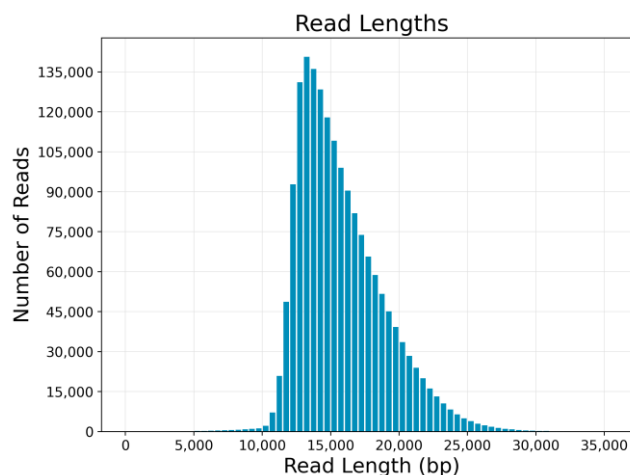


Abbildung 19: Übersicht zu den Read-Längen aus der Long-Read Sequenzierung.

Mit den Long-Read Sequenzdaten konnten wir insgesamt 44.337 SVs identifizieren, die auf Qualität getestet wurden ($CR \geq 90\%$; PASS). Diese setzen sich zusammen aus 22.957 Insertionen, 20.647 Deletionen, 129 Duplikationen, 192 Inversionen und 412 Translokationen. Die meisten SVs sind kurz, jedoch wurden auch Deletionen, Duplikationen und Inversionen mit einer Länge von über 20 kb identifiziert (Abbildung 20). 25.214 SVs haben eine Länge >150 bp. Diese setzen sich zusammen aus 13.285 Insertionen, 11.612 Deletionen, 129 Duplikationen und 188 Inversionen. Die identifizierten SVs werden in Form von GVCF- und SNF-Dateien an das Long-Read Consortium übergeben, wo sie zusammen mit den SVs von anderen Rassen prozessiert werden, um eine Datenbank mit den SVs vieler verschiedener Rinderrassen zu generieren. Die Übergabe erfolgt, sobald die Richtlinien für die Identifizierung der SVs und Datenübermittlung im Consortium geklärt sind.

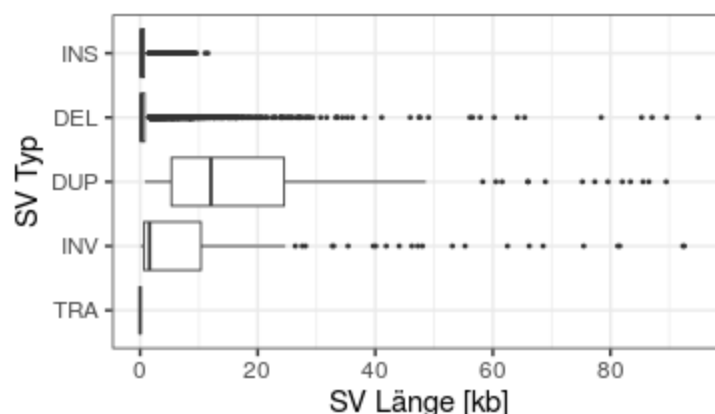


Abbildung 20: Strukturelle Varianten in Bezug zu ihrer Länge in Kb. Es wurden 22.957 Insertionen (INS), 20.647 Deletionen (DEL), 129 Duplikationen (DUP), 192 Inversionen (INV) und 412 Translokationen (TRA) gefunden.

Anschließend erfolgt die Imputation der strukturellen Varianten, die mithilfe von Long-Read-Sequenzdaten identifiziert wurden, in die DSN-Population. Dies ermöglicht die Durchführung genomweiter Assoziationsstudien unter Verwendung dieser SVs. Die weltweit führenden Forschungsgruppen haben bereits mehrfach gezeigt, dass solch drastische strukturelle DNA-Varianten die Ursache für Unterschiede in Merkmalen sein können.

Unser Ziel ist es, SVs in der DSN-Population zu identifizieren, die kausale Mutationen (SNPs und SVs) für bereits nachgewiesene genetische Assoziationen zwischen Genotyp und Merkmalen sein können. Diese Merkmale umfassen unter anderem die Milchmenge und -zusammensetzung, Mastitis, Endoparasitenbefall und Fruchtbarkeit. Die Identifizierung ursächlichen Mutationen ermöglicht eine direkte Selektion auf genetische Varianten, was die Genauigkeit der genomischen Selektion signifikant erhöht. Dies ist besonders wichtig für kleine Populationen, in der die Größe der Lernstichprobe immer relativ klein bleibt. Es ist erwähnenswert, dass diese Arbeiten über das Projektende hinaus weiterverfolgt werden.

4.8 Wissenstransfer und Praxisseminare

Von zentraler Bedeutung in diesem Projekt war das Ziel, einen effizienten Wissenstransfer mit den an dem Projekt beteiligten Partnern zu gewährleisten. Einerseits sollte hierbei über den aktuellen Forschungsstand berichtet und sich ausgetauscht werden, um gemeinsame Interessen zu finden und damit Kooperationsmöglichkeiten aufzuzeigen. Andererseits soll der wissenschaftliche Austausch mögliche Überschneidungen mit anderen Forschungsprojekten ausschließen. Außerdem sollen die Ergebnisse regelmäßig den Praxisbetrieben vorgestellt, deren Nutzen erläutert und mit ihnen diskutiert werden.

Insgesamt wurden die Projektergebnisse auf 19 Praxisseminaren/Meetings, 11 Konferenzen und 3 Messen präsentiert (Tabelle 17). Hervorheben möchten wir die von der HU Berlin organisierte Veranstaltung, an denen Vertreter der Praxisbetriebe, des Zuchtverbands, des vit, des BLE und internationale Wissenschaftler, die auch an kleinen Populationen arbeiten, teilgenommen haben, um die Erkenntnisse aus diesem und anderen Projekten vorzustellen, zu diskutieren und Expertise auf hohem Niveau zu erlangen. Dabei handelt es sich um die folgenden Veranstaltungen: DSN-Meeting am 13.02.2017, DSN-Symposium am 13.06.2018, Fachgespräch „Erhaltung/Biodiversität in kleinen Nutztierassen“ am 26.10.2021 und DSN-Symposium am 27.10.2021.

Die zahlreichen Wissenstransfermaßnahmen, darunter nationale und internationale Konferenzen, haben wesentlich zur zunehmenden Aufmerksamkeit für die Rasse DSN beigetragen haben. Diese Maßnahmen ermöglichten einen intensiven Austausch von Fachwissen und Erfahrungen, wodurch das Bewusstsein und Interesse an der Rasse sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene gestärkt wurde.

Tabelle 17: Auflistung aller Praxisseminare und Konferenzen.

Veranstaltung, Datum	Beitrag, Zielgruppe
Messe EuroTier 2016, Hannover, 15.-18.11.2016	Beitrag: Prospekte und Poster, Beantwortung von Fragen durch P. Korcuć
DSN Nachzuchtbesichtigung und Mitgliederversammlung, Agrargenossenschaft Gräfendorf, 1.12.2016	Beitrag: Präsentation, Prospekte und Poster zu dem Projektvorhaben und ersten Ergebnissen von P. Korcuć (Ein Poster wurde im Betrieb aufgehängt.) Teilnehmer: Betriebsleiter der am Projekt beteiligten DSN Agrarbetriebe, Mitarbeiter der RBB und der HU Berlin (AG Brockmann).

Internationale Grüne Woche, Berlin, 20.-29.01.2017	Beitrag: Prospekte lagen am Stand der RBB aus. Zielgruppe: Messebesucher
DSN Meeting, Humboldt-Universität zu Berlin, 13.02.2017	Dieses Meeting wurde von der HU Berlin organisiert. Beitrag: Präsentation des DSN-Projekts Zielgruppe: Mitarbeiter vom RBB, vit, der HU Berlin (AG Brockmann) und der Universität Gießen (AG König)
45 Jahre DSN-Genreservezucht in Brandenburg, Gräfendorf, 23.06.2017	Beitrag: Prospekte Zielgruppe: Die am Projekt beteiligten Agrarbetriebe, RBB, Veranstalter und Besucher der Tierschau
9. Frankenhausener Züchtertagung, Hessische Staatsdomäne Frankenhausen, 03.- 04.11.2017	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu derzeitigen Forschungsstand des DSN-Projekts und Prospekte Zielgruppe: Mitarbeiter diverser DSN-Agrarbetriebe aus Hessen, Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern, aber auch Mitarbeiter von Zuchtverbänden (z.B. RBB) und von Hochschulen/ Universitäten
DSN Nachzuchtbesichtigung und Mitgliederversammlung, Agrargenossenschaft Gräfendorf, 22.11.2017	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu derzeitigen Forschungsstand des DSN-Projekts Zielgruppe: Vertreter der am Projekt beteiligten DSN-Agrarbetriebe, Mitarbeiter der RBB und der AG Brockmann
WCGALP 2018, Auckland, Neuseeland, 11.-16.02.2018	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć über die optimale Imputationsstrategien Zielgruppe: Internationale Wissenschaftler
DSN-Symposium, Humboldt Universität Berlin, AG Brockmann, 13.06.2018	Dieses Meeting wurde von der HU Berlin organisiert. Beitrag: Präsentation der Ergebnisse innerhalb des DSN-Projekts durch P. Korcuć, S. Meier, dreier Bachelorarbeiten und C. Buchholz (RBB) Zielgruppe: Mitarbeiter der RBB, vit, HU Berlin, Uni Gießen, des Ministeriums für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Landwirtschaft, der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung und Vertreter aller beteiligten Agrarbetriebe. Bei dem DSN-Symposium wurde mit allen Teilnehmenden angeregt diskutiert.
DSN Nachzuchtbesichtigung und Mitgliederversammlung, Agrargenossenschaft Gräfendorf, 30.11.2018	Beitrag: Präsentation von S. Meier zu Kaseinvarianten und Abstammungsrichtigkeit in DSN Zielgruppe: Vertreter der am Projekt beteiligten DSN-Agrarbetriebe, Mitarbeiter der RBB und der AG Brockmann
DSN Nachzuchtbesichtigung und Mitgliederversammlung, Gräfendorf, 6.12.2019	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć und S. Meier zu derzeitigen Forschungsstand des DSN-Projekts Zielgruppe: Vertreter der am Projekt beteiligten DSN-Agrarbetriebe, Mitarbeiter der RBB und der AG Brockmann
2020	Tagungen (DGfZ/GfT-Vortragstagung 2020, Internationalen Kongress für Rind und Schwein) und Praxisseminare (DSN-Nachzuchtbesichtigung und die DSN Mitgliederversammlung) wurden aufgrund der Corona-Pandemie abgesagt.
DSN-Projekttreffen, RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg, Groß Kreutz, 12.04.2021	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu derzeitigen Forschungsstand des DSN-Projekts Zielgruppe: Vertreter der HU Berlin (G.A. Brockmann), der RBB (C. Buchholz, M. Thiele), der DSN-Betriebe und des Vereins Genreserve DSN e.V. (M. Jänsch und M. Hartmann)
ISAG 2021, Online Konferenz, 26.-30.07.2021	Beitrag: Posterpräsentation Zielgruppe: Internationale Wissenschaftler

DSN-Nachzuchtbesichtigung, Agrargenossenschaft Gräfendorf, 3.08.2021	Beitrag: nur Teilnahme Zielgruppe: Vertreter der HU Berlin (U. Müller, P. Korcuć), der RBB (C. Buchholz, M. Thiele), der DSN-Betriebe und des Vereins Genreserve DSN
EAAP 2021, Davos, Schweiz, 30.08-03.09.2021	Beitrag: Vortrag zum DSN-spezifischen SNP-Chip von G. B. Neumann Zielgruppe: Internationale Wissenschaftler
BMEL Kongress zur Zucht von Rind und Schwein, Berlin, 6.-7.10.2021	Beitrag: Nur Teilnahme Zielgruppe: Politiker, Professoren, und Wissenschaftler
Treffen Rotbunt DN (RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg, Groß Kreutz, 14.10.2021	Beitrag: Präsentation mit Übersicht über DSN-Projekt von P. Korcuć Zielgruppe: Vertreter der HU Berlin (G.A. Brockmann, P. Korcuć), der RBB (C. Buchholz, M. Thiele), der vit (D. Segelke), der RSH (H. Kahle), der Agrargen. Gräfendorf (M. Jänsch, M. Hartmann)
Fachgespräch „Erhaltung/Biodiversität in kleinen Nutztierassen“, Online Meeting, 26.10.2021	Dieses Online-Meeting wurde von der HU Berlin organisiert. Beitrag: Moderation des Fachgesprächs durch G.A. Brockmann, Präsentation des DSN-Projekts durch P. Korcuć und ausführliche Diskussion über die Züchtung in kleinen Rinderpopulationen Zielgruppe: Vertreter der HU Berlin (G.A. Brockmann, P. Korcuć) und des BLE (J. Bremond), verschiedene Wissenschaftler, die an kleinen Rinderpopulationen forschen und Interessierte aus diversen Arbeitsgruppen
DSN-Symposium, RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg, Groß Kreutz, 27.10.2021	Dieses Meeting wurde von der HU Berlin organisiert. Beitrag: Moderation des Fachgesprächs durch G.A. Brockmann, Präsentation des DSN-Projekts durch P. Korcuć und ausführliche Diskussion über die Züchtung in kleinen Rinderpopulationen Zielgruppe: Vertreter der HU Berlin (G.A. Brockmann, P. Korcuć, U. Müller, G.B. Neumann), der RBB (C. Buchholz, M. Thiele), von DSN-Betrieben und des Vereins Genreserve DSN (Agrargen. Gräfendorf, Züllsdorf und Havelstrand), des BLE (J. Bremond)
50 Jahre Genreservezucht in Brandenburg, DSN-Fachtagung, Herzberg, 16.06.2022	Beitrag: Präsentation „Was lesen wir aus dem Genom der DSN?“ von G.A. Brockmann Zielgruppe: Vertreter der am Projekt beteiligten DSN-Agrarbetriebe, Mitarbeiter der RBB und der AG Brockmann
WCGALP 2022, Rotterdam, Niederlande, 3.-8.07.2022	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu verbesserten GWAS mit DSN200K-Chip Zielgruppe: International Wissenschaftler
DGFZ- und GfT- Vortragstagung 2022, Kiel, 21.-22.09.2022	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu verbesserten GWAS mit DSN200K-Chip Zielgruppe: Deutsche Wissenschaftler und Tierzüchter
BMEL Kongress zur Zucht und Erhaltung alter und bedrohter einheimischer Nutztierassen, Bonn, 26.-28.09.2022	Beitrag: Präsentation „DSN: Informationen der Genanalyse, neue Merkmale & Zuchtwertschätzung, praktische Zuchtarbeit“, von G.A. Brockmann, S. König (Universität Gießen) und C. Buchholz (RBB) Zielgruppe: Politiker, Professoren, Tierzüchter, Vertreter von Betrieben
DVG-Vet-Congress 2022, Berlin, 13.-15.10.2022	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu verbesserten GWAS mit DSN200K-Chip Zielgruppe: Tiermediziner
Messe EuroTier 2022, Hannover, 16.11.2022	Beitrag: Präsentation von G.A. Brockmann zu „DSN - Eine alte und bedrohte Rinderrasse im Fokus der Wissenschaft“ Zielgruppe: Messebesucher
Zoom Meeting RBB, 16.01.2023	Beitrag: Besprechung des Fortlaufens der DSN-Projekt Typisierung Teilnehmer: Vertreter von RBB (C. Buchholz), vit (R. Reents), IfN (A. Wagener) und HU Berlin (G.A. Brockmann, P. Korcuć, G.B. Neumann)

