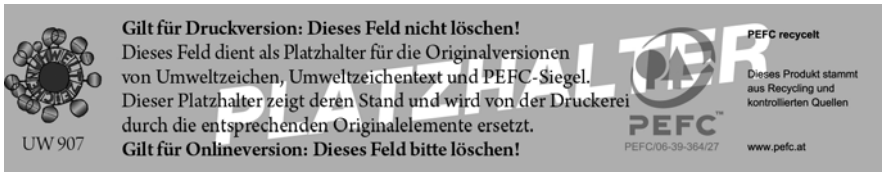
FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM LIPIZZANER, NORIKER UND DEM ÖSTERREICHISCH-UNGARISCHEN WEIßEN BAROCKESEL

ENDBERICHT ZUM FORSCHUNGSPROJEKT NUMMER 101332

Bundesministerium
Nachhaltigkeit und
Tourismus

IMPRESSUM
Projektnehmer: Veterinärmedizinische Universität Wien Department für Biomedizinische Wissenschaften
Institut für Tierzucht und Genetik
ProjektleiterIn: Mag.vet.med.Mag.phil.Gertrud Grilz-Seger/Dr.Thomas Druml
Tel. : +43 0664 602575634
E-Mail: gertrud.grilz@vetmeduni.ac.at
Projektmitarbeiterin: Mag.vet.med.Mag.phil.Gertrud Grilz-Seger/Dr. Thomas Druml
Tel.: +43 0664 8224844
E-Mail: thomas.druml@gmx.at
Kooperationspartner: ARGE Noriker, ARGE Haflinger, Bundesgestüt Piber
Finanzierungsstellen Bundesministerium für Nachhaltigkeit und Tourismus
Projektlaufzeit: 20.8.2018-15.02.2019

1. Auflage



ISBN

Alle Rechte vorbehalten.
Wien, 08.11. 2019

FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM LIPIZZANER, NORIKER UND DEM ÖSTERREICHISCH-UNGARISCHEN WEIßEN BAROCKESEL

ENDBERICHT ZUM FORSCHUNGSPROJEKT NUMMER 101332

INHALTSVERZEICHNIS

IMPRESSUM 2

1 ZUSAMMENFASSUNG 7

2 SUMMARY 9

3 EINLEITUNG 10

4 PROJEKTZIELE 12

5 PROJEKTSTRUKTUR 12

5.1 EIGENE VORARBEITEN 12
5.1.1 FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN 12
5.1.2 GENOMISCHE POPULATIONSSTRUKTUR ÖSTERREICHISCHER PFERDERASSEN 13
5.2 ARBEITSPAKETE 16
5.2.1 ARBEITSPACKET WP1 (LIPIZZANER) 16
5.2.2 ARBEITSPACKET WP2 (WEIßER BAROCKESEL), TEIL 1 17
5.2.2.1 ARBEITSPAKET WP2 (Mohrenkopf), TEIL 2 17
5.3 PROJEKTMITARBEITER/INNEN 18
5.4 NATIONALE UND INTERNATIONALE KOLLABORATOREN 18
5.4.1 BEREITSTELLUNG VON DNA PROBEN UND PEDIGREES 18
5.4.2 BEREITSTELLUNG VON SNP DATEN UND PEDIGREES 18
5.4.3 AKADEMISCHE ARBEITSGRUPPEN 19

6 FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM LIPIZZANER 20

6.1 EINLEITUNG 20
6.2 MATERIAL UND METHODE 20
6.3 ERGEBNISSE 21
6.3.1 DIE AUFHELLUNGEN 22
6.3.2 SCHECKUNGEN 22
6.3.3 HERITABILITÄTEN ABZEICHEN 23
6.4 DISKUSSION 24
6.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN 25

7 GENETISCHE GRUNDLAGEN DER MOHRENKOPFFARBE BEIM NORIKER 26

7.1 EINLEITUNG 26
7.2 MATERIAL UND METHODE 26
7.2.1 GENOMWEITE SNP DATEN UND GENOMWEITE ASSOZIATIONSANALYSE 26
7.2.2 PEDIGREE- UND ROHANALYSE UND SEQUENZVERGLEICH 26
7.3 ERGEBNISSE 27
7.4 DISKUSSION 30
7.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN 30

8 GENOMISCHE POPULATIONSANALYSEN 31

LIPIZZANER 31
8.1 EINLEITUNG 31
8.2 MATERIAL 31
8.3 METHODE 31
8.4 ERGEBNISSE 32
8.4.1 HAUPTKOMPONENTENANALYSE 32
8.4.2 NETZWERKANALYSE 33
8.4.3 HOMOZYGOTIEREGIONEN 35
8.4.4 ROH INSELN 37

8.4.5 GEN ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGS ANALYSE 41
8.5 DISKUSSION 42
8.6 SCHLUSSFOLGERUNGEN 44
HAFLINGER 45
8.7 EINLEITUNG 45
8.7.1 MATERIAL UND METHODEN 45
8.8 ERGEBNISSE 47
8.8.1 ADMIXTURE ANALYSE UND POPULATIONSSTRUKTUR 47
8.8.2 ROH PARAMETER 47
8.8.3 ROH INSELN 48
8.8.4 GEN ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGSANALYSE 51
8.8.5 SNP GENOTYPENEXTRAKTION 51
8.9 DISKUSSION 52
8.10 SCHLUSSFOLGERUNGEN 53
NORIKER 55
8.11 EINLEITUNG 55
8.12 MATERIAL UND METHODEN 56
8.13 ERGEBNISSE 56
8.13.1 ROH ANALYSE UND POPULATIONS STRUKTUR 56
8.13.2 ROH INSELN 58
8.13.3 ROH INSELN IN SUBSTRUKTUREN 59
8.13.4 GEN ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGSANALYSE 62
8.13.5 GRÖßEN ASSOZIIERTE SNPS IN ROH INSELN 63
8.14 SCHLUSSFOLGERUNGEN 64

9 SELEKTIONSSIGNATUREN IN 12 EUROPÄISCHEN PFERDERASSEN 66

9.1 EINLEITUNG 66
9.2 MATERIAL UND METHODE 67
9.2.1 SNP GENOTYPISIERUNG 67
9.3 ERGEBNISSE 67
9.3.1 VERTEILUNG UND MUSTER DER ROH INSELN (HOMOZYGOTIEREGIONEN) 68
9.3.1.1 Genotypfrequenz der mit Körpergröße und Fellfarbe assozierten SNPs 75
9.3.2 GENE ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGANALYSE 77
9.4 DISKUSSION 78

10 PEDIGREE UND INZUCHT ANALYSE BEIM ÖSTERREICHISCH-UNGARISCHEN BAROCKESEL 80

10.1.1 EINLEITUNG 80
10.1.2 MATERIAL UND METHODE 80
10.1.3 ERGEBNISSE 81
10.1.4 DISKUSSION 82
10.1.5 PCA ANALYSE ANHAND DES SNP CHIP DATEN 83

11 FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM WEIßEN BAROCKESEL 84

11.1 MATERIAL UND METHODEN 85
11.2 ERGEBNISSE 86
11.3 DISKUSSION 87
11.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN 88

12 AUSBLICK 89

13 PUBLIKATIONEN 90

13.1 VERÖFFENTLICHTE PUBLIKATIONEN 90
13.1.1 PUBLIKATIONEN IN DRUCK BZW. IN VORBEREITUNG 90
13.2 POSTER 90
13.3 VORTRÄGE 90

14 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 92

15 LITERATUR 99

16 TABELLENVERZEICHNIS 113

17 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 114

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Farbzucht stellt ein zentrales Element in der Pferdezucht dar und im speziellen hat diese Methode eine große Bedeutung für die österreichischen Pferderassen Noriker, Haflinger, Lipizzaner und den Weißen Österreichisch-Ungarischen Barockesel. Die Fellfarbe wird in den einzelnen Zuchtprogrammen in der Selektion nicht nur aus ästhetischen Gründen berücksichtigt, sondern auch in gesundheitlicher Hinsicht, da sie die Fitness und den ökonomischen Wert der Pferde beeinflusst. In diesem Projekt wurden beim Lipizzaner bislang unbekannte Allel Frequenzen der einzelnen Farbgene, die aus dem barocken Genpool herrühren, untersucht und der Einfluss der langfristigen Selektion auf Fellfarbe auf die genomische Architektur beim Lipizzaner, Noriker und Haflinger analysiert. Weiter wurden genetische Marker, die mit der Mohrenkopf-, Blau-, Braun-, Rotschimmelfarbe (roan) assoziiert sind, evaluiert bzw. identifiziert, sowie putative Tumorsuppressor-Gene in Verbindung mit der Melanom Genese beim Lipizzaner ermittelt und in einem Ausschlussverfahren der genetische Hintergrund der weißen Fellfarbe des Österreichisch-Ungarischen Weißen Barockesel untersucht. Es konnte zusätzlich eine Interaktion zwischen den Genen *OCA2*/*HERC2* mit der Schwalbenbauchfärbung (mealy, pangare) beim Exmoor Pony und den unterschiedlichen Fuchsschattierungen (chestnut, sorrel) beim Haflinger und Noriker festgestellt werden.

Durch die Genotypisierung bekannter Loci im *KIT* (*KIT* proto-oncogen tyrosinase receptor) und im *TYR* (Tyrosinase) Gen beim Österreichisch-Ungarischen Weißen Barockesel war es möglich, diese Mutationen als Ursache für die weiße Fellfärbung in der untersuchten Stichprobe auszuschließen. Diese Befunde haben auch eine Bedeutung für die Interpretation der Zuchtgeschichte und für das Zuchtprogramm in dieser Eselrasse, da wir daraus schließen können, dass keine direkte Verbindung zwischen dem phänotypisch ähnlichen italienischen Asinara Esel und dem Österreichisch-Ungarischen Weißen Barockesel besteht.

Ein in Vorarbeiten von den Projektmitarbeitern mit der Mohrenkopffärbung assoziierter SNP (Einzelnukleotid-Polymorphismus) konnte in diesem Projekt anhand einer größeren Stichprobe verifiziert werden. Die Sequenzanalyse der Region um diesen SNP enthüllte einen Haplotyp im *KIT* Gen, der mit dem Roan Phänotyp in drei verschiedenen Kaltblutpferderassen (Noriker, Belgier, Slowenisches Kaltblut), beim Quarter Horse und dem Murgesen nachgewiesen werden konnte. Der aus dieser Arbeit resultierende genetische Marker kann nun für die Identifikation von homo- und heterozygoten Mohrenköpfen (Roan) beim Noriker genutzt werden.

In weiterer Folge wurde in diesem Projekt eine umfassende genomweite Analyse der Populationsstruktur, genomischer Verwandtschaft, Autozygotie und genetischer Diversität bei den drei österreichischen Hauptrassen Lipizzaner, Noriker und Haflinger unter besonderer Berücksichtigung der Farbzucht durchgeführt. Mittels der Analyse von durchgehenden Homozygotie Regionen (runs of homozygosity; ROH) war es möglich, eindeutige Selektionssignaturen für die Selektion auf Fellfarbe am Genom dieser drei Rassen zu identifizieren. Diese Resultate konnten auch in einer umfassenden Meta-Analyse mit einem Groß-Datensatz, der 12 Europäische Pferderassen beinhaltete, bestätigt werden. Selektionssignaturen für Fellfarben konnten somit beim Vollblutaraber, Haflinger, Gidran (*MC1R*), beim Lipizzaner und Gidran (*STX17*), beim Exmoor Pony (*ASIP*) und beim Noriker (*MC1R, LP*) nachgewiesen werden. Eine Reihe an Genen, die für die Leistung, Fitness und Exterieur Merkmale verantwortlich sind, wurden beispielsweise beim Noriker als Signaturen ausgewiesen, dazu zählen die mit Körpergröße assoziierten Loci wie *LCORL/NCAPG*, *ZFAT* und *LASP1*. Beim Gidran und dem Französischen Traber konnten Signaturen für Selektion auf Verhaltensmerkmale entdeckt werden (*GRINB2* und *NTM/OPCML*), während die Selektion auf Exterieur Merkmale durch überlappende Homozygotie Regionen im *HOXB* Cluster beim Lipizzaner und Noriker nachgewiesen wurde. Weiter konnte gezeigt werden, dass beim Noriker mehrere Gene, die mit oxidativem Stress (*COX11*, *STXBP4*, *HLF* und *MMD*) und Autophagie (*CALCOCO2*), die mit der alpinen Haltungsumwelt zusammenhängen, unter langfristigem Selektionsdruck stehen.

Zusammenfassend konnten in diesem Projekt zahlreiche Informationen mit hoher Relevanz für die praktische Zuchtarbeit gewonnen werden und die Selektionsentscheidungen können somit zukünftig auch mit genotypischen Informationen unterstützt werden. Viele der Resultate sind von weitreichender wissenschaftlicher Bedeutung im Bereich der Farbgenetik, der Erforschung genetischer Ursachen von Fitness, Exterieur- und Leistungsmerkmalen und bilden damit eine Grundlage für weitere wissenschaftliche Forschung.

2 SUMMARY

Breeding for coat color is a main objective in horse breeding programs in general and it especially has a high impact on the Austrian breeds Noriker, Lipizzan, Haflinger and the white Austro-Hungarian Donkey. Coat color is not only considered in selection programs because of aesthetic reasons, it also influences health, fitness and the economic value of the respective breeds. In this project we investigated the up to date unknown allele frequencies of coat color genes originating from the baroque gene pool in the Lipizzan horse, the influence of selection for coat color on the genomic architecture in Lipizzan, Noriker, Haflinger, genetic markers for the roan coat color, putative melanoma suppressor genes in Lipizzans and marker/genes related to the white phenotype in the Austro-Hungarian Donkey. We further identified an interaction of the gene *OCA2/HERC* with mealy/pangare and sorrel/chestnut color phenotype in Exmoor Pony and Haflinger. By genotyping of known mutations in the *KIT* and *TYR* gene in the Austro-Hungarian Donkey, we were able to exclude these mutations being responsible for the typical white phenotype present in this population. All these findings have important implications on breeding history and breeding programs as we are able to conclude, that there is no direct relationship between the white Italian Asinara donkey and the Austro-Hungarian Donkey. A SNP (single nucleotide polymorphism) identified in previous studies was confirmed to be associated with roan coat color in Noriker horses. Comparative sequence analyses around this SNP revealed a haplotype in the *KIT* gene, which was associated with roan coat color in three investigated draught horse breeds (Noriker, Slovenian and Belgian draught horse), the Murgese and in Quarter horses. The resulting genetic marker can now be used for the identification of homozygous and heterozygous roan Noriker horses.

Furthermore, in this project firstly a comprehensive genome-wide analysis of the genomic architecture, genetic diversity and genetic relationship could be achieved for the three main Austrian horse breeds Lipizzan, Noriker and Haflinger. By means of runs of homozygosity (ROH) and ROH islands we identified signatures of selection due to breeding for coat color, which also was confirmed in a comprehensive meta-analysis on a set of twelve European horse breeds. In this study we found genes located within ROH islands, that were shared by more than 50% of individuals within a breed, for coat color in Purebred Arabian, Haflinger, Gidran (MC1R), in Lipizzan and Gidran (*STX17*) and in Exmoor Pony (*ASIP*). A range of genes relevant for performance, fitness and phenotype characteristics in horses were detected, as size associated loci in Noriker (*LCORL/NCAPG, ZFAT* and *LASP1*). Within Gidran and French Trotter selection for behavioral traits was indicated by *GRINB2* and *NTM/OPCML*. Selection targets for conformation breeding were pinpointed by the *HOXB*-cluster in the Lipizzan and Noriker horse. Several genes related to organism response to oxidative stress (*COX11, STXBP4, HLF* and *MMD*) and autophagy (*CALCOCO2*) (alpine pasture management), were underlined for Noriker horses.

Summarizing these results, this project provides important information for practical breeding work, as selection decisions now can be assisted by individual genotype information. Many of the results are of far-reaching scientific importance in the field of color genetics, the study of genetic causes of fitness, conformation and performance characteristics and thus form the basis for further scientific research.

3 EINLEITUNG

Die Zucht spezieller Fellfarben nimmt in der österreichischen Pferdezucht einen großen Stellenwert ein und ist bei den drei Hauptrassen Haflinger, Lipizzaner und Noriker ein wichtiges Rasse- und Selektionskriterium. In der genetischen Forschung spielte die Farbvererbung beim Pferd schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts eine wichtige Rolle bei der Verifizierung bzw. Anwendung der Mendelschen Erbregeln und das Interesse an den Fellfarben des Pferdes ist seitdem in der internationalen „scientific community" ungebrochen. Innerhalb der letzten drei Jahrzehnte konnten die wichtigsten genetischen Ursachen für viele Farbvarianten gefunden werden. Marklund et al. identifizierten 1996 eine Punktmutation am Chromosom 3 im *MC1R* Gen als Ursache für die Fuchsfarbe und 2001 konnten von Rieder et al. der genetische Mechanismus für die Braun- und Rappfarbe aufgeklärt werden. Pielberg et al. gelang 2008 der Nachweis der kausalen Mutation für die Schimmelfärbung beim Pferd. In kurz aufeinander folgenden Publikationen wurde der genetische Hintergrund für die Aufhellungen und Verdünnungen der Grundfarben (Cream Gen Falbe, Isabell - Mariat et. al., 2003; *TBX3* Dun, Falbe – Imsland et al., 2015; *SLC36A1* Champagne - Cook et al., 2008; *PMEL* Sliver - Brunberg et al., 2006) beschrieben. Eine amerikanische und eine Schweizer Forschergruppe fanden mehrere Marker/Mutationen, die einzelne Scheckungsvarianten und Abzeichen hervorrufen (*SB1* Sabino - Brooks and Bailey, 2005; *KIT* Tobiano - Brooks et al. 2007; *EDNRB* Overo - Yang et al. 1996; Dominant White - Haase et al. 2009; Haase et al., 2011; Splashed White - Hauswirth et al., 2012; Hauswirth et al., 2013). Die amerikanischen Genetikerinnen Holl und Bellone konnten den grundlegenden genetischen Mechanismus der Tigerzeichnung entschlüsseln (Bellone et al. 2013, Bellone et al., 2013; Holl et al., 2016), wobei Grilz-Seger et al. (2017) und Druml et al. (2017) weitere Einflussfaktoren auf die Variabilität der Tigerung nachwiesen. Wagner und Reissmann (2000; 2001) identifizierten eine weitere *MC1R* Variante, während Druml et al. (2018) Gensubstitutionseffekte bei der braunen Fellfarbe aufzeigten.

Die Fellfarbe ist nicht nur unter ästhetischen und ökonomischen Gesichtspunkten bedeutsam, sondern die Pigmentierung des Haarkleides und der Haut stellt auch eine wichtige Schutzfunktion dar. Die Pigmentierung schützt vor schädlichen Wirkungen der UV-Strahlung und das Fellkleid ist zentral für die Thermoregulation. Störungen in der Pigmentierung von Haut und Haaren können mit Beeinträchtigungen des Gesundheitszustandes einhergehen. Daher stehen die genetischen Ursachen für die unterschiedlichen Haar-, Haut- und Augenfarben (Salehar et al., 2016; Branitzky et al., 2009; Garcia-Borron et al., 2014) im Fokus der humangenetischen Forschung. Ein besonderer Schwerpunkt der Humangenetik ist die Erforschung von Pigmentierungsstörungen und ihren pathogenen Auswirkungen. Zu diesem Themenkomplex zählt das Melanom, das die höchste Letalitätsrate bei Hauterkrankungen aufweist. Da die Fellfarbe ein explizites Zuchtziel beim Pferd darstellt und eine lange Pedigree Dokumentation existiert, kann das Pferd als optimales Modelltier für Fragestellungen in diesem Bereich genutzt werden.

Der Lipizzaner spielte als Modelltier für die Erforschung der genetischen Ursache der Schimmelfärbung eine wichtige Rolle (Pielberg et al., 2008). Die Selektion auf die Schimmelfärbung erfolgt seit rund 150 Jahren (Grilz-Seger und Druml, 2011) und diese Farbvarietät gilt seitdem als rassespezifisch. Vor diesem Zeitpunkt wurden die Pferde in den Habsburger Hofgestüten in den verschiedensten Fellfarben gezüchtet. Welche dieser Farbvarianten im Genpool der aktuellen Lipizzaner Population noch vorhanden sind, war aufgrund der epistatischen Wirkung des Schimmelgens nicht bekannt. Die Genotypisierung bekannter Farbloci erlaubt erstmals eine Bestimmung der innerhalb der Lipizzaner Population segregierenden Farballele, wobei die Grundfarbe und der Allel Status des Schimmelgens durch ihren Einfluss auf den Melanom Status auch tiergesundheitlich relevant sind (Pielberg et al., 2008). Eine Phänotypisierung der Abzeichen ist durch die Schimmelfärbung ebenfalls erschwert. Generell sind in der Lipizzaner Zucht Tiere mit markanten oder großen Weißabzeichen unerwünscht, da sie einerseits dem Zuchtziel nicht entsprechen und andererseits aufgrund der fehlenden Pigmentierung eine erhöhte Fotosensibilität aufweisen. Die genaue Phänotypisierung

ermöglicht eine Einschätzung der auftretenden Abzeichen und durch die Berechnung der Heritabilität sind züchterische Selektionsmaßnahmen möglich.

Der genetische Hintergrund der beim Noriker gezüchteten Fellfarben (Braun, Fuchs, Rappe, Mohrenkopf, Schecke, Tiger) ist bis auf die Mohrenkopf Färbung (engl. blue roan) bekannt. Marklund et al. haben 1999 gezeigt, dass der roan Faktor auf dem Equinen Chromosom 3 in der *KIT* Region lokalisiert ist. Gleichzeitig wurde von Forschergruppen (Hintz und VanVleck, 1979; Marklund et al., 1999) postuliert, dass Homozygotie am Roan Locus zur Frühresorption des Embryos führt. Diese Hypothese wurde jedoch in weiterer Folge in Frage gestellt (Sponenberg und Bellone, 2017), es ist aber bislang noch nicht gelungen, die kausale Mutation für diese für den Noriker typische Fellfärbung zu finden. In genomweiten Analysen konnte von den Projektmitarbeitern ein mit der Mohrenkopffarbe beim Noriker assoziierter SNP auf Chromosom 3 identifiziert werden, an dessen Verifizierung in diesem Projekt gearbeitet wurde.

Die Österreichisch-Ungarischen Weißen Barockesel gelten als weltweite Rarität. Die genetische Grundlage ihrer Farbe wurde bislang noch nicht abgeklärt. Während beim Pferd die Erforschung der genetischen Ursachen der Fellfarben weit fortgeschritten ist, ist man beim Esel erst in den Anfängen. Eine phänotypische Klassifikation wurde von Sponenberg und Bellone (2017) in Analogie zur Systematik beim Pferd vorgenommen. Abitbol et al. identifizierten 2014 eine Mutation im *MC1R* Gen, welche die Fuchsfarbe beim Esel hervorruft und im Jahr darauf eine Mutation am *ASIP* Locus, welche für das Verschwinden der beim Esel typischen Aufhellungen im Bereich des Maules, des Bauches und den Innenseiten der Schenkel ist. Als Ursache für den albinotischen Phänotyp beim italienischen Asinara Esel wurde eine Mutation im *TYR* Gen (Utzeri et al., 2015) verantwortlich gemacht, Haase et al. (2015) fanden zwei weitere Varianten im *KIT* Gen, die für die Dominant White Färbung und die Scheckung beim Esel verantwortlich sind. Um die Fragestellung der genetischen Grundlage der typischen Fellfärbung von Weißen Barockeseln zu klären, wurden in diesem Projekt an einer repräsentativen Stichprobe mittels Ausschlussverfahren die Genotypisierung der bislang bekannten Loci vorgenommen.

Durch die Etablierung hochdichter SNP Genotypisierungsarrays (Schäffer et al., 2017) steht ein wichtiges wissenschaftliches Werkzeug zur Analyse des Equinen Genoms zur Verfügung. Auf Basis von Genotypisierungsdaten und hochdichten SNP Chip Daten wurden in anderen Species (Rind, Schaf, Ziege) die demografischen Auswirkungen und die Effekte von Zuchtprogrammen und Selektionsstrategien auf die Populationsstruktur, den Autozygotiegrad und Selektionssignaturen untersucht (Purfield et. al, 2012; Marras et. al., 2014, Bosse et al., 2015). Äquivalente Studien zum Pferd mit 670k Daten waren bis dato nur in geringer Anzahl vorhanden (Metzger et al., 2015). Im Rahmen dieses Projektes wurden von den Projektmitarbeitern die ersten umfassenden genomischen Populationsanalysen anhand von 670k SNP Daten beim Lipizzaner, Noriker und Haflinger vorgenommen. Die in dieser Arbeit ausgearbeitete und adaptierte grafische Repräsentation der Ergebnisse in Form von Netzwerkgrafiken ermöglichen eine leichte Nachvollziehbarkeit wissenschaftlicher Ergebnisse, die wichtige zuchtpraktische Hinweise, wie genetische Verwandtschaft und Inzuchtgrad von einzelnen Individuen sowie vom Familien zueinander veranschaulicht.

4 PROJEKTZIELE

Das Ziel dieses Projektes war es, (1) den Farbgenpool und die spezifischen Allel Frequenzspektra beim Lipizzaner zu identifizieren, (2) die Erblichkeit bzw. genetische Komponente der vorkommenden Abzeichen und Scheckungsvarianten beim Lipizzaner zu bestimmen, (3) den genetischen Hintergrund der spezifischen Fellfarbe des Österreichisch-Ungarischen Weißen Barockesels zu klären und (4) die Auswirkungen der Farbzucht auf die Populationsstruktur, Selektionssignaturen und Autozygotie beim Noriker, Lipizzaner und Haflinger zu untersuchen. Beim Noriker wurde zusätzlich getestet (5), ob sich ein von den Projektmitarbeitern identifizierter genetischer Marker als Gentest für den Mohrenkopf- Braun- und Rotschimmel (im Englischen als blue/bay/red roan bezeichnet) geeignet ist.

5 PROJEKTSTRUKTUR

5.1 EIGENE VORARBEITEN

5.1.1 FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN

In einem bereits abgeschlossenen vom FFG geförderten Projekt Nr. 843464 mit dem Titel: "Automatisation von Phänotypisierungen von Exterieur- und Bewegungsmerkmalen und genomische Analysen beim Lipizzaner" konnten neben der Innovation von Phänotypisierungsmethoden auch genomische Analysen mittels des 670k Affymetrix SNP Chip erarbeitet werden. Neben diesen konkreten Vorarbeiten, aus denen ein Teil des Datenbestandes resultiert, waren die Projektmitarbeiter auch in weiteren wissenschaftlichen Studien mit direktem Bezug zur Fragestellung dieses Projektes tätig. Dazu gehören populationsgenetische Untersuchungen zu Vitiligo, Melanom Status und fortschreitenden Ergrauen beim Lipizzaner (Curik et al., 2013; Pielberg et al., 2008).

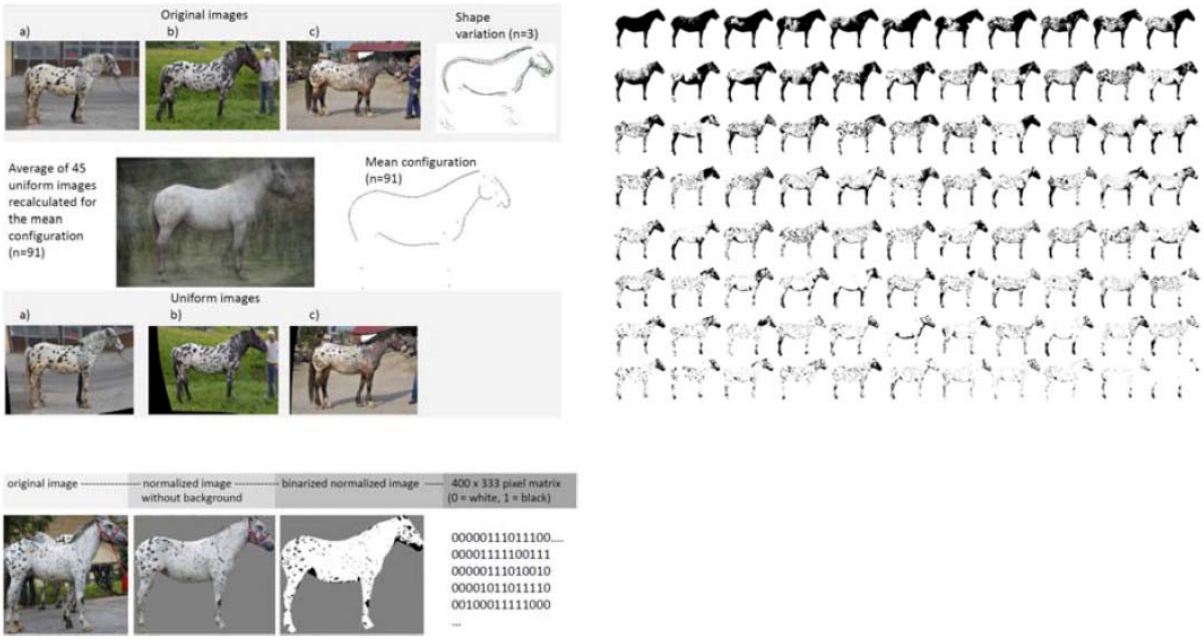


Abbildung 1: Arbeitsfluss der Pixel basierenden Methode nach Druml et al. (2017) um Scheckungsmuster von Pferden aus Digitalbildern in Binärdaten umzuwandeln

In Hinsicht auf die Vererbung der Fellfarbe beim Pferd, im speziellen der Tigerzeichnung beim Noriker, konnten von den Projektmitarbeitern neue Analysemethoden erarbeitet werden. Auf Basis von standardisierten Digitalbildern von Noriker Tigern, wurden nach einer Normalisierung der Bilder mittels Prokrustes Statistik neue uniforme Bilder (Form, Größen und Positionsvariation wurde wegskaliert) berechnet, welche nach einer uniformen Objektsegmentierung in Binärdaten umgewandelt wurden. Diese Daten beschreiben Art, Lokalisation und Ausmaß der Tigerzeichnung und konnten mittels Statistikprozeduren analysiert werden (Abb.1). Neben der Bestätigung des Einflusses von Grundfarbe, Alter und der Fellfarben der Eltern auf die Tigerzeichnung (Druml et al., 2017) konnte von Grilz-Seger et al. (2017) mit Genotyp Informationen der *LP* (Bellone et al., 2013) und *PATN1* (Holl et al., 2016) Loci nachgewiesen werden, dass die Systematik der traditionellen österreichischen Tigerzucht beim Noriker optimal auf die Zucht und Erhaltung der gewünschten Tigerzeichnung abgestimmt ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der SNP ECA1:108 249 293 C > T, der beim Appaloosa mit der Tigerzeichnung und der Nachtblindheit assoziiert ist (Bellone et al., 2010), beim Noriker nicht anwendbar ist. Es konnte hier keine Assoziation zwischen dem SNP und der Tigerzeichnung festgestellt werden.

In einer weiteren Arbeit mittels photometrischer Farbbestimmungsmethoden nach dem CIE L*a*b Farbsystem und Genanalysen wurden die Allel Effekte von *ASIP* und *MC1R* auf die Farbschattierungen der beiden Grundfarben Braun und Rappe untersucht (Druml et al., 2018). Hier konnte anhand von Shagya-Arabern und Norikern gezeigt werden, dass die Allel Kombination *E/E A/a* in den dunklen satt pigmentierten Braunschattierungen resultierte, während die anderen Genotyp Kombinationen lichtere Brauntöne verursachen (Abb.2).

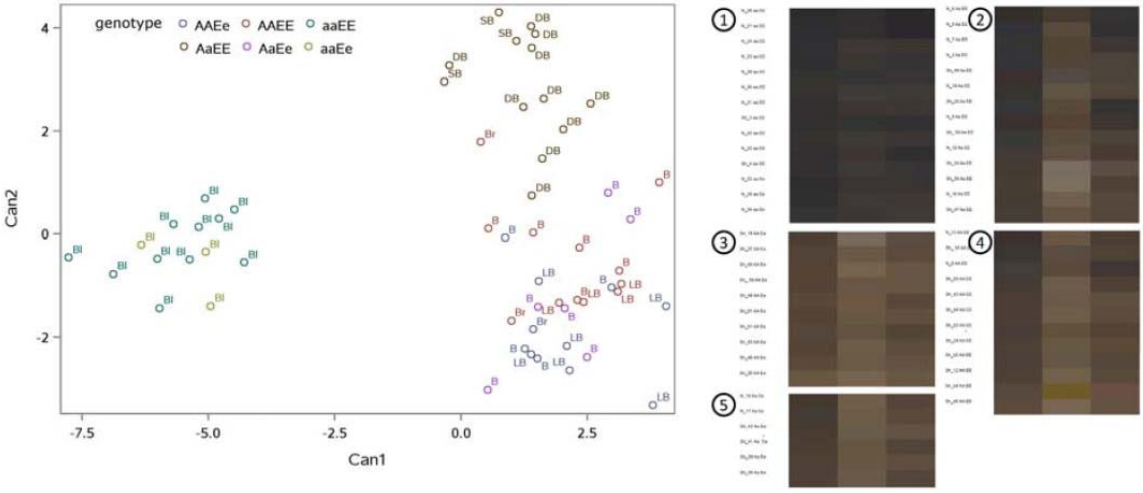


*Abbildung 2: Kanonische Varianzanalyse (links) von photometrischen Werten im CIE L*a*b System, um die phänotypische Differenzierung von Pferden unterschiedlicher Allel Kombinationen von ASIP und MC1R darzustellen (Druml et al., 2017)*

Diese wissenschaftlichen Vorarbeiten gipfelten im Jahr 2018 in einer populärwissenschaftlichen Buchpublikation (Grilz-Seger und Druml, 2018; Handbuch Pferdefarben), welche in Zusammenarbeit mit der Zentralen Arbeitsgemeinschaft österreichischer Pferdezüchter (ZAP) realisiert wurde. Damit konnte ein speziell auf die österreichische Pferdezucht abgestimmter und auf den aktuellen Stand des Wissens gebrachter Praxisleitfaden erstellt werden, welcher den österreichischen Züchtern zur Verfügung steht und die seit 1949 (Praxisheft der ARGE Noriker) existierende Lücke in der Dokumentation schließt.

5.1.2 GENOMISCHE POPULATIONSSTRUKTUR ÖSTERREICHISCHER PFERDERASSEN

Im Jahr 2013 wurde der erste HD (hoch dichte) SNP 670 k Genotypisierungs-Array beim Pferd eingeführt, der erstmals eine relativ kostengünstige Genotypisierung von 670.604 SNPs und damit einen direkten

Einblick in das Genom des Pferdes ermöglichte (Schaefer et al., 2017). Während die Erforschung einzelner Farbgene innerhalb der letzten Jahrzehnte beim Pferd rasante Fortschritte gemacht hat, lagen bis 2018 beim Pferd relativ wenige auf hochdichten SNP Daten basierende Untersuchungen zur Populationsstruktur, genetischer Diversität und Selektionssignaturen vor.

Im Jahr 2013 wurde mit der erstmaligen Datenerhebung von HD SNP Daten der österreichischen Pferderassen (Lipizzaner, Noriker, Haflinger) begonnen. Dieser genomischen Forschung vorangegangen waren intensive Vorarbeiten, welche die Pedigree Strukturen, Inzucht und Verwandtschaftsverhältnisse der drei Hauptrassen untersuchten und welche eine repräsentative Auswahl für die Genotypisierung ermöglichten.

Für die Pedigreeanalyse beim österreichischen Noriker wurden 36.000 Tierdatensätze in die Analyse von Genpool, Verwandtschaft und Inzucht miteinbezogen, wobei die Ergebnisse aus dieser Arbeit sowohl wissenschaftlich (Druml et al., 2006) als auch populärwissenschaftlich (Druml, 2005; Grilz-Seger und Druml, 2012) publiziert wurden. Die Pedigreestudien beim Lipizzaner zogen sich über einen längeren Zeitraum, beginnend im Jahr 1999 hinweg und Ergebnisse konnten auf breiter Ebene disseminiert werden (Zechner et al., 2002; Druml und Sölkner, 2011; Sölkner und Druml, 2011; Grilz-Seger und Druml, 2011; Druml et al., 2017). Für den Haflinger konnten erstmals von den Projektmitarbeitern die beiden Haflinger Stutbücher der ARGE Haflinger und des Haflingerpferdezuchtverbandes Tirol in einer Datenbank zusammengeführt werden, was somit auch die erstmalige und gemeinsame Pedigreeanalyse, der Hengstlinien und der Stutenfamilien ermöglichte (Druml et al., 2016).

Durch die Weiterentwicklung der Netzwerkanalyse, gelang es Populationsparameter (genetische Distanz, Verwandtschaftsgrad, Admixture) mit genomischer Inzucht in eine generell leicht nachvollziehbare Darstellung zu integrieren. Damit wurde eine Methode von hohem praktischem Wert geschaffen, welche auch für die Zuchtplanung geeignet ist.