RBB Meeting, Groß Kreutz, mit Dr. Jan-Hendrik Osmers, 31.05.2023	Beitrag: Übersicht über DSN-Projekt und Besprechung des Fortlaufens des Projekts nach Projektende Teilnehmer: J.-H. Osmers, G.A. Brockmann, P. Korcuć, Vertreter von RBB und HU Berlin
Arche Warder, Warder, 21.07.2023	Beitrag: Präsentation des DSN-Projekts „Was lesen wir aus dem Genom der DSN?“, G.A. Brockmann Zielgruppe: Mitarbeiter der Arche Warder, Besucher
ISAG 2023, Kapstadt, Südafrika 3.-7.07.2023	Beitrag: Poster über Ergebnisse aus GWAS mit Milch „New loci for milk production traits in German Black Pied (DSN) cattle using whole-genome sequencing data“ von P. Korcuć Beitrag: Poster über Diversität in DSN “High genetic diversity is maintained in the endangered breed of German Black Pied cattle (DSN)“, G.A. Brockmann Zielgruppe: Internationale Wissenschaftler Teilnahme: P. Korcuć, G.A. Brockmann
EAAP 2023 Lyon, Frankreich, 26.08.-2.09.2023	Beitrag: Präsentation über funktionelle Information der Sequenzdaten von DSN „Functional information embedded in the unmapped short reads of whole-genome sequencing“, G.B. Neumann Zielgruppe: Internationale Wissenschaftler Teilnahme: G.B. Neumann, G.A. Brockmann
WRC 2023, Berlin, Deutschland, 9.-11.09.2023	Beitrag: Poster über Erhaltung gefährdeter Rassen wie DSN „Conservation measures for endangered livestock populations: A case study in Deutsches Schwarzbuntes Niederungsrind (DSN)“, G.B. Neumann Zielgruppe: International Wissenschaftler
DGFZ- und GfT- Vortragstagung 2023, Kiel, 13.-14.09.2023	Beitrag: Präsentation von P. Korcuć zu GWAS mit Milchleistungsdaten „Neue Loci für Milchproduktionsmerkmale beim Deutschen Schwarzbunten Niederungsrind (DSN) basierend auf Gesamtgenomsequenzdaten“, P. Korcuć Zielgruppe: Deutsche Wissenschaftler und Tierzüchter Teilnahme: G.A. Brockmann, G.B. Neumann, P. Korcuć
Meeting RBB, 14.11.2023	Übersicht über DSN-Projekt und Besprechung des Fortlaufens des Projekts nach Projektende Teilnahme: J.-H. Osmers, M. Thiele, P. Korcuć, G.A. Brockmann
DSN-Nachzuchtbesichtigung und Mitgliederversammlung, Agrargenossenschaft Gräfendorf, 8.11.2023	Beitrag: Präsentation der Projektergebnisse, Diskussion des Wissenstransfers, P. Korcuć, U. Müller, G.A. Brockmann Teilnehmer: Vertreter der HU Berlin (U. Müller, P. Korcuć, G.A. Brockmann), der RBB (J.-H. Osmers, M. Thiele), der DSN-Betriebe und des Vereins Genreserve DSN

Die Veröffentlichungen, die im Rahmen des DSN-Projekts in nationalen und internationalen Fachzeitschriften gemacht wurden, sind unter Abschnitt 10 „Übersicht aller im Berichtszeitraum realisierten Veröffentlichungen zum Projekt, bisherige geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse“ gelistet.

5 Diskussion der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

5.1 Aufbau der Gewebe-, Phänotypen- und Genotypen-Datenbanken

Das Ziel des Projekts wurde erfolgreich erreicht. Innerhalb des Projektzeitraums konnten wir insgesamt 6.075 Proben sammeln, daraus die DNA isolieren und mittels verschiedener Techniken genotypisieren. Die Proben und Daten sind in folgenden Banken abgelegt:

Gewebeproben:	HU Berlin, IfN Schönow
DNA:	HU Berlin, IfN Schönow
SNP-Chip-Genotypen:	HU Berlin, vit
Genotypen auf Gesamtgenom imputiert:	HU Berlin
Sequenzdaten:	HU Berlin, vit
Phänotypen:	HU Berlin, vit

Die methodische Vielfalt hat unsere Forschung und den Erkenntnisgewinn maßgeblich bereichert und ermöglicht, ein breites Spektrum an genetischen Informationen zu erfassen. Allerdings stellte das Zusammenführen der Daten aus den verschiedenen Techniken sowohl hinsichtlich der Datenanalyse als auch der Integration in die Datenbanken von vit eine Herausforderung dar. Im vit werden die Daten für die Abstammungskontrolle benutzt und können vom Zuchtverband RBB und den landwirtschaftlichen Betrieben eingesehen werden.

Durch die im Projektzeitraum generierten Gesamtgenomsequenzdaten konnten die Daten aus verschiedenen Typisierungstechniken sinnvoll zusammengeführt und anschließend z.B. für genomweite Assoziationsstudien genutzt werden. Die Benutzung weniger unterschiedlicher SNP-Chips zur Genotypisierung ist für zukünftige Projekte erstrebenswert.

In Bezug auf die Übermittlung der Genotypen an vit war die Verwendung des Eurogenomics EuroG MD Chips zur Genotypisierung der DSN-Tiere ein geeigneter Lösungsansatz, da dieser SNP-Chip routinemäßig für die Genotypisierung der Holstein-Population verwendet wird. Durch den breiten Einsatz ist dieser Chip derzeit die kostengünstigste Genotypisierungsoption. Zudem ist durch die bestehende Routine eine schnelle Datenübermittlung an vit und in der Folge auch an den Zuchtverband RBB und die landwirtschaftlichen Betriebe gesichert.

Die Sequenzierung der DSN und die Veröffentlichung der Sequenzdaten im 1.000-Bullengenom-Projekt erlaubte uns den Zugriff auf Gesamtgenomsequenzdaten von über 5.000 Rindern aus über 50 verschiedenen Rinderrassen. Diese Daten aus dem 1.000-Bullengenom-Projekt wurden für die Imputationsstudie, vergleichende Analysen zwischen DSN und anderen Rassen, insbesondere auch Holstein, und auch das Design des DSN200K-Chips verwendet.

Eine weitere Herausforderung war die Anpassung der diversen Genotyp-Daten an das aktualisierte Referenzgenom ARS-UCS1.2. Während des Projektzeitraums wurde in 2018 das Rindergenom von der Version UMD3.1 auf die neue Version ARS_UCD1.2 aktualisiert. Dadurch mussten alle bis dato gesammelten Genotyp-Daten an das neue *Bos taurus* Referenzgenom angepasst und bisher generierte Pipelines überarbeitet werden, was zeitaufwendig war, aber erfolgreich durchgeführt wurde.

Bezüglich der Long-Read Sequenzierung war die größte Herausforderung die Isolation hochmolekularer DNA. Dabei konnte nicht auf Standard-Protokolle zur DNA-Isolation aus Gewebe-, Blut- oder Spermaproben zugegriffen werden. Spezielle Protokolle mussten für das Rind verfeinert und angepasst werden. Das von uns etablierte Protokoll wurde mit dem Long-Read Consortium geteilt.

5.2 Imputation auf Gesamtgenomsequenz

Durch die Imputation von genomweiten Sequenzdaten in Genotyp-Daten, die durch SNP-Chips erzeugt wurden, gelingt es, hochdichte genomweite Sequenzdaten für alle genotypisierten Tiere zu erhalten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *in silico* Imputation ein mächtiges Werkzeug darstellt, um genetische Analysen in der Rinderzucht mit hohem Informationsgehalt, effizient und kostengünstig durchzuführen. Der Prozess, bei dem Genotypen von geringer Dichte, wie die vom Illumina BovineSNP50 BeadChip mit etwa 54K SNPs, auf ein Niveau von Gesamtgenomsequenzdaten imputiert werden, ist ein Schlüsselement, um die Anzahl der hoch-informativen Tiere für Analysen wie GWAS effizient zu steigern. Die hohe Imputationsgenauigkeit, eine entscheidende Voraussetzung für die Richtigkeit der imputierten Genotypen, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die von uns durchgeführten umfangreichen Analysen zur Ermittlung der optimalen Imputationsstrategie für unsere DSN-Population zeigten, dass publizierte Strategien nicht uneingeschränkt anwendbar waren. Die von uns durchgeführte Studie offenbarte wichtige Erkenntnisse bezüglich der Imputationsgenauigkeit in Abhängigkeit von dem benutzten Phasing-Verfahren, der Imputationssoftware, der 1- oder 2-Schritt-Imputation, und der Zusammensetzung der Referenzpopulation. Die Erkenntnisse wurden benutzt, um die Genotyp-Daten aus SNP-Chips mit höchster Imputationsgenauigkeit auf Sequenzniveau zu imputieren. Die Lösungsansätze, bieten wertvolle Einblicke für zukünftige Forschungsarbeiten in diesem Bereich.

5.3 Genomweite Assoziationsstudien

Durch das Zusammenführen der Genotypen von diversen SNP-Chips und Gesamtgenomsequenzierung konnten GWAS für Milch-, Wachstums- und Fleischleistung und anderen Phänotypen mit einer deutlich höheren Tieranzahl, einer signifikant höheren Markerdichte und für DSN funktionell bedeutsamen Markern durchgeführt werden. Nur dadurch konnte eine Vielzahl von genomischen Loci mit Einfluss auf die untersuchten Merkmale in DSN identifiziert werden.

Durch die Nutzung von imputierten Gesamtgenomsequenzdaten für die Analyse von Milch-, Wachstums- und Fleischleistung war es uns zudem möglich, die signifikanten Effekte zwischen den Genotypen und den untersuchten Merkmalen auf einzelne Regionen runter zu brechen und bestimmte Gene zu favorisieren, darunter auch die Region bei *MGST1*, die sowohl mit Milchfettgehalt als auch dem Geburtsgewicht assoziiert wurde. Regionen, die den Eiweißgehalt beeinflussten, wurden auf Chromosom 6 bei dem Kaseingen *CSN1S1* und auf Chromosom 10 bei *GNG2* gefunden. Für die Protein- und Fettmenge wurden Regionen auf Chromosom 1 bei *FGF12*, für Milchmenge auf Chromosom 1 bei *HTR3C*, für die Milch- und Proteinmenge auf Chromosom 8 bei *TLE4* und für die Milch- und Fettmenge auf Chromosom 27 bei *TNKS* gefunden. Die Ergebnisse aus der Milchleistung wurden mit einer ausreichend großen Stichprobe von 2.160 DSN-Kühen durchgeführt und sind sicher.

Der bei DSN-Kühen identifizierte *MGST1*-Locus für den Fett- und Proteingehalt wurde übereinstimmend mit bereits veröffentlichten GWAS-Ergebnissen in verschiedenen Holstein-Populationen und diversen anderen Rassen wie Braunvieh, Fleckvieh, Normande und Montbéliarde gefunden (Ning et al., 2017; Pausch et al., 2016; Tribout et al., 2020; Wang et al., 2012). Ebenso wurden wie in DSN auch in zahlreichen unabhängigen Studien in verschiedenen Rassen Assoziationen mit dem Kasein-Gencluster auf Chromosom 6 für den Proteingehalt, dem Locus auf Chromosom 10 für den Proteingehalt, dem Locus auf Chromosom 20 für den Proteingehalt und dem Locus auf Chromosom 21 für die Milchleistung nachgewiesen (Cole et al., 2011; Jiang et al., 2019; Meredith et al., 2012; Nayeri et al., 2016; Pausch et al., 2016; Sanchez et al., 2017; Tribout et al., 2020).

Bezüglich der Wachstums- und Fleischleistung wurden erste Einblicke in mögliche genetische Faktoren geliefert, die das Schlachtkörpergewicht von Bullen beeinflussen könnten. Trotz der relativ geringen Stichprobengröße von nur 565 Bullen konnten wir erfolgreich genomische Loci für Körpergewicht identifizieren. Das sind hier bislang Geburtsgewicht und Gewicht im Alter von 3 Wochen. Dies sind neue Ergebnisse zum Wachstum von Rindern, die wir in DSN gefunden haben und bei anderen Doppelnutzungsrassen noch nicht beschrieben wurden. Wir haben potenzielle Kandidatengene identifiziert, deren Funktion hauptsächlich in der neuronalen Entwicklung liegt. Für die restlichen analysierten Phänotypen der Wachstums- und Fleischleistungen konnten bisher keine assoziierten SNPs identifiziert werden. Eine Erhöhung der Stichprobengröße ist notwendig, um die Signifikanzschwellen für diese Phänotypen zu erreichen. Dafür wurden bereits weitere DSN-Tiere genotypisiert. Die Daten wurden jedoch gerade erst erhalten oder sind noch im Prozessieren, so dass diese Daten noch nicht in Assoziationsanalysen einbezogen werden konnten.

Wachstums- und Fleischleistungsdaten von DSN-Kühen wurden nicht untersucht, da diese nur sehr begrenzt zuverlässige Daten zum Fleischansatz liefern, weil sie aus unterschiedlichen Gründen und in unterschiedlichem Alter zum Schlachten gehen, so dass die Einflussfaktoren auf das Schlachtgewicht mannigfaltig und schwer kontrollierbar sind.

Die mit GWAS für verschiedenen Merkmale identifizierten genomischen Loci können als Basis für Selektionsentscheidungen benutzt werden, um so die Rasse DSN genetisch zu verbessern. Dafür haben wir den GenScore als Werkzeug zur Unterstützung der Entscheidungsfindung entwickelt. Das Vorhandensein von genetischen Markern, die einen Effekt auf Milch-, Wachstums- und Fleischleistung zeigen, können dazu beitragen, zukünftige Zuchtprogramme hinsichtlich des Doppelnutzungscharakters von DSN zu verbessern. So kann zum Beispiel die Selektion auf bevorzugte Allele die Milchleistung und -zusammensetzung und/oder das Geburtsgewicht verbessern. Vorgesehen ist, die identifizierten signifikanten SNPs auf den bestehenden Eurogenomics EuroG MD SNP-Chips zusätzlich zu integrieren, um die signifikant mit Milch-, Wachstums- und Fleischleistung assoziierten SNPs routinemäßig in der Population zu erfassen und zu berücksichtigen. Signifikante SNPs aus den durchgeführten GWAS, die mit Milchleistung, Mastitis, Fruchtbarkeit oder Endoparasitenresistenz assoziiert sind, wurden bei dem Design des DSN-spezifischen SNP-Chips (DSN200K-Chip) berücksichtigt.

Die Erhaltung der Rasse DSN als Zweinutzungsrasse erfordert eine sorgfältige Balance in der Zucht, um sowohl die Milch- als auch die Fleischleistung gleichermaßen zu berücksichtigen. Informationen zu genetischen Markern für Milchproduktion und solche für Fleischansatz können helfen, die Selektion auf den Zweinutzungstyp effizienter zu gestalten ohne dabei die typischen Eigenschaften der DSN-Rinder zu verlieren. Ziel ist es, eine mögliche negative Beeinflussung der Fleischigkeit bei der Selektion auf höhere Milchmenge oder umgekehrt, eine Beeinträchtigung der Milchleistung bei stärkerer Berücksichtigung der Fleischleistung zu vermeiden. Dies entspricht dem angestrebten Zuchtziel der DSN-Betriebe.

Kleine Populationen wie die der DSN stellen besondere Herausforderungen dar, insbesondere wenn es um die Selektion auf günstige Allele geht, während gleichzeitig die genetische Vielfalt bewahrt und Inzucht vermieden werden soll. Dies erfordert eine genaue Planung und Umsetzung von Zuchtstrategien, um die Ausgewogenheit zwischen Milch- und Fleischproduktion zu gewährleisten und gleichzeitig die Gesundheit und Vielfalt der Population zu erhalten.

Die Selektion basierend auf Markern für die anderen untersuchten Merkmale (Mastitis, Exterieurmerkmale, Fruchtbarkeit, Gesundheitsindikatoren, Endoparasitenresistenz) kann äquivalent zu den Verfahren mit den Markern für Milch-, Wachstums- und Fleischleistung erfolgen. Die mögliche

gegenseitige negative Beeinflussung kann bislang jedoch nicht berücksichtigt werden, da dazu noch keine Informationen vorliegen.

Aufgrund der engen Verwandtschaft von DSN zu Holstein, könnten die erarbeiteten Resultate auch in Holstein oder anderen Rassen, die eng mit DSN verwandt sind, Verwendung finden und dort zumindest überprüft werden.

Die Ergebnisse unserer GWAS wurden ausführlich mit Vertretern des Genreserve DSN e.V., RBB und vit diskutiert. Trotz der Herausforderungen, die sich aus der geringen Populationsgröße ergeben, wie die Notwendigkeit, Inzucht zu vermeiden und Zuchtbullen außerhalb der DSN-Population auszuwählen, sind die Möglichkeiten zur Verbesserung und Erhaltung der Milch- und Mastleistung vielversprechend und sollen in der Anpaarungsentscheidung und Auswahl von Jungbullen berücksichtigt werden sowie in der Eingruppierung der weiblichen Jungtiere in genetisch besser und genetisch schlechter veranlagte. Der Zuchtverband und die Betriebe stehen dem aufgeschlossen gegenüber.

5.4 Ökonomischer Zuchtwert

Die Entwicklung eines ökonomischen Zuchtwerts für DSN-Bullen basierend auf dem Modell für Holstein ist neu. Unser Hauptziel war es, den Lebenszeit-Nettozuchtwert an die speziellen Bedürfnisse der DSN-Rasse anzupassen, indem wir neben der Milchleistung und Finesseigenschaften auch die Fleischproduktion berücksichtigten. Für die Erstellung des DSN-Nettozuchtwerts (DSN Net Merit) nutzten wir die geschätzten Zuchtwerte von DSN-Bullen und entwickelten einen zusätzlichen Zuchtwert für Schlachtgewicht und -qualität, basierend auf den Schlachtgewichten der Nachkommen. Ein entscheidender Schritt war die Anpassung der Margengewinne pro Standardabweichung der deutschen Holsteins auf DSN-spezifische Werte.

In dieser Studie machte der DSN Net Beef 3,7% des DSN Net Merit aus. Diese Größenordnung stimmt grob mit den Zuchtstrategien anderer Zweinutzungsrasen in Deutschland überein, die die Berücksichtigung von etwa 5% Fleischmerkmalen im Gesamtverdienstindex von Rassen wie Fleckvieh und Braunvieh empfehlen. Der DSN Net Merit mit dem Teilindex DSN Net Beef, der nicht stark mit bestehenden Zuchtwerten korreliert, ist nützlich, um den Doppelnutzungscharakter der DSN zu erhalten. Jedoch wird die Fleischleistung indirekt als Leistung der Nachkommen berechnet, was möglicherweise nicht die gesamte genetische Varianz des Merkmals widerspiegelt.

Die Milchproduktion trägt zwar am meisten zum DSN Net Merit bei, aber eine ausschließliche Zucht auf einen hohen DSN Net Merit würde nicht zur Erhaltung der Rasse beitragen. Die Zucht einer Zweinutzungsrasse darf sich nicht nur auf die Milchleistungsmerkmale konzentrieren, sie muss auch auf die Menge und Qualität des Fleisches der Jungbullen berücksichtigen. Die letzte Zuchtwertschätzung für Fleischmerkmale (Schlachtkörpergewicht, Schlachtkörperform und Fettklasse) in DSN wurde 2012 durchgeführt. Um in der kleinen DSN-Population Kosten zu sparen, wurde die Zuchtwertschätzung für Fleisch nicht weitergeführt. Seitdem wurde die Rindfleischproduktion unter kontrollierten Halte- und Fütterungsbedingungen nicht mehr systematisch gemessen, so dass es keine Zuchtwerte gibt. Um diese Lücke zu schließen, haben wir den DSN Net Beef als Subindex des DSN Net Merit entwickelt. Das bedeutet, dass eine Selektion auf der Grundlage von DSN Net Merit auch zur Verbesserung von Schlachtkörpergewicht, Fleischigkeit und Fettklasse beitragen kann, also von Merkmalen, die im DSN Net Beef enthalten sind.

Die berechneten DSN Net Merit-Werte wurden erfolgreich an den RBB und die Betriebe weitergegeben. Neben den Vorteilen des DSN Net Merits als Selektionsinstrument ist eine wesentliche

Einschränkung, dass der DSN Net Merit preislichen Schwankungen unterliegt. Das macht eine regelmäßige Neuberechnung erforderlich, die über das Projekt hinaus nicht geleistet werden kann. Trotz dieser Herausforderungen bleibt der DSN Net Merit ein weiterer Schritt in Richtung einer umfassenden und spezifischen Zuchtwertschätzung für Zweinutzungsrasen.

5.5 Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten

Das Vorhandensein der Gesamtgenomsequenzdaten ermöglichte einen umfassenden Einblick in segregierende Sequenzvarianten in DSN. Anhand der Allelfrequenzen und im Vergleich mit anderen Rassen wurden aus den identifizierten Sequenzvarianten DSN-typische Varianten bestimmt. Für alle Sequenzvarianten wurde eine Übersicht zum potentiellen funktionellen Einfluss auf Gentranskripte in der DSN-Population erstellt. Die Gesamtgenomsequenzdaten bieten eine reiche Grundlage für vielfältige genetische Untersuchungen. Es wurden sowohl umfassende Untersuchungen zur Reinrassigkeit, Inzucht und genetischen Diversität der DSN durchgeführt, als auch spezifische Regionen im Detail analysiert. Ein Beispiel hierfür sind die Untersuchungen der Sequenzvarianten in der Kaseinregion auf Chromosom 6, des Locus für Hornlosigkeit auf Chromosom 1, des Holstein Haplotyps 5 auf Chromosom 9 und des Gens *DGAT1* auf Chromosom 14.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reinrassigkeit der DSN, zur genetischen Diversität innerhalb der DSN-Population und zwischen verwandten Rassen, die signifikanten Ergebnisse der genomweiten Assoziationsanalysen und Berechnungen der ökonomischen Zuchtwerte der eingesetzten Zuchtbullen wurden wiederholt ausgiebig mit den Vertretern des Vereins Genreserve DSN e.V., RBB und vit diskutiert. Im Mittelpunkt der Diskussion stand immer der Informationsgehalt der Ergebnisse und die Möglichkeiten zur Nutzung dieser Informationen in der angewandten Zuchtarbeit. Die Ergebnisse zur Reinrassigkeit (>90% DSN-Anteil im Genom) und genetischen Diversität (Inzucht<2,7%) in der DSN-Population belegen die außerordentlich gute Zuchtarbeit in der kleinen Population der DSN im Zuchtgebiet der RBB in den letzten 30 Jahren. Das heißt gleichzeitig, dass die Strategie zur getroffenen Auswahl von Zuchtbullen, sehr erfolgreich war. Das ist letztlich der Erfolg des aktiv agierenden DSN-Zuchtverbands.

Die Erfassung von Sequenzvariationen in diesen Regionen und die Berechnung ihrer Frequenzen bieten die Möglichkeit, genetische Strategien zu entwickeln, wie zum Beispiel die züchterische Anreicherung vorteilhafter Kaseinvarianten in der DSN-Population. Ebenso konnten wir nachweisen, dass das Allel für Hornlosigkeit in DSN nicht vorhanden ist und somit keine Möglichkeit besteht, hornlose DSN zu züchten und somit das Tierwohl in diesem Punkt zu verbessern. Zudem wurde gezeigt, dass die *DGAT1*-Variante, die für die hohe Milchleistung bei Holstein-Rindern verantwortlich ist, in der DSN-Population fixiert ist und somit nicht zur weiteren Steigerung der Milchleistung genutzt werden kann. Diese Beispiele illustrieren nur einen kleinen Teil der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Gesamtgenomsequenzdaten.

5.6 Vorschlag von genetischen Markern

In diesem Projekt wurden mittels GWAS genetische Marker identifiziert, die signifikant mit verschiedenen Milch- oder Fleischleistungsmerkmalen bei DSN-Kühen oder -Bullen assoziiert sind. Diese Marker wurden genutzt, um einen genetischen Score (GenScore) zu berechnen, der die Zuchtwertschätzung unterstützt und die Selektion von Tieren mit überlegenen Leistungseigenschaften erleichtert. Für jeden assoziierten SNP wurde im Ergebnis der Assoziationsanalysen eine Effektgröße und die Richtung des Effekts für jedes Allels ermittelt. Diese Effekte gehen in die Berechnung des GenScores für jedes Tier ein. Dabei wurden alle signifikanten Loci für ein Merkmal berücksichtigt,

wobei ein höherer GenScore auf eine bessere genetische Prädisposition für hohe Leistungen hindeutet.

Die Einführung des genetischen Scores, basierend auf GWAS-Ergebnissen, bietet zwar eine effiziente Methode zur Identifikation und Selektion von Tieren mit hohem genetischen Potenzial in der DSN-Population, birgt jedoch auch spezifische Herausforderungen. In einer kleinen Population wie der DSN ist die gezielte Selektion mittels Marker und dem GenScore besonders anspruchsvoll, da die Gefahr der Erhöhung der Inzucht besteht.

Inzucht kann zu einer Verringerung der genetischen Vielfalt und einer Zunahme von gesundheitlichen Problemen und genetischen Defekten führen. Daher ist es entscheidend, bei der Anwendung des GenScores eine sorgfältige Balance zwischen der Auswahl von Tieren mit überlegenen Merkmalen und der Aufrechterhaltung einer ausreichenden genetischen Diversität zu finden. Dies erfordert eine detaillierte Planung und Überwachung der Zuchtstrategien, um sicherzustellen, dass die genetische Basis der Population nicht eingeschränkt wird. Die Selektion sollte daher nicht ausschließlich auf der Grundlage des GenScores erfolgen. Vielmehr soll der GenScore als gutes Werkzeug helfen.

Der genetische Score ist ein vorübergehender Bewertungswert für ein Tieres, in dem die signifikanten Effekte summiert werden. Die Integration zusätzlicher genetischer Marker und die Einbeziehung umweltbedingter Faktoren könnten die Vorhersagegenauigkeit des Scores weiter erhöhen. Der Score kommt dem genomischen Zuchtwert nahe, ersetzt ihn jedoch nicht, weil er nicht das gesamte Genom berücksichtigt. Das gesamte Genom kann sicher erst berechnet und berücksichtigt werden, wenn die Größe der Basispopulation von derzeit ca. 6.000 auf ca. 10.000 Tiere erweitert werden kann. Das war in einem Nachfolgeprojekt vorgesehen, das wegen der staatlichen Einsparungen z.Z. leider nicht durchgeführt werden kann.

5.7 Long-Read Sequenzierung

Die Nutzung von Long-Read Sequenzdaten in unserem Forschungsprojekt hat uns ermöglicht, eine umfangreiche Menge an strukturellen Varianten (SVs) zu identifizieren: Insgesamt wurden 44.337 SVs erkannt, die sich aus einer Vielzahl von Insertionen, Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen zusammensetzen und eine hohe Qualität aufweisen. Diese SVs bilden die Grundlage für den nächsten entscheidenden Schritt – die Imputation dieser strukturellen Varianten in die DSN-Population. Dies eröffnet die Möglichkeit, genomweite Assoziationsstudien unter Verwendung dieser neu identifizierten SVs durchzuführen.