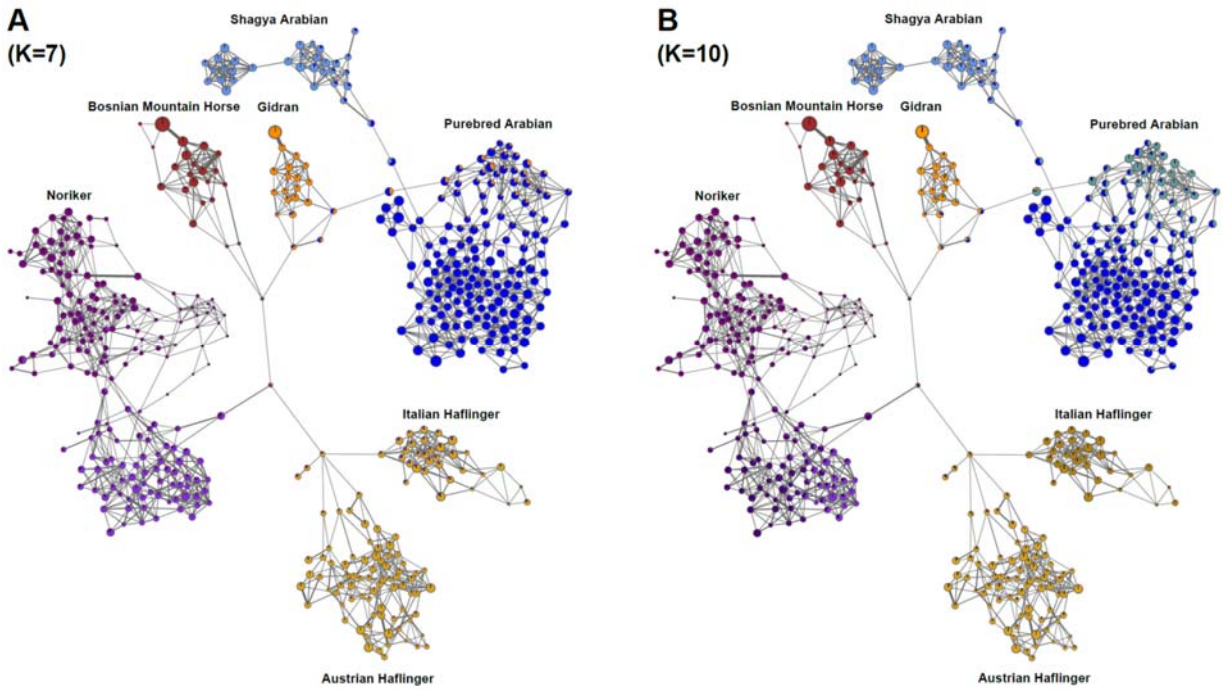


Abbildung 3: Populationsübergreifende Netzwerkgrafik auf Basis von HD 670k SNP Daten von sieben Pferderassen die historisch einen Einfluss auf den Haflinger, Lipizzaner und Noriker hatten. Dieses Netzwerk beinhaltet die genetische Distanz genetische Distanz (Länge der Verbindungslinien), genomische Verwandtschaft (Breite der

Verbindungslinien), Admixture (Farbanteil in den einzelnen Kreisen) und Autozygotie (Größe der Kreise) (aus Druml et al., 2018)

In einer Arbeit von Druml et al. (2018) konnten die genomischen Beziehungen von sechs Pferderassen, die im Rahmen der k.k. Monarchie entstanden sind und den wesentlichen Einfluss auf die drei österreichischen Hauptrassen Noriker, Lipizzaner und Haflinger, hatten analysiert werden (Abb.3). Im selben Jahr publizierten Grilz-Seger et al. (2018) eine Studie, die sich mit den Auswirkungen von unterschiedlichen Zuchtstrategien auf die Autozygotie in Pferderassen mit kleinen Populationsgrößen beschäftigte.

5.2 ARBEITSPAKETE

5.2.1 ARBEITSPACKET WP1 (LIPIZZANER)

– Probenentnahme

Im ersten Arbeitsschritt wurden die bereits aus Vorarbeiten vorhandenen Proben mit dem aktuellen Pferdebestand des Gestütes Piber und Spanischen Reitschule abgeglichen und aktualisiert. Begleitend wurde eine fotografische Dokumentation durchgeführt und auf Basis der Fohlenbeurteilungen die Grundfarbe und Abzeichen ermittelt.

– SNP Extraktion, Etablierung der Gentests für die einzelnen Farbloci

Von allen Tieren, von denen SNP Daten vorlagen, wurde die am Affymetrix Axiom® Genotypisierungs-Array verfügbaren Farballele extrahiert (*MC1R*, *PMEL17/SILV, SLC36A1).* Für die Farbloci *ASIP*, *STX17, SLC45A2/MATP, PAX*^{C70}*, SB1* erfolgte die Etablierung der Gentest und nach der DNA Extraktion wurde die Genotypisierung durchgeführt.

– Analyse der Farbgenotypen und Heritabilitätenschätzung der Abzeichen

Es wurde eine detaillierte Auswertung der innerhalb der Lipizzaner Population segregierenden Farbloci vorgenommen und Träger seltener Farbvarianten ermittelt. Durch die Erstellung tierindividueller Genotyplisten wurde für das Gestüt Piber ein zuchtplanerisches Werkzeug erstellt. Durch die statistische Auswertung und Analyse wurden für die Abzeichen die Heritabilität und die genetischen Korrelationen geschätzt. Die Ergebnisse wurden in Form eines Artikels zusammengefasst.

– Ermittlung der Populationsstruktur auf Basis von SNP Daten

Die Populationsstrukur und der Autozygotiegrad der österreichischen Lipizzanerpopulation wurde im Rahmen einer Vergleichsstudie, welche weitere Lipizzanerpopulationen aus vier europäischen Lipizzanergestüten beinhaltete, anhand einer Hauptkomponetenanalyse und der Bestimmung von Homozygotieregionen (ROH) ermittelt. In Form von Netzwerkgrafiken wurden unterschiedliche Parameter (S_{ROH}, Admixture und genetische Distanz) sowohl innerhalb der einzelnen Gestüte als auch die genetische Beziehung zwischen den Gestüten dargestellt. Anhand überlappender Homozygotie Regionen wurden Selektionssignaturen unter besonderer Berücksichtigung von Melanom beeinflussenden Faktoren identifiziert. Die Resultate wurden in Form einer Publikation zusammengefasst.

5.2.2 ARBEITSPACKET WP2 (WEIßER BAROCKESEL), TEIL 1

– Probenentnahme

Für den Österreichisch-Ungarischen Weißen Barockesel wurde mittels Pedigreeauszug des Zuchtverbandes eine Auswahl der zu untersuchenden Tiere getroffen, um eine strukturierte Stichprobe zu gewährleisten. Mit Mithilfe des Verbandes konnten neben bestehenden Proben aus der Abstammungskontrolle zusätzlich weiße ungarische Esel und farbige Esel in die Studie miteinbezogen werden.

– Pedigreestudie

In diesem Abschnitt des Projektes wurde das Pedigree auf Hinweise für mögliche Segregation und Aufspaltungsverhältnisse des die weiße Fellfarbe verursachen Gens analysiert und eine allgemeine Pedigreeanalyse (Generationsäquivalent, Gründeranalyse, Inzucht) durchgeführt.

– Genotypisierung

In einem ersten Schritt erfolgte die Genotypisierung potentieller depigmentierte Phänotypen beim Esel verursachende Farbloci im *KIT* Gen (Dominat White und White Spotting). Nachdem beide Loci als Ursache der spezifischen Fellfarbe des Österreichisch-Ungarischen Barockesel ausgeschlossen werden konnten, erfolgte die Genotypisierung einer Mutation im Tyrosinase Gen (c.604C>G; p.His202Asp) durch die italienische wissenschaftliche Arbeitsgruppe (Prof. Fontanesi, Dr. Utzeri, Universität Bologna), die mit dem weißen Phänotyp beim italienischen Asinara Esel assoziiert worden war.

5.2.2.1 ARBEITSPAKET WP2 (MOHRENKOPF), TEIL 2

In einem ersten Schritt wurden 140 Noriker, wobei alle in dieser Rasse vorkommenden Farbvarianten berücksichtigt wurden, mittels 670 k Affymetrix Axiom™ Equine Genotypisierungs Array genotypisiert und eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durchgeführt. Die GWAS wurde mittels eines Fall (14 Mohrenköpfe) - Kontroll Designs (26 Rappen) durchgeführt. Für die Verifizierungsstudie des mit der Mohrenkopffarbe assoziierten Top-SNP wurden von 1012 Pferden die SNP Genotypen extrahiert. Beim Noriker wurden anhand von Pedigreeinformationen die Fellfarbe der Elterntiere und die Spaltungsverhältnisse der Nachkommen untersucht. Damit war es möglich, potentiell homozygote und heterozygote Tiere zu identifizieren, die für die Verifizierungsstudie benötigt werden. Zu Verifikationszwecken wurden weitere Proben von Norikern und Pferden aus unterschiedlicher Rassen (Quarter Horse, Murgese, Shetland Pony, Slowenisches Kaltblut, Trakehner, Deutsches Warmblut, Appaloosa, Belgier, Traber) in die Studie miteinbezogen, der am besten assoziierte SNP mittels LGC KASP Technologie genotypisiert und die Übereinstimmung zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp am putativen genetischen Marker für den Roan Faktor untersucht. Anhand der Sequenz eines am Roan Faktor homozygoten Noriker Hengstes wurde in Zusammenarbeit mit der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe Wallner (Dr. Barbara Wallner und Mag. Simone Reiter) nach weiteren Roan spezifischen genetischen Varianten gesucht.

ARBEITSPAKET WP1 (NORIKER, Haflinger), Teil 3

– Ermittlung der Populationsstruktur auf Basis von SNP Daten

Die Auswirkungen der Farbzucht auf die genomische Architektur und die Autozygotie beim Noriker wurde anhand der Ermittlung von ROH Parametern (S_{ROH}, F_{ROH}, N_{ROH}), überlappenden Homozygotie Regionen und einer Netzwerkgrafik ermittelt und dargestellt. Der österreichische Haflinger wurde im Rahmen einer Vergleichsstudie, welche Stichproben von zwei weiteren Haflingerpopulationen aus Südtirol und Slowenien

beinhaltete, mittels einer Hauptkomponentenanalyse und der Bestimmung von Homozygotie Regionen (ROH) untersucht. In Form von Netzwerkgrafiken wurden unterschiedliche Parameter (S_{ROH}, Admixture und genetische Distanz) sowohl innerhalb der einzelnen Populationen als auch die genetische Beziehung zwischen den Populationen dargestellt. Anhand überlappender Homozygotie Regionen konnten Selektionssignaturen identifiziert werden.

5.3 PROJEKTMITARBEITER/INNEN

- MMag. Gertrud Grilz-Seger, Main Researcher, Projektkoordination, Projektmanagement, Konzeption des Versuchaufbaus, der Analysen und Publikationen, ROH- und Populationsanalysen, Selektionssignaturen, Gen Ontologie Analysen, wissenschaftliche Dissemination, Berichtlegung

- Dr. Thomas Druml, Projektkoordination, Probenmanagement, BLUP und GWAS Analysen, Datenmanagement

5.4 NATIONALE UND INTERNATIONALE KOLLABORATOREN

5.4.1 BEREITSTELLUNG VON DNA PROBEN UND PEDIGREES

Proben und Pedigrees wurden von unten angeführten Zuchtverbänden, Institutionen und Gestüten zur Verfügung gestellt.

- ARGE Noriker (DI Johann Wieser)
- ARGE Haflinger (Ing. Manfred Lientschnig, Ing. Walter Werni, Mag. Wilhelm Popatnig)
- Südtiroler Haflinger Zuchtverband (Dipl. Ing. Michael Gruber)
- Lipizzaner Gestüt Piber (Dr. Max Dobretsberger)
- Slowakisches Nationalgestüt Topol'čianky
- Ungarisches Nationalgestüt Szilvasvárad
- Kroatische Nationalgestüte Lipik und Đakovo
- Matjaz Mesarič, Dr., Klinik für Reproduktion und Großtiere, Universität Laibach, Veterinärmedizinische Fakultät, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, Slowenien
- Marko Cotman, PhD., Institute for Preclinical Sciences, Universität Laibach, Veterinärmedizinische Fakultät, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slowenien
- Verein zur Erhaltung der weißen Barockesel
- Nationalpark Neusiedlersee-Seewinkel

5.4.2 BEREITSTELLUNG VON SNP DATEN UND PEDIGREES

- Gottfried Brem, Prof. Dr., Institut für Tierzucht, Veterinärmedizinische Universität Wien

- Anne Richard, Prof., UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, Bat 211, 78352 Jouy-en-Josas, Frankreich

- Gabriella Lindgren, Prof., Livestock Genetics, Department of Biosystems, KU Leuven, Leuven 3001, Belgien und School of Life and Environmental Sciences, University of Sydney, Sydney, Australien

- Brandon Velie, Dr., School of Life and Environmental Sciences, University of Sydney, Sydney, Australien und Department of Animal Breeding & Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

- Markus Neuditschko, PhD, Agroscope, Schweizer Nationalgestüt, Les Longs Prés, CH-1580 Avenches

5.4.3 AKADEMISCHE ARBEITSGRUPPEN

- Gottfried Brem, Prof. Dr., Institut für Tierzucht, Veterinärmedizinische Universität Wien

- Markus Neuditschko, PhD, Agroscope, Schweizer Nationalgestüt, Les Longs Prés, CH-1580 Avenches

- Michaela Horna, Dr., Department für Tierzucht, Slowakische Landwirtschaftliche Universität in Nitra, Nitra-Chrenová, Slowakei

- Matjaz Mesarič, Dr., Klinik für Reproduktion und Großtiere, Universität Laibach, Veterinärmedizinische Fakultät, Cesta v Mestni log 47, 1000 Ljubljana, Slowenien

- Marko Cotman, PhD., Institute for Preclinical Sciences, Universität Laibach, Veterinärmedizinische Fakultät, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slowenien

- Luca Fontanesi, Prof., und Valerio Joe Utzeri, PhD Department of Agri-Food Sciences and Technologies, Division of Animal Sciences, Universität Bologna, Italien

- Wallner, Barbara, Dr., und Simone Reiter, Mag., Institut für Tierzucht, Veterinärmedizinische Universität Wien

6 FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM LIPIZZANER

6.1 EINLEITUNG

Die Züchtung spezieller Fellfarben zählt zu den zentralen Zielstellungen der Pferdezucht seit dem Beginn der Domestikation (Wutke et al., 2016; Schubert et al., 2014; Pruvost et al., 2011; Librado et al., 2017; Ludwig et al., 2009). Der Lipizzaner eignet sich aufgrund der bis ins 18. Jahrhundert vorliegenden Pedigreeaufzeichnungen bestens, um die Verteilung der Fellfarben über einen längeren Zeitraum zu untersuchen (Brem, 2011). Eine fortlaufende Dokumentation der Farbphänotypen beim Lipizzaner liegt ab dem späten 18. Jahrhundert vor, für die Perioden davor gibt es mehrere Quellen, die eine stichprobenartige Beschreibung der Fellfarben in den Zuchtherden Lipizzas, und jenen von drei weiteren Hofgestüten (Kladrub, Koptschan, Halbthurn), mit denen Lipizza züchterisch in Verbindung stand, erlauben (OSTA, 1880). Die Selektion auf die Schimmelfarbe beim Lipizzaner besteht seit ca. 150 Jahren und ist explizit im Zuchtziel verankert. In den vorangegangenen Jahrhunderten gestaltete sich die Farbzusammensetzung in den Habsburger Hofgestüten wesentlich diverser, wie es exemplarisch in den Gemälden des kaiserlichen Hofmalers Georg J. Hamilton jun. aus den Jahren 1723 und 1728 überliefert ist.

Im Jahr 2008 wurde die genetische Grundlage für die Schimmelfarbe, eine sich dominant vererbende Mutation im *STX17* Gen anhand einer Lipizzaner Stichprobe entdeckt (Pielberg et al., 2008). Curik et al. (2013) konnten einen Effekt des Allel Status der *STX17* Mutation auf die zeitliche Dynamik des Ergrauens des Fellkleides und Vitiligo beim Lipizzaner feststellen. Deutlich von Vitiligo, eine progressive Depigmentierung an Kopf, Anus und Perianalregion, abzugrenzen sind die Abzeichen, die durch das frühzeitige Ergrauen beim Lipizzaner schwer zu identifizieren sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war den Allel Status und die Genotypen Verteilungen einzelner bekannter Farbloci in der aktuellen staatlichen Lipizzaner Herde des Gestütes Piber und der Spanischen Hofreitschule Wien zu erheben, die phänotypische Varianz der Abzeichen zu erfassen und eine Heritabilitätsschätzung für die Abzeichen durchzuführen. Damit soll eine Datengrundlage erstellt werden, die zukünftig für züchterische Maßnahmen in der Farbzucht beim Lipizzaner genutzt werden können.

6.2 MATERIAL UND METHODE

In dieser Studie wurden insgesamt 213 adulte (>3 Jahre) Lipizzaner (88 Zuchtstuten und 125 Hengste) des Lipizzaner Gestüts Piber und der Spanischen Hofreitschule Wien untersucht. Die Proben für die genetischen Analysen stammten aus Vorarbeiten der Projektmitarbeiter bzw. aus Archivmaterial der routinemäßig durchgeführten Abstammungskontrolle. Von allen Pferden wurde der Farbphänotyp erhoben und auf Basis der Fohlenbeurteilungen die Grundfarbe und Abzeichen ermittelt.

Anhand der Phänotyperhebungen und der Pedigreeaufzeichnungen wurden die vorhandenen Fellfarben bestimmt und folgende Loci genotypisiert: *MC1R, ASIP*, *STX17*, *MATP*, Silver, Champagne, PAX^{C70Y}, *SB1*, wobei von 135 Pferden die Genotypen auf *MC1R*, Silver, Champagne, PAX^{C70Y}, SB1 aus Vorarbeiten mit dem 670k SNP Affymetrix Axiom® Genotypisierungsarrays bekannt waren. Zusätzlich wurden von drei Lipizzanern (1 Zuchtstute und zwei Fohlen), die gescheckt waren, folgende Loci, die für entsprechende Farbvarianten verantwortlich sind, untersucht: Tobiano; Overo; Sabino *SB1*; Splashed White -*SW1*, *SW2*, *SW3*, *SW4*; Dominat White *W5*, *W10*, *W20*.

Die DNA Extraktion erfolgte mit dem nexttec™ Tissue & Cells Kit (nexttec™, Deutschland) gemäß der Herstellerhinweise. *MC1R, SB1 und* $PAX3^{C70Y}$ Loci wurden mit dem Pyrosequencing Verfahren auf einem

PyroMark Q96 MD Pyrosequencer genotypisiert (QIAGEN, Germany) und ASIP und *SLC45A2* (Cream) wurden mittels der KASP Technik bestimmt. Der *STX17* Locus wurde nach der Methode nach KAVAR et al. (2012) bestimmt.

Das Ausmaß der Abzeichen, die im Rahmen der Tieridentifikation und bei der Beschreibung des Nationale schriftlich festgehalten werden, wurde bei insgesamt 169 Pferden, von denen auch genomweite 670k SNP Daten vorhanden waren, anhand der Methode von Rieder et al. (2008) in numerische Variablen umgewandelt. Abzeichen wurden auf folgenden Körperteilen erhoben: Kopf, Vordergliedmaßen, Hintergliedmaßen und Körper. Nach Rieder et al. (2008) wurde jedes Abzeichen des Kopfes in den Bereichen Stirn, Nasenrücken, Maul und Nüstern mit einem Wert von 0 (kein Abzeichen) bis 3 (vollständig weiß) bewertet. Maul und Nüstern wurden auf einer Skala von 0 bis 6 beschrieben. Beim Kopf können anhand dieser Skala max. 16 Punkte erreicht werden. Die Bereiche der Gliedmaßen wurden geteilt in bis Fessel hoch (1), bis halbes Röhrbein hoch (2), bis unter Karpal- bzw. Sprunggelenk hoch (3), bis Mitte Karpal- bzw. Sprunggelenk hoch (4) und bis über Karpal- bzw. Sprunggelenk hoch (5) weiß. Körperabzeichen wurden jeweils mit einem Punkt bewertet.

Die deskriptive Statistik und das Datenmanagement wurde mit dem Programmpaket SAS University Edition (SAS 2018) durchgeführt, die Heritabilitäten, Zuchtwerte und genetische Korrelationen wurden mit dem Programmpaket ASReml 2.0 (Gilmore et al., 2008) geschätzt, wobei folgendes statistisches Model verwendet wurde:

$Ym = \mu + am + \varepsilon m$

am = Tiereffekt (Zuchtwert)

$\varepsilon ijklm$ = Zufälliger Restfehler

6.3 ERGEBNISSE

Von den insgesamt 213 untersuchten Lipizzanern (88 Zuchtstuten, 125 Schulhengste) waren drei Hengste phänotypisch Braun, der Rest waren Schimmel. Die Genotypenfrequenz am *STX17* Locus, der kausativ für die Schimmelfarbe beim Pferd ist, resultierte in 80.6% reinerbigen Schimmeln *G/G* (Abb.4), 17.9% mischerbigen Schimmeln *G/g* und 1.5% Nicht-Schimmeln *g/g*. Der Anteil an reinerbigen Schimmeln war mit 84.7% bei den Zuchtstuten höher als bei den Schulhengsten (*G/G* 77.5%).

In Bezug auf die Grundfarbe konnte gezeigt werden, dass unter der Schimmeldecke keine Füchse (reinerbig rezessiv am *MC1R* Locus *e/e*) vorkamen. Hingegen waren 92.9% der Lipizzaner reinerbig für das dominante Allel *E* auf *MC1R*. Die Allelfrequenz des rezessiven *e* Allels in der Population variiert somit von 1.2% bei Stuten bis 6.8% bei Hengsten. Die Frequenz des Braun-Allels *A* (*ASIP*) lag in der gesamten Stichprobe bei 68.5%. Der Anteil der braunen Pferde (*A/a E/E, A/a E/e, A/A E/E, A/A E/e*) lag bei 81.1%, jene der Rappen (*a/a E/-)* lag bei 11.9%, wobei die Rappen zu 100% reinerbig für das *E* Allel waren. Von den möglichen Allelkombinationen für braune Fellfarbe dominierte die Variante *A/a E/E* mit 59.2% (Abb.5), gefolgt von der Variante *A/A E/E* mit 33.7%.

In den Stutbuchaufzeichnungen des frühen 18. Jahrhunderts erreichte der Anteil an Schimmeln in der Gesamtherde vergleichsweise rund 25%, wobei zu dieser Zeit noch nicht zwischen veränderlichen Schimmeln (*STX17* Locus) und permanenten Schimmeln (Roan Faktor *Rn*) unterschieden wurde (Grilz-Seger und Druml, 2019). Unter den normal gefärbten Pferden dominierten die Braunen mit einem Anteil von 69.2% gefolgt von 26.9 Rappen und 3.8% Falben.

Abbildung 4: Links der Hengst Conversano Bonavoja, homozygoter Milchschimmel; Abbildung 5: re. Favory Aquileja, ein kastanienbrauner Lipizzaner, eine Schattierung, die durch die Allel Kombination A/a E/E hervorgerufen wird (Fotos Druml)

6.3.1 DIE AUFHELLUNGEN

In der gesamten staatlichen österreichischen Lipizzanerherde konnten drei Falben (1.5%), die heterozygot am Cream Gen *SLC45A2* waren, identifiziert werden (Allelfrequenz des *Cr* Allels von 0.7% in der Population). Diese Pferde zeigten die Genotyp Kombination *A/A E/e G/g*. Die für die Aufhellungen Silver *PMEL* und Champagne *SLC36A1* verantwortlichen Allele konnten bei keinem der untersuchten Tiere nachgewiesen werden und segregieren somit nicht in der Population.

6.3.2 SCHECKUNGEN

In der aktuellen österreichischen Population kann nach Pedigreestudien und phänotypischer Adspektion das Vorhandensein des für die Tigerzeichnung verantwortlichen *LP* Allels und des für die Tobianoscheckung verantwortlichen *TO* Allels ausgeschlossen werden. Von den sogenannten Minimalscheckungsgenen Sabino-1 (*SB1*) und Splashed White ($PAX3^{C70Y}$), konnten lediglich fünf heterozygote $PAX3^{C70Y}$Allelträger bei den Hengsten festgestellt werden. Das Sabino Allel *SB1* segregierte nicht in der Population. Bei den $PAX3^{C70Y}$Allelträgern ist jedoch zu beachten, dass keiner eine für die Splashed White Scheckung typische Zeichnung (mehr als 20% des Kopfes nicht pigmentiert) zeigte.

Drei Pferde, eine Zuchtstute und zwei Hengstfohlen wurden phänotypisch als Schecken klassifiziert, wobei die Stute und die Eltern der beiden Fohlen keines der zuvor genannten Scheckungsallele *SB1* oder $PAX3^{C70Y}$ hatten. Die drei Schecken und die Mutter eines Scheckfohlen wurden daher auf weitere bekannte Loci, die mit Scheckungsvarianten assoziiert wurden, untersucht: Overo (*EDNRB*), Dominant White (Allele *W5, W10*, *W20*), Splashed White (Allele *SW1, SW2, SW3, SW4*). Von den vier untersuchten Tieren waren drei Tiere heterozygot für das *W20* Allel, die Porzellanscheckstute Cantata (Abb.6) war homozygot *W20/W20*. Phänotypisch waren diese vier untersuchten Tiere jedoch sehr unterschiedlich. Während das Hengstfohlen aus der Fama (Abb.7) eine Sabino Scheckung ähnliche Zeichnung (eine unruhige den ganzen Körper erfassende Scheckung) zeigte, waren die anderen Tiere durch vier hohe Beinabzeichen und breite Blessen gekennzeichnet. Die Stute Cantata (homozygot W*20*) hatte zusätzlich einen weißen Streif quer über den Brustkorb.

Abbildung 6: Die Stute Cantata links als Fohlen und rechts als Dreijährige. Die Stute hat ein großes Kopfabzeichen, hohe Beinabzeichen und einen weißen Streifen am Brustkorb; Genotyp Splashed White; Dominant White: -/-; W20/W20 (- = Wildallel). (Fotos Lipizzanergestüt Piber).

Abbildung 7: Rechts die Schimmelstute Fama (Genotyp Splashed White; Dominant White: -/- ; W20/-) (- = Wildallel) mit einem gescheckten Hengstfohlen von Neapolitano Madar bei Fuß (Genotyp Splashed White; Dominant White: -/- ; W20/-). Links ein drei Tage Fohlen a.d. Porzellanscheckstute Cantata (vgl. Abb.2) (Genotyp Splashed White; Dominant White: -/-; W20/-) (Fotos Lipizzanergestüt Piber)

6.3.3 HERITABILITÄTEN ABZEICHEN

Von den 169 Lipizzanern hatten 13.6% keine Abzeichen bzw. 25.5% keine oder nur minimalen Abzeichen (Summe Abzeichen <= 2 Punkte). Ausgedehntere Abzeichen (mehr als 7 Punkte – entspricht z.B. bis Sprunggelenk hoch weiß plus Kopfabzeichen) waren bei 18.8% der Pferde vorhanden, wobei zwei Tiere jeweils einen Maximalwert von 13 Punkten (hinten links und hinten rechts bis Sprunggelenk hoch weiß) erreichten. Generell konnten mehr Kopfabzeichen (76.1%) als Beinabzeichen (62.4%) beobachtet werden (Tab.1).

TABELLE 1: MITTELWERTE, STANDARDABWEICHUNGEN (SD), MINIMA, MAXIMA, HERITABILITÄT (H^2) UND DEREN STANDARDFEHLER (SE) FÜR ABZEICHEN AUF VERSCHIEDENEN KÖRPERREGIONEN BEIM LIPIZZANER.

Variable	N	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum	h^2	SE
Kopf	158	2,05	1,6	0	7	0,50	0,18
Vorderbein links	169	0,33	0,56	0	3	0,71	0,16
Vorderbein rechts	168	0,25	0,51	0	3	0,26	0,17
Vorderbeine	168	0,58	0,95	0	6	0,59	0,17
Hinterbein links	169	0,52	0,62	0	2	0,37	0,19
Hinterbein rechts	169	0,46	0,58	0	2	0,27	0,17
Hinterbeine	169	0,98	1,07	0	4	0,23	0,18
Beine	168	1,57	1,76	0	10	0,48	0,18
Summe Abzeichen	157	3,66	2,87	0	13	0,65	0,16

Die Heritabilitäten für Abzeichen an Kopf und Extremitäten variierten von 0.23 bis 0.71, wobei die relativ hohen Standardfehler (von 0.16 bis 0.18) auf die geringe Stichprobengröße und die Schiefverteilung der kodierten Abzeichen zurückzuführen sind (Tab.2). Die höchsten Heritabilitäten konnten für Kopfabzeichen und Abzeichen an den Vorderbeinen ermittelt werden. Die genetischen Korrelationen (r_g) von Abzeichen an Kopf und den verschiedenen Extremitäten bewegten sich zwischen 0.99 und 0.64, also insgesamt in einem hohen Bereich, wobei ein Ausreißer zwischen rechten Vorder- und rechtem Hinterbein (r_g = 0.02) zu beobachten war. Die phänotypischen Korrelationen (r) hingegen bewegten sich in einem mittleren bis niedrigen Bereich (r von 0.25 bis 0.62).

TABELLE 2: HERITABILITÄTEN (ENTLANG DER DIAGONALE), GENETISCHE KORRELATIONEN (UNTERHALB DER DIAGONALE) UND PHÄNOTYPISCHE KORRELATIONEN, OBERHALB DER DIAGONALE FÜR ABZEICHEN AM KOPF UND DEN EINZELNEN EXTREMITÄTEN.

	Vorne rechts	Vorne links	Hinten rechts	Hinten links	Kopf
Vorne rechts	**0,27**	*0,52*	*0,38*	*0,40*	*0,25*
Vorne links	0,81	**0,68**	*0,42*	*0,51*	*0,48*
Hinten rechts	0,02	0,73	**0,31**	*0,62*	*0,37*
Hinten links	0,97	0,87	0,93	**0,37**	*0,41*
Kopf	0,64	0,99	0,99	0,99	**0,49**

6.4 DISKUSSION

Mit der verstärkten Verwendung des Lipizzaners als Fahrpferd, als sog. Postzugpferd, und dem damit gestiegenen Bedarf an Passergespannen zu Beginn des 19. Jahrhunderts, kam es zu einem sukzessiven Ansteigen der Schimmelfarbe, die heute als Rassetypisch angesehen wird (Grilz-Seger und Druml, 2011). Im 20. Jahrhundert wurden in der österreichischen Lipizzanerzucht ausschließlich Schimmel als Zuchttiere verwendet (mit einzelnen Ausnahmen), wodurch die Allelfrequenz der für diese Farbvariante verantwortlichen Mutation im *STX17* Gen auf derzeit 89.6% gestiegen ist. Das mit dem homozygoten Allelstatus einhergehende raschere Ergrauen und der zusätzlich daraus resultierenden Farbvariante des Milchschimmels, ist erwünscht. Es konnte aber in mehreren Studien gezeigt werden, dass mit dem erhöhten Homozygotiegrad auch eine erhöhte Prävalenz von Vitiligo und Melanomen einhergeht (Curik et al., 2013). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die überwiegende Grundfarbe unter der Schimmeldecke Braun ist, wobei die beiden Allelkombinationen *A/a E/E* und *A/A E/E* am häufigsten vorkommen. Druml et al. 2018 demonstrierten, dass der Genotyp *A/a E/E* mit einem dunkel pigmentierten (Dunkelkastanienbraunen) Phänotyp assoziiert. Die Fuchsfarbe, die beim Lipizzaner auf Pferde aus dem

orientalischen Genpool zurückzuführen ist (Grilz-Seger und Druml, 2011; Grilz-Seger et al., 2019a), ist in der aktuellen Zuchtpopulation des Gestütes Piber nicht präsent. Das Herausspalten von Füchsen ist daher nur in einem geringen Ausmaß zu erwarten (zu 0.1%). Das Cream-Allel welches die Falb Farbe beim Pferd hervorruft, die zur begehrtesten Fellfarbe des Lipizzaners bis Anfang des 19. Jahrhunderts zählte, wurde bei den österreichischen Lipizzanern bei drei Pferden in heterozygoten Status festgestellt. Die züchterische Verwendung der drei braunen Lipizzanerhengste, würde die einzigartige Möglichkeit bieten, diese barocke Fellfarbe wieder zum Vorschein zu bringen. Als eine der Ursachen für die bei drei Pferden auftretenden Scheckungen, konnte ein Allel (*W20*) des Dominant White Komplexes identifiziert werden.

Unter Abzeichen versteht man pigmentlose Haare und Hautstellen, die durch das Fehlen von Melanozyten zu Stande kommen. Melanozyten werden im Laufe der Embryonalentwicklung aus den Melanoblasten der Neuralleiste gebildet und wandern entlang der Körperachse von dorsal nach caudal und von proximal nach distal, wobei eine mitteldorsale Trennung zwischen den beiden Körperhälften besteht. Dadurch verteilen sich Melanoblasten auf beiden Körperhälften unabhängig voneinander. Eine komplette Pigmentierung an den distalen Körperteilen wie z.B. Kopf oder Unterextremitäten bedingt eine vollständige Migration der Melanoblasten und eine vollständige Differenzierung zu Melanozyten. Entsprechend dem gewünschten Zuchtziel beim Lipizzaner, das ausgedehnte Abzeichen nicht toleriert, war das durchschnittliche Ausmaß (inklusive der Maximalwerte) der Abzeichen niedrig. Während Rieder et al. (2008) beim Freiberger vergleichsweise Maximalwerte bis zu 35 Punkte ermittelten, lagen die Höchstwerte beim Lipizzaner (zwei Pferde) bei 13 Punkten. Die Mittelwerte für Kopfabzeichen/Vorderbeine/Hinterbeine lagen beim Lipizzaner bei 2.1/0.6/1.0, beim Freiberger bei 7.0/2.3/5.0 (Rieder et al., 2008). Die geschätzte Heritabilität für Kopfabzeichen lagen mit 0.50 in einem ähnlichen Bereich der von Rieder et al. (2008) angegeben wurde. Bei den Extremitäten gab es Abweichungen, vor allem in Bezug auf die Hinterbeine, wo Rieder et al. (2008) mit h^2=0.51 einen wesentlich höheren Wert schätzte als den in dieser Studie ermittelten (h^2=0.23). In einer Arbeit von Druml (2008) wurde für 3 669 Noriker eine Heritabilitätsschätzung der Abzeichen durchgeführt. Die beim Lipizzaner ermittelten Werte deckten sich bei den Variablen Summe Abzeichen, Abzeichen rechtes Vorderbein, Abzeichen linkes Hinterbein. Bei den diagonalen Beinpaaren ermittelte Druml 2008 vorne links eine mit einem Koeffizienten von 0.32 niedrigere und hinten rechts eine mit einem Koeffizienten von 0.48 höhere Heritabilität.

6.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

In dieser Studie konnte gezeigt werde, dass auch nach einer 150 Jahren gezielter Selektion auf einen einheitlichen Phänotyp eine Varianz bei den Fellfarben beim Lipizzaner vorhanden ist. Diese Varianz könnte züchterisch genützt werden, um das Spektrum der Fellfarben beim Lipizzaner wieder zu erweitern. Darüber hinaus können die nun zur Verfügung stehenden Genotyp Frequenzen für weiterführende Untersuchungen in Bezug auf deren Auswirkung auf Melanom und Vitiligo verwendet werden.

7 GENETISCHE GRUNDLAGEN DER MOHRENKOPFFARBE BEIM NORIKER

7.1 EINLEITUNG

Die Roan Färbung (Blau-, Braun und- Fuchsschimmel) ist durch eingestreute weiße Haare im Deckhaar gekennzeichnet, wobei der Kopf, die unteren Extremitäten und das Langhaar einfarbig sind. Mehrere Autoren postulierten einen dominanten Erbgang für die Roan Färbung und nahmen an, dass Homozygotie auf diesem Farblocus mit Letalität des Embryos verbunden ist (Hintz und VanVleck, 1979; Marklund et al., 1999). Andersson und Sandberg (1982) entdeckten einen Zusammenhang zwischen Tobiano, Fuchs und Roan und Serumproteinen. Ein Zusammenhang zwischen Tobiano und Serumproteinen wurde unabhängig auch von Bowling (1996) nachgewiesen. Im Jahr 1999 gelang es Marklund et al. (1999) die Assoziation des Roan Faktors mit dem *KIT* Gen nachzuwiesen, es ist aber in weiterer Folge noch nicht gelungen die kausale Mutation zu finden. Die Ergebnisse von Marklund et al. (1999) legten nahe, dass der Roan Faktor eventuell populationsspezifisch ist. In der vorliegenden Studie wurden mittels einer genomweite Assoziationsanalyse (GWAS), Pedigreeanalysen und einer vergleichenden Sequenzanalyse die genetische Ursache des Roan Faktor beim Noriker untersucht.