Die Bedeutung dieser strukturellen DNA-Varianten kann nicht genug betont werden. Solche strukturellen DNA-Mutationen können Gene oder auch große regulatorische Einheiten entfernen, zerstören oder deren Funktion unterbinden. Weltweit führende Forschungsgruppen haben wiederholt aufgezeigt, dass solche drastischen strukturellen Veränderungen im Genom Ursachen für Unterschiede in verschiedenen Merkmalen sein können. In unserem Projekt zielen wir darauf ab, SVs in der DSN-Population zu identifizieren, um die Basis für die Entdeckung kausaler Mutationen – sowohl SNPs als auch SVs – für bereits nachgewiesene genetische Assoziationen zwischen Genotyp und Merkmalen zu legen. Zu diesen Merkmalen gehören wichtige Aspekte wie Milchmenge und -zusammensetzung, Mastitis, Endoparasitenresistenz und Fruchtbarkeit.

Die Identifizierung ursächlicher Mutationen ermöglicht eine direkte Selektion auf genetische Varianten, was wiederum die Genauigkeit der genomischen Selektion erheblich erhöht. Dies ist insbesondere für kleine Populationen wie DSN von großer Bedeutung, wo die Größe der Lernstichprobe immer relativ klein bleibt. Auf ursächliche Mutationen kann direkt selektiert werden.

Es ist wichtig zu betonen, dass dieser Arbeitsabschnitt noch nicht abgeschlossen ist und trotz des Endes des offiziellen Projektzeitraums weiterverfolgt wird. Diese andauernde Forschung ist entscheidend, um ein tieferes Verständnis der genetischen Grundlagen von wichtigen landwirtschaftlichen Merkmalen zu erlangen und somit die Zuchtpraxis und die Genauigkeit der Selektion in kleinen Populationen wie DSN zu verbessern.

5.8 Fazit

Die Sammlung von Proben, Genotypen und Daten wird auch nach dem offiziellen Ende unseres Projekts fortgesetzt. Die Genotypisierung wird jedoch maßgeblich von Fördermitteln abhängig sein. Die kontinuierliche Datenerfassung ermöglicht es jedoch, ein detailliertes und dynamisches Bild der genetischen Einflüsse auf die Leistungsmerkmale und den typischen Charakter der DSN-Kühe zu erhalten. Durch die Erweiterung unserer Analysemethoden, einschließlich der Anwendung von genomweiten Sequenzierungen und Long-Read Sequenzdaten, können wir die Genauigkeit unserer genetischen Analysen verbessern und dadurch tiefere Einblicke in die funktionalen Faktoren gewinnen, die sowohl die Milch- als auch die Wachstums- und Fleischleistungen beeinflussen und darüber hinaus alle anderen Merkmale.

Zusammenfassend ist dieses Projekt ein bedeutender Schritt in Richtung einer verbesserten Zuchtauswahl und einer effizienteren Zucht, indem es die genetischen Grundlagen sowohl für die Milch- als auch für die Wachstums- und Fleischleistungen bei DSN-Kühen identifiziert hat, die als genetische Effekte von identifizierten signifikanten Markern in die praktische Arbeit einfließen.

5.9 Andere Herausforderungen der DSN-Züchter

Die Bemühungen zur Verbesserung der Milch- und Fleischleistung bei DSN-Rindern sind zwar wichtige Aspekte der Zuchtarbeit, sie allein sind jedoch nicht ausreichend, um die aktuellen Herausforderungen der DSN-Züchter umfassend zu adressieren. Die Züchter stehen vor einer Reihe von Problemen, die über die genetische Optimierung ihrer Herden hinausgehen.

Ein wesentliches Problem ist der Personalmangel, der zu einer erhöhten Arbeitsbelastung und Überarbeitung führt. Dies stellt eine große Herausforderung für die Betriebsführung und das Wohlergehen der Tiere sowie der Beschäftigten dar. Zudem verschärfen steigende Energie- und Futterkosten die wirtschaftliche Situation der Betriebe, was die Rentabilität und Nachhaltigkeit der landwirtschaftlichen Produktion erheblich beeinträchtigt.

Hinzu kommt die hohe Konkurrenz aus dem Ausland, die den Druck auf die heimischen Züchter weiter verstärkt. Diese internationale Konkurrenz kann sich negativ auf die Marktposition und Preise der lokal produzierten Produkte auswirken.

Schließlich fehlt es trotz des Engagements des Landes Brandenburg für die DSN-Tiere an ausreichender Förderung durch den Staat. Die Unterstützung in Form von finanziellen Mitteln, subventionierten Dienstleistungen oder regulatorischen Erleichterungen könnte den Züchtern helfen, diese schwierigen Zeiten zu überstehen und ihre Betriebe zukunftsfähig zu machen.

Diese vielschichtigen Herausforderungen zeigen, dass neben der genetischen Optimierung auch strukturelle und politische Maßnahmen erforderlich sind, um die Lage der DSN-Züchter und damit die Erhaltung der Rasse DSN nachhaltig zu verbessern.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und der Verwertbarkeit der Ergebnisse

Im Rahmen unseres Forschungsprojekts „Bereitstellung tierzüchterischer Marker für die Verbesserung der Züchtung innerhalb der gefährdeten Rasse DSN zur besonders tiergerechten und nachhaltigen Produktion tierischer Erzeugnisse“ haben wir intensiv nach genetischen Markern sowohl für Milch- als auch für Wachstums- und Fleischleistungsmerkmale gesucht. Unsere Studien konzentrieren sich auf die Nutzung genomischer Loci, die geeignet sind, die genetische Qualität der DSN-Rasse zu verbessern und dadurch den Gewinn aus der Milchproduktion zu steigern, wobei gleichzeitig der Doppelnutzungscharakter der DSN gesichert werden soll. Deshalb wurden auch genetische Marker für die Fleischproduktion gesucht, um Kopplungen zwischen genetischen Effekten auf die Milch- und Fleischleistungen zu identifizieren.

6.1 Genotypen

Im Verlauf des Projektzeitraums wurden umfangreiche Genotyp-Daten gesammelt, die vollständig in die Datenbank von vit integriert wurden und nun für direkte Abstammungskontrollen zur Verfügung stehen. Dies ist besonders nützlich, um Inkonsistenzen oder Fehler in den Aufzeichnungen zu identifizieren und zu korrigieren, was für die Aufrechterhaltung hoher Standards in der Zuchtpraxis unerlässlich ist. Die Möglichkeit, offene oder falsch zugeordnete Kuh- bzw. Bulle-Kalb-Beziehungen zu überprüfen und zu klären, trägt erheblich zur Verbesserung der Datenqualität und -genauigkeit bei, was wiederum für erfolgreiche Zuchtentscheidungen und -strategien von entscheidender Bedeutung ist und falsche Anpaarungen vermeidet.

6.2 Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten

Zusätzlich zu den Genotyp-Daten, die in die vit-Datenbank eingelesen wurden, können spezifische identifizierte Sequenzvarianten für weitere wertvolle Möglichkeiten der Selektion benutzt werden. Ein Beispiel hierfür wäre bei den Kaseinvarianten die mögliche Produktion von A2-Milch. A2-Milch gilt als bekömmlicher für Menschen und wird in einigen Ländern speziell als Nischenprodukt vermarktet. Die gezielte Selektion von Kühen, die diese spezielle Kaseinvariante aufweisen, könnte daher einen wirtschaftlichen Vorteil darstellen, wenn A2-Milch besser vermarktet wird. Indem Züchter diese genetische Information nutzen, könnten sie eine kleine Herde aufbauen, die speziell für die Produktion von A2-Milch geeignet ist, was wiederum das Angebot an diesem spezialisierten und nachgefragten Produkt erhöhen würde. Die Verfügbarkeit von detaillierten Informationen über Sequenzvarianten eröffnet somit neue Wege für die Züchtung, die nicht nur die Tiergesundheit und Leistungsfähigkeit berücksichtigen, sondern auch spezifische Marktanforderungen und Konsumentenpräferenzen. Diese Entwicklung stellt einen Schritt in Richtung einer zielgerichteten und marktorientierten Zuchtstrategie dar, die es ermöglicht, auf das spezifische Gesundheitsbewusstsein des Menschen zu reagieren und Trends im Milchmarkt effektiv zu bedienen.

Aufgrund der im Projektzeitraum gesammelten umfangreichen genomischen Daten und identifizierten Sequenzvarianten ist es möglich, effektive Strategien zur Vermeidung von Inzucht in der DSN-Population zu entwickeln und umzusetzen. Die genetischen Informationen ermöglichen eine präzise Berechnung von genomischer Inzucht und tragen maßgeblich dazu bei, den Grad der Inzucht genau zu bestimmen und zu überwachen. Darüber hinaus bieten die gesammelten Sequenzvarianten die Möglichkeit, die genetische Diversität innerhalb der Population präzise zu berechnen. Diese Berechnungen sind entscheidend, um eine hohe genetische Vielfalt zu sichern, was wiederum für die

Gesundheit und Leistungsfähigkeit der Rasse von zentraler Bedeutung ist. Diese genomischen Daten erlauben es auch, geeignete Zuchtbullen außerhalb der DSN-Population mittels phylogenetischer Analyse zu identifizieren. Durch die Einbeziehung dieser Bullen kann genetische Vielfalt in die Population gebracht werden, während die Reinheit der Rasse gewahrt bleibt. Insgesamt bieten die gesammelten genomischen Daten und Sequenzvarianten eine solide Grundlage, um fundierte Zuchtentscheidungen zu treffen, die nicht nur die Vermeidung von Inzucht unterstützen, sondern auch zur Erhaltung und Verbesserung der genetischen Diversität und Gesundheit der DSN-Population beitragen.

6.3 Ergebnisse aus der genomweiten Assoziationsanalyse

Die durch GWAS identifizierten SNPs und ihre Assoziationen dienen als Grundlage für Selektionsentscheidungen und sind von entscheidender Bedeutung für Anpaarungsentscheidungen und die Vorhersage der Leistung junger Tiere. Bei der Auswahl von Zuchtbullen und der Entscheidung über den Verbleib von Kühen in der Herde, werden Marker bevorzugt, die hoch signifikant sind und mit großen genetischen Effekten verbunden sind. Diese Marker werden zu einem genetischen Score zusammengefasst.

Der genetische Score ist als Instrument gedacht, um dem RBB und den Betrieben dabei zu helfen, fundierte Entscheidungen in der DSN-Zucht treffen zu können. Er soll eine Bewertung der genetischen Potenziale einzelner Tiere sowohl in Bezug auf Milch- als auch auf Wachstums- und Fleischleistungen ermöglichen. Durch diesen Score können Betriebe die genetischen Stärken insbesondere ihrer jungen Tiere besser erkennen und nutzen, was zu einer optimierten Zuchtauswahl und einer verbesserten Produktionsleistung beitragen kann. Das betrifft potentielle Zuchtbullen auf der männlichen Seite als auch potentielle Bullenmütter auf der weiblichen Seite.

Die genomischen Informationen aus vorliegenden GWAS mit signifikanten SNP-Effekten für einzelne Merkmale können zur Auswahl von Zuchtbullen aus potentiellen Jungbullen, zur gezielten Anpaarungsentscheidung zur Verbesserung der Leistung der Nachkommen und zur Vorhersage der Leistung junger Tiere genutzt werden. Um die Auswahl der Zuchtbullen zu unterstützen, wurden zu jedem Bullen folgende Angaben zu den signifikanten SNP für Milchleistung und Mastitis zusammengefasst: SNP Genotyp, Effekt des vorhandenen SNP-Genotyps auf Milch-kg, Fett-%, Fett-kg, Eiweiß-%, Eiweiß-kg und Mastitis-Risiko. Die positiven Marker-Allele sind insbesondere bei der Selektion potentieller Zuchtbullen zu berücksichtigen. Außerdem wurden Haplotyp-Effekte für den *MGST1*-Lokus auf Chromosom 5 angegeben, der Einfluss auf den Milchfettgehalt und das Geburtsgewicht hat. Für jedes Tier wurden die Summeneffekte der Top-Marker an allen signifikanten Loci für das jeweilige Merkmal ausgewiesen. Die Daten wurden in Form einer Excel-Tabelle mit Sortierfunktion an den RBB und die Betriebe übergeben.

Die genomischen Informationen sollen auch genutzt werden, um weibliche Tiere vor der Besamung zur Zuchtentscheidung zu klassifizieren. Dabei werden die Jungtiere in Genreservetiere der 1. Klasse (die besten/überdurchschnittlichen) und Genreservetiere der 2. Klasse (die unterdurchschnittlichen) eingestuft. Diese Einstufung soll die optimierte Anpaarung an vorhandene Besamungsbullen unterstützen. Das Ziel besteht darin, die besten weiblichen Jungtiere (Genreservetiere der 1. Klasse) mit den besten Bullen anzupaaren, während die unterdurchschnittlichen Tiere auch mit anderen Bullen angepaart werden können. Das betrifft zum jetzigen Zeitpunkt alle in 2023 geborenen weiblichen Tiere, die auch genotypisiert wurden. Unter Verwendung der gleichen Informationen wie für die Jungbullen haben die weiblichen Tiere genomische SNP-Werte erhalten. Diese dienen der Einstufung der weiblichen Jungtiere in beste und unterdurchschnittliche. Für jedes Tier wurden die

Summeneffekte aller signifikanten Loci auf das jeweilige Merkmal ausgewiesen. Auch diese Daten wurden in Form einer Excel-Tabelle mit Sortierfunktion übergeben.

Langfristig ist über das Projektende hinaus vorgesehen, die Top-SNPs für DSN aus der Assoziationsanalysen in DSN bezüglich der Milch-, Wachtsums- und Fleischleistung auf den bestehenden europäischen Eurogenomics EuroG MD SNP-Chip zu integrieren, um so eine routinemäßige und schnelle Genotypisierung dieser für DSN-Zuchtentscheidungen wichtigen SNPs zu sichern. Hierzu wurden bereits Gespräche mit dem vit und dem RBB geführt.