7.2 MATERIAL UND METHODE

7.2.1 GENOMWEITE SNP DATEN UND GENOMWEITE ASSOZIATIONSANALYSE

Es wurden SNP Daten von 1012 Pferden aus 12 Pferderassen (140 Noriker, 36 Achal Tekkiner, 33 Shagya Araber, 80 Freiberger, 23 Bosnische Gebirgspferde, 28 Posavina, 20 Gidran, 389 Lipizzaner, zwei Quarter Horse, zwei Shetland Ponys, drei Slowenische Kaltblut Pferde und 256 Exmoor Ponys) in die Studie miteinbezogen. Nach der Qualitätskontrolle und Exkludieren der SNPs mit einer Minor Allelfrequenz (MAF < 0.01) verblieben 464.880 SNPs für die genomweite Assoziationsanalyse (GWAS). Die GWAS wurde mit dem mittels eines Fall-Kontroll Designs (Fallgruppe: 14 Mohrenköpfe, Kontrollgruppen: 26 Rappen) durchgeführt und auf ein multiples Niveau via Fishers exakt Test korrigiert. Die SNP-Extraktion und die GWAS erfolgte mit dem Software Paket PLINK v.1.7 (Purcell et al. 2007). Die Grafiken wurden mit der R-Plattform (www.r-project.com) hergestellt. Der anhand der SNP Daten identifizierte Top SNP und weitere putative mit der Mohrenkopffarbe assoziierte Varianten wurden an 97 zusätzlich genotypisierten Pferden (roan/nicht-roan) ausfolgenden Rassen getestet: Noriker (26/38), Quarter Horse (7/5), Appaloosa (0/2), Murgese (2/2), Belgier (1/0), Slowenisches Kaltblut (3/0), Shetland Pony (3/2), Trakehner (1/1), Traber (0/1), Deutsches Warmblut (3/1).

7.2.2 PEDIGREE- UND ROHANALYSE UND SEQUENZVERGLEICH

Die Plausibilität der ermittelten Genotypen bei den roan farbenen Norikern wurde anhand des Noriker Stutbuches (ARGE NORIKER, 2019), bestehend aus 55.567 Einzeldatensätzen, ermittelt. Für acht roan farbenen Noriker, die homozygot *G/G* am top-SNP AX-103594067 waren, wurde eine ROH Analyse basierend auf einem überlappenden Leseraster mittels PLINK v1.7 mit folgenden Einstellungen vorgenommen: die minimale SNP Dichte pro ROH Segment betrug einen SNP per 50 kb mit einer maximal zugelassenen Lückenlänge von 50 kb; Segmente wurde als Homozygotie Regionen definiert (ROH), wenn ihre minimale Länge größer als 125 kb war und mehr als 20 homozygote SNPs umschloss, wobei pro Segment ein heterozygoter und ein fehlender SNP erlaubt war. Die Sequenz des Mohrenkopfhengstes NO180 (Jagannathan et al., 2018), der in einer Vorgängerstudie als homozygot am Top-SNP identifiziert worden war (Grilz-Seger et al., 2019) wurde in der Region ECA3:79,472,667-79,694,802 mittels vergleichender Sequenzanalyse mit den weiteren 87 publizierten Pferden (Jagannathan et al., 2018) aus

folgenden Rassen verglichen: 4 Achal-Tekkiner, 4 American Paint Horse, 1 American Standardbred, 2 Araber, 1 Polnische Warmblutpferde, 3 Deutsche Warmblutpferde, 29 Freiberger, 4 Haflinger, 2 Hannoveraner, 8 Holsteiner, 4 Isländer, 2 Deutsche Reitponys, 1 Morgan Horse, 2, 1Holländisches Warmblut, 3 Oldenburger, 3 Quarter Horse, 4 Schweizer Warmblutpferde, 3 Shetland Pony, 1Englisches Vollblut, 3 Trakehner, 2 UK Warmblut, 2 Welsh Ponys.

7.3 ERGEBNISSE

Die genomweite Assoziationsanalyse ergab acht SNPs, die mit dem roan Phänotyp assoziiert und im *KIT* Gen lokalisiert waren (Abb.1). Der top-SNP (AX-103594067, ECA3:g.79,543,439A>G,) lag entweder in homozygoter bzw. heterozygoter Form bei 64 roan farbenen Pferden vor (51 Noriker, drei Slowenische Kaltblüter, sieben Quarter Horses, zwei Murgesen und einem Belgier (Tab.1).

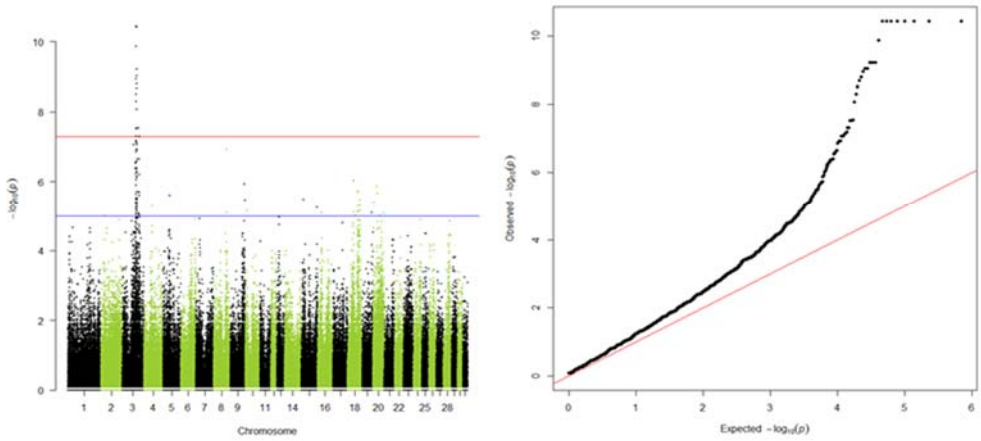


Abbildung 8: Manhatten Plot und Quantile-Quantile plot der GWAS Mohrenkopf (Noriker) versus Rappen (Noriker) (aus Grilz-Seger et al., 2019)

Bei den nicht-roan farbenen Pferden, die aus fünfzehn unterschiedlichen Rassen stammten, wurde das roan (*G*) Allel nicht nachgewiesen, d.h. alle Tiere waren homozygot *A/A* (Wildtypallel).

Abbildung 9: Mohrenköpfe (engl. blue roan) beim Murgesen (li.), Lipizzaner (mi.) und Noriker (re.)

Acht Lipizzaner, bei denen aufgrund der Schimmelfarbe die Mohrenkopffarbe nicht ausgeschlossen werden konnte und von denen bekannt ist, dass sie aus einer Familie stammen in der das roan Gen segregiert (Abb.9), wiesen das *G* Allel auf (Tab.3).

TABELLE 3: SNP GENOTYPEN VERTEILUNG FÜR SNP AX-103594067(3:G.79543439A>G)

Nicht-roan	**N**	**Genotyp *A/A***	**Genotyp *A/G***	**Genotyp *G/G***
Appaloosa	2	2	0	0
Achal Tekkiner	36	36	0	0
Shagya Araber	33	33	0	0
Freiberger	80	80	0	0
Bosnisches Gebirgspferd	23	23	0	0
Posavina	28	28	0	0
Gidran	20	20	0	0
Lipizzaner Rappe/braun	10	10	0	0
Lipizzaner, Schimmel*	379	371	8	0
Quarter Horse	5	5	0	0
Noriker	157	157	0	0
Exmoor Pony	256	256	0	0
Shetland Pony	2	2	0	0
Trakehner	1	1	0	0
Deutsches Warmblut	1	1	0	0
Murgese	2	2		
Traber	1	1	0	0
Summe**	**1036**	**1028**	**8**	**0**
Roan	**N**	**Genotyp A/A**	**Genotyp A/G**	**Genotyp G/G**
Noriker	51	0	36	15
Quarter Horse	7	0	7	0
Slowenisches Kaltblut	3	0	3	0
Murgese	2	0	2	0
Belgisches Kaltblut	1	0	0	1
Shetland Pony	3	3	0	0
Trakehner	1	1	0	0
Deutsches Warmblutpferd	3	3	0	0
Summe**	**71**	**7**	**48**	**16**

* bei den 379 Schimmel farbenen Lipizzanern ist die zugrunde liegende Farbe nicht sichtbar, aber es ist bekannt das Roan in einer spezifischen Familie segregiert.** Fishers exakt Test für die Genotyp Assoziation (A/A und G/-) nicht roan/roan ergab einen p-Wert von p<0.001.

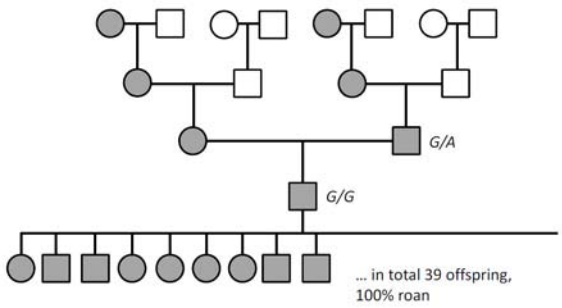


Abbildung 10: Pedigree Beispiel für die Segregation des Roan Faktors beim Noriker Hengst NO180. Hengste sind als Rechtecke, Stuten als Kreise abgebildet (Mohrenköpfe sind grau, nicht-roan Phänotypen sind weiß gekennzeichnet) (aus Grilz-Seger et al., 2019f)

Die Pedigreeanalyse bestätigte einen dominanten Erbgang des roan Allels. Alle untersuchten Mohrenköpfe hatten als Elterntier zumindest einen Mohrenkopf. Anhand der Pedigrees und der phänotypischen Spaltungsverhältnisse konnten homozygote Tiere bestimmt werden, wobei das Genom des homozygoten Mohrenkopfhengst N180 (Abb.10) für die weiteren Analysen als Referenz verwendet wurde.

Die vergleichende Sequenzanalyse der Region (ECA3:79,472,667-79,694,802 (EquCab3)), die mittels ROH Analyse von acht homozygoten Norikern ermittelt worden war, der 88 Pferde (88.vars.flt.pass.ebi.vcf, Jagannathan et al. 2018) ergab 1552 Varianten. Unter der Annahme, dass der Roan Faktor in Pferd NO180 in homozygoter Form vorliegen sollte, verblieben 314 homozygote Varianten in Tier NO180. Davon waren 88 homozygote Sequenzvarianten ausschließlich im Tier NO180 vorhanden. Nach Anwendung des Filters, wonach die gefundenen Varianten in weiteren fünf Tieren vorkommen dürfen, verblieben 115 Kandidatenvarianten.

Die Auswertung der Kandidatenvarianten ergab zwei Single-Nukleotide Varianten (*SNV*) auf den Positionen ECA3:79,540,501 und ECA3:79,545,912 in der kodierenden Region des *KIT* Gens, die mit den von Marklund et al. (1999) identifizierten Varianten übereinstimmten und sehr nahe (Abstand 2,4-2,9kb) am identifizierten top-SNP lokalisiert sind.

TABELLE 4: LOKALISATION, REFERENZ ALLEL (REF) UND ALTERNATE ALLEL (ALT) FÜR DIE IDENTIFIZIERTEN DELETIONEN IN REGION A (A1, A2, A3), DEN ASSOZIERTEN TOP-SNP (SNV) UND DIE INDEL IN REGION B (B1)

SNP	Position auf EquCab3	REF	ALT
A1	ECA3:79,531,997_79,532,011	TTCCATGATTAATTA	-
A2	ECA3:79,533,217_79,533,224	CTCGTCTT	-
A3	ECA3:79,533,282_79,533,285	TTCT	-
SNP	ECA3:79,543,439	A	G
B1	ECA3:79,588.127-29	ACA	TTATCTCTATAGTAGTT

Als potentielle Roan Kandidaten verblieben zwei Regionen (A und B) im regulatorischen Abschnitt des *KIT* Gens. In der 3'-flankierenden Region des *KIT* Gens (Region A) wurden drei Deletionen (Tab.4) identifiziert und eine 3 bp Deletion kombiniert mit einer 17 bp Insertion im Intron 20 des *KIT* Gens (B1). Die Genotypisierung ergab, dass A1 nicht roan spezifisch war und daher exkludiert wurde.

TABELLE 5: GENOTYPENVERTEILUNG DER VIER IDENTIFIZIERTEN VARIANTEN UND DIE ENTSPRECHENDE HAPLOTYPEN

Rassen/roan	***n***	***A2 (3:79533214)***	***A3 (3:79533281)***	***SNV (3:79543439)***	***B1 (3:79588127-29)***	***Haplotyp***
Noriker	18	Het.	Het.	Het.	Het.	11-1-1/00-0-0
Noriker	8	Hom. ALT	Hom. ALT	Hom. ALT	Hom. ALT	11-1-1/11-1-1
Quarter Horse	7	Het.	Het.	Het.	Het.	11-1-1/00-0-0
Slow. Kaltblut	3	Het.	Het.	Het.	Het.	11-1-1/00-0-0
Belgier	1	Hom. ALT	Hom. ALT	Hom. ALT	Hom. ALT	11-1-1/11-1-1
Murgese	2	Het.	Het.	Het.	Het.	11-1-1/00-0-0
Shetland Pony	3	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Trakehner	1	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Warmblut	3	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Rassen nicht-roan						
Noriker	38	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Quarter Horse	5	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Appaloosa	2	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Murgese	2	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Traber	1	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Warmblut	1	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0
Shetland Pony	2	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	Hom.REF	00-0-0/00-0-0

Nach Genotypisierung der vier Loci verblieb ein Haplotyp (11-1-1), der ausschließlich bei den roan farbenen Tieren der Rassen Noriker, Quarter Horse, Murgesen, Slowenisches Kaltblut und Belgier vorkam, und mit dem Genotyp Ergebnis am Top-SNP (AX-103594067, ECA3:g.79,543,439A>G,) übereinstimmte (Tab.5). Interessanterweise konnte der Haplotyp bei roan farbenen drei Shetlandponys (n=3), Deutschen Warmblut

und beim Trakehner (n=4) nicht identifiziert werden, diese Pferde wiesen denselben Haplotyp (00-0-0) wie nicht-roan Tiere auf.

7.4 DISKUSSION

Marklund et al. (1999) identifizierten eine inkomplette Assoziation zwischen dem Roan Phänotyp und den Genotyp Informationen in einer Stichprobe, die 33 roan und 92 nicht roan farbene Belgier beinhaltete. Die im *KIT* Gen gefundenen, mit roan assoziierten Polymorphismen lagen bei Welsh, Shetland und Gotland Pony nicht vor, wodurch die Autoren postulierten, dass der Roan Faktor eventuell populationsspezifisch ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit der Hypothese von Marklund et al. (1999) überein, indem ein für den Noriker, Slowenisches Kaltblut, Belgier, Lipizzaner und Murgesen spezifischer, mit roan assoziierter SNP gefunden wurde, der beim Shetland Pony, Deutschen Warmblut und Trakehner nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch zu beachten, dass mit Ausnahme des Norikers die Stichprobe der untersuchten roan farbenen Pferde gering war und eine Verifizierung des top-SNPs in anderen Rassen und des roan assoziierten Haplotyp anhand einer größeren Stichproben vorgenommen werden sollte. In letzter Zeit wurde die postulierte embryonale Letalität von am Roan Locus homozygoten Tieren in Frage gestellt (Sponenberg und Bellone, 2017), mit den Resultaten dieser Untersuchung konnte die Existenz von homozygoten Mohrenköpfen beim Noriker nachgewiesen werden.

7.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Mit dem SNP AX-103594067(3g:79,543.439A>G) liegt ein genetischer Marker für die Mohrenkopffarbe beim Noriker vor. Ob dieser Marker auch für die Rassen, bei denen das roan spezifische *G* Allel und der Roan Haplotyp identifiziert worden ist (Quarter Horse, Murgese, Lipizzaner, Slowenisches Kaltblut, Belgier), genutzt werden kann, bedarf einer weiteren Verifizierung anhand einer größeren Stichprobe.

8 GENOMISCHE POPULATIONSANALYSEN

LIPIZZANER

8.1 EINLEITUNG

Der Lipizzaner ist eine der am besten dokumentierten Pferderassen und dessen Pedigreeinformationen und Gestütsaufzeichnungen reichen mit einigen Unterbrechungen bis in das 17. Jahrhundert zurück. Der Gründergenpool dieser Pferderasse setzt sich aus 456 Pferden zusammen (Zechner et al., 2002; Druml und Sölkner, 2012; Druml et al., 2018), die größtenteils auf im 18. Jahrhundert geborene Tiere des Hofgestüts Lipizza zurückzuführen sind. Der Lipizzaner-Genpool, die genetische Diversität und die Populationsstruktur wurden bislang mit unterschiedlichen wissenschaftlichen Methoden analysiert. Mittels Pedigreeanalyse berechneten Zechner et al. (2002), Sölkner und Druml (2012), Druml et al. (2018) die Inzuchtkoeffizienten und effektive Populationsgröße von Lipizzanern aus mehreren europäischen Staatsgestüten. Achmann et al. (2004) ermittelte auf Basis von Mikrosatelliten Markern Populationsstruktur und genetische Distanzen von Lipizzaner Herden aus mehreren europäischen Staatsgestüten und Kavar et al. (1999) analysierte mittels mitochondrialer DNA die maternale Diversität des Lipizzaners. Wallner et al. (20013) beleuchtete mit einer Haplotypenanalyse des Y-Chromosoms die patrilineare Struktur dieser Pferderasse. Die meisten dieser Studien wurden im Rahmen bzw. in Anschluss eines internationalen Forschungsprojekts, dem sogenannten Kopernikus- Projekt, durchgeführt (Dovc et al., 2006). In mehreren Folgestudien konnten wichtige Erkenntnisse zu der Heritabilität von Melanomen, Vitiligo und des Ergrauens des Haarkleids (Seltenhammer et al., 2002; Curik et al., 2013) gewonnen, sowie das kausative Schimmelgen (Graugen) identifiziert werden (Pielberg et al., 2008).

In der vorliegenden Analyse wurde anhand von SNP Genotyp Informationen die Populationsstruktur der österreichischen Lipizzaner ermittelt und mit Lipizzanern aus vier weiteren europäischen Staatsgestüten (Lipik/ Đakovo, Szilvasvárad, Topol'čianky) in Beziehung gestellt und verglichen. Der Autozygotiegrad und überlappende Homozygotie Regionen wurden für die einzelnen Subpopulationen errechnet und es wurde eine Gen Ontologie und Anreicherungsanalyse für die bekannten Gene, die sich innerhalb von homozygoten Regionen befinden, durchgeführt.

8.2 MATERIAL

Insgesamt wurden 377 Lipizzaner aus den Gestüten Piber (254 Pferde), Topol'čianky (55 Pferde), Đakovo und Lipik (45 Pferde), Szilvasvárad (23 Pferde) in die Studie einbezogen. Die Haarproben wurden im Zeitraum zwischen 2013 bis 2017 gesammelt. Die untersuchten Lipizzaner der Gestüte Piber (Österreich) und Topol'čianky(Slowakei) entsprachen der gesamten Gestütspopulation des jeweiligen Staatsgestüts. Die kroatischen Lipizzaner der Staatsgestüte Lipik und Đakovo entsprachen einem Drittel der Gestütspopulation und die ungarische Stichprobe des Gestüts Szilvasvárad einem Viertel des Zuchtbestandes.

8.3 METHODE

Die SNP Genotypen wurden mittels des 670,000 SNP Affymetrix® Axiom Equine HD Array (Schäfer et al., 2017) bestimmt, wobei die chromosomalen Positionen der SNPs anhand des EquCab2.0 Referenz Genoms hergeleitet wurden. SNPs, die auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert waren (X: 28,017 SNPs und Y: 1 SNP) und 30.864 SNPs ohne chromosomale Zuordnung, wurden in den Analysen nicht berücksichtigt. Bei der Qualitätskontrolle wurden SNPs, deren Genotypisierungsrate unter 10% lag und SNPs, die eine Minor Allel Frequenz unter 0.01 aufwiesen, ausgeschlossen. Um die genomische Struktur der untersuchten Pferdepopulationen zu ermitteln, haben wir eine Modell-basierende Cluster-Analyse angewandt, welche im

Programm Admixture 1.23 (Alexander et al., 2009) implementiert ist. In Simulationsschritten zu je 100 Iterationen wurden 2 bis 8 genetische Cluster (K) abgeleitet, wobei die beste Lösung der 100 Iterationen pro K mittels der Log Liklihood Statistik bestimmt wurde. Die Ergebnisse der Admixture Analyse wurden mit dem Programm Distruct 1.1 (Rosenberg, 2004) visualisiert und in weiterer Folge in eine hochauflösende Netzwerkgrafik implementiert.

Die Verwandtschaftsgrade und die genetische Bedeutung von Einzeltieren wurden anhand eines detaillierten Populationsnetzwerks dargestellt, welches auf einer IBS (identical by state) Verwandtschaftsmatrix (G-Matrix) beruht. Die paarweisen genetischen Distanzen wurden durch die Subtraktion der paarweisen Verwandtschaftskoeffizienten von 1 berechnet. Die daraus resultierende Distanzmatrix wurde mit dem Programm NetView (Neuditschko et al., 2012; Steinig et al., 2015) analysiert, wobei die Anzahl der k-nearest neighbours (k-NN) auf 10 gesetzt wurde. Im resultierenden Pferdenetzwerk wurden die Verbindungslinien mit der genetischen Distanz assoziiert, die Größe der Kreise entspricht dem Inzuchtgrad (F_{ROH}) der einzelnen Tiere. Paarweise F_{ST} Werte wurden mit dem R-Paket Geneland (https://rdrr.io/cran/Geneland) berechnet.

Die Bestimmung der Homozygotie Segmente (ROHs) wurde mit dem in der Software PLINK v1.7 (Purcell et al., 2007) implementierten „sliding window“ Ansatz durchgeführt, wobei folgende Einstellungen vorgenommen wurden: minimale SNP Dichte von einem SNP pro 50 kb, maximaler Abstand zwischen zwei Homozygotie Segmenten von 100 kb und die Minimumlänge eines ROHs war mit 500 kb und mehr als 80 aufeinanderfolgenden homozygoten SNPs definiert, wobei 1 heterozygoter und max. 2 fehlende SNPs erlaubt waren.

Die Anzahl ROH pro Tier (N_{ROH}), die Gesamtlänge von ROHs pro Individuum (S_{ROH}), die mittlere ROH Länge pro Tier (L_{ROH}) und die ROH basierende Inzucht (F_{ROH}) wurden auf die einzelnen Subpopulationen gemittelt und deskriptiv dargestellt, wobei F_{ROH} nachfolgender Formel berechnet wurde:

F_{ROH} = Summe (L_{ROH}/L_{AUTO})

, wobei die Länge des autosomalen Genoms (L_{AUTO}) auf 2.243 Gb gesetzt wurde.

Als ROH Insel wurden überlappende Homozygotie Regionen definiert, die von mehr als 50% der Individuen in den einzelnen Subpopulationen geteilt wurden. Grafische Darstellungen, Datenmanagement und deskriptive Statistik wurden mittels der Statistik Software Programme R (www.r-project.com) und SAS v.9.1 (SAS, 2009) erstellt. Mit Hilfe der Equinen Ensembl Datenbank Equ cab2 (www.ensembl.org) wurden die in den einzelnen ROH Inseln lokalisierten bekannten Gene ermittelt und Genlisten für die einzelnen Subpopulationen erstellt. Mit der Open-Source-Datenbank DAVID (Datatabase for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) v6.8 – verfügbar unter https://david.ncifcrf.gov – wurden eine Gen Ontologie (GO) und Genanreicherungsanalyse (KEGG pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)) auf Basis der ermittelten Genlisten der einzelnen Lipizzaner Subpopulationen durchgeführt.

8.4 ERGEBNISSE

8.4.1 HAUPTKOMPONENTENANALYSE

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA Analyse) zeigte, dass 35% der genetischen Varianz durch die drei ersten Hauptkomponenten (PCs) erklärt werden (Abb. 11a). Wie in Abbildung 11 dargestellt, bildet die österreichische Lipizzaner Population einen eigenen Cluster, der durch niedrige paarweise genetische Distanzen gekennzeichnet ist. Die anderen drei Subpopulationen (Đakovo/Lipik, Szilvasvárad, Topol’čianky) zeigen eine ausgeprägte Vernetzung untereinander und sind gleichzeitig durch einen höheren Grad an genetischer Diversität charakterisiert.

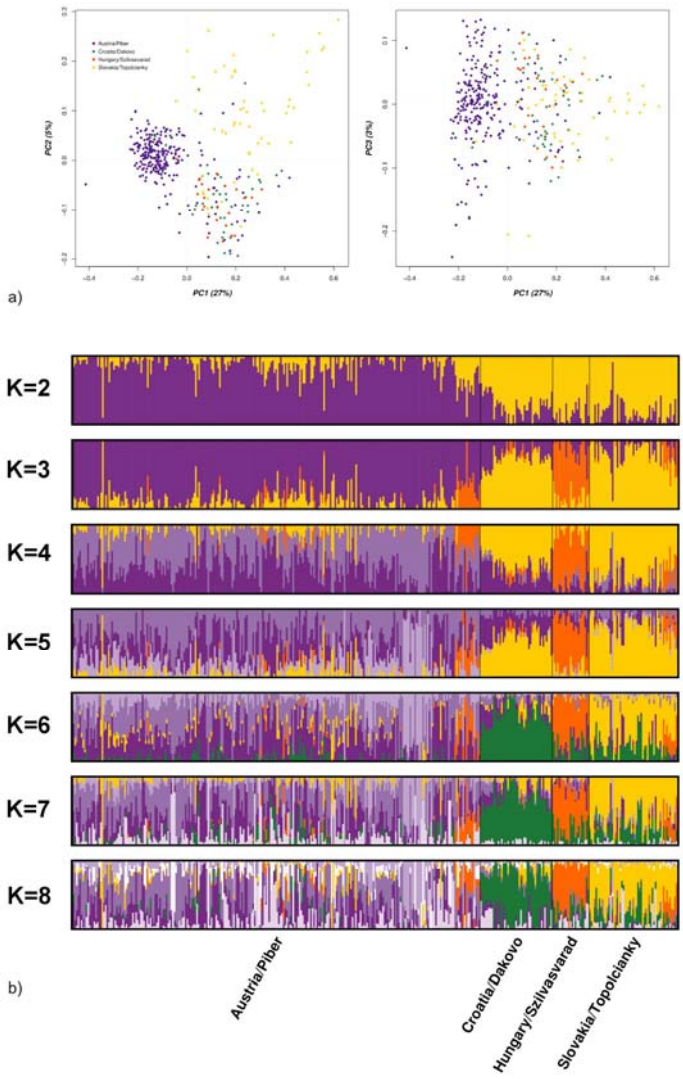


Abbildung 11: a) Darstellung der ersten drei Hauptkomponenten, die zusammen 35% der genetischen Varianz der untersuchten Lipizzaner Stichprobe erklären. (b) Grafische Darstellung der einzelnen Admixture Simulationsschritte (K von 2 bis 8) und die dabei errechneten individuellen Clusterzugehörigkeitskoeffizienten für Österreichische, Kroatische, Ungarische und Slowakische Lipizzaner (aus Grilz-Seger et al., 2019a)

Mit der Admixture Analyse werden in einer Gesamtstichprobe genetische Substrukturen auf Individuen ebene identifiziert, wobei die Anzahl an möglichen Clustern in jedem Simulationsschritt um einen erhöht wird (Abb.11b). Beim ersten Simulation Szenario, bei dem zwei unterschiedliche genetische Cluster angenommen wurden (K=2), separierte sich die österreichische Lipizzanerherde von den anderen Subpopulationen (Abb.11b). Im folgenden Schritt (K=3) formierten die ungarischen Pferde eine eigene genetische Untereinheit. Bei den nächsten zwei Schritten (K=4 bis K=5) konnten innerhalb der österreichischen Population zwei weitere Sub-Cluster entdeckt werden, während sich mit K=6 ein eigenständiger slowakischer Cluster bildete, der sich von den kroatischen Lipizzanern abgrenzte.

8.4.2 NETZWERKANALYSE

In der Netzwerkanalyse wurden die individuellen S_{ROH} -Werte mit den Tier-individuellen Clusterzugehörigkeitskoeffizienten der Admixture Analyse (K=8) kombiniert und graphisch dargestellt. Dadurch konnte die Aussagekraft der vorangegangenen Analysen wesentlich erhöht werden, indem die Pferde nach ihrer Gestütszugehörigkeit separiert und Ausreißer identifiziert werden konnten.

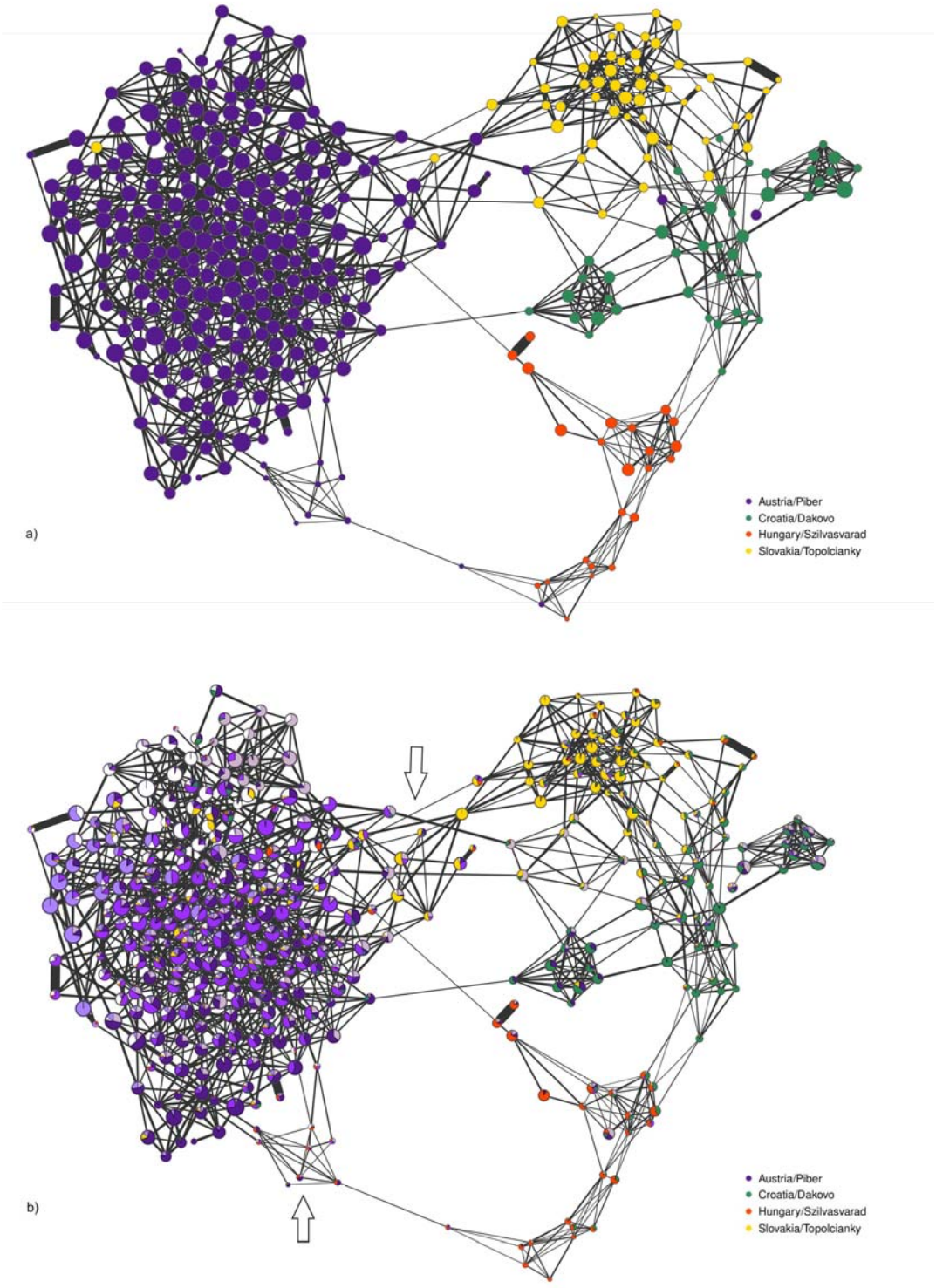


Abbildung 12: Hochauflösende Netzwerkdarstellung von Lipizzanern aus den Gestüten Piber (Austria), Topol'čianky (Slowakei), Đakovo und Lipik (Kroatien) und Szilvasvárad (Ungarn). (a) Im oberen Netzwerk sind die einzelnen Pferde (Kreise) nach ihrem Herkunftsgestüt gekennzeichnet. Im unteren Netzwerk (b) beinhalten die individuellen Kreise auch die einzelnen Clusterzugehörigkeitskoeffizienten aus der Admixture Analyse. Die Größe der Kreise ist proportional zur genomischen Inzucht (S_{ROH}), und die Länge der Verbindungslinien stellt die genetische Distanz zwischen den Tieren dar, während die Breite der Verbindungslinien proportional zur genomischen Verwandtschaft ist (aus Grilz-Seger et al., 2019a).

Wie in Abbildung 12 dargestellt, ist die im Vergleich zu den anderen Subpopulationen höhere Verwandtschaft und niedrigere genetische Distanz der Lipizzaner des Gestüts Piber durch kürzere und dickere Verbindungslinien der einzelnen Punkte ersichtlich. Innerhalb der österreichischen Lipizzaner

Population bilden sich zwei Subcluster, die durch einen höheren Grad an genetischer Admixture gekennzeichnet sind und die mit den slowakischen und ungarischen Lipizzanern verbunden sind. Bei diesen Tieren handelt es sich um Nachkommen zugekaufter Zuchtstuten, die in die Zuchtherde von Piber integriert wurden. Wie im Netzwerk zu sehen (Abb.12), sind diese Tiere durch ein wesentlich geringeres genomische Verwandtschaftsniveau (längere und dünnere Verbindungslinien) und kleinere S_{ROH} Werte (kleinere Kreise) charakterisiert. Im kroatischen Cluster konnten mittels Netzwerk drei Untereinheiten dargestellt werden, wobei die rechts liegende Einheit die Pferde aus Lipik und die links liegende Gruppe die Pferde von Đakovo repräsentieren. In der Mitte befindet sich eine Gruppe von Tieren, die durch einen höheren Vernetzungsgrad mit slowakischen und ungarischen Lipizzanern gekennzeichnet sind. Die ungarischen Pferde sind rechts unten im Netzwerk dargestellt und sind durch sehr geringe S_{ROH} Werte charakterisiert.

8.4.3 HOMOZYGOTIEREGIONEN

Die ROH Analyse aller in dieser Studie untersuchten Lipizzaner ergab eine durchschnittliche genomische Länge der homozygoten Abschnitte (S_{ROH}) von 297.10 Mb (+-119.85) und eine durchschnittliche Anzahl von 202.7 homozygoten Segmenten (N_{ROH}) (Tab.6). Die einzelnen Subpopulationen variierten in den ROH Parameter. Die höchste geschätzten Werte für S_{ROH} und N_{ROH} wurden für die Lipizzaner des Gestüts Piber ermittelt (S_{ROH}=342 Mb; N_{ROH} =211.85), gefolgt von den kroatischen Pferden (S_{ROH} 214.66 Mb, N_{ROH} =186.87) und den slowakischen Lipizzanern (S_{ROH} =205.06 MB, N_{ROH} =187.58).

TABELLE 6: MITTELWERTE, STANDARDABWEICHNGEN (SD), MINIMA UND MAXIMA FÜR DIE VARIABLEN S_{ROH} (IN MB), N_{ROH}, L_{ROH} (IN MB) UND F_{ROH} FÜR DIE GESAMTE LIPIZZANERSTICHPROBE, DIE PFERDE DES GESTÜTS PIBER, DES GESTÜTS TOPOL'ČIANKY, UND DER KROATISCHEN UND UNGARISCHEN STICHPROBEN.

Gesamt	**n**	**Mittelwert**	**SD**	**Minimum**	**Maximum**
S_{ROH}	377	297.01	119.85	1.91	550.21
N_{ROH}		202.07	51.96	3.00	333.00
L_{ROH}		1.42	0.43	0.56	2.45
F_{ROH}		0.13	0.05	0.00	0.25
Piber/Österreich					
S_{ROH}	254	342.88	105.43	3.35	550.21
N_{ROH}		211.85	46.00	6.00	333.00
L_{ROH}		1.59	0.41	0.56	2.45
F_{ROH}		0.15	0.05	0.00	0.25
Topol'čianky/Slowakei					
S_{ROH}	55	205.05	76.75	30.38	359.72
N_{ROH}		178.58	50.81	48.00	301.00
L_{ROH}		1.06	0.17	0.63	1.35
F_{ROH}		0.09	0.03	0.01	0.16
Lipik, Đakovo/Kroatien					
S_{ROH}	45	214.66	85.99	81.31	401.22
N_{ROH}		186.87	47.38	96.00	320.00
L_{ROH}		1.11	0.22	0.85	1.62
F_{ROH}		0.10	0.04	0.04	0.18
Szilvasvárad/Ungarn					
S_{ROH}	23	171.53	112.58	1.91	402.80
N_{ROH}		158.39	83.30	3.00	131.00
L_{ROH}		0.98	0.22	0.64	1.44
F_{ROH}		0.07	0.05	0.00	0.18

Das niedrigste Autozygotieniveau (S_{ROH} =171.53; N_{ROH} =158.39) hatten die ungarischen Lipizzaner. Die ermittelte Inzucht basierend auf F_{ROH} lag bei 13.2% (+-5.3%) für die gesamte Stichprobe, und variierte in den einzelnen Subpopulationen zwischen 15.3% (+-4.7%) in Piber und 7.6% (+-5.0%) bei der ungarischen Subpopulation (Tab.7).

Das Alter der Inzucht wurde anhand der unterschiedlichen ROH Längenklassen errechnet (Tab. 7). Die Werte für $F_{ROH<2Mb\ waren}$ mit 6.7% am höchsten in der österreichischen Stichprobe und mit 5.6% am niedrigsten bei der ungarischen Subpopulation. Um die Inzucht, basierend auf Verwandtschaftspaarungen innerhalb der letzten zehn Generationen, zu ermitteln, wurden die F_{ROH} Berechnung anhand von ROHs> 10 Mb durchgeführt. F_{ROH} >10 Mb war in der Slowakischen Stichprobe nicht vorhanden, tendierte zu Null in der ungarischen Subpopulation, und erreichte 1.1% in der österreichischen Stichprobe.

TABELLE 7: VERTEILUNG DER ROHS UND F_{ROH} (IN %) IN UNTERSCHIEDLICHEN LÄNGENKLASSEN (0.5-1 MB, 1-2 MB, 2-4 MB, 4-6 MB, 6-8 MB, 8-10 MB, >10 MB) BEZIEHUNGSWEISE IN CUMULATIVEN LÄNGENKLASSEN (<1 MB, <2 MB, <4 MB, <6 MB, <8 MB, <10 MB, TOTAL F_{ROH}) FÜR DIE ÖSTERREICHISCHE, SLOWAKISCHE, KROATISCHE UND UNGARISCHE UND DIE GESAMTE STICHPROBE (GESAMT).

ROH Längenklassen	Österreich	Kroatien	Ungarn	Slowakei	Gesamt
0.5-1 Mb	22.7	37.7	41.0	40.0	28.1
1-2 Mb	21.3	31.1	32.1	32.3	24.8
2-4 Mb	23.9	22.2	19.4	21.4	23.1
4-6 Mb	12.9	5.7	5.2	4.8	10.4
6-8 Mb	7.6	2.2	1.2	0.9	5.6
8-10 Mb	4.2	0.4	0.4	0.5	3.0
>10 Mb	7.4	0.6	0.6	0.0	5.1
F_{ROH} per Längenklasse					
$F_{ROH\ 0.5\text{-}1Mb}$	3.5	3.6	3.1	3.7	3.5
$F_{ROH\ 1\text{-}2Mb}$	3.3	3	2.5	3	3.1
$F_{ROH\ 2\text{-}4Mb}$	3.7	2.2	1.5	2	3.1
$F_{ROH\ 4\text{-}6Mb}$	2	0.6	0.4	0.4	1.5
$F_{ROH\ 6\text{-}8Mb}$	1.2	0.2	0.1	0.1	0.8
$F_{ROH\ 8\text{-}10Mb}$	0.6	0	0	0	0.4
$F_{ROH\ >10Mb}$	1.1	0.1	0	0	0.8
F_{ROH} per Längenklasse (cum.)					
$F_{ROH\ <1Mb}$	3.5	3.6	3.1	3.7	3.5
$F_{ROH\ <2Mb}$	6.7	6.5	5.6	6.6	6.6
$F_{ROH\ <4Mb}$	10.4	8.7	7.1	8.6	9.7
$F_{ROH\ <6Mb}$	12.4	9.3	7.5	9	11.2
$F_{ROH\ <8Mb}$	13.5	9.5	7.6	9.1	12
$F_{ROH\ <10Mb}$	14.2	9.5	7.6	9.1	12.5
$F_{ROH\ total}$	15.3	9.6	7.6	9.1	13.2

Das ROH Muster, ausgedrückt im Plot N_{ROH} versus $S_{ROH,}$ ergab für die österreichische Stichprobe eine Rechtsverschiebung in Richtung höhere S_{ROH-} Werte und eine erhöhte S_{ROH-}Varianz (Abb.13)., Die Verteilung der ROH Segmente in den unterschiedlichen Längenklassen ergab in der Österreichischen Subpopulation den niedrigsten Anteil von ROH Segmenten kleiner als 2 Mb (21.3%), diese Längenklasse war in den anderen Subpopulationen zwischen 31.1% und 32.3% vertreten (Tab. STX17). Gleichzeitig wies die österreichische Stichprobe den höchsten Anteil von ROHs >6 Mb (19.2%) auf und 7.4% der ROHs-Segmente war länger als 10Mb.

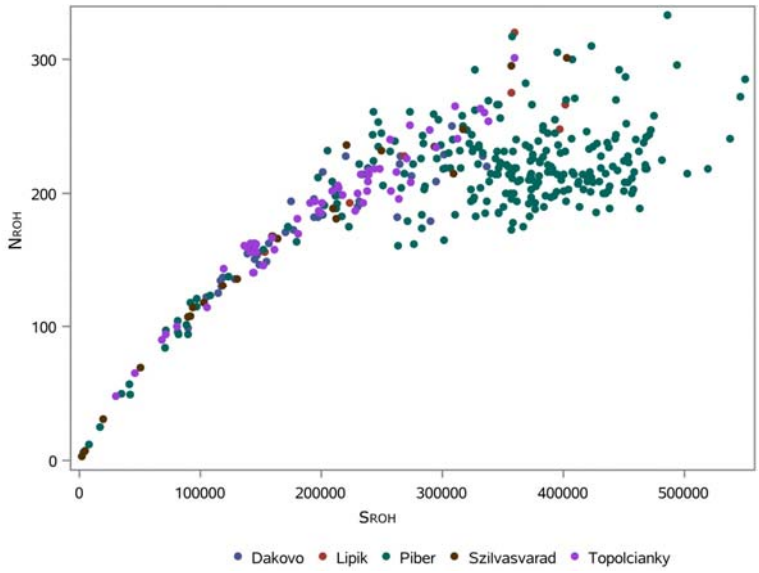


Abbildung 13: Profile Plot von S_{ROH} versus N_{ROH}. Individuen sind als einzelne Punkte dargestellt (Đakovo/Kroatien = blau; Lipik/Kroatien = rot; Piber/Österreich = grün; Szilvasvárad/Ungarn = braun; Topol'čianky/Slowakei = violett).

8.4.4 ROH INSELN

In der gesamten Stichprobe wiesen mehr als 50% der untersuchten Lipizzaner fünf überlappende Homozygotie Regionen auf, die am Chromosom 11 und 14 lokalisiert waren (Tab.8). Eine davon, ein homozygotes Segment am Chromosom 11 (ECA11:24.13-24.81 Mb), wurde bei 61.3% der Tiere nachgewiesen und umschloss die Gene *COPZ2, CBX1, SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6.* In Abbildung 14a ist die Position und Länge des Homeobox-B Clusters in dieser homozygoten Region für die einzelnen Subpopulationen dargestellt. Die Länge dieser homozygoten Region war in allen Subpopulationen nahezu identisch, sie variierte lediglich in der Frequenz zwischen 59.2% bei den slowakischen Lipizzanern und 72.7% bei den ungarischen Lipizzanern.

TABELLE 8: ROH INSELN, DIE IN MEHR ALS 50% DER TIERE ÜBERLAPPEN (ROH FREQ.) FÜR DAS GESAMTE LIPIZZANER PROBE UND DIE IN DEN INSELN ENTHALTENEN BEKANNTEN GENE.

Chr.	Beginn	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
11	24,134.125	24,816.254	682.1	0.613	*COPZ2, CBX1, SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6*
11	30,677.562	30,685.590	8.0	0.501	-
11	31,015.821	31,942.748	926.9	0.666	*C11H17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1, MSI2*
14	34,988.691	34,999.535	10.8	0.501	-
14	34,651.534	34,935.341	283.8	0.514	*SPRY4, NDFIP1*

Die zweite am Chromosom 11 lokalisierte ROH Insel (Position 31,015.821 - 31,942.748) erreichte in der österreichischen und kroatischen Stichprobe eine maximale Länge von 927 kb und eine Frequenz von 72.8% bzw. 62.6% (Abb.14b). Beim slowakischen Lipizzaner war diesen homozygote Region in zwei Fragmente gebrochen, während die ungarischen Lipizzaner das kürzeste homozygote Segment aufwiesen.

Am Chromosom 25 wurden in der Nähe des *STX17* (Syntaxin-17) Gens eine homozygote Region bei 46.2% der Tiere der gesamten Stichprobe identifiziert. Eine sich autosomal dominant vererbende Mutation im Syntaxin Gen verursacht die Schimmelfarbe beim Pferd. Die Frequenz des homozygoten Segments lag unter

den für den Lipizzaner erwarteten Werten. Aus vorangegangenen Studien weiß man, dass die Frequenz des homozygoten *STX17* Genotyps G/G beim Lipizzaner bei 67.3% liegt (Pielberg et al., 2006).

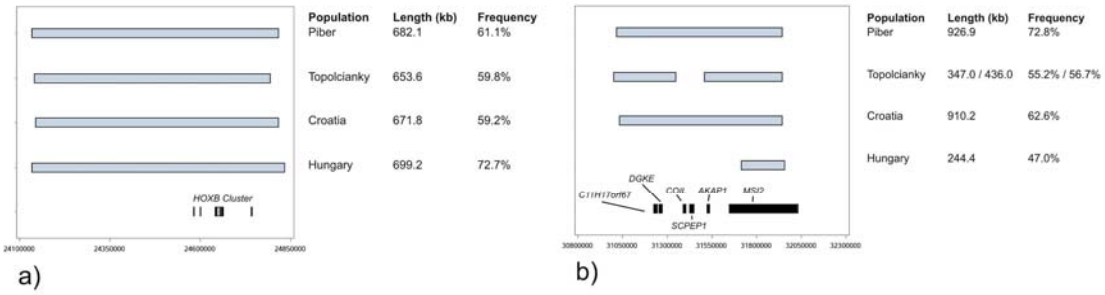


Abbildung 14: a) Darstellung der ROH Inseln, die den HOXB Cluster auf ECA11:24.13-24.81 Mb beinhalten für die einzelnen Stichproben. In Abbildung b) wird eine ROH Insel auf ECA11:31.01-31.94 Mb gezeigt, welche die Gene C11H17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1, MSI2 beinhaltet (aus Grilz-Seger et al., 2019a).

Aus diesem Grund adaptierten wir die Länge des ROH Fenster (80 kb, min. 20 SNPs) und wiederholten den Scan rund um das STX17 Gen. Mit dieser neuen Einstellung identifizierten wir bei 66.1% der Tiere der gesamten Stichprobe eine 399.9kb lange ROH Insel (ECA25:6,394.110-6,794.044) um das STX17 Gen (Abb.15). Bei den einzelnen Subpopulationen war die Frequenz der Homozygotie Region mit 71.2% beim österreichischen Lipizzaner am höchsten und mit 51.1% beim kroatischen Lipizzaner am niedrigsten.

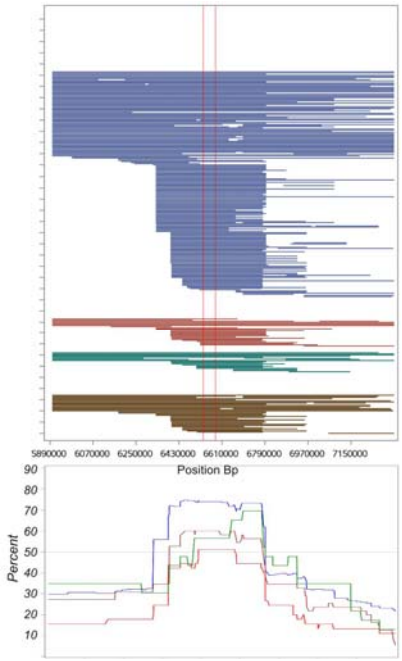


Abbildung 15: ROH Insel rund um das STX17 Gen (gekennzeichnet durch die zwei vertikalen roten Linien) auf ECA25:6.394.110-6.794.044. Die einzelnen Subpopulationen sind farblich gekennzeichnet: Österreich = blau, Slowakei = braun, Kroatien = rot, Ungarn = grün (aus Grilz-Seger et al., 2019a).

Die Ermittlung der einzelnen Subpopulation ergab für die österreichische Stichprobe die höchste Anzahl an Homozygotie Regionen (16), die auf ECA3 (2 Inseln), ECA5, ECA7 (2 Inseln), ECA8, ECA11 (3 Inseln), ECA14, ECA16 (4 Inseln), ECA18 und ECA20 lokalisiert waren (Tab.9). Die Länge der Homozygotie Regionen schwankte zwischen 20.2 kb und 953.3 kb, wobei das längste Segment auf ECA11 (Position: 31.01-31.94 Mb) lokalisiert war und bei 72,8% der Lipizzaner vorhanden war. Die zweithäufigste ROH Insel (61.1%) war ebenfalls auf dem ECA11 (Position 24.13-24.81 Mb). Insgesamt waren acht ROH Inseln ausschließlich in der österreichischen Stichprobe vorhanden (Tab. 9).

TABELLE 9: ROH INSELN, DIE IN MEHR ALS 50% DER TIERE ÜBERLAPPEN (ROH FREQ.) FÜR DIE LIPIZZANER POPULATION VON PIBER UND DIE IN DEN INSELN ENTHALTENEN BEKANNTEN GENE.

Chr.	Beginn	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
3	118,669.793	118,769.903	100.1	0.508	*UVSSA, MAEA*
3	118,809.979	118,893.880	83.9	0.506	*CTBP1*
5	48,702.703	49,211.103	508.4	0.530	*CHD1L, FMO5, PRKAB2*
7	50,434.281	50,606.416	172.1	0.507	-
7	50,636.963	50,733.100	96.1	0.508	-
8	93,409.518	93,605.837	196.3	0.538	*CTDP1*
11	24,134.125	24,816.254	682.1	0.611	*COPZ2, CBX1,SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6*
11	30,607.721	30,687.266	79.6	0.526	-
11	31,015.821	31,942.748	926.9	0.728	*C11H17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1, MSI2*
14	41,779.891	42,365.786	585.9	0.546	*FSTL4*
16	37,870.208	38,823.469	953.3	0.542	*C16H3orf84, KLHDC8B, CCDC71, LAMB2, USP19, QARS, QRICH1, IMPDH2, NDUFAF3, DALRD3, ARIH2, WDR6, P4HTM, IP6K2, NCKIPSD, CELSR3, TMEM89, UQCRC1, SLC26A6, UCN2, PFKFB4, SHISA5, TREX1, ATRIP, CCDC51, PLXNB1, NME6, ECATH-3, ECATH-2*
16	39,675.098	39,695.300	20.2	0.507	-
16	39,890.148	39,920.855	30.7	0.507	*CCDC12*
16	40,077.806	40,159.633	81.8	0.514	*TMIE, ALS2CL*
18	635.232	1,235.687	600.5	0.528	*ARHGEF4, PLEKHB2*
20	43,065.487	43,166.223	100.8	0.507	*CAPN11, SLC29A1, HSP90AB1, SLC35B2, NFKBIE, TCTE1*

In der slowakischen Stichprobe wurden sechs Homozygotie Regionen auf ECA11 (3), ECA14, ECA16 und ECA22 identifiziert, wobei die Inseln auf ECA11 und ECA16 mit den korrespondierenden Homozygotie Regionen der österreichischen Lipizzaner überlappten (Tab.10). Weitere ROH Inseln auf ECA22:47.90-48.48 Mb und ECA14:34.65-35.08 Mb waren auch in der kroatischen Stichprobe vorhanden.

TABELLE 10: ROH INSELN, DIE IN MEHR ALS 50% DER TIERE ÜBERLAPPEN (ROH FREQ.) FÜR DIE LIPIZZANER POPULATION VON TOPOL'ČIANKY UND DIE IN DEN INSELN ENTHALTENEN BEKANNTEN GENE.

Chr.	Beginn	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
11	24,140.999	24,793.573	652.6	0.598	*COPZ2, CBX1,SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6*
11	31,000.312	31,347.338	347.0	0.552	*C11H17orf67, DGKE*
11	31,507.758	31,942.748	435.0	0.567	*AKAP1, MSI2*
14	34,651.534	35,086.649	435.1	0.609	*SPRY4, NDFIP1, GNPDA1, RNF14*
16	39,675.098	39,775.712	100.6	0.507	*SETD2*
22	47,905.031	48,488.839	583.8	0.576	*CDH4, TAF4, LSM14B, PSMA7, SS18L1, MTG2, HRH3, OSBPL2, ADRM1, LAMA5, CABLES2, RBBP8NL, GATA5*

In der kroatischen Subpopulation wurden sechs Homozygotie Regionen auf ECA4, ECA7, ECA11 (2 Inseln), ECA14, ECA22 identifiziert, deren Länge zwischen 129.1 kb und 1.14 Mb schwankte. Das Längste homozygote Segment auf ECA14:34.05-35.18 Mb war bei 72.6% der Pferde vorhanden und umschloss neun bekannte Gene (Tab.11).

TABELLE 11: ROH INSELN, DIE IN MEHR ALS 50% DER TIERE ÜBERLAPPEN (ROH FREQ.) FÜR DIE KROATISCHEN LIPIZZANER STICHPROBEN VON LIPIK AND ĐAKOVO UND DIE IN DEN INSELN ENTHALTENEN BEKANNTEN GENE.

Chr.	Beginn	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
4	58,110.547	58,620.749	510.2	0.529	*HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10, HOXA11, EVX1, HIBADH*
7	52,014.500	52,143.583	129.1	0.532	-
11	24,144.431	24,816.254	671.8	0.592	*COPZ2, CBX1,SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6*
11	31,032.580	31,942.748	910.2	0.626	*C11H17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1, MSI2*
14	34,051.957	35,189.508	1,137.5	0.726	*ARHGAP26, FGF1, SPRY4, NDFIP1, GNPDA1, RNF14, PCDH12, PCDH1, DELE1*
22	47,901.830	48,624.259	722.4	0.549	*TAF4, CDH4, LSM14B, PSMA7, SS18L1, MTG2, HRH3, OSBPL2, ADRM1, LAMA5, CABLES2, RBBP8NL, GATA5, SLCO4A1, NTSR1*

Die ungarische Stichprobe hatte sechs ROH Inseln, die auf, die auf ECA4, ECA8, ECA11, ECA22, ECA23, ECA30 lokalisiert waren und in der Länge zwischen 497.4 kb und 699.2 kb variierten (Tab.12). Vier davon waren auf ECA8, ECA22, ECA23 und ECA30 waren ausschließlich bei den ungarischen Lipizzanern vorhanden. In Abbildung 16 sind zwei Beispiele von Stichproben spezifischen Homozygotie Regionen auf dem Chromosom 8 dargestellt.

TABELLE 12: ROH INSELN, DIE IN MEHR ALS 50% DER TIERE ÜBERLAPPEN (ROH FREQ.) FÜR DIE UNGARISCHE LIPIZZANER STICHPROBE VON SZILVASVÁRAD UND DIE IN DEN INSELN ENTHALTENEN BEKANNTEN GENE.

Chr.	Beginn	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
4	58,107.774	58,605.189	497.4	0.522	*HOXA1, HOXA2, HOXA3, HOXA5, HOXA6, HOXA7, HOXA9, HOXA10, HOXA11, EVX1*
8	22,121.802	22,651.589	529.8	0.602	*TMEM120B, RHOF, SETD1B, HPD, PSMD9, WDR66, BCL7A, MLXIP, IL31, LRRC43, B3GNT4, DIABLO, CLIP1*
11	24,134.125	24,833.366	699.2	0.727	*COPZ2, CBX1,SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2*
22	45,518.067	46,096.341	578.3	0.522	*ZNF831, EDN3, PHACTR3*
23	27,658.254	28,189.490	531.2	0.522	*UHRF2, GLDC, KDM4C*
30	4,781.530	5,465.214	683.7	0.522	*KIF26B, SMYD3*

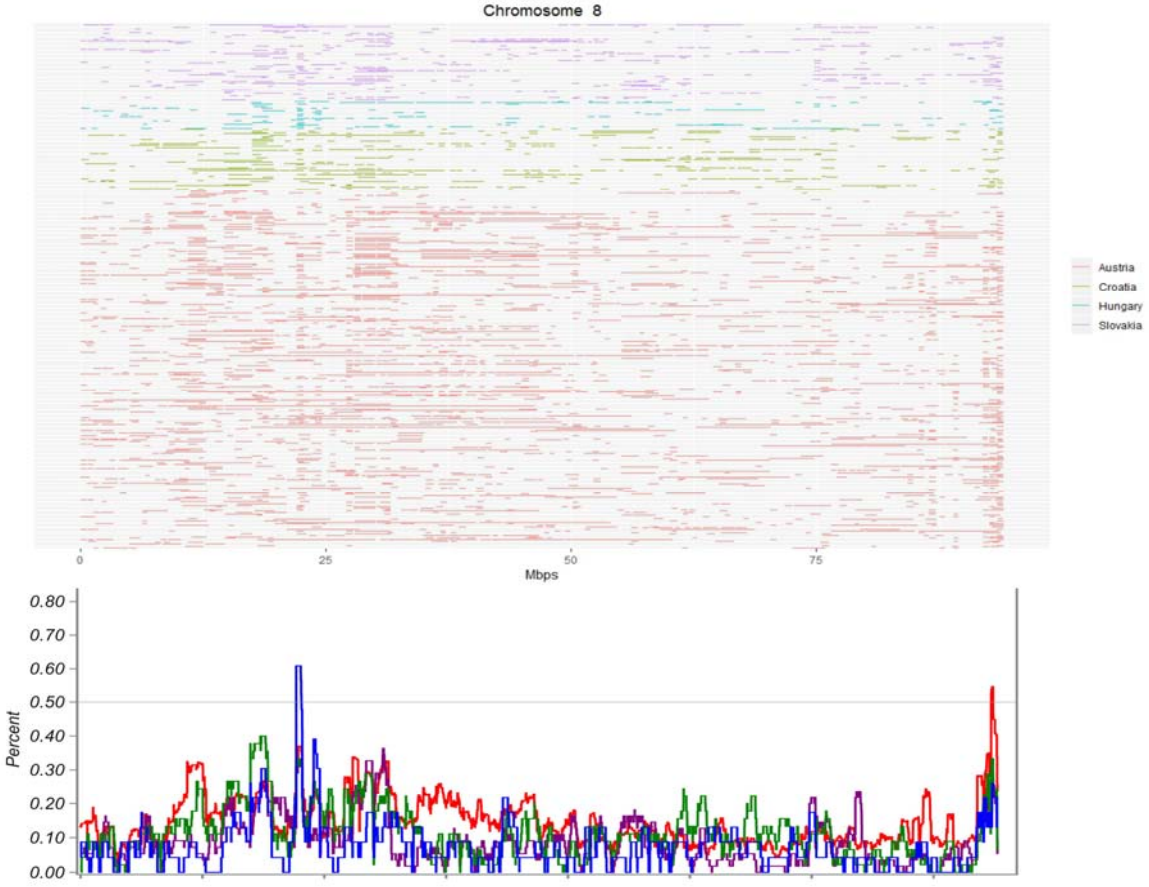


Abbildung 16: ROH Verteilung auf ECA8 in der gesamten Lipizzaner Stichprobe. Eine private ROH Insel ist hier für ungarische Lipizzaner ersichtlich (blaue Linie) und eine für die österreichischen Lipizzaner (rote Linie) (aus Grilz-Seger et al., 2019a).

8.4.5 GEN ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGS ANALYSE

Die Gen Ontologie und Anreicherungsanalyse unterstrich für die gesamte untersuchte Stichprobe die Bedeutung des Homeobox-B Clusters und die höchste signifikanten Werte ($p<0.001$) wurden für die Gen Ontologie (GO) Termini GO:0048704~embryologische Morphogenese des Skelettsystems und GO:0009952~anterior/posterior Struktur Ausprägung ermittelt (Tab.13). Weiter erreichte der GO Terminus GO:0043565~Sequence-specifische DNA Bindung einen signifikanten Level ($p<0.001$) in der

Gesamtstichprobe. Drei der zwanzig in homozygoten Regionen lokalisierten Gene waren in der OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) Datenbank gelistet *(DGKE* - 615008~Hämolytisches urämisches Syndrome; *HOXB1* - 614744~Facial Parese; *SPRY4* - 615266~Hypogonadotroper Hypogonadism), keines dieser Gene ist jedoch in der Datenbank für potentielle Erbfehler beim Pferd (OMIA, Online Mendelian Inheritance in Animals) angeführt.

TABELLE 13: GEN ONTOLOGIE (GO) TERMINI UND KEGG PFADE BASIEREND AUF DEN INNERHALB VON ROH INSELN LOKALISIERTEN GENEN FÜR DIE GESAMTE LIPIZZANER STICHPROBE

Term	p-Wert	Gene	Fold Enrichment	Bonferroni p-Wert
Biologische Prozesse				
GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis	<0.001	*HOXB3, HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	159.70	<0.001
GO:0009952~anterior/posterior pattern specification	<0.001	*HOXB3, HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	73.89	<0.001
GO:0021570~rhombomere 4 development	0.003	*HOXB1, HOXB2*	707.24	0.134
GO:0021612~facial nerve structural organization	0.011	*HOXB1, HOXB2*	176.81	0.438
Molekulare Funktionen				
GO:0043565~sequence-specific DNA binding	<0.001	*HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB6, HOXB13*	16.37	0.002
GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	0.007	*HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB6*	9.10	0.105

Die GO Analyse bestätigte die vorgenannten Termini auch für die österreichische Stichprobe und ergab zusätzlich fünf weitere Termini (GO:0021570~Rhombomer 4 Entwicklung, GO:0021612~ Entwicklung des Nervus facilis Nervs, GO:0006183~GTP Biosynthetischer Prozess, GO:0006950~Stressantwort und GO:0071353~zelluläre Antwort auf interleukin-4). Die Slowakische Stichprobe war gekennzeichnet durch drei Populationsspezifische GO Termini: GO:0048864~Stammzellenentwicklung, GO:0001525~Angiogenesis, GO:0006368~Elongation der Transkription vom RNA Polymerase II Promoter. Für die kroatische und ungarische Subpopulation ergab die GO Analyse 12 gemeinsame Termini und zusätzlich zwei spezifische für die Ungarischen Lipizzaner (GO:0006355~Regulation der Transkription, DNA-templated; GO:0001578~Mikrotubuli-Bündel Formation) und drei spezifische für die kroatische Stichprobe (GO:0007156~homophile Zelladhaesion via Plasmamembran Adhaesionmoleküle; GO:0050890~Kognition; GO:0001759~Organ Induktion). Alle vorgenannten 12 Termini basierten auf *HOXB*- and *HOXA*-Kluster. Die höchsten signifikanten Werte ($p<0.001$) wurden auch in diesen beiden Subpopulationen für die Termini GO:0009952 und GO:0048704 ermittelt.

8.5 DISKUSSION

Die Netzwerkgrafik, welche die Ergebnisse der Admixture und der NetView Analyse kombinierte, ergab, dass die einzelnen Gestütspopulationen genetischen Subpopulationen innerhalb des Lipizzanerzucht gleichzusetzen sind, wobei die größte genetische Distanz zwischen den österreichischen und ungarischen bzw. kroatischen Lipizzanern ermittelt wurde. Die slowakischen Lipizzaner klusterten zwischen die österreichischen und kroatischen Lipizzaner. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten vorangegangener

Studien (Achmann et al., 2014) überein. In der vorliegenden Studie wiesen die österreichischen und slowakischen Lipizzaner eine geringere genetische Distanz und einen höheren Verwandtschaftsgrad innerhalb der jeweiligen Gestütsherde auf als die ungarischen und kroatischen Lipizzaner. Der höhere Verwandtschaftsgrad der slowakischen Pferde ist auf die mit rund fünfzig Gestütsstuten relativ kleine Zuchtpopulation des slowakischen Staatsgestüts Topolčianky zurückzuführen.

Im Gestütsvergleich wies die österreichische Subpopulation die höchsten Werte in allen ROH Parametern auf, während in der ungarischen Stichprobe die niedrigsten Werte ermittelt wurden. Die genomische Inzucht ($F_{ROH)}$ lag auf einem ähnlichen Niveau wie sie Zechner et al. (2002) mittels Pedigreeanalyse ermittelt hatte. Grundsätzlich war damit F_{ROH} mit 0.13 beim Lipizzaner niedriger als aufgrund der langjährigen Gestütszucht erwartet und lag auf einem vergleichbaren Niveau wie beim österreichischen und slowenischen Haflinger (0.13 bzw. 0.12) und beim Bosnische Gebirgspferd (0.14) (Druml et al., 2018; Grilz-Seger et al., 2018). Höhere Werte wurden in einer vorangegangenen Studie (Druml et al., 2018) beim Shagya Arabers (F_{ROH} = 0.16) und beim Vollblutaraber (F_{ROH} = 0.18) ermittelt. Grundsätzlich wird angenommen, dass die Länge der Homozygotie Regionen mit dem „Alter" der Inzucht korrespondiert. Kürzlich stattgefundene Verwandschaftanpaarungen führen zu langen homozygoten Segmenten, wobei nach Browning und Browning (2010) und Thompson (2013) ROHs Längen von 16.6, 10.0 und 5.0 Mb auf gemeinsame Ahnen in der 3ten, 5ten und 10ten Generation zurückzuführen sind. Unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Generationsintervalls beim Lipizzaner von zehn Jahren können homozygote Segmente <2Mb auf die Gründungsphase der Lipizzanerzucht datiert werden. Die Werte für $F_{ROH>10Mb,}$ als Schätzung der Inzucht innerhalb der letzten fünf Generationen, tendierte in der slowakischen, kroatischen und ungarischen Stichprobe gegen null und lag beim österreichischen Lipizzaner bei rund 1.1%. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass es auch langfristig in kleinen, geschlossenen Zuchtpopulationen möglich ist, einer Inzuchtsteigerung entgegen zu wirken.

Die überlappenden Homozygotie Regionen bestätigten die Ergebnisse der Netzwerkanalyse und ergab ebenfalls eine vergleichsweise nähere genomische Verwandtschaft zwischen der ungarischen und kroatischen bzw. der österreichischen und der slowakischen Stichprobe. Die ungarischen Lipizzaner hatten spezifische ROH Inseln auf den Chromosomen ECA8, ECA14, ECA23 und ECA30 und die österreichischen Lipizzaner wiesen gehäuft homozygote Regionen auf den Chromosomen ECA3, ECA5, ECA8, ECA16 und ECA20 auf. Ausschließlich bei der österreichischen Stichprobe wurde am Chromosom 16 (Position: 37.87-38.82 Mb) eine 953.3kb lange ROH Insel identifiziert, die neben 29 weiteren Genen, die zwei Gene *ECATH-3* und *ECATH-2* beinhaltete. Diese beiden Gene kodieren antimikrobielle Peptide, die eine wichtige Rolle in der Immunantwort beim Pferd spielen (Scocchi et al., 1999; Skerlavaj et al., 2001). Weiter unterstrich die GO Analyse die Gene *UCN2* (urocortin 2, a member of the corticotropin-releasing hormone family) on ECA16 and *HSP90AB1* (Equus caballus heat shock protein 90 alpha family class B member 1) mit den Terminus GO:0006950 (response to stress). Vom Gen *HSP90AB1* wird angenommen, dass es eine Rolle im altersabhängigen Metabolismus der Chondrozyten beim Pferd spielt.

Der Lipizzaner spielte als Modelltier für die Erforschung der genetischen Ursache der Schimmelfärbung eine wichtige Rolle (Pielberg et al., 2008). Im Jahr 2008 wurde die genetische Grundlage für die Schimmelfarbe, eine sich dominant vererbende Mutation im *STX17* Gen anhand einer Lipizzaner Stichprobe entdeckt (Pielberg et al., 2008). Curik et al. (2013) konnten einen Effekt des Allel Status der *STX17* Mutation auf die zeitliche Dynamik des Ergrauens des Fellkleides und Vitiligo beim Lipizzaner feststellen. Der Genotyp am Grau-Locus ist besonders bei Pferderassen mit hoher Prävalenz für das Melanom bedeutsam, das bei reinerbigen Schimmeln verstärkt auftritt (Pielberg et al., 2008). Ebenfalls gehäuft tritt bei homozygoten Lipizzaner Schimmeln Vitiligo auf, eine mit dem Alter fortschreitende Depigmentierung der Haut, die vor allem im Kopf und Anal- und Geschlechtsbereich zu sehen ist. Die zugrundeliegende genetische Ursache konnte noch nicht identifiziert werden, es wird vermutet, dass es sich um einen Einzelgeneffekt handelt, der eventuell mit dem Grau-Gen gekoppelt ist. Die Häufigkeit von Melanomen liegt bei Lipizzanern über 15 Jahren bei 80% (Seltenhammer et al., 2003; Curik et al., 2013) Die meisten der Melanome sind gutartig und

metastasieren nicht (Seltenhammer et al., 2004). Pielberg et al. (2013) konnte nachweisen, dass die gelinkten Gene *STX17, NR4A3, ERP44* und *INVS* im Melanom Gewebe exprimiert werden, wobei ein Zusammenhang mit dem Allelstatus des *STX17* Gens insbesondere auf die Expression von *NR4A3* zu bestehen scheint. Der zugrundeliegende molekulare Prozess ist bislang nicht geklärt. In dieser Studie wurde eine überlappende Homozygotie Region auf dem Chromosom 14 identifizierte, in der die Gene *SPRY4* und *NDFI1* lokalisiert waren. Beide Gene sind Gegenstand der Melanom Forschung beim Menschen und stehen im Zusammenhang mit der Metastasierung von Melanomen und der Überlebensrate von Melanom Patienten (Tennis et al., 2010; Shaverdashvili et al., 2015; Peng et al., 2017). Als weiterer putativer Tumorsuppressor wurde das Gen *HSP90AB1* (Metri et al., 2017) in einer überlappenden Homozygotie Region identifiziert.

8.6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die in dieser Studie angewandte und verbesserte Netzwerkgrafik stellt eine Form der Visualisation dar, die auf eine leicht verständliche Weise fundamentale Maßzahlen zur genetischen Diversität, Autozygotie und genetischer Verwandtschaft sowohl auf Einzeltierniveau als auch auf Populationsebene veranschaulicht. Sie stellt damit ein wichtiges Werkzeug zur Informationsaufbereitung dar, dass in der Zuchtpraxis genutzt werden kann. Mit dieser Untersuchung liegt erstmals eine genomische Charakterisierung der österreichischen Lipizzaner Population und deren Beziehungen zu weiteren europäischen Lipizzaner Populationen vor.

HAFLINGER

8.7 EINLEITUNG

Beim Haflinger wurden bislang anhand von SNP-Daten eine genomweite Assoziationsstudie und zwei rassenübergreifende Studien zur Populationsstruktur publiziert (Bellone et al., 2017; Druml et al., 2018; Grilz-Seger et al., 2018). Der Haflinger ist die letzte und damit jüngste der im Rahmen der österreichisch-ungarischen Monarchie entstandenen Pferderassen. Im Jahr 1867 wurde im Zuge der Heeresreform vom k.k. Ackerbauministerium die Etablierung einer Kleinpferderasse, die sowohl als Trag- und Arbeitstier als auch als Reitpferd verwendbar sein sollte, beschlossen. Zu diesem Zweck wurde ein Zuchtprogramm, basierend auf Südtiroler Landesstuten, ergänzt mit importierten galizischen/bukowinischen Landesstuten, Norikern aus der Landeszucht und Staatshengsten des k.k. Staatsgestüts Radautz der Rassen Shagya-Araber, Vollblutaraber und Gidran, etabliert und umgesetzt (Südtiroler Haflingerzuchtverband, 1995). Durch gezielte Verwandtschaftspaarungen innerhalb der ersten Generationen wurde rasch eine Konsolidierung in Größe, Typ und Farbe erreicht. Mit Ende des Ersten Weltkrieges wurde das Hauptzuchtland Südtirol von Österreich abgetrennt, das damit über keine nennenswerte Stutengrundlage verfügte. Nach Kreuzungsversuchen mit Kriegsrücklassstuten im Kleinpferdetyp wurde die österreichische Haflingerpopulation im Wesentlichen auf importierten Original Haflingerstuten (OHast.) aus Südtirol aufgebaut und nach dem Zweiten Weltkrieg mit dem Fohlenhof Ebbs eine Nukleus Herde und ein striktes an den Anforderungen des Freizeitmarktes orientiertes umfassendes Zuchtprogramm etabliert, das tonangebend für die österreichische Haflingerpferdezucht werden sollte. Ab den 1980er Jahren setzte unter der Vorreiterrolle des Tiroler Zuchtverbandes unter dem Motto der „Modernisierung“ ein rigoroser Umzüchtungsprozess ein. Bei diesem Prozess kam es zu gravierenden phänotypischen Änderungen: Erhöhung der Widerristhöhe, Abnahme des Kalibers, Selektion auf weißes Langhaar, stärkere Betonung des Gangvermögens im Trab. Diese Typänderung wurde durch Massenselektion auf einzelne Nordtiroler Elitehengste bewerkstelligt, und führte gleichzeitig zu einer Abnahme der genetischen Diversität und einer Verkleinerung des Genpools (Druml et al., 2016). In Südtirol (bzw. Italien) wurde dieser Umzüchtungsprozess nicht so rigoros durchgeführt und der ursprüngliche Haflingertyp und Genpool blieb hier somit länger erhalten.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Populationsstrukturen und die genetische Differenzierung von drei Haflinger Subpopulationen mittels SNP-Analysen zu untersuchen und die Auswirkung des Umzüchtungsprozesses anhand von genomweiten überlappenden Homozygotie Regionen (runs of homozygosity, ROH) zu analysieren. Die Stichproben setzten sich aus österreichischen, slowenischen und italienischen Haflingern zusammen, wobei letztere aus Zuchttieren bestand, die den Südtiroler Genpool vor dem Umzüchtungsprozess repräsentieren und somit selektiv ausgewählt wurde und nicht den aktuellen Südtiroler Haflingerbestand repräsentiert. Die slowenische Stichprobe ist repräsentativ für die slowenische Haflingerpopulation, die in den 1960ern auf Basis von importierten österreichischen Zuchttieren aufgebaut wurde. Die österreichische Stichprobe beinhaltete aktive Zuchttiere der ARGE Haflinger (Arbeitsgemeinschaft österreichischer Haflingerzüchter) im derzeit gewünschten modernen Typ.