6.4 Projekt zur Entwicklung eines genomischer Zuchtwerte für DSN

Längerfristig arbeiten wir zusammen mit der Justus-Liebig-Universität Gießen an der Erarbeitung einer genomischen Zuchtwertschätzung für die kleine Population der DSN. Dafür muss der Datenumfang der Population jedoch weiterhin vergrößert werden. Um die Mastleistung zu bewerten, müssen hier auch kontinuierlich Proben und Daten von männlichen Tieren gesammelt werden. Um die genomische Zuchtwertschätzung in DSN zu etablieren, wurde im Rahmen des Bundesprogramm Nutztierhaltung "Maßnahmen zur nachhaltigen Tierzucht für gesunde und robuste Tiere sowie mehr Umwelt- und Klimaschutz" ein Vorhaben namens „Strategien zur Erhaltung und züchterischen Verbesserung des robusten Deutschen Schwarzbunten Niederungsrindes (DSN) als lebendes Kulturgut“ mit den Projektpartnern der Justus-Liebig Universität Gießen, dem RBB und vit eingereicht. Dieses Projekt liegt trotz sehr guter Beurteilung wegen Sparmaßnahmen im Ministerium auf Eis.

7 Gegenüberstellung der erreichten und der ursprünglich geplanten Ziele; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Während des Projektzeitraums 2016-2019 wurden die Arbeitsaufgaben aus

Tabelle 1 bearbeitet. Trotz des verspäteten Projektstarts wurden fast alle Arbeitsaufgaben und ihrer Unteraufgaben erfüllt. Auf die einzelnen Arbeitsaufgaben und ihre Unteraufgaben wird im Folgenden näher eingegangen.

Tabelle 1: Balkendiagramm mit Meilensteinplanung für den Projektzeitraum 2016-2019.

Arbeitsaufgaben	Zeittafel (Quartale)											
	2016		2017				2018				2019	
	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
1. Sequenzierung der 25 DSN-Tiere												
1.1 Auswahl repräsentativer Tiere (RBB, HUB)	■											
1.2 Bereitstellung der Blut-Proben (RBB)	■											
1.3 Vorbereitung der DNA-Proben (HUB)	■											
1.4 Sequenzierung (an der TU München) (TUM)		■										
1.5 Übernahme der Rohdaten (HUB)			A									
2. Auswertung der Sequenzdaten (HUB)												
2.1 Qualitätscheck, Identifizierung von Sequenzvarianten				■	■							
2.2 Allelfrequenzen innerhalb DSN					■							
2.3 Sequenzvarianten zw. DSN und anderen Rassen							B					
3. Funktionelle Annotation von Sequenzvarianten (HUB)												
3.1 Annotation von Genfunktionen								■	■			
3.2 Vorschlag von genetischen Markern										C		
4. Anlegen einer Gewebedatenbank der DSN												
4.1 Anschaffung der Tiefkühltechnik, Aufbau der Logistik (HUB)	■											
4.2 Probensammlung von ca. 3000 Tieren (RBB) DNA- Präparation (HUB), DNA- Langzeitlagerung (IfN)		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.3 Bereitstellung von Phänotypen		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4.4 Genotypisierung: 10 Marker, ca. 1500 Tiere (HUB)												
4.4. Assoziationsanalyse von SNPs mit Merkmalen (HUB)											D	
5. Wissenstransfer, Praxisseminare												
5.1 Jährliche Treffen von HUB, RBB und IfN, DSN-Züchtertagung 2017/18, Grüne Woche (RBB, HUB)		E		E		E		E		E		E
5.2 Workshops (alle)									E			E
6. Publikationen in Praxis- und Fachzeitschriften												
z.B. für „Blickpunkt Rind“, Flyer (HUB)									F			F

1. Die Arbeitsaufgabe zur Sequenzierung der 25-DSN-Tiere wurde vollständig erfüllt.
2. Die Arbeitsaufgabe zur Auswertung der Sequenzdaten wurde vollständig erfüllt.
3. Die Arbeitsaufgabe zur funktionellen Annotation von Sequenzvarianten wurde teilweise erfüllt. Es wurden zwar Gene identifiziert, die Regionen mit hoher Differenz der Allelfrequenz zwischen DSN und Holstein einhergeht, aber diese Analyse war wegen der begrenzten Tierzahl noch nicht ausreichend, um genetische Marker für die züchterische Anwendung vorzuschlagen.
4. Die Arbeitsaufgabe zum Anlegen einer Gewebedatenbank der DSN wurde fast vollständig erfüllt. Eine GWAS mit Milchleistungsdaten und Genotypen vom Illumina BovineSNP50 BeadChip von 657 DSN-Kühen wurde durchgeführt. Um die Sicherheit der geschätzten Alleleffekten zu erhöhen wurde die Genotypisierung von weiteren 1.700 DSN-Kühen beantragt und genehmigt. Dadurch war die Genotypisierung einzelner Marker überflüssig. Für die Analysen wurde das Projekt um 2 Jahre verlängert.

5. Die Arbeitsaufgabe zu Wissenstransfer und Praxisseminaren wurde vollständig erfüllt. Es ist hervorzuheben, dass die HU Berlin ein DSN-Symposium organisiert hat (13.06.2018), auf dem die Ergebnisse innerhalb des DSN-Projekts den Mitarbeitern der RBB, vit, der Universität Gießen, des Ministeriums für Ländliche Entwicklung, Umwelt und Landwirtschaft, der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung und Vertretern aller beteiligten Agrarbetriebe vorgestellt wurden.
6. Die Arbeitsaufgabe zu Publikationen in Praxis- und Fachzeitschriften wurde vollständig erfüllt.

Während des Projektzeitraums 2020-2021 wurden die Arbeitsaufgaben aus Tabelle 2 bearbeitet. Fast alle Arbeitsaufgaben und ihrer Unteraufgaben wurden erfüllt. Auf die einzelnen Arbeitsaufgaben und ihre Unteraufgaben wird im Folgenden näher eingegangen.

Tabelle 2: Erweiterung der Aufgaben des DSN-Projekts für den Projektzeitraum 2020 – 2021.

Arbeitsaufgaben	Zeittafel (Quartale)								
	Jahr Quartal	2020				2021			
		1	2	3	4	1	2	3	4
7. Gewebe- und DNA-Bank mit dazugehörigen Phänotypen									
7.1 Sammeln von weiteren Gewebeproben und DNA-Isolierung	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7.2 Aktualisierung von Phänotypen und Sammeln neuer Phänotypen (Totgeburten, Fleischleistung)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8. Bearbeitung der Sequenz- und SNP-Chip-Daten									
8.1 Anpassung der bisherigen Datensätze und Überarbeitung der Programme an das neue Update des 1000-Bullengenom-Projekts	x								
8.2 Integration der in 2019 erhaltenen Genotyp-Daten in die vorhandenen Datensätze	x								
8.3 Qualitätscheck, Identifizierung von Sequenzvarianten der 75 neu sequenzierten DSN	x	x							
8.4 Auswahl von weiteren 150 DSN-Tieren für die Sequenzierung zur Abbildung der Population basierend auf genetischer Diversität, Leistungs- und Verwandtschaftsanalysen und Integration in den bisherigen Datensatz + Wiederholung von 8.3 für die 150 neu sequenzierten DSN-Tiere	x	x	x						
8.5 Imputation der 50k SNP-Chip-Daten auf Sequenzlevel für alle Tiere			x	x					
9. Analysen der Genotyp-Daten									
9.1 Untersuchung der Allelfrequenzen und Diversität mit neuem unikalem umfassenden Datensatz innerhalb der DSN-Population und Vergleich mit anderen Rassen			x	x	x				
9.2 Qualitätstestung der aktualisierten Phänotypen und Vorbereitung für Assoziationsstudien			x	x	x				
9.3 Wiederholte genomweite Assoziationsanalyse mit aktualisierten Phänotypen (Milchleistung, Exterieur, Fruchtbarkeit, Krankheiten, etc.)				x	x	x	x		
9.4 Genetische Marker werden funktionell annotiert und Regionen quantitativer Merkmale (QTL, „Quantitative Trait Locus“) auf Kandidatengene untersucht					x	x	x	x	
9.5 Vorschlag von genetischen Markern (a) zur Verbesserung der Milchleistung und (b) zur Erhaltung der Diversität in DSN						x	x		
9.6 Genotypisierung von 10 funktionellen Markern in ca. 1500 Tieren der DSN- Population mit KASP-Assays + anschließende Assoziationsstudie							x	x	
10. Wissenstransfer, Praxisseminare									
10.1 Jährliche Treffen von HUB, RBB und IfN (DSN-Züchtertagung)				x					x
10.2 Nationale und internationale Konferenzen (DGfZ, EAAP)			x			x	x		
10.3 Organisation und Durchführung einer Veranstaltung mit Vertretern von Doppelnutzungsgrinderrassen aus Deutschland und ggfls. auch aus dem europäischen Ausland						x	x	x	

7. Die Arbeitsaufgabe zur Gewebe- und DNA-Bank mit dazugehörigen Phänotypen wurde vollständig erfüllt.
8. Die Arbeitsaufgabe zur Bearbeitung der Sequenz- und SNP-Chip-Daten wurde vollständig erfüllt.
9. Die Arbeitsaufgabe zur Analyse der Genotyp-Daten wurden vollständig erfüllt. Es wurden genetische Marker basierend auf der GWAS mit 1.490 DSN-Kühen und Genotyp-Daten vom Illumina BovineSNP50 BeadChip für die Verbesserung der Milchleistung vorgeschlagen. Diese Informationen wurden dem Zuchtverband RBB und den Betrieben direkt vorgelegt. Die Studie wurde publiziert. Die Genotypisierung von 10 funktionellen Markern in ca. 1.500 Tieren der DSN-Population mit KASP-Assays und anschließende Assoziationsstudie (Arbeitsaufgabe 9.6) wurde nicht durchgeführt, da diese Arbeitsaufgabe mit der durchgeführten GWAS mit 1.490 DSN-Kühen bereits erfüllt wurde.
10. Die Arbeitsaufgabe zu Wissenstransfer und Praxisseminaren wurde teilweise erfüllt. Durch die Kontaktbeschränkungen aufgrund der Corona-Pandemie konnten in den Jahren 2020-2021 nicht alle Konferenzen und Praxisseminare stattfinden. Es ist hervorzuheben, dass die HU Berlin das Fachgespräch „Erhaltung/Biodiversität in kleinen Nutztierassen“ als Online-Meeting (26.10.2021) organisiert hat, auf dem die Projektergebnisse den Vertretern des BLE, verschiedenen internationalen Wissenschaftlern, die an kleinen Rinderpopulationen forschen, und Interessierten aus diversen Arbeitsgruppen präsentiert wurden. Einen Tag später wurde von der HU Berlin ein DSN-Symposium organisiert (27.10.2021), an dem die Projektergebnisse den Vertretern der RBB, der DSN-Betriebe und des Vereins Genreserve DSN und des BLE präsentiert wurden.

Während des Projektzeitraums 2022-2023 wurden die Arbeitsaufgaben aus Tabelle 3 bearbeitet. Alle Arbeitsaufgaben und ihrer Unteraufgaben wurden erfüllt. Auf die einzelnen Arbeitsaufgaben und ihre Unteraufgaben wird im Folgenden näher eingegangen.

Tabelle 3: Erweiterung der Aufgaben des DSN-Projekts für den Projektzeitraum 2022 – 2023.

Arbeitsaufgaben	Zeittafel (Quartale)								
	Jahr	2022				2023			
		Quartal	1	2	3	4	1	2	3
11. Sammeln von Gewebeproben, Phänotypen und Genotypen									
11.1 Sammeln von weiteren Gewebeproben und DNA-Isolierung (m/w)	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11.2 Aktualisierung von Phänotypen, Sammeln und Aufarbeitung neuer Phänotypen zur Fleischleistung	x	x	x	x	x	x	x	x	x
11.3 Genotypisierung von 384 Tieren mit dem DSN-spezifischen SNP-Chip					x				
11.4 Qualitätscheck und Integration der neuen Genotypen mit den vorhandenen Genotypen + Imputation der Genotypen auf Sequenzlevel						x	x		
12. Assoziationsanalysen									
12.1 Qualitätstestung der aktualisierten Phänotypen und Vorbereitung für Assoziationsstudien			x			x			
12.2 Genomweite Assoziationsanalyse mit aktualisierten Phänotypen der Fleischleistung der DSN-Kühe und DSN-Bullen			x	x	x	x	x		
12.3 Genetische Marker werden funktionell annotiert und Regionen quantitativer Merkmale (QTL, „Quantitative Trait Locus“) auf Kandidatengene untersucht						x	x	x	x
12.4 Vergleich der Ergebnisse aus Fleischleistung mit denen aus Milchleistung							x	x	
12.5 Vorschlag von genetischen Markern zur Verbesserung der Fleischleistung									x

13. Wissenstransfer/ Praxisseminare								
13.1 Jährliche Treffen von HUB, RBB und IfN (DSN- Zuchtverbandsjubiläum)				x				x
13.2 Nationale und internationale Konferenzen (DGfZ, EAAP)			x				x	
13.3 Konzept für optimale Erhaltung der Population + Verfassen des Abschlussberichts								x
14. Erweiterung der Ziele um Long-Read Sequenzierungsdaten						x	x	x

11. Die Arbeitsaufgabe bezüglich des Sammelns von Gewebeproben, Phänotypen und Genotypen wurde vollständig erfüllt.
12. Die Arbeitsaufgabe zu den Assoziationsanalysen wurde vollständig erfüllt.
13. Die Arbeitsaufgabe zum Wissenstransfer und den Praxisseminaren wurde vollständig erfüllt.
14. Die Arbeitsaufgabe zur Analyse der Long-Read Sequenzierungsdaten wurde vollständig erfüllt. Die identifizierten strukturellen Varianten sollen zur Imputation in die SNP-Daten aller DSN-Tiere benutzt werden. Eine nachfolgende genomweite Assoziationsstudie soll strukturelle Varianten finden, die mit der Milch-, Wachstums, oder Fleischleistung assoziiert sind. Dieses Ziel, das nicht Bestandteil dieses Projekts ist, wird nach dem Projektende weiterverfolgt.

8 Zusammenfassung

Das Projekt zur Verbesserung der Deutschen Schwarzbunten Niederungsrind (DSN)-Rasse, die auf der Roten Liste gefährdeter einheimischer Nutzierrassen steht, hatte das Ziel, diese Rasse für den ökologischen Landbau attraktiver zu gestalten. Die Schwerpunkte lagen auf genetischen Untersuchungen und der Entwicklung von Zuchtstrategien, die zur Verbesserung der Milchleistung beitragen und die robusten Eigenschaften der DSN im Vergleich zur Hochleistungsrasse Deutsche Holstein betonen.

Die wichtigsten Ergebnisse des Projekts umfassen:

- **Datenbanken:** Für die Rasse DSN wurden umfangreiche Gewebe-, Phänotypen- und Genotypen-Datenbanken aufgebaut. Diese Datenbanken umfassen Informationen von nahezu der gesamten existierenden DSN-Population im Zuchtgebiet der RBB. Diese Datenbanken sind essentiell für zukünftige genetische Analysen und Zuchtentscheidungen.
- **Inzucht und Diversität:** Der Nachweis der Rassezugehörigkeit und Abstammung anhand der Genotyp-Daten wurde den Betrieben direkt übermittelt.
- **Imputation der SNP-Chip Genotypen auf die Gesamtgenomsequenz:** Durch die Imputation der SNP-Chip Genotypen auf das Gesamtgenomsequenzierungsniveau wurde die Anzahl informativer Marker je Tier drastisch erhöht. Dies ermöglichte präzisere genetische Analysen und die Identifikation von genetischen Varianten, die mit wichtigen Merkmalen assoziiert sind.
- **Genomweite Assoziationsstudien für Milchleistungs-, Wachstums- und Fleischleistungsmerkmale:** In den GWAS wurden genetische Marker identifiziert, die mit Milchleistungsmerkmalen sowie Wachstum assoziiert sind. Den größten Effekt auf die Milchzusammensetzung hatte die *MGST1*-Region. Signifikante Effekte wurden für das Geburtsgewicht und das Körpergewicht im Alter von 3 Wochen gefunden. Diese Marker bieten Ansatzpunkte, die Milch- und Mastleistung der DSN gezielt zu verbessern.
- **Genomweite Assoziationsstudien für Mastitis, Fruchtbarkeit, Gesundheitsmerkmale und Endoparasitenresistenz:** In den GWAS wurden genetische Marker für die klinische Mastitis, Zwischenkalbezeit, Non-Return-Rate nach 56 Tagen, somatische Zellzahl, Fett-Protein-Verhältnis und Endoparasitenresistenz identifiziert und dazugehörige Kandidatengene gefunden. Gene in den Regionen, die die Endoparasitenresistenz beeinflussen, gehören vor allem zu Stoffwechselwegen der direkten Immunantwort.
- **Vergleich der Ergebnisse aus Fleisch- und Milchleistung:** Ein wichtiger Aspekt des Projekts war der Vergleich der genetischen Grundlagen von Fleisch- und Milchleistung, um ungewollte Kopplungen auszuschließen. Hier konnten genetische Marker differenziert werden, die direkt die Milch- oder Fleischleistung beeinflussen. Die Region um *MGST1* hat jedoch Einfluss auf die Milchzusammensetzung und das Geburtsgewicht. Hier ist die genetische Kopplung von möglicherweise zwei Loci bei der Zuchtentscheidung zu berücksichtigen. Diese Ergebnisse liefern wertvolle Erkenntnisse für die Entwicklung von Zuchtstrategien, die beide Leistungsaspekte berücksichtigen.
- **Ökonomischer Zuchtwert:** Der DSN Net Merit wird zu 52,8% aus Milch, 43,4% aus Fitness und 3,8% Fleisch bestimmt. Das zeigt, dass die Milchmenge entscheidend ist für die ökonomische Rentabilität der DSN ist. Die Werte des DSN Net Merit und seinen Subindizes für verfügbare DSN-Besamungsbullen wurden den Betrieben zur Verfügung gestellt.
- **Funktionelle Annotation von Genvarianten:** Die aus den Gesamtgenomsequenzdaten von 304 DSN-Rindern identifizierten 20,6 Millionen Sequenzvarianten wurden umfassend analysiert.

Hierbei wurden potentiell funktionell bedeutsame und DSN-typische Sequenzvarianten identifiziert. Diese Kenntnisse helfen beim Auffinden ursächlicher Mutationen für einzelne Merkmale.

- Genetische Analysen: Es konnte nachgewiesen werden, dass die Herdbuchtiere reinrassig sind und damit unter 10% Fremdgenomanteil tragen. Zu den Rassen, die mit DSN am nächsten verwandt sind zählen Dutch Friesian Red, Dutch Belted, Holstein und Holstein Red. Unter den Kaseinvarianten segregiert der für den Menschen günstige A2-Typ im β -Kasein. Eine Veranlagung zur Hornlosigkeit und der in der Holstein Population segregierende Haplotyps 5, der auf bestimmte Erbkrankheiten hinweist, wurde in der DSN-Population nicht nachgewiesen.
- Vorschlag von züchterisch relevanten genetischen Markern: Basierend auf den GWAS-Ergebnissen wurden signifikante genetische Marker vorgeschlagen, die für die Zucht von DSN-Rindern nützlich sein könnten. Für Milchmerkmale und Wachstum wurden die genetischen Effekte dieser signifikanten Marker im GenScore addiert und für jedes Jungtier und potentiellen Zuchtbullen berechnet. Diese GenScores können in der Anpaarungsentscheidung zur Verbesserung der Milchproduktion bei Beibehaltung des Doppelnutzungscharakters helfen.
- Long-Read Sequenzdaten: Die identifizierten strukturellen Varianten können in genomweiten Assoziationsstudien mit Milchproduktion, Fleisch- und Wachstumsleistung genutzt werden, um kausale Mutationen zu identifizieren. Solche strukturellen DNA-Mutationen können signifikante genetische Unterschiede verursachen und ursächliche Mutationen darstellen, die von besonders signifikantem Wert für kleine Populationen wie DSN sind. Obwohl das offizielle Projektende erreicht ist, wird diese wichtige Forschung fortgesetzt, um die Zuchtpraxis und Selektionsgenauigkeit in kleinen Populationen weiter zu optimieren.
- Wissenschaftstransfer: Publikation aller Ergebnisse wurden in 16 Beiträgen in nationalen und internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Ergebnisse wurden in 34 Beiträgen auf Konferenzen, Praxisseminaren oder Messen vorgestellt. Hervorzuheben sind vier Veranstaltungen, die von der HU Berlin organisiert wurden, um Vertretern der Praxisbetriebe, des Zuchtverbands, des vit, des BLE und internationalen Wissenschaftlern die Erkenntnisse aus diesem Projekt vorzustellen, zu diskutieren und Expertise auf hohem Niveau zu erlangen. Die praxisrelevanten Ergebnisse wurden den Praxisbetrieben und dem Zuchtverband direkt zur Unterstützung der Anpaarung übergeben. Die zahlreichen Wissenstransfermaßnahmen, darunter nationale und internationale Konferenzen, haben wesentlich zur zunehmenden Aufmerksamkeit für die Rasse DSN beigetragen haben. Diese Maßnahmen ermöglichten einen intensiven Austausch von Fachwissen und Erfahrungen, wodurch das Bewusstsein und Interesse an der Rasse sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene gestärkt wurde.

Die Ergebnisse des Projekts bieten die Möglichkeit, die Selektion von DSN-Rindern zu verbessern und gleichzeitig die typischen Eigenschaften der Rasse zu erhalten oder sogar zu verbessern. Sie bieten zudem die Grundlage für zukünftige Zuchtprogramme unter Einbeziehung der genomischen Selektion und können dazu beitragen, die genetische Vielfalt und Gesundheit der Population zu erhalten. Die Erkenntnisse aus diesem Projekt können auch auf andere Rinderrassen übertragen und dort zur Verbesserung von Zuchtprogrammen genutzt werden.

9 Literaturverzeichnis

- Aldersey, J. E., Sonstegard, T. S., Williams, J. L., and Bottema, C. D. K. (2020). Understanding the effects of the bovine POLLED variants. *Anim. Genet.* 51, 166–176. doi:10.1111/age.12915.
- Brøndum, R., Guldbandsen, B., Sahana, G., Lund, M., and Su, G. (2014). Strategies for imputation to whole genome sequence using a single or multi-breed reference population in cattle. *BMC Genomics* 15, 728. doi:10.1186/1471-2164-15-728.
- Caroli, A. M., Chessa, S., and Erhardt, G. J. (2009). Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.* 92, 5335–5352. doi:10.3168/jds.2009-2461.
- Cole, J. B., Wiggans, G. R., Ma, L., Sonstegard, T. S., Lawlor, T. J., Crooker, B. A., et al. (2011). Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. *BMC Genomics* 12, 408. doi:10.1186/1471-2164-12-408.
- Doran, A. G., Berry, D. P., and Creevey, C. J. (2014). Whole genome association study identifies regions of the bovine genome and biological pathways involved in carcass trait performance in Holstein-Friesian cattle. *BMC Genomics* 15, 837. doi:10.1186/1471-2164-15-837.
- Jiang, J., Ma, L., Prakapenka, D., VanRaden, P. M., Cole, J. B., and Da, Y. (2019). A Large-Scale Genome-Wide Association Study in U.S. Holstein Cattle. *Front. Genet.* 10, 412. doi:10.3389/fgene.2019.00412.
- Korkuć, P., Neumann, G. B., Hesse, D., Arends, D., Reißmann, M., Rahmatalla, S., et al. (2023). Whole-Genome Sequencing Data Reveal New Loci Affecting Milk Production in German Black Pied Cattle (DSN). *Genes (Basel)*. 14, 581. doi:10.3390/GENES14030581/S1.
- Kräußlich, H., and Claus, R. (1981). *Rinderzucht*. Ulmer Available at: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/154217> [Accessed April 10, 2017].
- Kreiner-Møller, E., Medina-Gomez, C., Uitterlinden, A. G., Rivadeneira, F., and Estrada, K. (2015). Improving accuracy of rare variant imputation with a two-step imputation approach. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 395–400. doi:10.1038/ejhg.2014.91.
- Leal-Gutiérrez, J. D., Rezende, F. M., Reecy, J. M., Kramer, L. M., Peñagaricano, F., and Mateescu, R. G. (2020). Whole Genome Sequence Data Provides Novel Insights Into the Genetic Architecture of Meat Quality Traits in Beef. *Front. Genet.* 11. doi:10.3389/fgene.2020.538640.
- Littlejohn, M. D., Tiplady, K., Fink, T. A., Lehnert, K., Lopdell, T., Johnson, T., et al. (2016). Sequence-based Association Analysis Reveals an MGST1 eQTL with Pleiotropic Effects on Bovine Milk Composition. *Sci. Rep.* doi:10.1038/srep25376.
- McLaren, W., Pritchard, B., Rios, D., Chen, Y., Flicek, P., and Cunningham, F. (2010). Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor. *Bioinformatics* 26, 2069–2070. doi:10.1093/bioinformatics/btq330.
- Meier, S., Arends, D., Korkuć, P., Kipp, S., Segelke, D., Filler, G., et al. (2021). Implementation of an economic lifetime net merit for the dual-purpose german black pied cattle breed. *Agric.* doi:10.3390/agriculture11010041.
- Meredith, B. K., Kearney, F. J., Finlay, E. K., Bradley, D. G., Fahey, A. G., Berry, D. P., et al. (2012). Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC Genet.* doi:10.1186/1471-2156-13-21.
- Mueller, U., Mlaouhi, A., Staufenbiel, R., Hasselmann, L., Tripmacher, R., and Brockmann, G. . A. (2007). The influence of energy content during the rearing period on physiological markers and milk yield: A study at monozygotic twins. *Züchtungskunde* 79, 231–242. Available at: <https://publications.goettingen-research-online.de/handle/2/51545>.
- Nayeri, S., Sargolzaei, M., Abo-Ismael, M. K., May, N., Miller, S. P., Schenkel, F., et al. (2016). Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. *BMC Genet.* 17, 75. doi:10.1186/s12863-016-0386-1.

- Ning, C., Kang, H., Zhou, L., Wang, D., Wang, H., Wang, A., et al. (2017). Performance Gains in Genome-Wide Association Studies for Longitudinal Traits via Modeling Time-varied effects. *Sci. Reports* 2017 7 1, 1–12. doi:10.1038/s41598-017-00638-2.
- Pausch, H., Emmerling, R., Schwarzenbacher, H., and Fries, R. (2016). A multi-trait meta-analysis with imputed sequence variants reveals twelve QTL for mammary gland morphology in Fleckvieh cattle. *Genet. Sel. Evol.* 48, 14. doi:10.1186/s12711-016-0190-4.
- Pausch, H., MacLeod, I. M., Fries, R., Emmerling, R., Bowman, P. J., Daetwyler, H. D., et al. (2017). Evaluation of the accuracy of imputed sequence variant genotypes and their utility for causal variant detection in cattle. *Genet. Sel. Evol.* 49, 24. doi:10.1186/s12711-017-0301-x.
- Randhawa, I. A. S., Burns, B. M., McGowan, M. R., Porto-Neto, L. R., Hayes, B. J., Ferretti, R., et al. (2020). Optimized Genetic Testing for Polledness in Multiple Breeds of Cattle. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 10, 539–544. doi:10.1534/g3.119.400866.
- Saatchi, M., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., and Garrick, D. J. (2014). Large-effect pleiotropic or closely linked QTL segregate within and across ten US cattle breeds. *BMC Genomics* 15, 442. doi:10.1186/1471-2164-15-442.
- Sambraus, H. H. (2011). *Farbatlas Nutztierassen : 263 Rassen in Wort und Bild*.
- Sanchez, M. P., Govignon-Gion, A., Croiseau, P., Fritz, S., Hozé, C., Miranda, G., et al. (2017). Within-breed and multi-breed GWAS on imputed whole-genome sequence variants reveal candidate mutations affecting milk protein composition in dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.* 49, 1–16. doi:10.1186/S12711-017-0344-Z/TABLES/6.
- Sargolzaei, M., Chesnais, J. P., and Schenkel, F. S. (2014). A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. *BMC Genomics* 15. doi:10.1186/1471-2164-15-478.
- Schütz, E., Wehrhahn, C., Wanjek, M., Bortfeld, R., Wemheuer, W. E., Beck, J., et al. (2016). The Holstein Friesian Lethal Haplotype 5 (HH5) Results from a Complete Deletion of TBF1M and Cholesterol Deficiency (CDH) from an ERV-(LTR) Insertion into the Coding Region of APOB. *PLoS One* 11, e0154602. doi:10.1371/journal.pone.0154602.
- Sejrsen, K., and Purup, S. (1997). Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *J. Anim. Sci.* 75, 828. doi:10.2527/1997.753828x.
- Tribout, T., Croiseau, P., Lefebvre, R., Barbat, A., Boussaha, M., Fritz, S., et al. (2020). Confirmed effects of candidate variants for milk production, udder health, and udder morphology in dairy cattle. *Genet. Sel. Evol.* 52, 1–26. doi:10.1186/S12711-020-00575-1/FIGURES/5.
- van Binsbergen, R., Calus, M., Bink, M., van Eeuwijk, F., Schrooten, C., and Veerkamp, R. F. (2015). Genomic prediction using imputed whole-genome sequence data in Holstein Friesian cattle. *Genet. Sel. Evol.* 47, 71. doi:10.1186/s12711-015-0149-x.
- VanRaden, P., Null, D., Sargolzaei, M., Wiggans, G., Tooker, M., Cole, J., et al. (2013). Genomic imputation and evaluation using high-density Holstein genotypes. *J. Dairy Sci.* 96, 668–678. doi:10.3168/jds.2012-5702.
- Wang, X., Wurmser, C., Pausch, H., Jung, S., Reinhardt, F., Tetens, J., et al. (2012). Identification and Dissection of Four Major QTL Affecting Milk Fat Content in the German Holstein-Friesian Population. *PLoS One* 7, e40711. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0040711.
- Wang, Z., and Chatterjee, N. (2017). Increasing mapping precision of genomewide association studies: To genotype and impute, sequence, or both? *Genome Biol.* 18, 17–19. doi:10.1186/s13059-017-1255-6.
- Zhang, F., Wang, Y., Mukibi, R., Chen, L., Vinsky, M., Plastow, G., et al. (2020). Genetic architecture of quantitative traits in beef cattle revealed by genome wide association studies of imputed whole genome sequence variants: I: feed efficiency and component traits. *BMC Genomics* 21, 36. doi:10.1186/s12864-019-6362-1.