8.7.1 MATERIAL UND METHODEN

Die genomweiten SNP Genotypen der drei Haflinger Stichproben (Südtiroler Haflinger Pferdezuchtverband/Italien, ARGE Haflinger/Österreich, Slowenischer Haflingerzuchtverband) lagen aus vorangegangenen Studien vor (Druml et al., 2018; Grilz-Seger et al., 2018). In dieser Arbeit wurden die drei Haflingersubpopulationen erstmals gemeinsam einer vergleichenden Analyse unterzogen. Die Südtiroler Stichprobe bestand aus 32 Stuten, die dem ursprünglichen Südtiroler Zuchtziel entsprachen und keine jüngere Verwandtschaft zur österreichischen Haflingerzucht aufwiesen. Die slowenische Haflingerstichprobe, basierend auf 18 Zuchttieren, stellt eine repräsentative Stichprobe der aktuellen

slowenischen Haflingerzuchtpopulation dar, die sich aus in den 1960ern Jahren importierten österreichischen Zuchttieren entwickelt hat, wobei es seit 2005 zu einer Introgression von einzelnen Hengsten mit Nordtiroler Genetik gekommen ist. Die österreichische Stichprobe, bestehend aus 78 Pferden, ist ein repräsentativer Querschnitt der Zuchtpopulation der ARGE Haflinger, die sich zu einem großen Anteil aus Haflingern mit Nordtiroler Abstammung und einigen Tieren mit alter bundesländerspezifischer Genetik zusammensetzt.

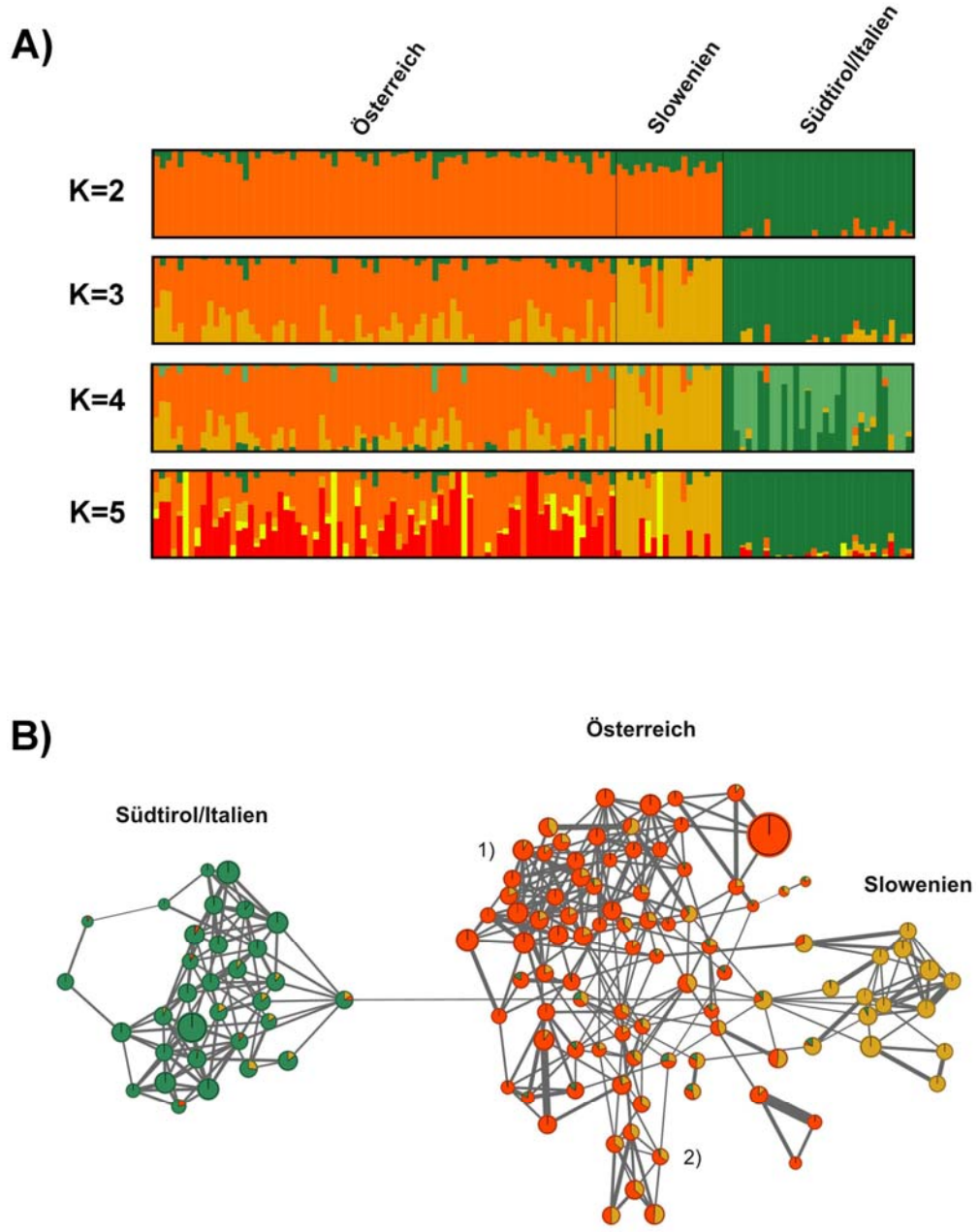


Abbildung 17: A) Genetische Clusterzuordung mittels Admixture Analyse für die drei Stichproben Südtiroler (Italienischer), Slowenischer und Österreichischer Haflinger in den Simulationsszenarios K = 2-5. B) Netzwerkdarstellung der gesamten Haflingerstichprobe. Jeder Kreis entspricht einem Individuum, die Schattierung dem genetischen Cluster und die Größe entspricht dem Inzuchtgrad (F_{ROH}); die Länge der Verbindungslinien bezeichnet die genetische Distanz und die Breite der Linien den Verwandtschaftsgrad (aus Grilz-Seger et al., 2019c).

Zu Genotypisierung, Qualitätskontrolle, statistische Methoden: Admixture Analyse, Netzwerkanalyse, ROH und GO Analyse, vgl. 8.3. Zusätzlich wurden zur Bestimmung der Genotyp Frequenzen einzelner mit

Körpergröße assoziierten SNPs drei SNPs nach Makvandi-Nejad et al. (2012) extrahiert: AX-103666681, AX-103185455 und AX-104094124, sowie drei vorwiegend mit Widerristhöhe assoziierte SNPs nach Signer-Hasler (2012): AX-103033648, AX-104488257 und AX-104389593.

8.8 ERGEBNISSE

8.8.1 ADMIXTURE ANALYSE UND POPULATIONSSTRUKTUR

Die mit dem Programm Admixture durchgeführte Cluster Analyse trennte die drei Stichproben bei K=2 in zwei genetische Einheiten und separierte somit die Südtiroler Haflinger von den restlichen Tieren. Im nächsten Simulationsschritt (K=3) differenzierte sich die slowenischen Pferde von der österreichischen Stichprobe.

In den nachfolgenden beiden Szenarien waren in der italienischen (K=4) und der österreichischen (K=5) Stichprobe weitere genetische Substrukturen erkennbar (Abb.17A). In Abbildung 17B wird die Populationsstruktur anhand einer Netzwerkanalyse dargestellt, die im Wesentlichen die Ergebnisse der Admixture Analyse widerspiegelt. Die Stichproben bilden hier drei genetisch und verwandtschaftlich differenzierte Einheiten. Die Südtiroler Haflinger weisen die höchste genetische Distanz auf und sind lediglich über einen direkten Verwandtschaftspfad mit der österreichischen Population verbunden. Der slowenische Haflinger (in Abb. 17B rechts) hat eine relativ enge Beziehung zu den österreichischen Haflingern und ist entsprechend vernetzt. Die österreichische Stichprobe zeigt zwei unterschiedliche Gruppierungen im Netzwerk, oben: 1) eine genetisch einheitliche, enger verwandte Gruppe, bei der ein Einzeltier durch eine hohe Autozygotie gekennzeichnet ist und unten: 2) eine Gruppe, die durch eine höhere Diversität und höhere genetische Distanzen charakterisiert ist.

Die genetische Distanz, ausgedrückt mittels F_{ST} Werten, war mit 7.3 bzw. 7.1 Prozent zwischen den Südtiroler Haflingern und den slowenischen bzw. österreichischen Haflingern am höchsten. Die letzteren beiden Stichproben wiesen mit einem F_{ST} Wert von 3.7% eine deutlich geringere genetische Distanz auf.

8.8.2 ROH PARAMETER

Bei den ROH Parametern S_{ROH}, L_{ROH} und F_{ROH} wies der Südtiroler Haflinger die höchsten Durchschnittswerte auf (Tab. 14). Der mittlere Inzuchtkoeffizient F_{ROH} reichte von 0.12 (+- 0.05) beim slowenischen Haflinger bis zu 0.14 (+- 0.05) beim Südtiroler Haflinger.

TABELLE 14: MITTELWERTE, STANDARDABWEICHUNG (SD), MINIMUM- UND MAXIMUMWERTE FÜR DIE VARIABLEN S_{ROH} (IN MB), N_{ROH}, L_{ROH} (IN MB) UND F_{ROH}

Stichprobe	n	Mittelwert	SD	Min.	Max.
Südtirol					
S_{ROH}	32	304.56	108.29	40.10	471.07
N_{ROH}		166.03	44.99	46.00	303.00
L_{ROH}		1.82	0.58	0.72	2.81
F_{ROH}		0.14	0.05	0.02	0.21
Slowenien					
S_{ROH}	18	270.36	113.15	1.59	447.73
N_{ROH}		155.56	57.69	3.00	213.00
L_{ROH}		1.61	0.45	0.53	2.28
F_{ROH}		0.12	0.05	0.001	0.20
Österreich					
S_{ROH}	78	279.56	88.74	69.17	512.91

Stichprobe	n	Mittelwert	SD	Min.	Max.
N_{ROH}		185.26	33.71	91.00	264.00
L_{ROH}		1.50	0.37	0.76	2.64
F_{ROH}		0.13	0.04	0.03	0.23

Auf individueller Ebene erreichten Einzeltiere der österreichischen Haflingerstichprobe die höchsten Autozygotie- und genomischen Inzuchtwerte (S_{ROH} = 512.91 Mb; F_{ROH} = 0.23). Gleichzeitig konnten in allen Stichproben Einzeltiere mit sehr geringen F_{ROH} Werten unter 0.03 beobachtet werden.

8.8.3 ROH INSELN

Die Anzahl der überlappenden Homozygotie Regionen (ROH Inseln) betrug beim österreichischen Haflinger fünf, beim Südtiroler Haflinger acht und beim slowenischen Haflinger elf (Abb.18.). Die größte Gesamtlänge der homozygoten Regionen, die bei mehr als 50% der Individuen der jeweiligen Subpopulation vorhanden war, wies der slowenische Haflinger mit 9.1 Mb auf, gefolgt vom Südtiroler Haflinger mit 5.9 Mb und dem österreichischen Haflinger mit 4.9 Mb. In allen drei Stichproben war das Chromosom (ECA) 3 durch eine Akkumulation von ROH Inseln charakterisiert (Abb.18), wobei die Gesamtlänge der ROH Inseln am Chromosom 3 beim slowenischen Haflinger mit 3.1 Mb am längsten war. Damit lagen in dieser Stichprobe 61.3% der überlappenden Homozygotie Regionen auf diesem Chromosom.

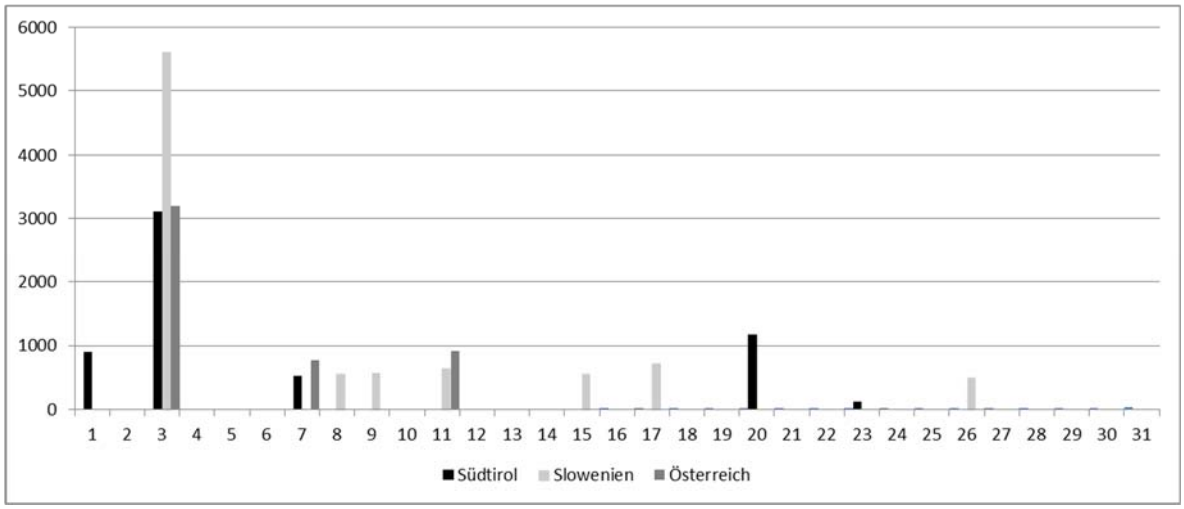


Abbildung 18: Verteilung der Summe an ROH Inseln (in Mb) über die einzelnen Chromosomen für die Südtiroler, die slowenische und die österreichische Haflingerstichprobe (aus Grilz-Seger et al., 2019c).

Alle drei Subpopulationen hatten eine ROH Insel um den *MC1R* (Melanocortin Rezeptor 1) Locus auf Chromosom 3, wobei eine Punktmutation im *MC1R* Gen für die Fuchsfarbe verantwortlich ist (Marklund et al., 1996). Diese ROH Insel, die neben dem *MC1R* Gen maximal 41 weitere Gene beinhaltete, war beim Südtiroler Haflinger mit 2.9 Mb am längsten. (Abb.19). Wie in Abbildung 19 ersichtlich, wiesen die drei Subpopulationen in dieser Region ein unterschiedliches Autozygotiemuster auf.

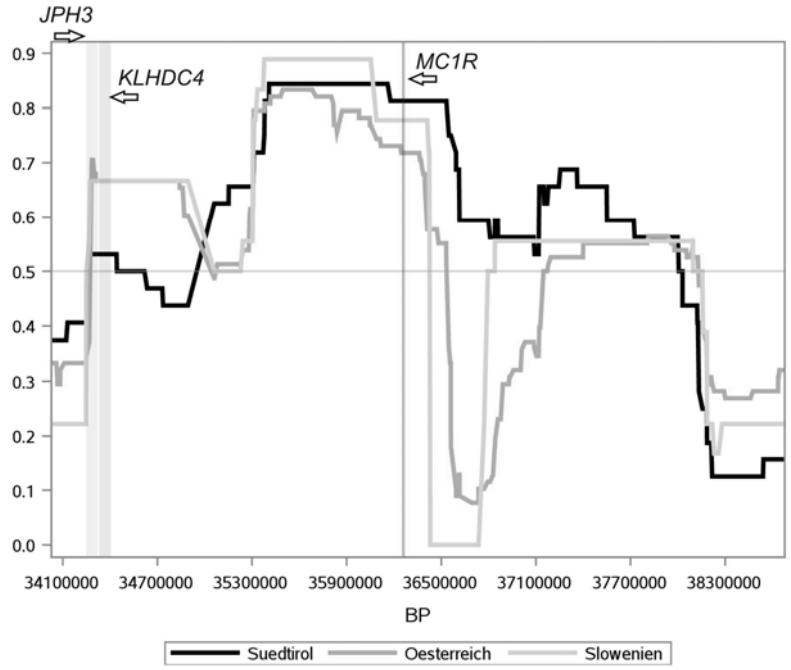


Abbildung 19: Darstellung der ROH Inseln (% der Tiere, die an der jeweiligen SNP Position ein ROH teilen) für die Südtiroler, slowenischen und österreichischen Haflinger auf Chromosom 3 (aus Grilz-Seger et al., 2019c).

Alle drei Subpopulationen hatten eine Homozygotie Region, die zumindest die Gene *JPH3* (junctophilin-3**)** und *KLHDC4* (kelch domain containing 4) umfasste. Nach dem *MC1R* Locus fiel die Homozygotie zwischen den Genen *DBNDD1* (dysbindin domain containing 1) und *BDH2* (3-hydroxybutyrate dehydrogenase 2) beim slowenischen und beim österreichischen Haflinger steil ab. Außer den ROH Inseln am Chromosom 3 konnte nur eine weitere Stichproben übergreifende Autozygotieregion am Chromosom 7 beim österreichischen und Südtiroler Haflinger identifiziert werden (Tab.15).

TABELLE 15: ROH INSELN UND DIE DARIN LOKALISIERTEN GENE, DIE BEI ZUMINDEST ZWEI DER DREI HAFLINGER SUBPOPULATIONEN ANZUTREFFEN WAREN

Chr.	Anfang	Ende	Gemeinsame ROH Inseln	Bekannte Gene
3	34,280.529	34,732.351	Südtiroler, slowenischer und österreichischer Haflinger	*JPH3, KLHDC4*
3	35,305.705	36,428.488	Südtiroler, slowenischer und österreichischer Haflinger	*CDT1, GALNS, APRT, TRAPPC2L, PABPN1L, CBFA2T3, ACSF3, CDH15, RPL13, SPG7, DPEP1, CPNE7, CDK10, SPATA2L, ZNF276, VPS9D1, FANCA, SPIRE2, TCF25, MC1R, DEF8, GAS8, DBNDD1*
3	37,179.496	38,003.628	Südtiroler, slowenischer und österreichischer Haflinger	*MANBA, NFKB1, SLC39A8, BANK1*
7	48,318.909	48,849.611	Österreichischer und Südtiroler Haflinger	*ACP5, ELOF1, CNN1, ECSIT, ZNF653*

Diese 503.7 lange Homozygotie Region trat bei 53% der Tiere der Südtiroler Stichprobe auf und umfasste neben mehreren noch nicht identifizierten Genen die Gene *ACP5*, *CNN1*, *ELOF1*, *ESCIT*, *ZNF653* (Abb.20). Beim österreichischen Haflinger umschloss die ROH Insel zusätzlich die Gene *PRKCSH*, *RGL3*, *EPOR, SWSAP1*. Die Pferde der slowenischen Stichprobe hatten in dieser Region keine ROH Insel.

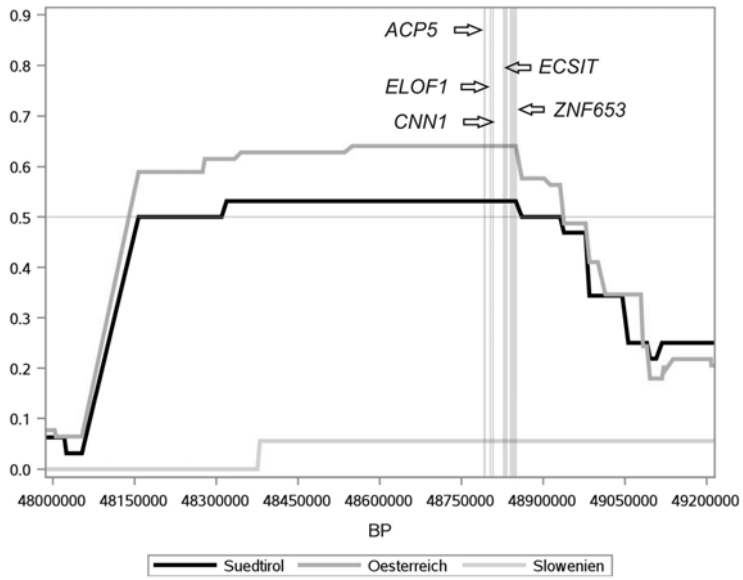


Abbildung 20: Darstellung der ROH Inseln (% der Tiere die an der jeweiligen SNP Position ein ROH teilen) für die Südtiroler, slowenischen und österreichischen Haflinger am Chromosom 7 (aus Grilz-Seger et al., 2019c).

Beim Südtiroler Haflinger lagen die fünf subpopulationsspezifischen ROH Inseln auf den Chromosomen 1 (2 Inseln), 20 (2 Inseln) und 23 und waren mit einer durchschnittlichen Länge von <1Mb relativ kurz. Auf den Chromosomen 1 und 23 umfasste die Homozygotie Region jeweils ein einzelnes Gen. Das Gen *DOCK8* (dedicator of cytokinesis) auf Chromosom 23 lag bei 53% der Tiere in einer 118.6 kb langen ROH Insel. Auf Chromosom 1 (Position 113.4-113.6 Mb) hatten 56% der Tiere eine homozygote Region, die direkt mit dem Gen *OCA2* (melanocyte-specific transporter protein) überlappte (Abb.21).

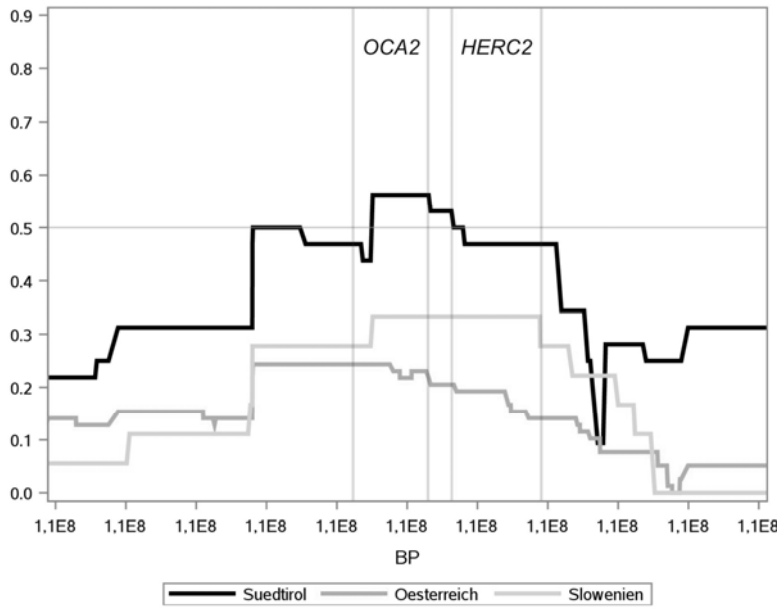


Abbildung 21: Darstellung der ROH Inseln (% der Tiere die an der jeweiligen SNP Position ein ROH teilen) für die Südtiroler, slowenischen und österreichischen Haflinger am Chromosom 1 (aus Grilz-Seger et al., 2019c).

Vom Gen *OCA2/HERC2*, das mit Aufhellungen der Iris, des Haares und der Haut beim Menschen und dem Schwein assoziiert wurde (Donnelly et al., 2012; Fernandez et al., 2006), wird vermutet, dass es bei der Schwalbenbauchfärbung (Pangarefärbung) eine Rolle spielen könnte (Grilz-Seger et al., 2019d). Wie in Abbildung 5 ersichtlich, wiesen auch 33 % der Slowenischen Haflinger ein homozygotes Segment auf, das

sich über *OCA2* und das darauffolgende *HERC2* erstreckte. Beim österreichischen Haflinger konnte dieser Homozygotie Block nicht nachgewiesen werden.

8.8.4 GEN ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGSANALYSE

Die Gen Ontologie (GO) und Anreicherungsanalyse der Genliste des Südtiroler Haflinger, die aus 76 in ROH Inseln lokalisierten Genen bestand, ergab einen signifikanten ($p<0.05$), in biologische Prozesse (BP) involvierten GO Terminus: Melanin Biosynthese Prozess, der auf den Genen *MC1R* und *OCA2* beruhte. Im Zusammenhang mit molekularen Funktionen (MF) ergab die GO Analyse den Terminus GO:0015299 (solute:proton antiporter activity) basierend auf den beiden Genen *SLC9B1* (solute carrier family 9 member B1) und *SLC9B2* (solute carrier family 9 member B2), die auch bei der slowenischen Stichprobe überrepräsentiert waren. Neun weitere Gene waren in Bezug auf die Zellkomponente Mitochondrium signifikant ($p<0.008$) angereichert.

Die GO Analyse ergab für die 87 Gene umfassende Genliste des slowenischen Haflingers einen weiteren MF Terminus (GO:0070573~Metallodipeptidase Aktivität), basierend auf den Genen *CNDP1* (carnosine dipeptidase 1) und *DPEP1* (dipeptidase 1)). Sowohl bei der Südtiroler als auch bei der slowenischen Genliste ergab die Analyse den KEGG Pfad Lysosom (ecb04142), basierend auf den Genen *GALNS* (galactosamine (N-acetyl) -6-sulfatase), *ACP5* (acid phosphatase 5), *CTSH* (cathepsin H) und *MANBA* (mannosidase beta). Beim slowenischen Haflinger wurde zusätzlich der KEGG Pfad Influenza A (ecb05164) herausgespielt.

Von den 60 in ROH Inseln lokalisierten Genen des österreichischen Haflingers unterstrich die GO Analyse lediglich einen Terminus (Zellantwort auf Interleukin-6 (GO:0071354)), der auf der Überrepräsentation der Gene *PHB* (prohibitin) und *NFKB1* (nuclear factor kappa B subunit 1) beruhte.

8.8.5 SNP GENOTYPENEXTRAKTION

Ein zentrales Kriterium des Umzüchtungsprozesses beim Haflinger war die Erhöhung der Widerristhöhe und des Rahmens, und es wurde bei diesen Merkmalen innerhalb der letzten 40 Jahre ein beachtlicher Zuchtfortschritt erzielt (Abb.22).

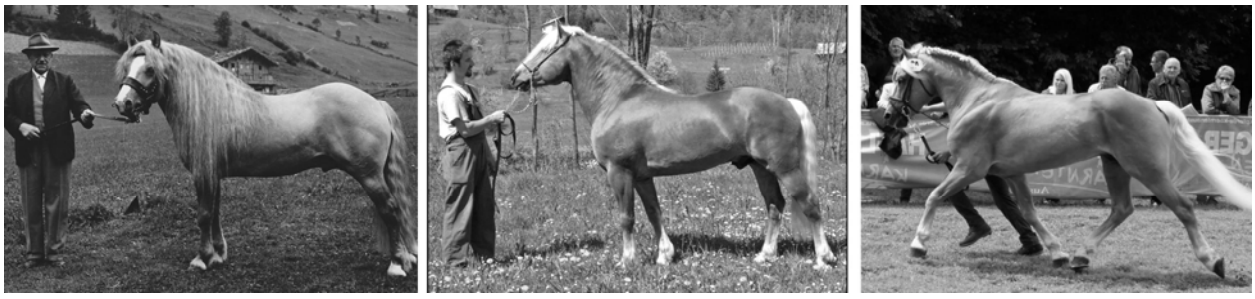


Abbildung 22: Typwandel und Ergebnis des Umzüchtungsprozesses beim Haflinger: links der Südtiroler Hengst Hafling, geb. 1952, in der Mitte der slowenische Haflingerhengst Smog, geb. 1998 und rechts der österreichischen Haflingerhengst Aragon, geb. 2000 (Fotos Archiv Brabenetz/Mesarić/Kärntner Pferdezuchtverband) (aus Grilz-Seger et al., 2019c).

Aus diesem Grund wurden im ersten Schritt die Genotypen von drei SNPs extrahiert, die von Makvandi-Nejad et al. (2012) mit der Variabilität von 33 Körpermaßen beim Pferd assoziiert worden waren (Tab. 3). Der SNP AX-103666681 nahe dem Gen *LCORL/NCAPG* (ligand dependent nuclear receptor corepressor like/ non-SMC condensin I complex subunit G) auf Chromosom 3 war in allen drei Stichproben nahezu auf das mit kleiner Körpergröße assoziierte Allel *T* fixiert. Bei dem SNP AX-103185455 (*ZFAT* (1)) nahe dem Gen *ZFAT* (zinc finger and AT-hook domain containing) auf Chromosom 9 zeigten die drei Stichproben ein spezifisches Muster (Tab.16).

TABELLE 16: SNP GENOTYPEN FÜR DIE LOCI *LCORL/NCAPG*, *ZFAT* UND *LASP1* IN DEN DREI HAFLINGER SUBPOPULATIONEN VON SÜDTIROL, ÖSTERREICH UND SLOWENIEN.

Südtiroler Haflinger n=32					
Chr.	SNP	Gen	Position	Genotypen Frequenz	Major Allel
3	AX-103666681	*LCORL/NCAPG*	105,547.002	100%T/T 0% C/T 0% C/C	T (klein)
9	AX-103185455	*ZFAT (1)*	75,550.059	16% C/C 53% T/C 31% T/T	T (groß)
9	AX-103033648	*ZFAT (2)*	74,795.013	66% C/C 31% C/T 3% T/T	C (niedrig)
9	AX-104488257	*ZFAT (3)*	74,795.089	66% C/C 31% C/A 3% A/A	C (niedrig)
9	AX-104389593	*ZFAT (4)*	74,798.143	56% G/G 38% A/G 4% A/A	G (niedrig)
11	AX-104097126	*LASP1*	23,259.732	19% G/G 44% A/G 38% A/A	A (groß)
Slowenischer Haflinger n=18					
Chr.	SNP		Position	Genotypen Frequenz	Major Allel
3	AX-103666681	*LCORL/NCAPG*	105,547.002	100%T/T 0% C/T 0% C/C	T (klein)
9	AX-103185455	*ZFAT*	75,550.059	17% C/C 67% T/C 17% T/T	C (klein) and T (groß)
9	AX-103033648	*ZFAT (2)*	74,795.013	39% C/C 56% C/T 5% T/T	C (niedrig)
9	AX-104488257	*ZFAT (3)*	74,795.089	39% C/C 56% C/A 5% A/A	C (niedrig)
9	AX-104389593	*ZFAT (4)*	74,798.143	39% G/G 56% G/A 5% A/A	G (niedrig)
11	AX-104097126	*LASP1*	23,259.732	13% G/G 56% A/G 31% A/A	A (groß)
Österreichischer Haflinger n=78					
Chr.	SNP		Position	Genotypen Frequenz	Major Allel
3	AX-103666681	*LCORL/NCAPG*	105,547.002	96%T/T 4% C/T 0% C/C	T (klein)
9	AX-103185455	*ZFAT*	75,550.059	39% C/C 45% T/C 17% T/T	C (klein)
9	AX-103033648	*ZFAT (2)*	74,795.013	21% C/C 45% C/T 35% T/T	T (hoch)
9	AX-104488257	*ZFAT (3)*	74,795.089	21% C/C 45% C/A 35% A/A	A (hoch)
9	AX-104389593	*ZFAT (4)*	74,798.143	21% G/G 45% G/A 35% A/A	A (hoch)
11	AX-104097126	*LASP1*	23,259.732	8% G/G 28% G/A 64% A/A	A (groß)

8.9 DISKUSSION

Alle in dieser Studie untersuchten Haflinger gehen auf die Ausgangspopulation des Ursprungszuchtlandes Südtirol zurück. Sowohl die Netzwerkanalyse als auch die Admixture und F_{ST} Analyse ergaben eine eindeutige Differenzierung der einzelnen nationalen Subpopulationen, wobei die genetische Distanz der Südtiroler Haflingerstichprobe, die sich aus Tieren des originalen Südtiroler Genpools vor der Umzüchtungswelle zusammensetzte, zu den anderen beiden Subpopulationen (Österreich/Slowenien) am größten war und einen paarweisen F_{ST} Wert erreichte, der in einem Bereich liegt, welcher von Petersen et al. (2013a) z.B. zwischen Hannoveranern und Andalusiern beobachtet wurde. Diese hohe genetische Distanz des Südtiroler Haflingers ist umso beachtlicher, wenn man berücksichtigt, dass bis in die 1970er Jahre ein permanenter Genfluss zwischen der österreichischen und Südtiroler Population gegeben war. Neben der Driftwirkung in beiden Populationen kann vor allem die starke formale Selektion, die ab den 1980er Jahren erfolgte Änderung des Zuchtziels und die Massenselektion auf einzelne Zuchttiere verbunden mit schnellen Generationsintervallen als ausschlaggebend für dieses Ergebnis angeführt werden. Die österreichische Stichprobe setzt sich, wie anhand der Netzwerkgrafik deutlich sichtbar, zum größten Teil aus genetisch sehr homogen, eng verwandten Tieren und aus einer kleineren Gruppe von Haflingern, die eine größere Diversität aufweisen, zusammen. Die slowenische Haflingerstichprobe, die sich aus Importen von österreichischen Haflingern seit den 1960er Jahre entwickelt hat, stellt eine Tochterpopulation dar und ist, obwohl genetisch eigenständig, stärker mit der österreichischen Stichprobe vernetzt.

Diese Ergebnisse der genomischen Analyse sind in Übereinstimmung mit den Resultaten einer vorangegangenen Pedigreestudie der österreichischen Haflingerzucht, die auf unterschiedlich weit in die Vergangenheit zurückreichende Referenzpopulationen (1978-1985, 2008-2015) beruhte und in der eine Abnahme der effektiven Anzahl an Gründertieren von 43 auf 31, ein Rückgang der effektiven Anzahl an Ahnen von 18 auf 12 und ein gleichzeitiger Anstieg der mittleren Inzucht von 6,3% auf 11,9% berechnet wurden (Druml et al., 2016). Die hier ermittelte genomische Inzucht von 12,5% sowie die Maximal- und Minimalwerte waren in einem sehr ähnlichen Bereich. Die bei einigen Einzeltieren gefundene sehr niedrige Inzucht (kleine Kreise in Netzwerkdarstellung) lag auch bei Druml et al. (2016) vor und ist auf die Anpaarung von Tieren aus den unterschiedlichen Genpools zurückzuführen. So können bei der Kombination von österreichischen Tieren mit Südtiroler Tieren die gemeinsamen Ahnen erst ab der 7ten Generation identifiziert werden.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Subpopulationen konnten auch anhand der ROH Inseln bestätigt werden. Grundsätzlich sind längere Homozygotie Regionen, die auf abstammungsgleiche Allele (identical by descent; IBD) zurückzuführen sind, zufällig am Genom verteilt. Im Gegensatz dazu entstehen überlappende Homozygotie Regionen (ROH Inseln), die von der Mehrheit der Individuen einer Population geteilt werden, in genomischen Regionen rund um unter Selektion stehenden Einzelgenen oder Gengruppen, oder in Bereichen mit geringer Rekombinationsrate (Pemberton et al., 2012). Der Großteil der insgesamt identifizierten ROH Inseln (15 von 19) war populationsspezifisch. Ein ähnliches Ergebnis wurde für Lipizzaner aus fünf verschiedenen Staatsgestüten ermittelt, bei dem sich selbst geringfügige Unterschiede im Genpool und im Zuchtziel in einem divergenten ROH Muster niederschlugen (Grilz-Seger et al., 2019a).

Die Selektion auf Größe stellte ein zentrales Kriterium des Umzüchtungsprozesses beim Haflinger dar. Die Genotypen jener SNPs, die nach Makvandi-Nejad et al., (2012) 83% der Varianz der Körpermaße erklären, wiesen den Haflinger dennoch als Kleinpferderasse aus, indem 96% (Österreich) - 100% (Südtirol) der Pferde am höchst assoziierten SNP in der Nähe des *LCORL/NCAPG* Gens homozygot für das „Klein-Allel“ waren. Dass *LCORL/NCAPG* hauptsächlich mit Widerristhöhe in Zusammenhang steht, konnte in einer Studie von Signer-Hasler et al. (2012) gezeigt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden Grilz-Seger et al. (2018 und 2019b) größtenteils homozygote Genotypen für das „Klein-Allel“ bei Pferderassen mit geringer Widerristhöhe (1.10 bis 1.45 m) (Bosnisches Gebirgspferden, Exmoor Pony und Posavina Pferd), während der Noriker (Widerristhöhe> 1.55m) zu 93.1% homozygot für das „Groß-Allel“ war. Eine vergleichbare Gewichtung zwischen Kaltblut- und Kleinpferderassen wurde auch von Makvandi-Nejad et al. (2012) und Petersen et al. (2013b) nachgewiesen. Eine mögliche Assoziation von *LASP1* mit Kalibermerkmalen (Grilz-Seger et al., 2018, 2019b) korrespondiert mit dem Überwiegen des „Groß-Allels“ auf dem *LASP1* Locus beim Südtiroler und Slowenischen Haflinger, die höhere Kaliber Indizes als die österreichischen Haflinger aufweisen. Die Genotypen der drei mit Widerristhöhe, Krupp- und Rückenlänge assoziierten SNPs (*ZFAT* (2), (3), (4)) nach Signer-Hasler et al. (2012) zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Subpopulationen. Während in der Südtiroler und der Slowenischen Haflingerstichproben die „Klein-Allele“ vorherrschten, zeigte der österreichische Haflinger eine eindeutige Verschiebung in die Richtung „Groß-Allele“. Zusammenfassend ergaben die SNP Muster, dass bei den Genen *ZFAT*, *LASP1* noch genotypische Varianz vorhanden ist und einen weiteren Zuchtfortschritt in Richtung Größe und Rahmen erwarten lässt, wobei gleichzeitig durch die Fixierung am *LCORL/NCAPG* Locus der Selektion Grenzen gesetzt sind.

8.10 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren den deutlichen Einfluss des Umzüchtungsprozesses auf die genomische Architektur des Haflingers, der durch die Drift der einzelnen Subpopulationen und einem hohen Autozygotiewert gekennzeichnet ist. In Hinblick auf die genetische Diversität und die Erhaltung der

rassetypischen Eigenschaften wäre eine Integration der nur mehr in kleiner Anzahl vorkommenden nationalen Bestände mit divergentem Genpool in die internationale Haflingerzucht von großer Bedeutung.

NORIKER

8.11 EINLEITUNG

Die Farbzucht nimmt in der Norikerpferdezucht einen zentralen Stellenwert ein und es haben sich langfristig spezielle züchterische Methoden entwickelt, um die präferierten Farbschläge gezielt zu züchten und zu erhalten. Für die Fuchszucht hat sich langfristig eine assortative Paarungsstrategie herauskristallisiert, welche Homozygotie Regionen am *MC1R* Locus auf ECA3 (Marklund et al., 1996). forciert. Die Tigerung beim Pferd wird laut gegenwärtigem Wissensstand durch zwei Loci genetisch determiniert: den sogenannten *LP* Komplex (ECA1:g.108 297.929–108 297.930ins1378) (Bellone et al., 2013) und den Modifikator *PATN1* (SNP ECA3:g.23 658.447T>G in der 3′ Region des *RFWD3*) (Holl et al., 2016), wobei der klassisch gezeichnete Volltiger heterozygot am LP Locus ist und gleichzeitig mindestens eine Kopie des dominanten *PATN1* Allels aufweisen muss (Bellone et al. 2013; Holl et al. 2016; ; Grilz-Seger et al., 2016; Druml et al. 2017a). Getigerte Pferde mit unerwünschter Tigerzeichnung wie beispielsweise Weißgeborene Tiger (*LP/LP PATN1/–*) oder Lendentiger (*LP/lp patn1/patn1*) werden generell nicht zur Weiterzucht verwendet. Dieses spezielle Selektionsschema ist für die hohe Prävalenz des Genotyps *LP/lp PATN1/–* (bis zu 96.9%) in der Noriker Tigerzucht verantwortlich (Grilz-Seger et al., 2017). Innerhalb der Zucht des bleibenden Schimmels wird die Mohrenkopfvariante (blue roan) von den Züchtern stark präferiert. Der Anteil an Mohrenköpfen nimmt somit bei den Deckhengsten 100% und bei den Zuchtstuten 95% ein, und es wird in der praktischen Zuchtarbeit eine Rotationsstrategie verfolgt, indem neben der assortativen Paarung auch Rappen ohne Zeichen zur Zucht verwendet werden. Braune und Rappen machen einen Großteil (bis zu 60%) der Noriker Population aus. Bei diesen beiden Farbschlägen kommen beide Anpaarungsstrategien vor – assortative und Rotationspaarung (Abb.23). Grilz-Seger wies in einer Buchpublikation (2006) auf die zentrale Bedeutung der Farbzucht im Sinne einer Strukturierung in spezifischen Familienstrukturen hin und legte erstmals seit 1949 eine Klassifikation der Fellfarben beim Noriker vor. Druml et al. (2009, 2017b) konnten mittels Pedigreeanalysen nachweisen, dass sich Füchse und Tiger anhand des Inzuchtniveaus, der effektiven Populationsgröße und anhand der Allelfrequenzen des *glycogen synthase 1* (*GYS1*) Gens unterscheiden, wobei eine höhere Frequenz des mit Polysaccharid Storage Myopathie (PSSM) Typ 1 assoziierten Allel bei den Noriker Füchsen nachgewiesen wurde.

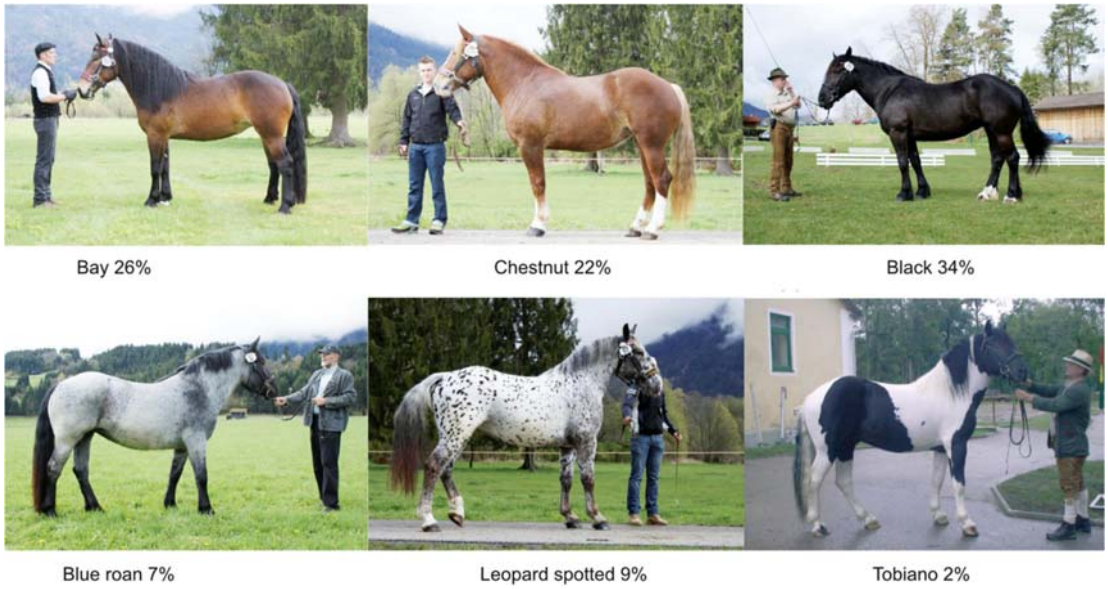


Abbildung 23: Darstellung der sechs Farbschläge, die beim Noriker gezüchtet werden plus deren prozentualer Anteil in der Population (Fotos Druml)

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Farbzucht und der darin angewandten Paarungsstrategien auf Homozygotie Muster und die genomische Architektur des Norikers zu untersuchen. Dazu wurden

sogenannte Homozygotie Regionen (ROH Inseln) identifiziert, der Geninhalt bestimmt und die resultierenden Gen Ontologien unter Berücksichtigung der jeweiligen Farbschläge untersucht. Zusätzlich wurden einige Loci, die für das Größenwachstum verantwortlich sind, untersucht, um so den züchterischen Trend innerhalb der europäischen Kaltblutpferdezucht zu analysieren.

8.12 MATERIAL UND METHODEN

In dieser Arbeit wurden 174 Noriker Pferde untersucht, von denen zwischen 2013 und 2016 Haarproben gesammelt wurden. Dabei wurde Wert auf Repräsentativität in Hinsicht auf die genealogischen Strukturen (Hengststämme und Stutenfamilien), Farbschläge und geografische Verbreitung gelegt. Von diesen 174 Pferden, die zwischen 1996 und 2014 geboren waren, waren 33 Tiere Rappen, 31 Tiere waren braun, 36 Tiere waren Füchse, 23 Tiere waren Mohrenköpfe, 48 Tiere waren Tiger und drei Tiere waren Schecken. Zusätzlich zu der Noriker Stichprobe wurden SNP Daten von 28 Posavina Pferden aus einer vorangegangenen Studie (Grilz-Seger et al., 2018) miteinbezogen.

Zu den Methoden siehe Kapitel Lipizzaner (8.3).

8.13 ERGEBNISSE

8.13.1 ROH ANALYSE UND POPULATIONS STRUKTUR

Die Analyse der Homozygotie Segmente (ROHs) zeigte, dass mittels der Kennzahlen S_{ROH} (Summe ROH) und N_{ROH} (Anzahl ROH), die einzelnen Farbschläge in zwei Hauptgruppen geteilt werden konnten. Füchse, Tiger und Schecken hatten die höchsten S_{ROH} Werte (mittleres S_{ROH} von 237,4 Mb bei Füchsen bis 284.2 Mb bei Schecken) und die höchste Anzahl an ROHs (N_{ROH}) (181.7 bei Füchsen bis 166.0 bei Tigern) (Tabelle 17).

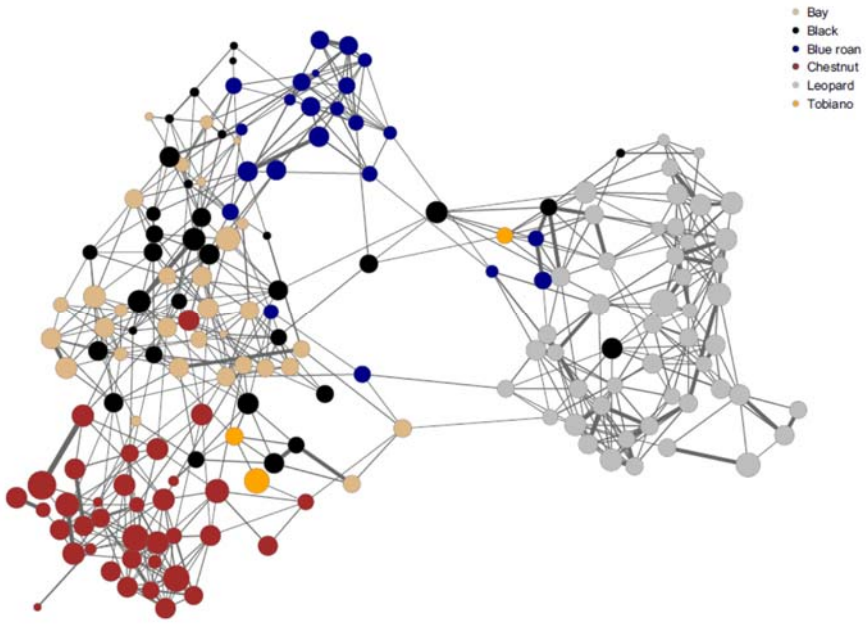


Abbildung 24: Hochauflösendes Populationsnetzwerk der untersuchten Noriker Pferde Stichprobe. Jede Kugel repräsentiert ein Individuum, die Farben markieren die Fellfarbe der jeweiligen Pferde (grau – Tiger, blau – Mohrenkopf, schwarz – Rappe, beige – Braun, rot – Fuchs, gelb – Schecke), und die Größe der Kugeln ist proportional zur individuellen Homozygotie (S_{ROH}). Die Länge der Verbindungslinien steht für die genetische Distanz und die Dicke für genetische Verwandtschaft (aus Grilz-Seger et al., 2019b).

Die zweite Hauptgruppe bestand aus Rappen, Braunen und Mohrenköpfen und war durch wesentlich geringere S_{ROH} und N_{ROH} Werte charakterisiert (Tab.17). Auf individuellem Niveau wurde die höchste

Homozygotie von einem Fuchs und einem Tiger mit S_{ROH} von über 400 Mb erreicht, was eine genomischen Inzuchtkoeffizient von rund 18% impliziert.

TABELLE 17: MITTELWERTE, STANDARDABWEICHUNGEN (SD), MINIMUM UND MAXIMUM WERTE FÜR DIE VARIABLEN S_{ROH} (IN MB), N_{ROH}, L_{ROH} (IN MB) UND F_{ROH} FÜR DAS GESAMTE SAMPLE UND DIE SUBPOPULATIONEN DEFINIERT DURCH DIE EINZELNEN FARBSCHLÄGE FUCHS, BRAUIN, RAPPE, MOHRENKOPF, TIGER UND SCHECKE.

Noriker Gesamt	**n**	**Mittelwert**	**SE**	**Min.**	**Max.**
SROH	174	213.2	97,6	13.1	452.0
NROH		159.2	52.3	19.0	320.0
LROH		1.3	0.4	0.6	2.4
FROH		0.10	0.04	0.01	0.20
Noriker Fuchs					
SROH	36	237.4	102.0	20.7	432.0
NROH		181.7	57.0	32.0	320.0
LROH		1.3	0.4	0.6	2.3
FROH		0.11	0.04	0.01	0.19
Noriker Tiger					
SROH	48	253.4	71.7	57.0	452.0
NROH		166.0	27.3	77.0	224.0
LROH		1.5	0.3	0.7	2.4
FROH		0.11	0.03	0.02	0.20
Noriker Schecke					
SROH	3	284.2	100.6	24.6	397.2
NROH		158.7	6.5	152.0	165.0
LROH		1.8	0.6	1.3	2.4
FROH		0.13	0.04	0.09	0.18
Noriker Braun					
SROH	31	178,7	99.0	13.1	351.2
NROH		149.6	61.6	20.0	245.0
LROH		1.1	0.3	0.6	1.8
FROH		0.08	0.04	0.01	0.16
Noriker Rappe					
SROH	33	180.0	110.9	15.7	354.8
NROH		139.3	65.4	19.0	227.0
LROH		1.2	0.4	0.7	1.9
FROH		0.08	0.05	0.01	0.16
Noriker Mohrenkopf					
SROH	23	176.5	72.8	16.4	306.2
NROH		151.5	40.8	26.0	212.0
LROH		1.1	0.3	0.6	1.8
FROH		0.08	0.03	0.01	0.14

Das hochauflösende Populationsnetzwerk in Abbildung 24 zeigt deutlich, dass die Noriker Stichprobe in zwei genetische Einheiten getrennt ist, die auf die in der Farbzucht übliche langfristige Selektions- und Anpaarungsstrategie zurückzuführen ist. Der tigerfarbene Cluster (graue Kugeln, rechts im Netzwerk) ist charakterisiert durch hohe genetische Distanzen zum Kern-Cluster (links) und eine einheitliche und vom Kern-Cluster abgegrenzte Gruppierung. Im Zentrum des Kern-Clusters kann ein höherer Grad an Admixture

(Vermischung) zwischen der Braunen und Rappenstichprobe festgestellt werden, was auf die hier üblichen Rotationspaarungen zurückzuführen ist. Der Fuchs-Cluster, links unten im Netzwerk, illustriert die Wirkungen der assortativen Paarungsstrategie auf eine divers strukturierte Population. Diese Gruppe ist eindeutig gegen alle anderen Farbschläge abgegrenzt, insbesondere gegen die Mohrenköpfe und Tiger. Die Mohrenköpfe gruppieren sich ebenfalls zu einem eigenen Cluster, der jedoch vor allem mit der Rappen- und Tiger Gruppierung verbunden ist.

Die Parameter S_{ROH}, N_{ROH} und L_{ROH} unterstreichen den Einfluss der aktuellen und der effektiven Populationsgröße sowie der Paarungsstrategien auf die Länge und Verteilung der ROH Segmente. Bei den Braunen, Rappen und Mohrenköpfen werden gängiger Weise Rotationspaarungen angewandt. Dieser Austausch von Zuchttieren anderer Farbschläge (in erster Linie Rappen) hat die effektive Populationsgröße gesteigert und resultierte in niedrigeren S_{ROH}, N_{ROH}, und F_{ROH} Werte. Die Noriker Fuchszucht wird durch relativ hohe S_{ROH} und N_{ROH} Werte, einen höheren Anteil an ROH Segmenten <6 Mb (90.8%) und gleichzeitig einen niedrigen Anteil und ROH Segmenten >10 Mb (3.9%) charakterisiert. Diese Ergebnisse sind die Folge einer langfristigen assortativen Anpaarungsstrategie (Farbe zu Farbe über 10 Generationen), einer erhöhten mittleren Verwandtschaft unter Vermeidung von allzu nahen Verwandtschaftspaarung. Die Konsequenz daraus ist ein relativ hoher F_{ROH} Wert von 11% (max. bis zu 19%) der sich vor allem aus kurzen ROH Segmenten zusammensetzt, die aus sogenannter alter Inzucht herrührt. Das ROH Muster, welches in der Tigerzucht beobachtet werden kann, ist typisch für Populationen mit Flaschenhals und erhöhter Verwandtschaft. Vergleichbare genomische Differenzierungen der Noriker Population nach Farbschlägen konnten auch in vorangegangenen Studien gezeigt werden (Druml et al., 2009). Im Vergleich zum Haflinger (Tab.14) und zum österreichischen Lipizzaner (Tab.6) wies der Noriker niedrigere S_{ROH} und F_{ROH} Werte auf und dies sowohl hinsichtlich der Durchschnittswerte als auch der erreichten Maxima.

8.13.2 ROH INSELN

Innerhalb der gesamten Noriker Stichprobe konnten sieben ROH Inseln auf ECA3, ECA9 und ECA11 identifiziert werden die von mehr als 50% der Tiere geteilt wurden. Alle Inseln deckten zusammen eine Länge von 5.1 Mb des gesamten Genoms ab (Tab.18). Vier Inseln waren auf ECA11 lokalisiert und darunter befand sich eine Region die in allen Farbschlägen (außer in der Tigergruppe) vorkam und die neben 29 annotierten Genen auch den sogenannten *Homeobox* (*HOXB*) Cluster beinhaltete.

TABELLE 18: CHROMOSOMALE POSITION, LÄNGE UND ANNOTIERTE GENE INNERHALB DEFINIERTER ROH INSELN, DIE VON MEHR ALS 50% DER INDIVIDUEN GETEILT WERDEN.

Chr.	Begin	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
3	105,152.868	105,210.249	57.38	51.6%	-
3	105,473.521	106,323.816	850.30	51.6%	*LCORL, NCAPG, DCAF16, FAM184B, MED28, LAP3 CLN2, QDPR*
9	74,981.480	75,661.942	680.46	62.0%	*ZFAT*
10	24,684.675	24,808.945	124.27	50.8%	*FIZ1, ZNF784, ZNF581, CCDC106, U2AF2, EPN1*
11	24,123.810	25,002.125	878.32	58.1%	*CDK5RAP3, COPZ2, CBX1, SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2, UBE22, ATP5MC1, SNF8, IGF2BP1*
11	25,612.643	25,657.958	5.32	51.6%	*FAM117A, TAC4*
11	29,877.648	31,220.694	1,343.05	62.4%	*HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1*

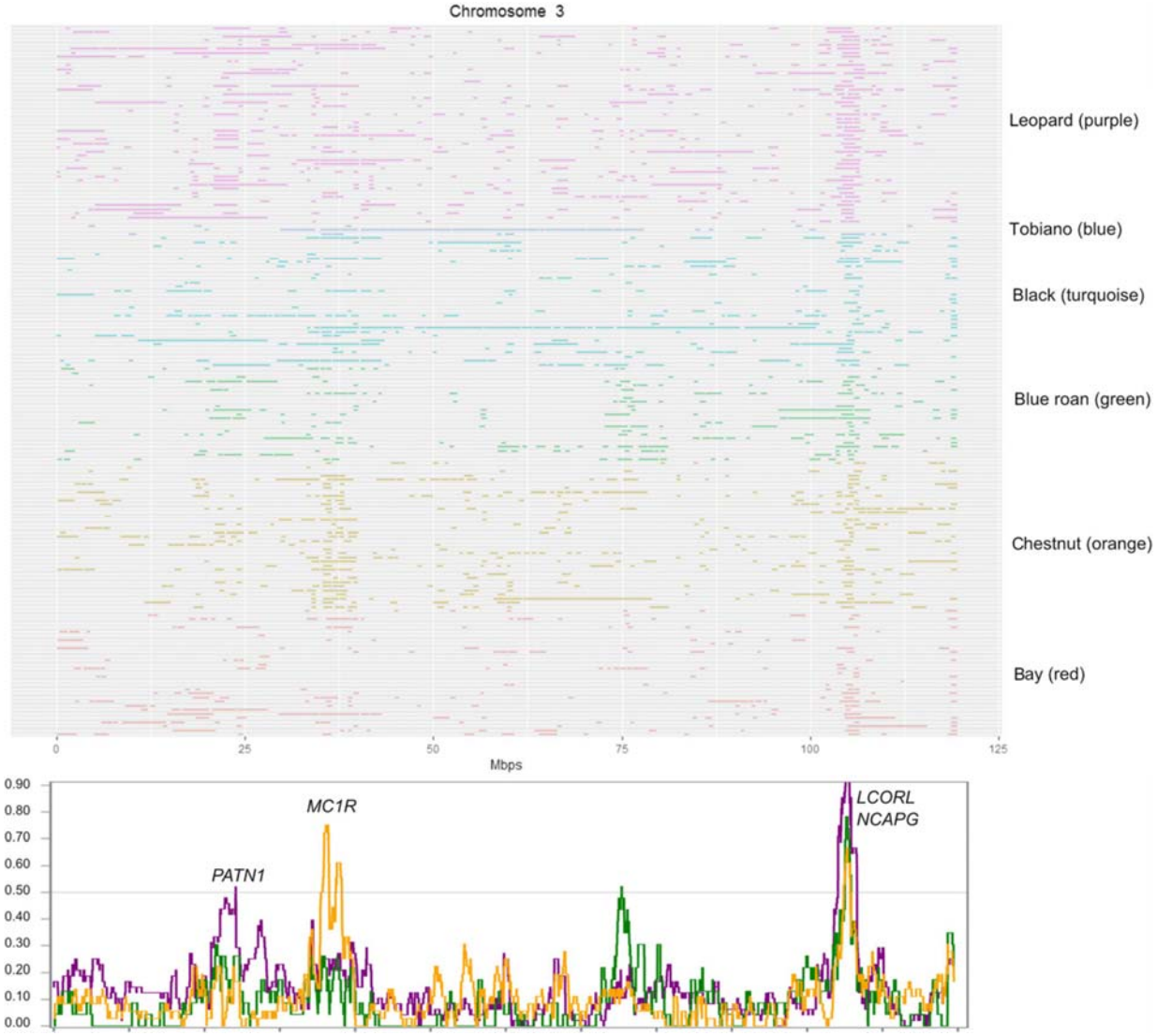


Abbildung 25: Individuelle Verteilung der ROHs auf ECA3. Farben kennzeichnen die einzelnen Noriker Farbschläge (violett – Tiger, blau – Schecke, türkis – Rappe, grün – Mohrenkopf, orange – Fuchs, rot – Braun). In der unteren Abbildung sind die Frequenzen der Tiere die ein ROH gemeinsam haben illustriert (aus Grilz-Seger et al., 2019b).

8.13.3 ROH INSELN IN SUBSTRUKTUREN

Bei den einzelnen Farbschlägen des Norikers wurde spezifische ROH Muster am Genom identifiziert. Die höchste Anzahl an ROH Inseln (n = 10) konnte in der Fuchspopulation gefunden werden, die zusammen eine Länge von 7.7 Mb des gesamten Genoms ausmachten (Tabelle xxx). Vier dieser Homozygotie Regionen waren Fuchsspezifisch und auf ECA2, ECA3 (zwei Inseln) und ECA10 lokalisiert. Unseren Erwartungen entsprechend konnte bei den Füchsen eine 851 kb lange ROH Insel auf ECA3 bestätigt werden, die neben 15 annotierten Genen auch den *Melanocortin 1 Rezeptor* (*MC1R*) beinhaltete, der kausativ für die Fuchsfarbe ist. Die zweite fuchsspezifische ROH Insel auf ECA3 zeigte Selektionssignaturen für die Gene SLC39A8 (*solute carrier family 39 member 8*) und *BANK1* (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1)*. Auf ECA10 wurden die Zink Finger Gene (*ZNF304, ZNF772* und *ZNF773*) und das Gen *AURKC (aurora kinase C*) hervorgehoben (Tab.19).

TABELLE 19: CHROMOSOMALE POSITION, LÄNGE UND ANNOTIERTE GENE INNERHALB DEFINIERTER ROH INSELN, DIE VON MEHR ALS 50% DER INDIVIDUEN GETEILT WERDEN, FÜR DIE NORIKER FUCHSPOPULATION.

Chr.	Begin	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
2	28,516.118	28,526.437	10.32	53.6%	-
2	28,660.340	28,868.113	267.77	54.0%	*TENT5B, KDF1, NUDC, NROB2, GPATCH3, GPN2, SFN, ZDHHC18, PIGV, ARID1A*
3	35,704.817	36,555,935	851.12	68.6%	*SPG7, RPL13, CPNE7, DPEP1, CDK10, VPS9D1, FANCA, SPATA2L, ZNF276, SPIRE2, TCF25, MCR1, DEF8, DBNDD1, GAS8*
3	37,444.692	38,217.472	772.78	58.3%	*SLC39A8, BANK1*
3	104,849.802	105,720.637	807.84	61.9%	*LCORL*
9	74,959.554	75,661.942	702.39	62%	*ZFAT*
10	26,105.708	26,644.961	539.25	52.8%	*AURKC, ZNF304, ZNF772, ZNF773*
11	23,203.615	25,657.958	2,257.60	62.3%	*FBXO47,RPL23, LASP1, C11H17orf98, PCGF2, CISD3, MLLT6, CWC25, PIP4K2B, PSMB3, SRCIN1, SOCS7, GPR179, NPEPPS, KNPB1, TBKBP1, MRPL10, OSBPL7, LRRC46, SCRN2, SP6, SP2, PRR15L, PNPO, CDKSRAP3, COPZ2,SNX11, CBX1, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2, ATP5MC1,UBE22, SNF8, IGF2BP1, BAGALNT2, GNGT2, ABI3, PHOSPHO1, ZNF652, NXPH3, PHB, NGFR, SPOP, SLC35B1, FAM117A, KAT7, TAC4*
11	29,652.068	31,309.554	1,657.49	81.4%	*COX11, STBXBP4, HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1, C11H17orf67, DGKE*
11	31,530.857	31,614.545	83.69	52.8%	*AKAP1*

Für die Gruppe der braunen Noriker konnten sieben ROH Inseln auf ECA3, ECA9, ECA10 und ECA11, die zusammen eine Länge von 3.9 Mb am Genom einnehmen, bestimmt werden (Tabelle IV). Eine Insel auf ECA10 war spezifisch für Braune und beinhaltete sechs annotierte Gene. Bei den rappfarbenen Norikern wurde die geringste Anzahl (n=4) an ROH Inseln gefunden werden (Tab.20), die im Wesentlichen mit den Inseln der Braunen Noriker in Länge und Position überlappten.

TABELLE 20: CHROMOSOMALE POSITION, LÄNGE UND ANNOTIERTE GENE INNERHALB DEFINIERTER ROH INSELN, DIE VON MEHR ALS 50% DER INDIVIDUEN GETEILT WERDEN, FÜR DIE BRAUNE NORIKER STICHPROBE.

Chr.	Begin	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
3	105,152.868	105,210.249	57.38	51.6%	-
3	105,473.521	106,323.816	850.30	51.6%	*LCORL, NCAPG, DCAF16, FAM184B, MED28, LAP3 CLN2, QDPR*
9	74,981.480	75,661.942	680.46	62.0%	*ZFAT*
10	24,684.675	24,808.945	124.27	50.8%	*FIZ1, ZNF784, ZNF581, CCDC106, U2AF2, EPN1*
11	24,123.810	25,002.125	878.32	58.1%	*CDK5RAP3, COPZ2, CBX1, SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2, UBE22, ATP5MC1, SNF8, IGF2BP1*
11	25,612.643	25,657.958	5.32	51.6%	*FAM117A, TAC4*
11	29,877.648	31,220.694	1,343.05	62.4%	*HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1*

TABELLE 21: CHROMOSOMALE POSITION, LÄNGE UND ANNOTIERTE GENE INNERHALB DEFINIERTER ROH INSELN, DIE VON MEHR ALS 50% DER INDIVIDUEN GETEILT WERDEN, FÜR DIE RAPPFARBENE NORIKER STICHPROBE.

Chr.	Begin	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
3	105,046.433	105,630.163	583.73	53.3%	-
9	75,089.448	75,661.942	572.49	55.4%%	*ZFAT*
11	23,732.591	25,010.061	1,277.47	55.5%	*NPEPPS, KPNB1, TBKBP1, OSBPL7, MRPL10, LRRC46, SCRN2, SP6, SP2, PNPO, PRR15L, CDK5RAP3, COPZ2, CBX1, SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2, UBE22, ATP5MC1, SNF8, IGF2BP1*
11	29,644.180	30,991.846	1,347.67	64.0%	*COX11, STBXBP4, HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1*

Für Mohrenköpfe konnten acht ROH Inseln auf ECA2, ECA3, ECA9, ECA11 und ECA15 identifiziert werden, die zusammen 5.8 Mb Länge am Genom ausmachten, wobei eine Insel auf ECA18 auch bei der Tigerpopulation bestätigt werden konnte. Die anderen sieben Inseln überlappten mit jenen der Braunen und Rappen in Länge und Position (Tab.21).

TABELLE 22: CHROMOSOMALE POSITION, LÄNGE UND ANNOTIERTE GENE INNERHALB DEFINIERTER ROH INSELN, DIE VON MEHR ALS 50% DER INDIVIDUEN GETEILT WERDEN, FÜR DIE NORIKER MOHRENSTICHPROBE.

Chr.	Begin	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
2	28,521.277	28,524.547	3.27	52.2%	-
3	75,358.079	75,400.511	42.43	52.2%	-
3	104,943.947	105,767.304	823.36	68.2%	*LCORL, NCAPG*
9	74,982.834	75,661.597	678.76	65.9%	*ZFAT*
11	22,989.768	24,884.475	1,894.71	61.9%	*FBXL20, STAC2, CACNB1, ARL5C, PLXDC1, FBXO47, RPL23, LASP1, C11H17orf98, CWC25, CISD3, PIP4K2B, PCGF2, MLLT6, SRCIN1, SOCS7, GPR179, NPEPPS, KPNB1, TBKBP1, OSBPL7, MRPL10, LRRC46, SCRN2, SP6, SP2, PNPO, PRR15L, CDK5RAP3, COPZ2, CBX1, SNX11, HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6, CALCOCO2*
11	24,901.862	25,022.125	120.26	52.7%	*UBE2Z, SNF8, IGF2BP1,*
11	29,644.180	31,307.829	1,663.65	66.0%	*COX11, STBXBP4, HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1, DGKE*
15	66,557.266	67,105.755	548.49	55.8%	-

In der Noriker Tigerzucht konnten neun ROH Inseln auf ECA2, ECA3, ECA6, ECA9, ECA11 und ECA15 bestätigt werden, die gemeinsam 7.2 Mb des Genoms belegen. Zwei davon, auf ECA6 und ECA11 waren spezifisch für die Tigerzucht. Die Homozygotie Region auf ECA6 beinhaltete die Gene *CACNA2D4, LRTM2, ADIPOR2, WNT5B, FBXL14, ERC1, RAD52, WNK1, NINJ2* und *B4GALNT3,* und wurde von 76.3% der Tiger geteilt. Diese Insel konnte auch interessanterweise auch beim Bosnischen Gebirgspferde gefunden werden, der ältesten Pferderasse der Balkan Halbinsel (Grilz-Seger et al., 2018). Neuere Studien aus der Archäogenetik haben gezeigt, dass die Tigerzeichnung beim Pferd schon bei 25.000 Jahre alten

Funden in West und Ost Europa nachgewiesen werden konnte (Pruvost et al., 2011). Beim Noriker Pferd ist dieser Farbschlag schon 1652 dokumentiert und dessen Ursprünge lassen sich zu autochthonen Pferden im Zentralalpinen Raum zurückverfolgen (Grilz-Seger et al., 2017).

TABELLE 23: CHROMOSOMALE POSITION, LÄNGE UND ANNOTIERTE GENE INNERHALB DEFINIERTER ROH INSELN, DIE VON MEHR ALS 50% DER INDIVIDUEN GETEILT WERDEN, FÜR DIE NORIKER TIGER STICHPROBE.

Chr.	Begin	Ende	Länge (kb)	ROH freq.	Bekannte Gene
2	28,516.118	28,544.165	28.05	54.2%	-
3	24,150.651	24,160.721	10.06	52.1%	-
3	104,084.892	106,607.212	2,522.32	78.0%	*LCORL,NCAPG,DCAF,FAM184b, MED28, LAP3, ODPR, CLRN2, LDB2*
6	28,806.179	30,119.366	1,313.19	76.3%	*CACNA2D4, LRTM2, ADIPOR2, WNT5B, FBXL14, ERC1, RAD52, WNK1, NINJ2, BAGALNT3*
9	74,959.554	75,442.848	483.29	62.9%	*ZFAT*
11	23,203.615	23,213378	9.76	52.1%	*FBXO47,RPL23*
11	29,683.529	31,631.624	1,948.10	62.6%	*COX11, STBXBP4, HLF, MMD, TMEM100, PCTP, ANKFN1, C11orfH17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1*
11	32,599.971	32,940.833	340.86	54.4%	*SUPT4H1, RNF43, HSF5, MTMR4, SEPT4, C11H17orf47, TEX14, RAD51C*
15	66,695467	67,228.658	533.19	52.1%	-

8.13.4 GEN ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGSANALYSE

Von den 51 annotierten Genen, die in den homozygoten ROH Inseln der gesamten Noriker Stichprobe identifiziert werden konnten, wurden sechs GO Termini aus biologischen Prozessen, drei GO Termini aus zellulären Komponenten und zwei GO Termini aus molekularen Funktionen, extrahiert (Tabelle VIII). Die höchsten Signifikanzniveaus ($p<0.0001$) wurden für die Termini GO:0048704—embryonic skeletal system morphogenesis und GO:0009952—anterior/posterior pattern specification, berechnet, beide basieren auf den Genen *HOXB3, HOXB1, PCGF2, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5* und *HOXB6.* Zwei Termini (GO:0021570—rhombomere 4 development und GO:0021612—facial nerve structural organization) mit Bezug zur Entwicklung von strukturellen Elementen und der Term GO:0001525—angiogenesis, wurden ebenfalls durch die Analyse hervorgehoben. Eine signifikante Anreicherung an *HOXB* Genen ($p<0.003$) wurde für Sequenz-spezifische DNA Bindung und Transkription Faktor Aktivität bestätigt, wobei auch das Gen *ZFAT* hervorgehoben wurde. Die GO Analyse unterstrich, abgesehen von den Tiger-spezifischen Termini und den Haut spezifischen Termini bei den Füchsen, die große Bedeutung des *HOXB* Gen Clusters in allen Subpopulationen, die durch die Termini GO:0048704—embryonic skeletal system morphogenesis und GO:0009952—anterior/posterior pattern specification ausgedrückt wird. Identische *HOXB* Cluster und GO Termini wurden in einer vorangegangenen Studie auch beim Posavina Pferd nachgewiesen (Grilz-Seger et al., 2018). Von den zahlreichen Funktionen in welchen *HOX* Gene eine Rolle spielen, stellen die komplexe morphologische Regulation und die Definition der anterioren-posterioren Körperachse die wichtigsten dar (Pearson et al., 2005). Laut neueren Studien in den Bereichen der evolutionären Genetik sind *HOX* Gene vor allem in die Regelung der morphologischen Adaptation und Diversifikation involviert. Eine archäogenetische Studie von Librado et al. (2017) über Veränderung des genomischen Profils im Laufe der Domestikationsgeschichte von Pferden zeigte, dass der *HOX* Cluster und der GO Term Entwicklung der anterior–posterioren Achse eine wesentliche Rolle bei Skythischen Pferden spielte. Obwohl Noriker und Posavina Pferde ein grundsätzlich anderes Exterieur aufweisen, nimmt die Zucht nach Exterieurmerkmalen und Rassetyp eine langfristige zentrale Position im Selektionsschema ein. Daraus kann gefolgert werden, dass die Bedeutung des *HOX* Clusters bei diesen Rassen ein Resultat der Selektion auf einen Rassespezifischen Habitus ist. Die Abwesenheit der *HOX* determinierten GO Termini beim Tiger

unterstützen diese These, da in dieser Subpopulation die langfristige Selektion eher die optimale Fellzeichnung fördert und das Exterieur hier eine untergeordnete Rolle spielt.