10 Übersicht aller im Berichtszeitraum realisierten Veröffentlichungen zum Projekt, bisherige geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Im Rahmen des DSN-Projekts wurden 16 Publikationen in nationalen und internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht. Diese sind im Folgenden in chronologischer Reihenfolge aufgelistet:

2018

- Beitrag zum DSN-Projekt der HU ist in der Februar Ausgabe der Zeitschrift Namens „DSN Mitteilungen“ durch den Verein zur Erhaltung und Förderung des Alten Schwarzbunten Niederungsringes (www.schwarzbuntes-niederungsring.de) veröffentlicht.
- Korcuć, P., Arends, D., Scheper, C., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2018). 1-step versus 2-step imputation: a case study in German Black Pied cattle. Proc. 11th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Auckland, New Zealand, 11-16.
- Meier, S., Eine alte Rasse im Fokus neuester wissenschaftlicher Untersuchungen, *Blickpunkt Rind*, 2, 2018

2019

- Korcuć, P., Arends, D., & Brockmann, G. A. (2019). Finding the optimal imputation strategy for small cattle populations. *Frontiers in genetics*, 10, 52.
- Meier, S., Korcuć, P., Arends, D., & Brockmann, G. A. (2019). DNA sequence variants and protein haplotypes of casein genes in German Black Pied Cattle (DSN). *Frontiers in genetics*, 10, 1129.

2020

- Meier, S., Brockmann, G. A. (2020). Deutsches Schwarzbuntes Niederungsring - Eine alte Rasse wird Gegenstand moderner Forschung. *Blickpunkt Rind* 2, 2020
- Meier, S., Arends, D., Korcuć, P., Neumann, G. B., & Brockmann, G. A. (2020). A genome-wide association study for clinical mastitis in the dual-purpose German Black Pied cattle breed. *Journal of dairy science*, 103(11), 10289-10298.

2021

- Korcuć, P., Arends, D., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2021). Genomic loci affecting milk production in German Black Pied cattle (DSN). *Frontiers in Genetics*, 12, 640039.
- Meier, S., Arends, D., Korcuć, P., Kipp, S., Segelke, D., Filler, G., & Brockmann, G. A. (2021). Implementation of an economic lifetime net merit for the dual-purpose German Black Pied cattle breed. *Agriculture*, 11(1), 41.

2022

- Brockmann, G. A., Korcuć, P., Meier, S., Neumann, G., 2022. Ergebnisse aus der Wissenschaft. In *Deutsches Schwarzbuntes Niederungsring – 50 Jahre Genreservezucht in Brandenburg*, Herausgeber RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg, p. 45-51
- Brockmann, G.A. (2022), *Das Deutsche Schwarzbunte Niederrind (DSN): Informationen aus der Genomanalyse*, DGFZ-Schriftenreihe, ISSN 0949-8842, 81:122-127.
- Korcuć, P., Neumann, G. B., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2022). Improved genome-wide associations using a breed-specific 200K SNP chip for German Black Pied (DSN) cattle. In *Proceedings of 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP)* (pp. 1567-1570). Wageningen Academic Publishers.

- Korkuć, P., Neumann, G.B., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., König, S., Brockmann, G. A. (2022). Verbesserte genomweite Assoziationen bei Verwendung eines rassespezifischen 200K SNP-Chips für Deutsche Schwarzbunte Niederungsrinder (DSN), Tagungsband Vortragstagung der DGfZ und GfT am 21./22. September 2022 in Kiel

2023

- Korkuć, P., Neumann, G. B., Hesse, D., Arends, D., Reißmann, M., Rahmatalla, S., ... & Brockmann, G. A. (2023). Whole-Genome Sequencing Data Reveal New Loci Affecting Milk Production in German Black Pied Cattle (DSN). *Genes*, 14(3), 581.
- Korkuć, P., Neumann, G.B., Hesse, D., Arends, D., Reißmann, M., Rahmatalla, Wolf, M. J., May, K., König, S., Brockmann, G. A. (2023). Neue Loci für Milchproduktionsmerkmale beim Deutschen Schwarzbunten Niederungsrind (DSN) basierend auf Gesamtgenomsequenzdaten, Tagungsband Vortragstagung der DGfZ und GfT am 13./14. September 2023 in Halle
- Neumann, G. B., Korkuć, P., Reißmann, M., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2023). Unmapped short reads from whole-genome sequencing indicate potential infectious pathogens in german black Pied cattle. *Veterinary Research*, 54(1), 95.

Weitere 12 Publikation sind aufgrund von Kooperation und der Zuarbeit zu dem DSN-SNP-Chip Projekt, das in Zusammenarbeit der HU Berlin mit der Justus-Liebig-Universität Gießen entstanden und im Folgenden gelistet:

2017

- Ko-Autorenschaft in 3 Beiträgen zum Thema DSN aufgrund der Kooperation mit Prof. Dr. Sven König, DGfZ 2017

2019

- May, K., Scheper, C., Brügemann, K., Yin, T., Strube, C., Korkuć, P., ... & König, S. (2019). Genome-wide associations and functional gene analyses for endoparasite resistance in an endangered population of native German Black Pied cattle. *BMC genomics*, 20, 1-15.

2020

- Naderi, S., Moradi, M. H., Farhadian, M., Yin, T., Jaeger, M., Scheper, C., ... & May, K. (2020). Assessing selection signatures within and between selected lines of dual-purpose black and white and German Holstein cattle. *Animal Genetics*, 51(3), 391-408.

2021

- Wolf, M. J., Yin, T., Neumann, G. B., Korkuć, P., Brockmann, G. A., König, S., & May, K. (2021). Genome-Wide Association Study Using Whole-Genome Sequence Data for Fertility, Health Indicator, and Endoparasite Infection Traits in German Black Pied Cattle. *Genes*, 12(8), 1163.
- Neumann, G. B., Korkuć, P., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., Reißmann, M. & Brockmann, G. A. (2021). Design and performance of a bovine 200 k SNP chip developed for endangered German Black Pied cattle (DSN). *BMC genomics*, 22(1), 1-13.

2022

- May, K., Wolf, M. J., Neumann, G. B., Korkuć, P., Brockmann, G. A., & König, S. (2022, December). Genetic evaluations and genomic characteristics for local cattle using genome sequences, 50K and a specific SNP chip. In Proceedings of 12th World Congress on Genetics

Applied to Livestock Production (WCGALP) Technical and species orientated innovations in animal breeding, and contribution of genetics to solving societal challenges (pp. 1131-1134). Wageningen Academic Publishers.

- Neumann, G. B., Korcuć, P., Arends, P., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2022, December). Phylogenetic analysis and nucleotide diversity of 69 cattle breeds including German Black Pied cattle using WGS. In Proceedings of 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP) Technical and species orientated innovations in animal breeding, and contribution of genetics to solving societal challenges (pp. 1008-1011). Wageningen Academic Publishers.

2023

- Neumann, G. B., Korcuć, P., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2023). Genomic diversity and relationship analyses of endangered German Black Pied cattle (DSN) to 68 other taurine breeds based on whole-genome sequencing. *Frontiers in Genetics*, 13, 993959.
- May, K., Wolf, M. J., Yin, T., Neumann, G. B., Korcuć, P., König, S., & Brockmann, G. A. (2023). Nutzen von Genotyp- und Sequenzdaten für die züchterische Weiterentwicklung von Rassen mit kleiner Populationsgröße am Beispiel des Deutschen Schwarzbunten Niederungsrindes. *Züchtungskunde*, 95(1).
- Neumann, G. B., Korcuć, P., Arends, D., Wolf, M. J., May, K., König, S., & Brockmann, G. A. (2023). Genomic diversity and relationship analyses of endangered German Black Pied cattle (DSN) to 68 other taurine breeds based on whole-genome sequencing. *Frontiers in Genetics*, 13, 993959.

Anhang (übergeben an den DSN-Zuchtverband, den RBB und die Betriebsleiter)

Untersuchungen zu Körpermerkmalen bei weiblichen Rindern der Rasse DSN zum Zeitpunkt der Besamung

Zusammenfassung

Auf Anregung der RBB und der AG Gräfendorf wurde von der Humboldt-Universität zu Berlin eine Studie durchgeführt, die das Ziel hatte, im DSN-Bestand der AG Gräfendorf einen Überblick zur Gewichtsentwicklung und zu Körpermaßen bei DSN-Färsen zu erarbeiten. Vorinformationen dazu gab es keine. Für die Analysen standen die Daten von 275 einmalig vermessenen und gewogenen Färsen zur Verfügung. Die Anzahl der Tiere reichte jedoch nicht aus, um alle im Zusammenhang mit Körpermerkmalen möglichen Fragestellungen ausreichend beantworten zu können. Im Folgenden zeigen wir Ergebnisse, die von praktischer Relevanz oder darüberhinausgehendem Interesse sein könnten.

Körpermerkmale bei Färsen

Zum Zeitpunkt des Wechsels in die Besamungsgruppe hatten die Tiere ein mittleres Alter von 14,4 Monaten und wogen im Durchschnitt 390 kg. Dieses Gewicht wird in der vorliegenden Arbeit als Erstbesamungsgewicht (Gew) bezeichnet. Zur gleichen Zeit betrug die Widerristhöhe (WH) 120 cm und die Kreuzbeinhöhe (KBH) 124 cm.

Das Erstbesamungsgewicht war am stärksten mit dem Brustumfang (BU, $r=0,56$), der Beckenbodenbreite (BBB, $r=0,40$), der Widerristhöhe (WH, $r=0,29$) und der Kreuzbeinhöhe (KBH, $r=0,28$) korreliert. Trotz der verhältnismäßig hohen Korrelation zwischen Erstbesamungsgewicht und Brustumfang genügte es nicht, das Erstbesamungsgewicht allein mit Hilfe des Brustumfangs abzuschätzen. Eine hinreichend genaue Abschätzung war aber möglich, wenn zusätzlich noch Widerristhöhe, Beckenbodenbreite und der Rührbeinumfang (RBU) gemessen wurden. Unter Berücksichtigung aller vier Körpermaße in einer multiplen Regressionsgleichung entspricht 1 cm größerer Brustumfang etwa einem 2,5 kg höherem Erstbesamungsgewicht. Bei alleiniger Berücksichtigung des Brustumfangs ohne Berücksichtigung der anderen Maße sind es 3 kg Erstbesamungsgewicht je cm Brustumfang, bei gleichzeitig stärkerer Über- oder Unterschätzung der Einzeltiere.

Signifikante väterliche Effekte auf die Merkmalsausprägung wurden bei der Kreuzbeinhöhe ($p<0,0001$), beim Brustumfang ($p=0,001$), bei der Brusttiefe (BT, $p=0,01$) und bei der Differenz aus Kreuzbeinhöhe und Widerristhöhe (DHM, $p=0,001$) nachgewiesen, tendenzielle Effekte auch bei der Widerristhöhe ($p=0,055$).

Neben den Einzelmerkmalen wurden zur Beschreibung des Körpertyps Indizes gebildet, die die Ausprägungen mehrerer Körpermerkmale eines Tieres miteinander verbinden und das Tier einer bestimmten Index-Gruppe zuordnet. Der Index **KFT2** (Variante 2 zur Bestimmung des Körperformtyps (KFT)) umfasst z.B. die Merkmale Kreuzbeinhöhe, Beckenbodenbreite und Brusttiefe. In jedem der Merkmale wurden die Tiere zunächst in zwei Gruppen unterteilt, eine Gruppe, die höhere (H) und eine Gruppe, die niedrigere (N) Werte für die Merkmalsausprägung aufwies als der Mittelwert über alle Tiere. Dieser Körperformtyp charakterisiert das Erscheinungsbild der Färsen umfassender als die 3 Einzelmerkmale für sich genommen. Der Gruppe HHH im KFT2 Index gehörten z.B. nur Tiere an, die in

allen 3 im Index zusammengefassten Merkmalen (Kreuzbeinhöhe, Beckenbodenbreite und Brusttiefe) überdurchschnittlich hohe Werte hatten. In der Gruppe NHH sind alle Tiere enthalten, die im Merkmal Kreuzbeinhöhe niedriger, aber in den Merkmalen Beckenbodenbreite und Brusttiefe höher als der Durchschnitt waren, womit sie sich in ihrer Gesamterscheinung im Körpertyp deutlich von der HHH-Gruppe unterschieden.