TABELLE 24: GEN ONTOLOGIE (GO) TERMINI UND KEGG PFADE (P<0.05) BASIEREND AUF IN ROH INSELN LOKALISIERTEN ANNOTIERTEN GENEN FÜR DIE GESAMTE NORIKER STICHPROBE

Kategorie	Term	P-Wert	Gene	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini
Biologische Prozesse	GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis	0.000000	*HOXB3, HOXB1, PCGF2, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	91.26	0.000000	0.000000
Biologische Prozesse	GO:0009952~anterior/posterior pattern specification	0.000000	*HOXB3, HOXB1, PCGF2, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	42.22	0.000000	0.000000
Biologische Prozesse	GO:0021570~rhombomere 4 development	0.005482	*HOXB1, HOXB2*	353.62	0.507936	0.210521
Biologische Prozesse	GO:0021612~facial nerve structural organization	0.021754	*HOXB1, HOXB2*	88.40	0.941416	0.508023
Biologische Prozesse	GO:0001525~angiogenesis	0.028921	*HOXB3, HOXB13, TMEM100*	10.94	0.977311	0.531010
Biologische Prozesse	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.097086	*LCORL, SP2, SNF8*	5.53	0.999998	0.888725
Celluläre Komponenten	GO:0005776~autophagosome	0.003831	*OSBPL7, CALCOCO2, PIP4K2B*	31.45	0.161863	0.161863
Celluläre Komponenten	GO:0005654~nucleoplasm	0.009575	*CWC25, MRPL10, HOXB7, PSMB3, SNF8, PNPO, HOXB13, KPNB1, PIP4K2B*	2.83	0.357623	0.198516
Celluläre Komponenten	GO:0005634~nucleus	0.065290	*HOXB3, HLF, HOXB1, HOXB2, SP2, HOXB8, HOXB5, HOXB6, SP6, CDK5RAP3*	1.86	0.955214	0.644876
Molekulare Funktion	GO:0043565~sequence-specific DNA binding	0.003415	*HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB6, HOXB13*	7.64	0.112847	0.112847
Molekulare Funktion	GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	0.012186	*HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB6, ZFAT*	5.31	0.348924	0.193107

Für die Tigerpopulation wurden lediglich zwei GO Termini (Biologische Prozesse; GO:0000730—DNA recombinase assembly and the KEGG pathway ecb03440:homologous recombination) und ein KEGG Pathway identifiziert, wobei alle auf den Genen *RAD51C* und *RAD52* aufbauten. Beide Gene spielen eine wichtige Rolle für die DNA-Doppelstrangreparatur und die homologe Rekombination (Chapman et al., 2012). Für die Fuchspopulation konnten zusätzliche GO Termini mit Bezug auf Haut und Epidermis (GO:0010482—regulation of epidermal cell division, GO:0045606—positive regulation of epidermal cell differentiation and GO:0003334—keratinocyte development) und Zell Regulation (GO:0043410—positive regulation of MAPK cascade) extrahiert werden.

8.13.5 GRÖßEN ASSOZIIERTE SNPS IN ROH INSELN

Das Noriker Pferd, ein mittelgroßes Kaltblutpferd mit einer mittleren Widerristhöhe von 155 bis 160 cm, war in den letzten beiden Jahrzehnten einem Selektionsdruck exponiert, der ein höheres Stockmaß und ein leichteres Kaliber begünstigte (von einer Größe um 155 cm im Jahr 1976 zu 162 cm im Jahr 2004).

Gegenwärtig können einzelne Exemplare ein Stockmaß von bis zu 173 cm erreichen, was speziell bei Rappen und Mohrenköpfen tendenziell gehäuft vorkommt (Druml et al., 2008). Der Kaliber Index beschreibt die Beziehung zwischen Knochenstärke, Größe und Volumen eines Pferdes und ist ein geeignetes Mittel, um zwischen leichten und schweren Pferden zu unterscheiden (Druml et al., 2008). Beispielsweise gilt das Posavina Pferd aufgrund seiner geringen Körpergröße (um die 138 bis 148 cm Stockmaß) und seines starken Kalibers (Index um 205, höher als beim Noriker), als das kleinste Kaltblutpferd Mitteleuropas.

In der untersuchte Noriker Stichprobe zeigten 60.3% der Pferde eine ROH Insel auf ECA9, welche das Gen *ZFAT* beinhaltete und ROH Inseln auf ECA3 mit den Genen *LCORL, NCAPG* und *LASP1.* Diese vier Gene wurden in jüngeren Studien genauer untersucht und konnten mit dem Merkmal Körpergröße assoziiert werden, wo sie zusammen bis zu 84% der Variabilität dieses Merkmals bestimmen (Makvandi-Nejad et al., 2012; Petersen et al., 2013). Um die genomischen Unterschiede zwischen dem großen Kaltblut Noriker und dem kleinen Kaltblut Posavina genauer zu untersuchen, extrahierten wir die Genotypen von assoziierten SNPs um diese Gene (Tabelle X). Am SNP beim *LCORL/NCAPG* Locus waren 93.1% der Noriker homozygot *C/C* (Groß), während auf den beiden anderen SNPs bei *ZFAT* und *LASP1* die „Groß“ Allele in homozygoter Form bei 68.1% respektive 70.1% der Noriker Pferde vorkamen.

Beim Posavina Pferd wurden andere Genotypen Frequenzen gefunden. Am *LCORL/NCAPG* Locus waren 57.1% der Tiere homozygot *T/T* (Klein). Auf den anderen beiden Marker zeigten die Posavina Pferde ein ähnliches Profil wie der Noriker (67.9% und 57.1% homozygot für die „Groß“-Allele) (Tab.25). Die Unterschiede zwischen Noriker und Posavina am *LCORL/NCAPG* Locus unterstützt die These, dass dieser Locus mit Wideristhöhe assoziiert ist und die anderen beiden in Größenparameter wie Kaliber, Volumen involviert sind. Am *ZFAT* Locus konnte beim Noriker eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht festgestellt werden, was zeigt, dass die Selektion für Größe nach wie vor im Gange ist.

TABELLE 25: GENOTYPENFREQUENZEN FÜR ASSOZIIERTE SNPS NAHE DEN LOCI *LCORL/NCAPG, ZFAT, LASP1* AUS DER STUDIE VON MAKVANDI-NEJAD ET AL. (2012) FÜR 174 NORIKER UND 28 POSAVINA PFERDE

Chr	Position	Allel1	Allel2	Noriker	Noriker	Noriker	Posavina	Posavina	Posavina
		klein	groß	groß / groß	groß / klein	klein / klein	groß / groß	groß / klein	klein / klein
3	105,547.002	T	C	90.3	6.7%	0.0%	3.8%	39.3%	57.1%
9	75,550.059	C	T	68.5%	12.7%	18.8%	67.9%	25.0%	7.1%
11	23,259.732	G	A	69.7%	27.9%	1.8%	57.1%	35.7%	7.1

8.14 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Zuchtziel beim Noriker Pferd basiert hauptsächlich auf der Exterieurzucht, wobei die Farbzucht ein zusätzliches Selektionskriterium in dieser Rasse darstellt. Die Erhaltung der Farbschläge hat bei dieser Rasse langfristig zu speziellen Anpaarungs- und Selektionsstrategien geführt. Die Farbschläge und Linien stellen genetische Subpopulationen dar, die langfristig die Erhaltung der genetischen Diversität fördern. Der positive Effekt der Strukturierung der Noriker Population durch die angewandten Prinzipien der Farb- und Linienzucht wird auch durch die ermittelten Autozygotie (SROH) und genomischen Inzuchtwerte (FROH) unterstrichen, wobei der Noriker die geringsten SROH und FROH Werte der in diesem Projekt untersuchten österreichischen Pferderassen (Haflinger, Lipizzaner) aufweist.

Die Analyse von ROH Inseln zeigte deutliche Selektionssignaturen für morphologische Kriterien und es konnte gezeigt werden, dass in einer geschlossenen Population mit einem relativ gleich verteilten Gründergenpool, die strikte Berücksichtigung eines weiteren Selektionsmerkmal (Farbzucht) in einer genomischen Strukturierung der Population resultiert, die auch mittels der Homozygotie Muster und ROH Inseln gemessen werden kann. Weiter konnte beispielsweise mit der Interaktion von Farb- und Größenassoziierten Loci gezeigt werden, dass die Selektion auf Fellfarbe auch andere genomische Regionen

abseits des Zielgens beeinflussen kann. Aus diesen Ergebnissen können wir schlussfolgern, dass die Analyse von ROH Inseln ein probates Mittel darstellt, um Selektionssignaturen bei Pferderassen auf genomweitem Niveau zu studieren.

9 SELEKTIONSSIGNATUREN IN 12 EUROPÄISCHEN PFERDERASSEN

9.1 EINLEITUNG

Intensive künstliche und natürliche Selektion haben zu einer beachtlichen phänotypischen Variation zwischen den europäischen Pferderassen geführt. Während die meisten Studien, die sich mit der Analyse von Selektionssignaturen auseinandersetzten, auf F_{ST} Statistik beruhten, wurde in der vorliegenden Studie 12 Pferderassen mittels ROH Analyse untersucht. Mit der Identifizierung überlappender Homozygotie Regionen war es damit möglich, nicht nur Unterschiede, sondern auch Gemeinsamkeiten zwischen 12 Pferderassen zu ermitteln. Dieser Ansatz, bei dem Selektionssignaturen anhand von gemeinsamen ROH Inseln bestimmt werden, wurde bereits bei verschiedenen Nutztierarten (Peripolli et al. 2018a; 2018b; Bertolini et al., 2018; Mastrangelo et al. 2017) und beim Pferd (Metzger et al., 2015; Grilz-Seger et al., 2018; Grilz-Seger et al., 2019ab; Nolte et al., 2019) durchgeführt.

Es wurden für die Untersuchung 1,476 Pferde aus 12 Rassen verwendet, die nach geografischen und phänotypischen Gesichtspunkten ausgewählt wurden. Der Herkunft der Rassen repräsentierte ein Nord-Südgefälle, das sich mit den Achal Tekkiner und den Vollblutaraber vom Mittleren und Nahem Osten und mit dem Exmoor Pony bis Großbritannien erstreckte. Die einzelnen Phänotyp Kategorien waren mit zwei Kaltblutrassen (Noriker, Posavina), drei Warmblutrassen (Lipizzaner, Selle François und Gidran), einer Vollblutrasse (Französischer Traber) und drei Kleinpferderassen (Bosnisches Gebirgspferd, Exmoor Pony und Haflinger) vertreten (Abb.26).

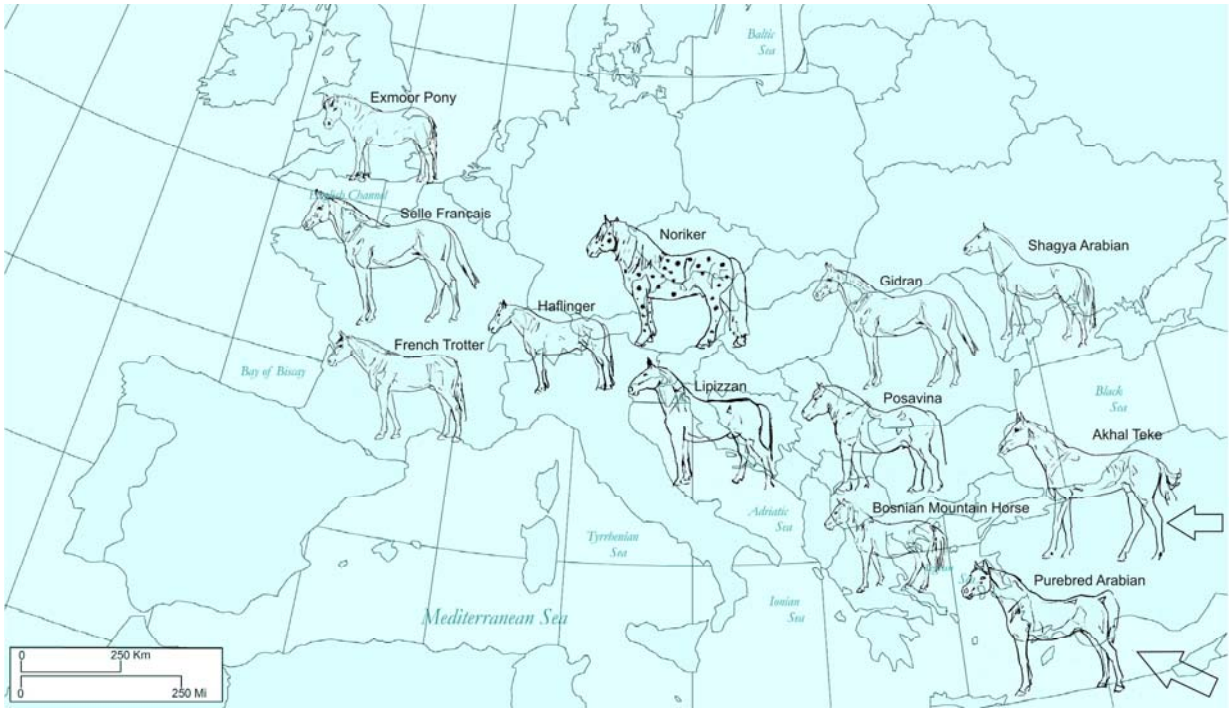


Abbildung 26: Geografische Herkunft der 12 untersuchten Pferderassen (Thomas Druml)

Drei der untersuchten Rassen gelten als alte autochthone Pferderassen (Noriker, Bosnisches Gebirgspferd und Exmoor Pony), bei denen semi-ferale Haltungsbedingungen eine wichtige Säule der Zucht sind. Die meisten der untersuchten Pferderassen, mit Ausnahme des Französischen Trabers, Selle Francais und des Gidran, unterlagen im Laufe ihrer Zuchtgeschichte keinem Einfluss des Englischen Vollblutes. Als Veredler wurde bei den mitteleuropäischen Pferderassen vor allem der Shagya Araber eingesetzt. So spielten Shagya

Araber Stuten und Hengste (Siglavy) eine züchterische Rolle beim Lipizzaner, dem Bosnischem Gebirgspferd und im geringeren Maße beim Posavina Pferd. Einzelne Shagya Araber Hengste wurden zu Begründern der Hengststämme beim Haflinger und beim Gidran. Die einzige der analysierten Pferderassen, bei der weder ein Einfluss des Arabischen- noch des Englischen Vollblutes nachzuweisen ist, stellt der Noriker dar.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es den Autozygotiegrad, unter besonderer Berücksichtigung von überlappenden Homozygotie Regionen, der 12 Pferderassen einer vergleichenden Analyse zu unterziehen und Rassen übergreifende gemeinsame Selektionssignaturen zu ermitteln.

9.2 MATERIAL UND METHODE

In die Populationsstudie wurden 1.476 Pferde aus zwölf Pferderassen einbezogen. Der Großteil der in der Studie analysierten Tiere (Haflinger, Noriker, Lipizzaner, Posavina, Bosnisches Gebirgspferd, Gidran und Shagya Araber) wurde anhand von Pedigree Informationen repräsentativ für die genealogische Struktur der jeweiligen Rasse gewählt. Beim Achal Tekkiner, Französischen Traber und beim Selle Francais wurden nur Tiere berücksichtigt, die keine Verwandtschaft innerhalb der letzten beiden Generationen aufwiesen. Beim Exmoor Pony wurde nur Pferde ausgewählt, die ein vollständiges, vier Generationen umfassendes Pedigree auswiesen und eng verwandte Tiere wurden ausgeschlossen.

9.2.1 SNP GENOTYPISIERUNG

Die SNP Genotypen der 1.476 Pferde wurden mittels des 670,000 SNP Affymetrix® Axiom Equine HD Array (Schäfer et al., 2017) bestimmt, wobei die chromosomalen Positionen der SNPs anhand des EquCab2.0 Referenz Genoms hergeleitet wurden. SNPs, die auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert waren (X: 28,017 SNPs und Y: 1 SNP) und 30.864 SNPs ohne chromosomale Zuordnung, wurden in den Analysen nicht berücksichtigt. Bei der Qualitätskontrolle wurden SNPs, deren Genotypisierungsrate unter 10% lag und SNPs, die eine Minor Allel Frequenz unter 0.01 aufwiesen, ausgeschlossen. Letztendlich verblieben 611,914 SNPs für die weiterfolgenden Analysen.

Die Populationsstrukturen wurden anhand einer Hauptkomponenten (PCA) Analyse dargestellt, welche auf einer IBS (identical by state) Verwandtschaftsmatrix (G-Matrix), die mit dem Programmpaket PLINK v.1.7 (Purcell et al., 2007) berechnet und mit dem Softwarepaket R (www.r-poject.com) dargestellt wurde, beruht.

Für die Bestimmung ROH Segmente und die GO- und Anreicherungsanalyse wurden die unter Punkt 8.3 beschriebenen Methoden angewandt.

9.3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der PCA Analyse ist in Abbildung 27 dargestellt. Die erste Hauptkomponente, die 36 % der genetischen Varianz erklärt, teilte die 12 Rassen in zwei Hauptgruppen: a) Kaltblut- und Kleinpferderassen (Noriker, Haflinger, Posavina und Exmoor Pony) und b) Orientalen und Sportpferderassen (Vollblutaraber, Shagya Araber, Achal Tekkiner, Gidran, Selle Francais, Französischer Traber, Lipizzaner und Bosnisches Gebirgspferd). Die zweite Hauptkomponente separierte den Lipizzaner klar von den anderen Rassen. Die Visualierung der Hauptkomponenten 1 und 3, die beide zusammen 37% der genomischen Varianz erklären, zeigte eine graduelle Überlappung der Kaltblutpferderassen entlang der PC1 Achse in Richtung schwerer zu leichtem Typ und geografisch von Nord nach Süd (Noriker – Haflinger – Posavina). Das Bosnische Gebirgspferd stellte den Übergangsbereich der autochthonen Rassen zu den orientalischen Rassen dar. In Bezug auf die Beziehung von Hauptkomponente 2 zu Hauptkomponente 3 formierte sich das Exmoor Pony in einem eigenen Cluster, während sich hingegen der Lipizzaner zu den Vollblut- und Shagya Arabern reihte. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass die autochthonen Rassen entsprechend ihrer Größe (von

klein bis groß) gereiht bzw. getrennt wurden (Posavina – Haflinger – Noriker).

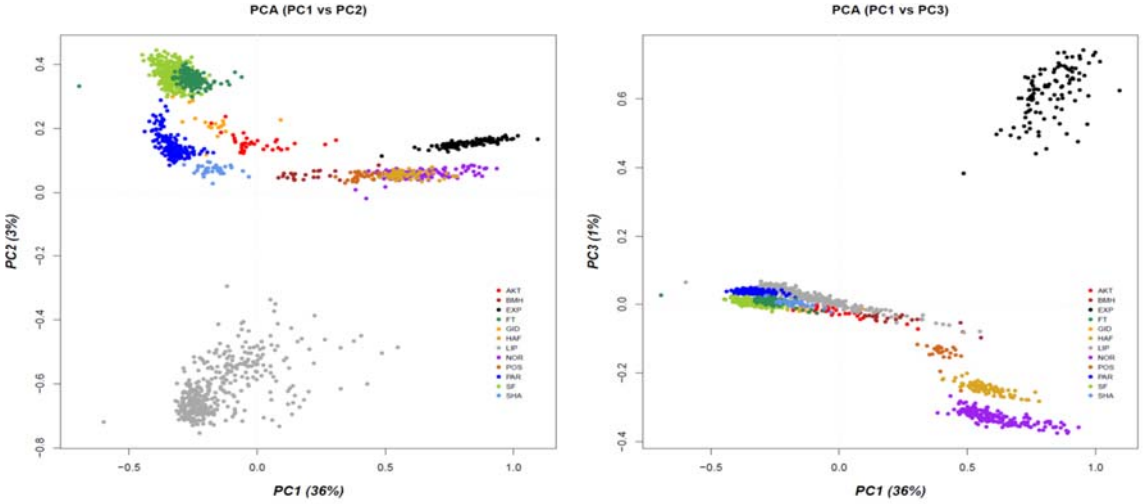


Abbildung 27: PCA Plot der Population Stratifizierung der untersuchten Pferde aus zwölf verschiedenen Rassen. In der linken Grafik Darstellung von PC1 versus PC2, beide erkläre zusammen 39% der genomischen Varianz; in der rechten Abbildung Darstellung von PC1 versus PC3, die zusammen 37% der genomischen Varianz erklären. (AKT = Achal-Tekkiner, BMH = Bosnisches Gebirgspferd, EXP = Exmoor Pony, FT = French Trotter, GID = Gidran, HAF = Haflinger, LIP = Lipizzaner, NOR = Noriker, POS = Posavina, PAR = Vollblut Araber, SF = Selle Francais und SHA = Shagya Araber)

9.3.1 VERTEILUNG UND MUSTER DER ROH INSELN (HOMOZYGOTIEREGIONEN)

Die durchschnittliche genomische Länge der homozygoten Abschnitte (S_{ROH}) lag zwischen 192.7 Mb und 506.1 Mb (Tab.26). Die höchsten Werte wurden beim Exmoor Pony (506.1 Mb), den Arabischen Rassen (Vollblut Araber – 368.1 Mb, Shagya Araber – 355.1 Mb, Gidran – 321.9 Mb) und dem Französischen Traber (352.8 Mb) vorgefunden.

TABELLE 26: S_{ROH} WERTE (IN MB), SUMME DER LÄNGE DER ROH INSELN (IN MB), ANZAHL ROH INSELN UND ANZAHL ANNOTIERTER GENE INNERHALB ROH INSELN, UND ANZAHL PRIVATE ROH INSELN PER RASSE

Pferderasse	S_{ROH} Mb	Summe ROH Inseln Mb	n ROH Inseln	n Gene in ROH Inseln	n private ROH Inseln
Exmoor pony	506.1	24.5	33	171	28 auf ECA1,2,3,4,6,16,18,19,22,23,28,30
French Trotter	352.8	20.5	22	156	14 auf ECA2,4,6,7,8,9,15,23
Selle Francais	297.1	2.1	5	8	1 auf ECA1
Lipizzaner	297.0	1.9	5	23	1 auf ECA14
Noriker	215.5	5.0	5	50	1 auf ECA11
Posavina	192.7	2.2	5	16	1 auf ECA28
Haflinger	279.7	4.9	5	60	-
Gidran	321.9	19.2	30	143	18 auf ECA2,3,4,6,9,14,17,22,25,27,28
Vollblut Araber	368.1	15.5	19	141	5 auf ECA2,4,5,14,22
Shagya Araber	355.1	22.4	32	242	23 auf ECA1,2,6,8,9,11,15,16,18,19, 23,25
Achal-Tekkiner	246.1	4.8	9	90	4 auf ECA1,11,19
Bosnisches Gebirgspferd	296.3	4.2	10	35	4 auf ECA3,6,11,23

Mittlere S_{ROH} Werte von rund 290 Mb wurden beim Lipizzaner, Selle Francais, Haflinger und dem Bosnischen Gebirgspferd vorgefunden, gefolgt vom Achal Tekkiner (246.1 Mb) und dem Noriker (215.5 Mb). Die niedrigsten Werte wies der Posavina (192.7 Mb) auf. Das Genom des Exmoor Pony war durch die höchste Anzahl von ROH Inseln und die größte Gesamtlänge der überlappenden Homozygotie Regionen (33 Inseln, 24.5 Mb) charakterisiert, gefolgt vom Shagya Araber (32 Inseln, 22.4 Mb), Gidran (30 Inseln, 19.2 MB) und Französischen Traber (22 Inseln, 20.5 Mb) (Tabelle 2). Die Anzahl der überlappenden Homozygotie Regionen war beim Lipizzaner (5 Inseln, 1.9 Mb), Selle Francais (5 Inseln, 2.1 Mb) und dem Posavina (5 Inseln, 2.2 Mb) vergleichsweise gering (Table 2, Anhang File 1). Generell korrespondierte die Gesamtlänge der ROH Inseln per Rasse mit dem durchschnittlichen S_{ROH}, mit Ausnahme des Lipizzaners und Selle Francais, bei denen die Länge der ROH Inseln mit 1.9 Mb, bzw. 2.1 Mb einem mittleren S_{ROH} von 297 Mb (Table 2) gegenüberstand.

Von den 180 ROH Inseln, die in der gesamten Stichprobe gefunden wurden, waren 100 populationsspezifisch. Alle anderen überlappenden in 36 genomischen Regionen mit zumindest einer weiteren ROH Insel einer anderen Pferderasse (Tabelle 3). Eine hohe Anzahl privater überlappender Homozygotie Regionen wurde beim Exmoor Pony (28 von 33), Shagya Araber (23 von 32), Gidran (18 von 30) und beim Französischen Traber (14 von 22) nachgewiesen (Tab.27). Eine geringe Anzahl von ROH Inseln wiese der Lipizzaner, Noriker, Posavina und Selle Francais auf, bei denen eine von fünf ROH Inseln ausschließlich in der jeweiligen Rasse vorkam. Beim Haflinger war keine Insel populationsspezifisch, alle fünf in dieser Rasse identifizierten Homozygotie Regionen überlappten mit ROH Inseln anderer Populationen.

TABELLE 27: RASSEN ÜBERLAPPENDE ROH INSELN (ANFANG UND ENDE IN MB) UND ANNOTIERTE GENE IM ÜBERLAPPUNGSBEREICH.

Chr.	Anfang	Ende	Rassen die ROH Inseln teilen	Annotierte Gene im Überlappungsbereich
1	148,443.474	148,516.796	Achal-Tekkiner, Bosnisches Gebirgspferd	*EIF2AK4*
3	34,386.385	34,732.351	Achal-Tekkiner, Haflinger	*KLHDC4, SLC7A5, CA5A, BANP*
3	36,047.262	36,548.306	Gidran, Haflinger, Vollblut Araber	*CDK10, SPATA2L, ZNF276, VPS9D1, FANCA, SPIRE2, TCF25, DBNDD1, GAS8, MC1R, DEF8*
3	37,179.496	38,127.255	Gidran, Haflinger, Vollblut Araber	*MANBA, NFKB1, SLC39A8, BANK1*
3	105,767.304	105,832.553	Exmoor Pony, Noriker	*NCAPG, DCAF16*
3	118,669.793	118,769.903	Lipizzaner, Shagya Araber, Vollblut Araber	*UVSSA, MAEA*
3	118,809.979	118,893.880	Lipizzaner, Shagya Araber, Vollblut Araber	*CTBP1*
3	118,659.800	119,479.623	Shagya Araber, Vollblut Araber	*UVSSA, MAEA, CTBP1, SPON2, FGFRL1, IDUA, SLC26A1, DGKQ, TMEM175, GAK, CPLX1, PCGF3, SLC49A3, MYL5, ATP5ME, PDE6B, PIGG*
4	15,163.634	15,817.917	Achal-Tekkiner, French Trotter	*NUDCD3, NPC1L1, DDX56, TMED4, OGDH, ZMIZ2, H2AFV, MYO1G, CCM2, TBRG4, RAMO3*
4	50,883.038	50,904.590	Gidran, Shagya Araber	*HDAC9*
4	52,692.165	52,840.002	Gidran, French Trotter	*ABCB5*
6	29,424.361	30,040.425	Bosnian Mountain, Posavina, Selle Francais	*ERC1, RAD52, WNK1, NINJ2*
6	41,240.508	41,843.164	Gidran, French Trotter	*GRIN2B*
6	81,156.975	81,795.964	Exmoor Pony, Gidran	*HMGA2, LLPH, IRAK3*

7	**39,587.420**	**41,127.737**	**French Trotter, Vollblut Araber, Shagya Araber**	***NTM, OPCML***
7	48,157.328	48,930.905	French Trotter, Haflinger	*ACP5, ELOF1, CNN1, ECSIT, ZNF653, PRKCSH, RGL3, EPOR, SWSAP1*
7	50,167.155	50,932.454	French Trotter, Vollblut Araber	*ZNF699*
9	31,329.939	32,034.084	Vollblut Araber, Shagya Araber	*PCMTD1, PXDNL*
9	44,411.007	44,562.960	Vollblut Araber, Shagya Araber, Exmoor Pony, (Haflinger)	*KCNS2*

11	**21,801.064**	**21,938.218**	**Vollblut Araber, Shagya Araber**	***KRT28, KRT27, KRT26, KRT25, KRT24***
11	21,966.387	22,416.682	Achal-Tekkiner, Vollblut Araber, Shagya Araber	*SMARCE1, CCR7, TNS4, GFBP4, TOP2A, RARA, CDC6, WIPF2, RAPGEFL1, CASC3, MSL1, NR1D1, THRA*
11	24,285.730	24,816.254	Noriker, Posavina, Gidran, Lipizzaner	*HOXB1, HOXB2, HOXB3, HOXB5, HOXB6, HOXB7, HOXB8, HOXB13, TTLL6*
11	24,793.573	24,822.752	Noriker, Posavina, Bosnisches Gebirgspferd, Haflinger, Gidran	*CALCOCO2*
11	26,117.473	27,008.802	Gidran, Vollblut Araber	*ACSF2, CHAD, RSAD1, MYCABPAP, EPN3, SPATA20, CACNA1G, ABCC3, ANKRD40, LUC7L3, ANKRD40CL, WFIKKN2, TOB1, SPAG9, NME1-NME2, MBTD1, UTP18*
11	27,363.048	28,118.531	Gidran, Vollblut Araber	*CA10*
11	29,747.581	30,078.455	Bosnisches Gebirgspferd, Exmoor Pony, Noriker,	*STXBP4, COX11, HLF, MMD*
11	30,690.860	30,774.494	Bosnisches Gebirgspferd, Haflinger, Lipizzaner, Noriker	*ANKFN1*
11	31,062.702	31,250.934	Lipizzaner, Noriker, Vollblut Araber, Shagya Araber	*C11H17orf67*
11	31,062.702	31,810.316	Vollblut Araber, Shagya Araber, Lipizzaner	*C11H17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1, MSI2*
15	79,489.871	79,964.006	French Trotter, Shagya Araber	-
18	10,733.279	11,116.742	Bosnisches Gebirgspferd, Vollblut Araber	*INHBB, RALB, EPB41L5*
18	49,323.427	49,940.945	French Trotter, Gidran, Selle Francais, Shagya Araber	*SSB, METTL5, UBR3, MYO3B*
19	50,554.541	50,890.075	Gidran, Vollblut Araber	*CBLB, ALCAM*
23	54,975.635	54,984.719	French Trotter, Gidran	*FGD3*
25	6,409.342	6,812.785	Lipizzaner, Gidran	*NR4A3, STX17, ERP44, INVS*

Wie erwartet, wies das Exmoor Pony keine gemeinsame Homozygotie Region mit dem Achal Tekkiner und den Sportpferderassen auf. Das Bosnische Gebirgspferd teilte keine gemeinsame Homozygotie Region mit dem Shagya Araber und den Sportpferdrassen und der Französische Traber hatte keine gemeinsame ROH Insel mit dem Lipizzaner, den Kaltblutpferderassen, dem Exmoor Pony und dem Bosnischen Gebirgspferd.

In Hinsicht auf die chromosomale Verteilung der ROH Inseln, konnte über alle zwölf Rassen hinweg mehrere Übereinstimmungen gefunden werden. Auf folgenden neun Chromosomen war in keiner der untersuchten Populationen eine ROH Insel vorhanden: ECA10, ECA12, ECA13, ECA20, ECA21, ECA24, ECA26, ECA29 und ECA31. Im Gegensatz dazu konnte auf ECA11 eine Akkumulation von überlappenden Homozygotie Regionen festgestellt werden (Abb.28), nachdem alle Rassen, mit Ausnahme des Trabers und des Selle Francais, ein bis zu fünf überlappende ROH Inseln auf diesem Chromosom aufwiesen (ECA11: 20 Mb – 37 Mb).

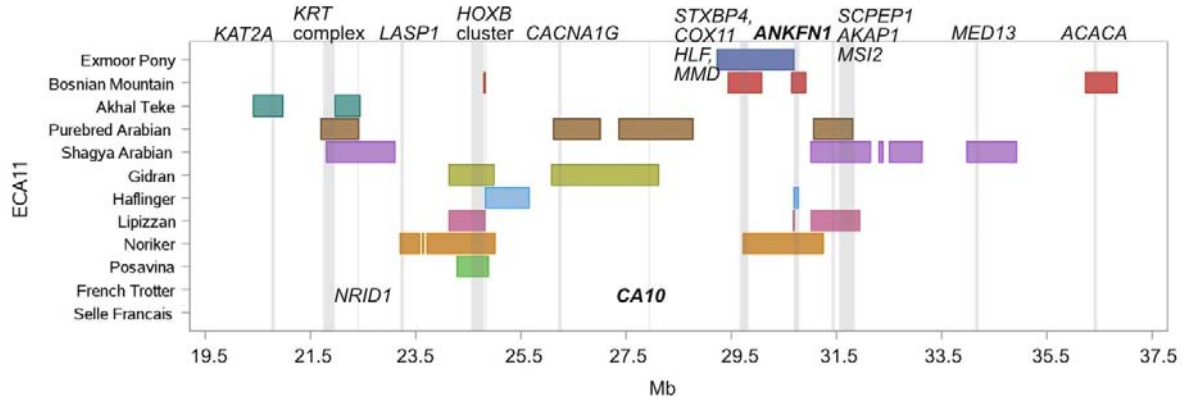


Abbildung 28: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA11 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d)

Beim Vollblutaraber und Shagya Araber überlappten die ROH Inseln in einer genomischen Region, in der mehrere Gene des KRT (Kreatin) Komplexes lokalisiert sind (Abb.28). Das Gen *LASP1* (LIM und SH3 Protein 1), das mit der Körpergröße beim Pferd assoziiert wurde (Makvandi-Nejad et al. (2012) war gemeinsam mit neun weiteren Genen in einer 235 kb langen ROH Insel beim Noriker präsent. Der Homeobox B Cluster (*HOXB*), eine Gengruppe mit fundamentaler Bedeutung für die embryonale Morphogenese (Pearson et al., 2006), war in einer bis zu 1.2 Mb langen ROH Insel beim Noriker, Posavina, Lipizzaner und Gidran anzutreffen (Abb.28). Die autochthonen Rassen (Exmoor Pony, Bosnisches Gebirgspferd und Noriker) teilten eine homozygote Region, in der die Gene *STXBP4* (syntaxin binding protein 4), *COX11* (cytochrome c oxidase copper chaperone *COX11*), *HLF* (HLF transcription factor), und *MMD* (monocyte to macrophage differentiation associated) lokalisiert sind. Die Homozygotie Region reichte beim Exmoor Pony und beim Noriker bis zum Gen *ANKFN1* (ankyrin repeat and fibronectin type III domain containing 1), welches beim Lipizzaner, Haflinger und dem bosnischen Gebirgspferd ebenfalls in einer ROH Insel lag (Abb.28). Die arabischen Pferderassen und der Lipizzaner hatten eine homozygote Region in der neben sechs weiteren Genen, die Gene *SCPEP1* (serine carboxypeptidase 1), *AKAP1* (A-kinase anchoring protein 1) und *MSI2* (musashi RNA binding protein 2) einschloss.

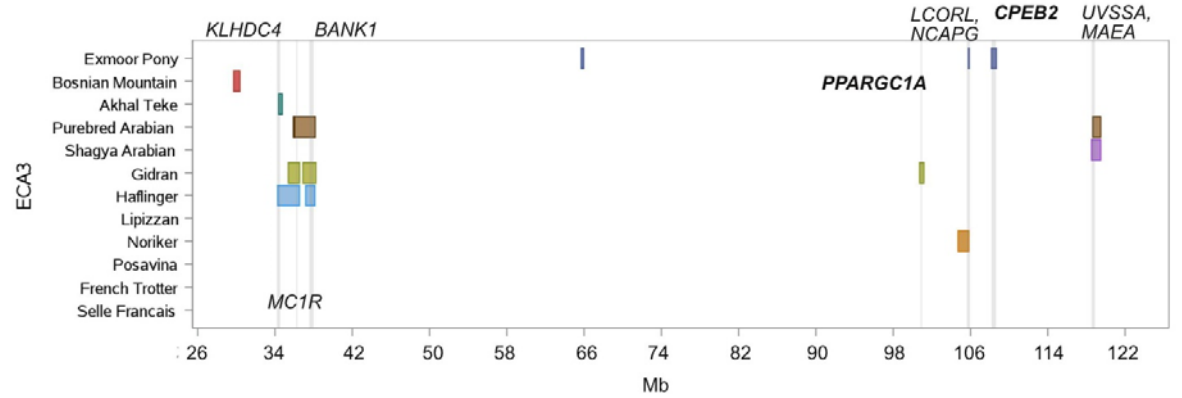


Abbildung 29: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA3 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d)

Eine weitere Akkumulation von ROH Inseln lag auf Chromosom 3 im Bereich der Gene *KLHDC4* (kelch domain containing 4), *MC1R* (melanocortin 1 receptor) and *BANK1* (B cell scaffold protein with ankyrin

repeats 1) and *UVSSA* (UV stimulated scaffold protein A) vor und trat bei orientalischen bzw. von orientalischen Pferden beeinflussten Rassen auf (Vollblut-und Shagya Araber, Haflinger und Achal Tekkiner) (Abb.29). Die längste Insel umschloss das Gen *MC1R* (Position 36.25-36.26 Mb) und war bis zu 2.2 Mb lang (Abb.29). Die beiden arabischen Rassen hatten ein Homozygotie Region um den *UVSSA* Locus (118.70-118.73 Mb). Im Bereich des *LCORL/NCAPG* Locus (ligand dependent nuclear receptor corepressor like / non-SMC condensin I complex subunit G), der mit Körpergröße assoziiert worden war, (Makvandi-Nejad et al., 2012), wiesen der Noriker und das Exmoor Pony eine ROH Insel auf. Beim Gidran wurde eine private Homozygotie Region auf ECA3 identifiziert, die mit dem Gen *PPARGC1A* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha).