Väterliche Effekte auf Körpermerkmale bei Färsen

Beim Vergleich der Gruppenzusammensetzung zwischen väterlichen Nachkommenschaften war der genetische Einfluss auf die Indizes z.T. deutlich erkennbar. So gehörten z.B. 7 von 17 (41,2%) Färsen des Bullen 815792 beim KFT2 zur NNN-Gruppe (klein, schmales Becken, wenig Brusttiefe), während es beim Bullen 815831 nur 4 von 37 (10,8%) waren. Umgekehrt gehörten lediglich 2 von 17 (11,8%) Nachkommen des Bullen 815792 zur HHH-Gruppe (überdurchschnittlich groß, überdurchschnittlich breites Becken, überdurchschnittliche Brusttiefe), beim Bullen 815831 war es hingegen mit 15 von 37 (40,5%) Färsen fast die Hälfte aller Halbgeschwister.

Zusammenhang zwischen Gesamtabgängen und Körpermerkmalen bei Färsen

Ein Zusammenhang zwischen den Körpermerkmalen bei Färsen und den Gesamtabgängen bis zum 30. Tag der 3. Laktation konnte statistisch nicht nachgewiesen werden. Alle p-Werte der F-Tests in den Modellen rangierten deutlich oberhalb der Signifikanzschwelle. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die im Alter von etwa 14 Monaten beim Jungtier untersuchten Körpermerkmale keine ausreichend starken Signale senden, auf deren Grundlage verlässliche Prognosen für die Nutzungsdauer erstellt werden könnten.

Zusammenhang zwischen Milchgelderlös und Körpermerkmalen bei Färsen

Der größte Teil der Erlöse bei weiblichen DSN-Rindern kommt aus der Milch. Daher wurde untersucht, ob die an den Färsen erfassten Körpermerkmale mit dem Milchgelderlös in Verbindung stehen könnten. Weil sich zeigte, dass sich Stärke und Richtung der untersuchten Effekte zwischen den verschiedenen Laktationen unterschieden, erfolgte die Auswertung laktationsweise.

In der 1. Laktation hatten unter Berücksichtigung der Einzelmerkmale die Widerristhöhe ($p=0,028$) und der Brustumfang ($p=0,006$) einen signifikanten Einfluss auf den Milchgelderlös. Sowohl die Erhöhung der Widerristhöhe um 1 cm als auch die Zunahme des Brustumfangs um 1 cm hatten einen Mehrerlös von etwa 15 EURO pro Laktation zur Folge.

In der 2. Laktation war der Effekt nicht mehr signifikant. Der Schätzwert des Effektes schwächte sich beim Brustumfang ab (10 Euro/cm, $p > 0,05$) und bei der Widerristhöhe kehrte er sich sogar ins Gegenteil um (-2,6 Euro/cm, $p > 0,05$).

In der 3. Laktation erlangte das kombinierte Merkmal „Index **KT1** (Variante 1 zur Bestimmung des Kalibertyps)“ Bedeutung für den Milchgelderlös ($p=0,053$). Für den Index wurden die Tiere hinsichtlich Erstbesamungsgewicht in 3 Gruppen unterteilt (niedrig=N, mittel=M und hoch=H) und mit den beiden Gruppen der Widerristhöhe (niedrig=N und hoch=H) kombiniert. Auch wenn im F-Test nur in der 3. Laktation Signifikanz nachweisbar war, fiel bereits in der 1. Laktation auf, dass NN-Tiere mit einem niedrigen Erstbesamungsgewicht (258-380 kg) und einer geringen Widerristhöhe (112-120 cm) den geringsten Milchgelderlös erwirtschafteten. Er lag um 146 € unter dem der NH-Gruppe, mit einem ebenfalls niedrigen Erstbesamungsgewicht (258-380 kg) aber einer gleichzeitig überdurchschnittlichen Widerristhöhe (121-128 cm). Der p-Wert für den einfachen Mittelwertvergleich zwischen beiden Gruppen beträgt 0,036. In der 2. und 3. Laktation näherten sich die NN-Tieren dem höheren Niveau

des Milchgelderlöses in den anderen Gruppen schnell an. Für diese Leistungsdynamik könnten ein unzureichendes Futteraufnahmevermögen in Verbindung mit einem nachzuholenden Skelettwachstum der kleinen Tiere während der 1. Laktation verantwortlich sein. Beides führt dazu, dass während dieser Zeit weniger Energie für die Milchsynthese zur Verfügung steht. Hinweise auf solche Zusammenhänge finden sich auch in den Differenzen zwischen Kreuzbeinhöhe und Widerristhöhe (DKW). Je größer diese Differenz ausfällt, umso auffälliger ist das jeweilige Tier überbaut. Junge Rinder mit solch einem Erscheinungsbild gelten dann gewöhnlich als spätreif. Besonders hohe DKW-Werte hatten sowohl die NN- (Erstbesamungsgewicht 358-380 kg, Widerristhöhe 112-120 cm, in der 1. Laktation geringster Milchgelderlös) als auch die MN-Tiere (Erstbesamungsgewicht 381-399 kg, Widerristhöhe 112-120 cm, Gruppe mit mittlerem Milchgelderlös in der 1. Laktation und höchstem Milchgelderlös in der 2. und 3. Laktation). Beide Gruppen hatten einen besonders großen Anstieg im Milchgelderlös von der 1. zur 2. Laktation. NH-Tiere, mit dem höchsten Milchgelderlös in der 1. Laktation (Erstbesamungsgewicht 358-380 kg, Widerristhöhe 121-128 cm) waren am wenigsten überbaut. Sie konnten sich zwar auch in der 2. und 3. Laktation noch gut behaupten, verloren hier aber ihre Spitzenposition.

Eine wichtige Rolle für den Milchgelderlös spielt die Wachstumsintensität von Jungrindern bis zur Besamung. Diese kann vor allem über die Fütterung gut beeinflusst werden. Die Fütterung im jungen Alter prägt Stoffwechselabläufe nachhaltig und ist auf diese Weise u.a. auch an der Milchleistung beim später laktierenden Rind beteiligt. Die Wachstumsintensität ist als Gewichtszunahme pro Zeiteinheit definiert. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung von Erstkalbealter (EKA) und Erstbesamungsgewicht in der 1. Laktation wird der höchste Milchgelderlös erwirtschaftet, wenn die Tiere zum Zeitpunkt des Wechsels in die Besamungsgruppe 442 kg wiegen (fast das Maximum aller erfassten Gewichte) und ein Erstkalbealter von 771 Tagen (25,4 Monate) erzielen. Für das Erreichen dieser Optimalwerte ist eine tägliche Zunahme von 861 g/d im Zeitraum von der Geburt bis zum Wechsel in die Besamungsgruppe erforderlich. Zum Erzielen eines maximalen Milchgelderlöses in der 2. Laktation sind ein Erstbesamungsgewicht von mindestens 440 kg und ein EKA von 731 Tagen (24 Monate) anzustreben, was einer täglichen Zunahme von 936 g/d entspricht. Da beginnend mit dem 3.-5. Lebensmonat bis zur Pubertät das intensivste Euterwachstum erfolgt (allometrische Phase), wird vorgeschlagen, besonders die davor- und danach liegenden Entwicklungsabschnitte bis zur Besamung für eine intensive Fütterung zu nutzen. Andernfalls besteht die Gefahr einer forcierten Fetteinlagerung ins Eutergewebe und einer reduzierten Parenchymbildung. Dies wurde mehrfach bei Untersuchungen an Milchrindern nachgewiesen, die anhaltend und ausreichend differenziert gefüttert wurden (Mueller et al., 2007; Sejrsen and Purup, 1997). Erfahrungen mit Zweinutzungsrasen liegen nicht vor.

Zusammenhang zwischen Reproduktion und Körpermerkmalen bei Färsen

In der 1. Laktation hatte das Erstbesamungsgewicht einen signifikanten ($p=0,04$), aber nur schwach wirkenden nachteiligen Effekt auf die Verzögerungszeit (VZ). Je kg Erstbesamungsgewicht erhöhte sich die Verzögerungszeit um 0,01 Tage.

Für die 2. Laktation wurden signifikante Zusammenhänge zwischen der Verzögerungszeit und der Anzahl Besamungen pro Laktation (ABL) auf der einen Seite und den Körpermerkmalen Beckenbodenbreite, Röhrbeinumfang, Brusttiefe (alle einzeln) sowie dem Index KFT2 auf der anderen Seite nachgewiesen. Wenn die Beckenbodenbreite um 1 cm anstieg, verlängerte sich in der 2. Laktation die Verzögerungszeit um 0,18 Tage, bei 1 cm größerem Röhrbeinumfang waren es 0,25 Tage und bei 1 cm Brusttiefe 0,14 Tage. In der 1. Laktation waren diese positiven Zusammenhänge ebenfalls statistisch signifikant, jedoch in einem deutlich schwächeren Ausmaß.

In der 3. Laktation hatten Tiere mit einem hohen Erstbesamungsgewicht und solche mit einer hohen täglichen Zunahme bis zum Wechsel in die Besamungsgruppe tendenziell sogar kürzere Verzögerungszeiten.

Beim Index **KFT2** fiel auf, dass kleine Tiere mit tiefer Brust und breitem Becken (NHH) sowohl in der 1. als auch in der 2. Laktation in beiden Reproduktionsmerkmalen (Verzögerungszeit, Anzahl Besamungen pro Laktation) die schlechtesten Leistungen hatten, während große Tiere mit geringer Brusttiefe und breitem Becken (HNN) die besten Ergebnisse erzielten. In der 1. Laktation betrug der Unterschied bei der Verzögerungszeit zwischen beiden Gruppen 42 Tage, was der Zeit von zwei Sexualzyklen bei der Kuh entspricht. In der 2. Laktation wuchs die Differenz noch weiter an und in der 3. Laktation rangierten diese Gruppen immer noch jeweils auf Rang 2 der vorteilhaften bzw. unvorteilhaften Merkmalsausprägung. Sowohl in der 1. als auch in der 2. Laktation waren die Differenzen beim einfachen Mittelwertvergleich signifikant ($p=0,002-0,018$) oder zumindest tendenziell erkennbar (ABL, 1. Laktation, $p=0,09$). Die Ursache für die Unterschiede in den Reproduktionsergebnissen zwischen den beiden Gruppen (NHH, HNN) können nur vermutet werden. Möglich ist, dass bislang wenig bekannte anatomisch-physiologische Faktoren hierfür verantwortlich sind. Daneben könnten auch die relativ kleinen Tierzahlen zufällig an den beobachteten Unterschieden beteiligt sein. Dagegen spricht jedoch, dass die Ergebnisse in drei aufeinanderfolgenden Laktationen bei Betrachtung von gleichzeitig zwei Reproduktionsmerkmalen und sich verändernder Gruppenzusammensetzung ähnlich sind.

Fazit

Mit dieser Studie wurden seit den Transformationsprozessen in der Rinderzucht beginnend 1998 erstmals wieder umfangreiche Erhebungen von Körpermerkmalen an jungen, noch nicht ausgewachsenen DSN-Rindern vorgenommen. Die Ergebnisse erlauben Rückschlüsse zur Veränderung des äußeren Erscheinungsbildes der Rasse im Verlaufe vieler Generationen Zuchtarbeit und gestatten Vergleiche mit anderen Rassen. Auch wenn hier nicht alle methodischen Auswertungsmöglichkeiten angewandt werden konnten und nicht alle Ergebnisse eindeutige Aussagen erlauben, so wurden doch etliche Ergebnisse erhalten, die für die praktische Zuchtarbeit von Interesse sein könnten.

Undifferenzierte, laktationsübergreifende Empfehlungen für die Aufzucht der Jungtiere lassen sich aus den Ergebnissen nicht ableiten. Gleiches gilt für die Eignung aller zum Zeitpunkt des Wechsels in die Besamungsgruppe erfassten Körpermerkmale als prognostisches Merkmal für die spätere Milchleistung und Fruchtbarkeit. Zwar sind die im Abschnitt Milchgelderlös aufgeführten Optimalwerte für das Erstbesamungsgewicht und das Erstkalbealter als generelle Zielwerte für die Maximierung des Milchgelderlöses prinzipiell geeignet, allerdings werden sie nicht allen Körpertypen gleichermaßen gerecht. So erwirtschaften z.B. kleine Tiere mit mittlerem Besamungsgewicht ab der zweiten Laktation einen höheren Milchgelderlös als Tiere, die mit mehr als 400 kg besamt werden. Große Tiere mit einem niedrigen Besamungsgewicht sind ebenso gut wie schwere Tiere. Vielmehr müssen die Beziehungen zwischen ökonomisch relevanten Merkmalen und Körpermerkmalen für jede Laktation einzeln beurteilt werden. Empfehlungen sind auch davon abhängig, welcher Merkmalskomplex für die züchterische Verbesserung der Population vorrangig bearbeitet werden soll. Der Fleischansatz, der neben Milchleistung und Tiergesundheit im Zuchtziel der Doppelnutzungsrasse DSN verankert ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt werden, da die erforderlichen Schlachtdaten nicht vorlagen und überdies auch nur weibliche Tiere in die Untersuchungen einbezogen wurden.

Wenn die am Jungrind erfassten und hier vorgestellten Körpermerkmale keine eindeutigen Beziehungen zur späteren Milchleistung und Fruchtbarkeit zeigen, dann bedeutet das im Umkehrschluss, dass sie bei der Selektion in Färsenbeständen auch nicht vordergründig berücksichtigt werden müssen, wodurch die züchterische Verbesserung anderer Merkmale erleichtert wird. Dies gilt insbesondere für die Bewahrung des Körpertyps, der dem Charakter eines Zweinutzungsrides Rechnung trägt.

Die hier erstmals getesteten Körperindizes, die die phänotypische Gesamterscheinung beschreiben, bieten einen neuen Ansatz, Zweinutzungsrider ganzheitlich zu charakterisieren. Obwohl der Arbeitsaufwand dafür nicht unerheblich ist, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass korrelierte Leistungsvariationen mit den Indizes häufig besser erklärt werden können als mit Einzelmerkmalen. Eine Verknüpfung von mehr als drei Merkmalen ist nicht zu empfehlen, da dann die Gruppenbezeichnungen unübersichtlich werden und je Gruppe entsprechend weniger Tiere zur Verfügung stehen.