ECA4 und ECA7 waren zwei Chromosomen, auf denen bei der orientalischen Gruppe und dem Selle Francais und Traber gehäuft ROH Inseln auftraten. Eine ausgeprägte Homozygotie Region wies der Französische Traber auf Chromosom 7 mit vier ROH Inseln, die insgesamt 10.1 Mb lang waren, auf (Abb.30).

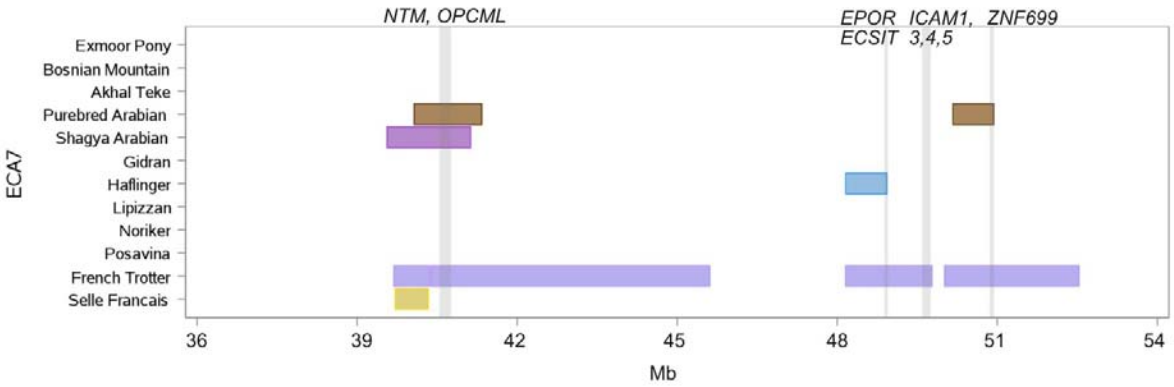


Abbildung 30: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA7 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d)

Bei der französischen Sportpferderasse Selle Francais wurden insgesamt lediglich fünf ROH Inseln identifiziert. Die Homozygotie Region auf ECA7 überlappte vollständig mit der des Trabers, sie war jedoch bei einer geringeren Anzahl von Pferden vorhanden. Lediglich ein schmales Segment, das die Gene NTM (neurotrimin) und OPCML (opioid-binding protein/cell adhesion molecule) beinhaltete, war bei mehr als 50% der Tiere der Stichprobe vorhanden (Abb.31).

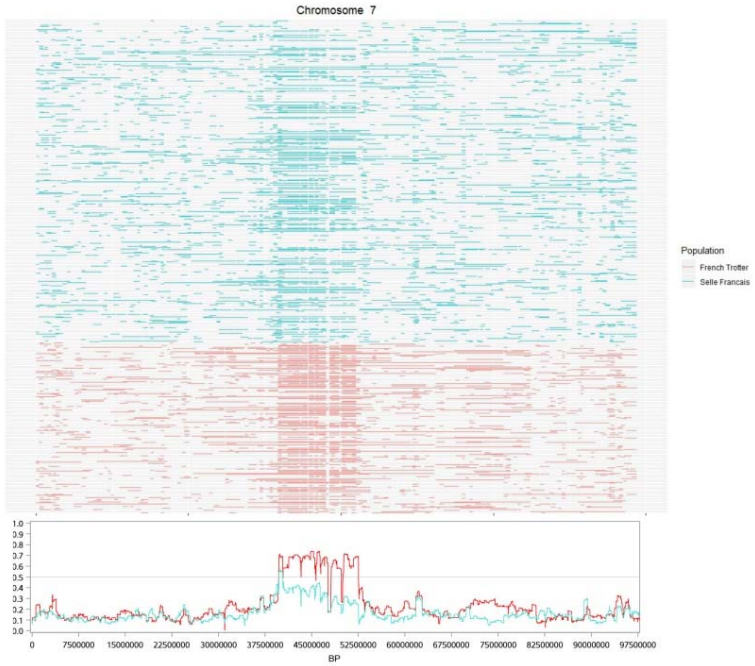


Abbildung 31: ROH Verteilung auf ECA7 in den Rassen French Trotter (rot) und Selle Francais (türkis). In der unteren Grafik wird die Überlappung der Homozygotie Regionen zwischen beiden Rassen veranschaulicht(aus Grilz-Seger et al., 2019d)

Von den 22 Roh Inseln, die beim Französischen Traber identifiziert wurde, waren 13 populationsspezifisch. Eine davon war umschloss das Gen *DMRT3* (doublesex and mab-3 related transcription factor 3) (Anhang 2), wobei eine Mutation in diesem Gen für die Fähigkeit des Passganges und des Tölts verantwortlich ist (Anderson et al., 2012).

Die autochthonen Pferderassen (Exmoor Pony, Noriker, Posavina und Bosnisches Gebirgspferd) hatten drei ROH Inseln auf drei verschiedenen Chromosomen gemeinsam. Außer der bereits genannten Insel auf ECA3 um das Gen *NCAPG* beim Noriker und Exmoor Pony (Abb.29) wurden überlappende Homozygotie Regionen um die Gene *STXBP4, COX11, HLF und MMD* beim Noriker, Exmoor Pony und Bosnisches Gebirgspferd identifiziert. Die dritte ROH Insel war auf ECA9 (75.0 Mb - 75.4 Mb) beim Noriker und Posavina vorhanden und umschloss das Gen *ZFAT* (zinc finger and AT-hook domain).

Die hohe genetische Distanz des Exmoor Pony zu den anderen untersuchten Rassen war auch im spezifischen ROH Insel Muster evident, indem 28 von 33 Inseln Rassen spezifisch waren. Die höchste Anzahl an privaten ROH Inseln wies das Exmoor Pony auf ECA22 auf, wo acht, insgesamt 4.7 Mb lange Homozygotie Regionen identifiziert wurden (Abb.32). Eine dieser Homozygotie Regionen beinhaltete das Gen ASIP (agouti-signaling-protein), welches für die braune Fellfarbe verantwortlich ist (Rieder et al., 2001).

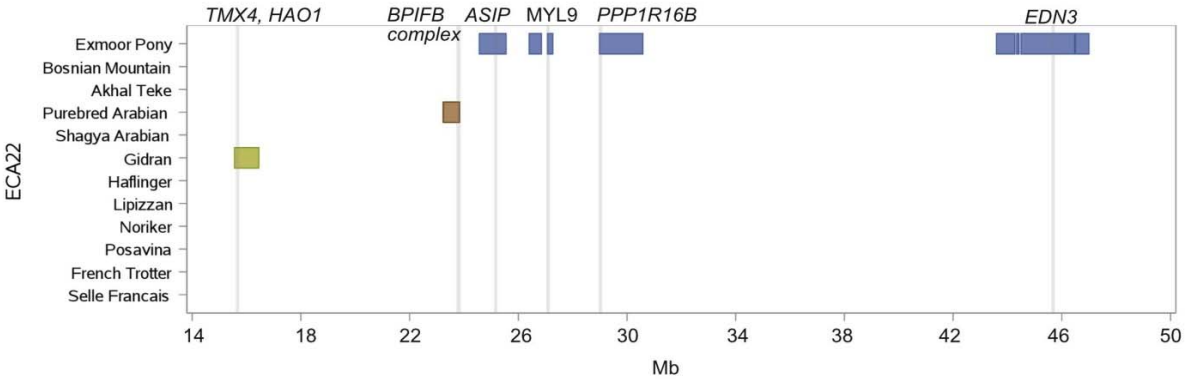


Abbildung 32: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA22 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d)

Außer den bereits besprochenen Chromosomen ECA3, ECA4, ECA7, ECA9 und ECA11, traten überlappende Homozygotie Regionen, die bei mindestens zwei der untersuchten Pferderassen präsent waren, auf sieben weiteren Chromosomen auf (ECA1, ECA6, ECA15, ECA18, ECA19, ECA23, ECA25). Der Achal Tekkiner teilte eine ROH Insel mit dem Bosnischen Gebirgspferd auf ECA1 (148.4 Mb - 148.1 Mb), in der ein singuläres Gen (EIF2AK4, eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4) lokalisiert war.

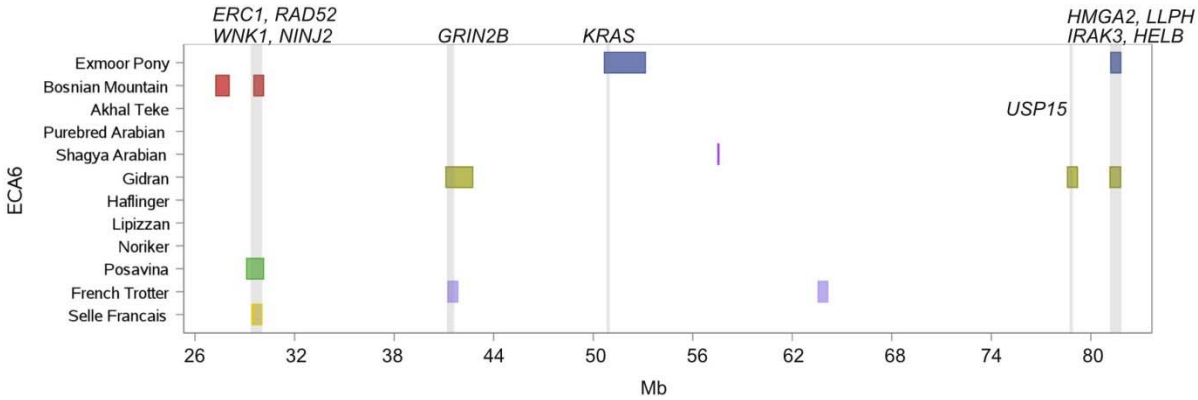


Abbildung 33: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA6 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d)

Auf ECA6 hatten der Posavina, das Bosnische Gebirgspferd und der Selle Francais eine Homozygotie Region, welche die Gene *ERC1* (ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1), *RAD52* (RAD52 homolog), *WNK1* (WNK lysine deficient protein kinase 1) and *NINJ2* (ninjurin 2) beinhaltete. Beim Gidran und beim Französischen Traber wurde eine ROH Insel um das Gen *GRIN2B* (glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B) ermittelt und das Exmoor Pony teilte eine Insel mit dem Gidran auf ECA6 im Bereich der Gene *HMGA2* (high mobility group AT-hook 2), *LLPH* (LLP homolog, long-term synaptic facilitation factor), *IRAK3* (interleukin 1 receptor associated kinase 3) and *HELB* (DNA helicase B) (Abb.33).

Der Gidran und der Shagya Araber teilten eine Homozygotie Region am Chromosom 18, in der die Gene SSB (small RNA binding exonuclease protection factor La), *METTL5* (methyltransferase like 5), UBR3 (ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3), und *MYO3B* (myosin IIIB) lokalisiert sind. Weiter lagen die Gene *RALB* (Ras-like G-protein) und *INHBB* (Inhibin subunit beta B) in einer Homozygotie Region beim Bosnischen Gebirgspferd und Vollblutaraber (Abb.34).

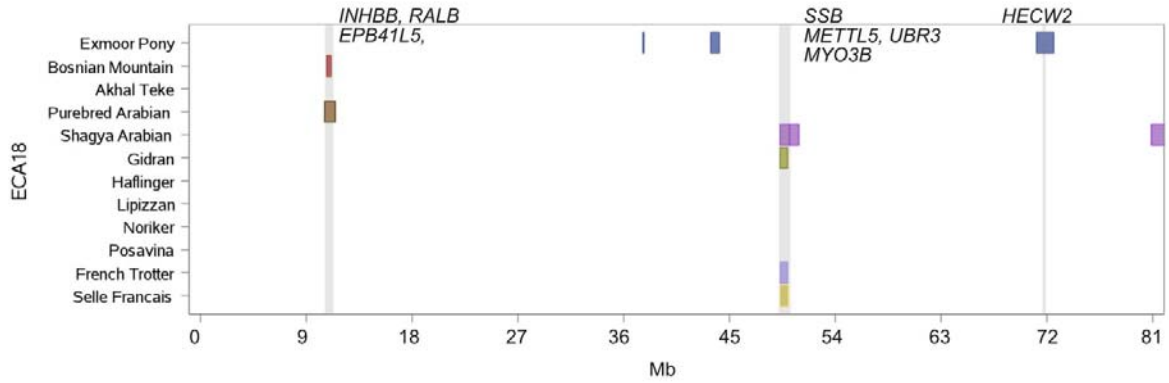


Abbildung 34: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA18 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d)

9.3.1.1 GENOTYPFREQUENZ DER MIT KÖRPERGRÖßE UND FELLFARBE ASSOZIERTEN SNPS

In sechs der untersuchten Pferdrassen ist die Zucht spezieller Fellfarben explizit im Zuchtziel verankert: Gidran und Haflinger werden ausschließlich als Füchse gezüchtet, beim Exmoor Pony stellt die braune Fellfarbe in Kombination mit einem Mehlmaul das erwünschte Zuchtziel dar. Der Lipizzaner wird seit 150 Jahren auf die Schimmelfarbe selektiert und beim Noriker ist die Erhaltung der sechs Fellfarben (Braun, Fuchs, Rappe, Tiger, Mohrenkopf und Schecke) ein fixer Bestandteil des Zuchtprogrammes.

Der Haflinger, Gidran und der Vollblutaraber wiesen eine ROH Insel um den *MC1R* Locus auf. In Tabelle 28 ist die Genotypenfrequenz des SNPs im *MC1R* Gen, das für die Fuchsfarbe verantwortlich ist angegeben.

TABELLE 28: GENOTYPENVERTEILUNG AM *MC1R* LOCUS (*T/T* = FUCHS; *T/C* OR *C/C* = KEIN FUCHS)

MC1R	***T/T***	***T/C***	***C/C***
Gidran	20	0	0
Haflinger	78	0	0
Vollblut Araber	91	53	11
Selle Francais	94	143	57
French Trotter	35	74	46
Posavina	6	9	13
Noriker	36	36	102
Bosnisches Gebirgspferd	2	11	10
Shagya Araber	1	9	22
Achal-Tekkiner	7	14	14
Lipizzaner	4	36	337
Exmoor Pony	0	1	103

Alle untersuchten Rassen, bei denen der Großteil der Pferde fuchsfarben waren, hatten eine zusätzliche stufenweise aufgebaute Homozygotie Region auf ECA3 (Abb.35). Die Kernregion beinhaltete die Gene *NFKB1* (Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit), *SLC39A8* (solute carrier family 39 member 8) und *BANK1* und erreichte beim Gidran eine Frequenz von 95%. Zusätzlich wurde beim Gidran eine ROH Insel um den *STX17* Locus auf ECA26 identifiziert, wobei eine Duplikation im *STX17* ist für die Schimmelfarbe verantwortlich (Pielberg et al., 2008). Dieses homozygote Segment war 403.5 kb lang und beinhaltete die Gene *STX17*, *NR4A3*, *ERP44* und *INVS*.

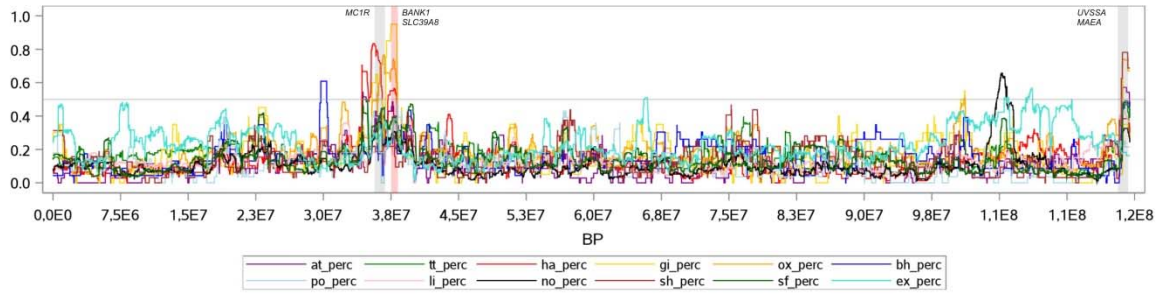


Abbildung 35: Verteilung der Homozygotie Regionen am Chromosom 3. Die Gene MC1R, BANK, SLC39A8, UVSSA, MAEA sind durch vertikale Balken hervorgehoben. Die einzelnen Linien des Plots geben die Frequenz der Tiere mit einer ROH Insel pro Rasse wieder, die Farben entsprechen folgenden Rassen : Achal-Tekkiner - purple; French Trotter - grün; Haflinger - rot; Gidran - gelb; Vollblut Araber - orange; Bosnisches Gebirgspferd - blau; Posavina - hellblau; Lipizzaner - pink; Noriker - schwarz; Shagya Araber - braun; Selle Francais - dunkelgrün; Exmoor Pony - türkis.

Ausschließlich beim Exmoor Pony wurde eine Homozygotie Region um den *ASIP* Locus identifiziert. Das Exmoor Pony wies zusätzlich eine private ROH Insel auf ECA1 auf, welche die Gene *OCA2* und *HERC2* umschloss. *OCA2/HERC2* wurden beim Menschen mit der Pigmentierung der Iris (blaue, grüne und braune Augenfarbe), einer Aufhellung der Haut und der Haare assoziiert (Donnely et al., 2012).

Die Größe stellt neben der Fellfarbe ein weiteres zentrales Selektionskriterium in einigen der untersuchten Pferderassen dar. Der ROH Insel Scan ergab mehrere Homozygotie Regionen in Bereichen von mit Körpergröße assoziierten Loci (*LCORL/NCAPG*, *ZFAT*, *LASP1* und *HMGA2*) bzw. mit Widerristhöhe assoziierten SNPs um das Gen *ZFAT* (Makvandi-Nejad et al., 2012; Signer-Hasler et al., 2012).

TABELLE 29: MIT KÖRPERGRÖßE ASSOZIIERTE SNPS AUF DEN MIT KÖRPERGRÖßE ASSOZIIERTEN LOCI *LCORL/NCAPG, ZFAT* AND *LASP1* UND GENOTYP FREQUENZEN BEIM BOSNISCHEN GEBIRGSPFERD (N=23; MITTLERES STOCKMAß = 130 - 142 CM; MITTLERES BIS HOHES KALIBER) UND BEIM EXMOOR PONY (EXMOOR PONY N=104; MITTLERES STOCKMAß = 117 – 130 CM; MITTLERES KALIBER) (N.S.=NICHT SIGNIFIKANT).

Bosnisches Gebirgspferd						
Chr.	SNP		Position	Genotypen Frequenz	HWE p-Wert	Major Allel
3	AX-103666681	*LCORL/NCAPG*	105,547.002	1/5/17	n.s.	T (klein)
9	AX-103185455	*ZFAT*	75,550.059	0/3/20	n.s.	C (klein)
11	AX-104097126	*LASP1*	23,259.732	1/9/13	n.s.	G (klein)
Exmoor Pony						
Chr.	SNP		Position	Genotypen Frequenz	HWE p-Wert	Major Allel
3	AX-103666681	*LCORL/NCAPG*	105,547.002	0/0/104	n.s.	T (klein)
9	AX-103185455	*ZFAT*	75,550.059	2/6/96	0.014	C (klein)
11	AX-104097126	*LASP1*	23,259.732	23/53/28	n.s.	A (groß)

ROH Inseln auf den *LCORL/NCAPG, ZFAT* und *LASP1* Loci waren beim Noriker vorhanden, das Posavina hatte eine Insel um das Gen ZFAT und das Exmoor Pony um die Gene *LCORL/NCAPG* und *HMGA2*. Aus einer vorangegangenen Studie (Grilz-Seger et al., 2019b) war bekannt, dass der Großteil der untersuchten Noriker homozygot für die “Großallele” auf den SNPs um die Loci *LCORCL/NCAPG*, *ZFAT* und *LASP1* war, während das Posavina eine höhere Frequenz des „Kleinallels“ am *LCORCL/NCAPG* Locus aufwies. Die Extraktion der drei mit Körpergröße assoziierten SNPs beim Exmoor Pony und beim Bosnischen Gebirgspferd zeigte, dass das Exmoor Pony fixiert auf das „Kleinallel“ am *LCORCL/NCAG* Locus war und 92% waren homozygot am „Kleinallel“ am *ZFAT* Locus. Der Großteil der untersuchten Bosnischen

Gebirgspferde (57% bis 87%) war homozygot für die „Kleinallele“ auf allen drei Loci (Tab.29). Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde beim Exmoor Pony am *ZFAT* Locus (p>0.014) und deutet auf einem andauernden Selektionsdruck in Richtung kleiner Körpergröße bei dieser Rasse hin.

9.3.2 GENE ONTOLOGIE UND ANREICHERUNGANALYSE

Hohe Signifikanz Level (Bonferroni korrigierter p-Wert<0.05) wurde für die GO Termini anterior/posterior pattern specification (GO:0009952), embryonic skeletal system morphogenesis (GO:0048704) und sequence-specific DNA binding (GO:0043565) bei den Rassen Gidran, Lipizzaner, Posavina und Noriker festgestellt. Beim Vollblut- und Shagya Araber ergab die GO Analyse den Terminus intermediate filament (GO:0005882), der auf mehreren Genen des Kreatin (KRT) Komplexes beruhte (Tab.30).

TABELLE 30: GENE ONTOLOGIE TERMINI AND KEGG SIGNALWEGE, DIE BEI MEHR ALS EINER RASSE ANZUTREFFEN WAREN (BHP-WERT = BONFERRONI KORREGIERTER P-WERT).

GO Term	Rassen	p -Wert	Gene	BH p-Wert
GO:0009952~anterior/posterior pattern specification	Lipizzaner/ Posavina/ Gidran	0.000	*HOXB3, HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	<=0.001
	Noriker	0.000	*HOXB3, HOXB1, PCGF2, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	
GO:0021570~rhombomere 4 development	Lipizzaner/ Posavina/ Noriker/Gidran	0.003	*HOXB1, HOXB2*	0.06 – 0.99
GO:0021612~facial nerve structural organization	Lipizzaner/ Posavina/ Noriker/Gidran	0.011	*HOXB1, HOXB2*	0.18 – 0.98
GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis	Lipizzaner/ Posavina/ Gidran	0.000	*HOXB3, HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	<0.001
	Noriker	0.000	*HOXB3, HOXB1, PCGF2, HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB5, HOXB6*	
GO:0071222~cellular response to lipopolysaccharide	Achal-Tekkiner	0.034	*IL6, NR1D1, RARA*	0.99
	Vollblut Araber	0.011	*NR1D1, NFKB1, RARA, SPON2*	
GO Zellkomponente	**Rassen**	**p-Wert**	**Gene**	**BH p-value**
GO:0005654~nucleoplasm	Achal-Tekkiner	0.010	*COASY, CDC6, HSD17B1, BBX, ACLY, BANP, CNP, STAT3, SMARCE1, ZMIZ2, DNAJC7, ATP6V0A1, TOP2A*	0.36 – 0.57
	Noriker	0.010	*CWC25, MRPL10, HOXB7, PSMB3, SNF8, PNPO, HOXB13, KPNB1, PIP4K2B*	
GO:0005882~intermediate filament	Shagya Araber	0.002	*KRT26, KRT25, KRT28, KRT27, KRT24*	<0.001 – 0.02
	Vollblut Araber	0.000	*KRT26, KRT25, KRT28, KRT27, KRT12, KRT20, KRT23, KRT24*	
GO Molekulare Funktion	**Rassen**	**p-Wert**	**Gene**	**BH p-Wert**
GO:0003700~transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	Gidran	0.033	*HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB6, NFKB1, CBFA2T3, TCF25, FOXP2*	0.11 - 0.99
	Lipizzaner/	0.007	*HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB6*	

GO Term	Rassen	p -Wert	Gene	BH p-Wert
	Posavina			
	Noriker	0.012	*HOXB2, HOXB7, HOXB8, HOXB6, ZFAT*	
GO:0005198~structural molecule activity	Shagya Araber	0.032	*KRT26, KRT25, KRT28, KRT27, EPB41, KRT24*	0.02 – 0.99
	Vollblut Araber	0.000	*KRT26, KRT25, KRT28, KRT27, KRT12, KRT20, KRT23, KRT24*	
GO:0015299~solute:proton antiporter activity	Vollblut Araber /Gidran	0.044	*SLC9B1, SLC9B2*	0.99
GO:0043565~sequence-specific DNA binding	Gidran	0.019	*HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB6, HOXB13, PPARGC1A, FOXP2*	0.007 - 0.92
	Lipizzaner/ Posavina/ Noriker	0.000	*HOXB1, HOXB2, HOXB7, HOXB6, HOXB13*	

Lediglich zwei rassenspezifische Termini waren signifikant ($p<0.05$) nach Korrektur auf multiplen Niveau. Beim Französischen Traber wurde der Terminus GO :0005178, integrin binding, basierend auf den Genen *ICAM1, ICAM4, ICAM5 und ICAM3*, und beim Vollblut Araber der Terminus GO:0005198, structural molecule activity, basierend auf dem Kreatin Komplex, ermittelt.

9.4 DISKUSSION

Die große ökonomische Bedeutung und die Stellung des Englischen Vollbluts als Veredler führte in den letzten Jahrzehnten zu einer intensiven wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit dieser Pferderasse, die sich in zahlreichen Publikationen niederschlug (Gu et.al., 2009). Für die meisten Pferderassen, die im Rahmen der österreichisch- ungarischen Monarchie entstanden sind, ist der Einfluss des Englischen Vollblutes nicht nachweisbar, die Rolle des Veredlers kam hier dem Shagya-Araber zu. Von den in dieser Studie untersuchten Pferderassen ist bei neun (Vollblutaraber, Shagya-Araber, Achal-Tekkiner, Haflinger, Noriker, Lipizzaner, Bosnisches Gebirgspferd, Posavina, Exmoor Pony) kein Einfluss des Englisches Vollblutes dokumentiert, diese Ausgangslage wurde durch ein divergentes ROH Muster auf genomischer Ebenen bestätigt. ROH Inseln traten bei allen analysierten Pferderassen, mit Ausnahme des Französischen Trabers und des Selle Francais, gehäuft auf ECA3 und ECA11 auf und beinhalteten Gene, welche die Fellfarbe (ECA3: *MC1R*), die Größe (ECA3: *LCORL/NCAPG*, ECA11: *LASP1*), Nukletidexzisionsreparatur (ECA3: *UVSSA*), die embryonale Skelettentwicklung (ECA11: *HOXB*-cluster) und Haarstruktur (ECA11: *KRT*-Komplex) beeinflussen. Gurgul et al. (2019) wies bei sechs polnischen Pferderassen ebenfalls eine Akkumulation von Selektionssignaturen auf ECA11 nach. Die Ergebnisse dieser Publikation (Gurgul et al., 2019) eignen sich durch die ähnliche Typzusammensetzung der analysierten Rassen (zwei Kaltblutpferderassen, zwei Primitivpferderassen, zwei Orientalische- und eine Warmblutpferderasse) als Vergleich. Die Autoren identifizierten Selektionssignaturen, indem sie die Rassen drei Hauptkategorien zuteilten (leichter, schwerer und primitiver Typ). Selektionssignaturen wurden bei den Kategorien schwer versus primitiv auf ECA11 um den *LASP1* Locus gefunden. Die Selektionssignatur am *LASP1* Locus, der mit der Körpergröße beim Pferd assoziiert ist (Makvandi-Nejad et al., 2012), wurde auch beim Noriker nachgewiesen.

Nolte et al. (2019) fanden Selektionssignaturen auf ECA11 für den *HOXB*-cluster in vier deutschen Sportpferderassen (Hannoveraner, Holsteiner, Oldenburger und Trakehner). ROH Inseln im Bereich des HOXB-cluster wurden beim Lipizzaner, Noriker, Posavina und Gidran vorgefunden und die GO Analyse ergab die Termini embryonic skeletal morphogenesis und anterior/posterior pattern Spezifikation in allen vier Rassen (vgl. Kap. 7) Ebenfalls auf dem Chromosom 11 wurde eine bis zu 1.3 Mb lange ROH Insel um den *KRT*- Komplex (*KRT* 12, 20, 23-28) bei den arabischen Rassen und den Achal Tekkiner identifiziert. Die Go Analyse ergab den Terminus hair follicle morphogenesis und intermediate filament. *KRT25* und *SP6*

wurden von Thomer et al. (2018) mit dem “curly“ (gelocktem) Deck- und Langhaar beim Bashkir Curly und Missouri Foxtrotter assoziiert.

Die Fellfarbe war nicht nur ein zentrales Selektionsmerkmal während des Domestikationsprozesses (Ludwig et al., 2009), sie ist auch ein zentrales Selektionskriterium in fünf der untersuchten Pferderassen (Lipizzaner, Haflinger, Gidran, Exmoor Pony und Noriker) und es wurden Selektionssignale um mehrere Farbloci identifiziert. Am Chromosom 3 wurde eine bis zu 2.5 Mb lange ROH Insel um das *MC1R* Gen, das für die Fuchsfarbe verantwortlich ist, beim Gidran, Haflinger und Vollblutaraber nachgewiesen, gleichzeitig traten bei Füchsen homozygote Regionen um die Gene *NFKB1, SLC39A8, BANK1, UVSSA* und *MAEA* bei den Füchsen auf. Diese Gene könnten eine Rolle für die in der Literatur angegebene größere Anfälligkeit von Füchsen für Hauterkrankungen spielen (Bellone et al., 2017). Zusätzlich wurde in der Gidran Stichprobe eine homozygote Region um den *STX17* Locus nachgewiesen, wobei eine Duplikation im *STX17* Gen für die Schimmelfarbe verantwortlich ist (Pielberg et al., 2008). Die ROH Insel umfasste die Gene *NR4A3, STX17, ERP44* und *INVS* und entsprach dem beim Lipizzaner identifizierten Haplotyp (Grilz-Seger et al., 2019). Der Nachweis des „Schimmel-Haplotyp“ bei nicht Schimmel farbenen Pferden wurde erstmals von Pielberg et al. (2005, 2008) bei orientalischen Pferderassen erbracht. Diese Resultate sprechen für einen Zusammenhang zwischen dem Grau-Locus und dem orientalischen Genpool.

Beim Exmoor Pony wurde weitere ROH Inseln im Bereich von Farbgenen nachgewiesen. Die Pferde der Stichprobe hatten eine homozygote Region um den *ASIP* Locus, verantwortlich für die braune Fellfärbung, und ein ROH Insel um die Gene *OCA2* und *HERC2*. Mehrere SNPs in den Genen *OCA2* und *HERC2* wurden mit Unterschieden in der Pigmentierung der Haut der Haut, der Iris und des Haares beim Menschen assoziiert (Sahela et al., 2016; Branicki et al., 2009). Fernández et al. erbrachte den Nachweis, dass sich *OCA2* auf die Färbung der Haut bei roten Zweig des Iberischen Schweines auswirkt. Weiter OCA2 und HERC2 als Kandidaten Gene für das sogenannte „Tigerauge“ vorgeschlagen (Kowalski und Bellone, 2011), diese Hypothese konnte nicht verifiziert werden. Unserem Wissen nach wurde OCA2/HERC2 bislang noch nicht als Ursache für den „mealy Phänotyp untersucht. Diese Fellfärbung, die mit Aufhellungen der Grundfarbe im Bereich des Bauchs, des Maules und der Augenumgebung einhergeht und beim Exmoor Pony ein Rassenmerkmal ist, wurde mit dem EDN3 Locus assoziiert (Jäderkvist Fegraeus et al., 2018). Nachdem eine ROH-Insel um den EDN3 Locus auch beim ungarischen Lipizzaner (Grilz-Seger et al., 2019), bei dem der mealy Phänotyp nicht vorkommt, nachgewiesen wurde, sind weitere Untersuchungen auf Basis von Phänotyp Daten für die Abklärung erforderlich.

Eine weitere Akkumulierung von homozygoten Regionen wurde bei den Orientalischen- und Sportpferderassen auf ECA4 und ECA7 nachgewiesen. Der Französische Traber wies eine ROH Insel um das *DMRT3* Gen auf, bei dem eine Mutation für die Fähigkeit zu alterierenden Gängen (Pass und Tölt) verantwortlich ist (Anderson et al., 2012). Weitere SNPs wurden auch mit der Alter abhängigen Rennleistung assoziiert (Ricard et al., 2015).

Zusammenfassend wurden in dieser Studie unter anderem Selektionssignaturen für Farbloci beim Vollblutaraber, Haflinger, Gidran (*MC1R*), beim Lipizzaner und Gidran (*STX17*) und beim Exmoor Pony (ASIP) gefunden. Selektion auf mit Körpergröße assoziierte Loci wurden bei Kaltblutpferden (Noriker (*LCORL/NCAGP*, *ZFAT* und *LASP1* Posavina (*ZFAT*)), Exmoor Pony (*LCORL/NCAGP* und *HMGA2*) und Gidran (*HMGA2*) identifiziert. Selektion auf Exterieurmerkmale lagen mit dem *HOXB*-Cluster bei vier Rassen vor (Lipizzaner, Noriker, Posavina und Gidran). Gene (*CALCOCO2*, *RALB* und *LAPTM4B*), die eine Rolle bei der Autophagie spielen, lagen beim Noriker, Vollblutaraber, Gidran und Bosnischen Gebirgspferd in überlappenden Homozygotie Regionen vor.

10 PEDIGREE UND INZUCHT ANALYSE BEIM ÖSTERREICHISCH-UNGARISCHEN BAROCKESEL

10.1 EINLEITUNG

Mit geschätzten 44 Millionen Tieren zählt der Esel auch heute noch weltweit zu den wichtigsten Arbeitstieren (Starkey and Starkey, 2000). Trotz seiner enormen wirtschaftlichen Bedeutung ist das Interesse der Wissenschaft an dieser Equidenart im Vergleich zum Pferd gering. Während beim Pferd zahlreiche Studien zu Domestikationsprozessen und deren Auswirkungen auf das Genom am aktuellen Stand der Technik vorliegen, fehlen vergleichbare Arbeiten für den Esel, der hauptsächlich als sogenannte „Outgroup“ zum Zwecke der Eichung der genetischen Pferdephylogenien verwendet wurde. Vom Esel, der sich vor ca. 4.5 Mio. Jahren vom gemeinsamen Entwicklungszweig mit dem Pferd abspaltete, nimmt man an, dass er vor ca. 5.000 Jahren in Ägypten domestiziert worden ist (Kimura et al., 2011). In zwei älteren Studien, die auf der Analyse mitochondrialer DNA basierten, wurden zwei Domestikationsereignisse jeweils in Somalien und Nubien angenommen (Rossel, 2008; Beja-Pereira et al., 2004). Bis zur vollständigen Mechanisierung der Landwirtschaft war der Esel in den südeuropäischen Ländern das wichtigste landwirtschaftliche Arbeitstier. Auch wenn seitdem viele Populationen bis zum Rande des Aussterbens gedrängt wurden, gibt es dennoch bis zu 55 Eselrassen bzw. Varianten in Europa. Als Vorarbeiten für Erhaltungszuchtprogramme wurden bislang eine Reihe von Mikrosatelliten basierenden Diversitätsstudien einzelner Populationen vor allem in Italien, Spanien und Frankreich durchgeführt. So wurde beispielsweise die französische Eselrasse Baudet du Poitou von Bellone et al. (1998), der Katalonische Esel von Jordana et al. (1999, 2001) und mehrere spanische Eselrassen von Aranguren-Mendez et al. (2001, 2002) untersucht. Italienische Forschergruppen beschäftigten sich besonders intensiv mit dem Esel, und veröffentlichten zwischen 2001 bis 2014 sieben Studien zur genetischen Diversität, die sich acht der insgesamt 15 in Italien gezüchteten Eselrassen widmeten (Cossedu et al., 2001; Guastella et al., 2007; Ciampollini et al., 2007; Bordonaro et al., 2012; Colli et al., 2012; Matassino et al., 2014).

Die vollständige Sequenzierung des Pferdegenoms im Jahre 2006 stellte einen Meilenstein dar, insofern als erstmals ein Referenzgenom vorlag (Chowdhary and Raudsepp, 2006), auf dessen Basis genomweite hochdichte SNP Genotypisierungs-Arrays entwickelt wurden (McCue et al., 2012). Mit diesen SNP Chips eröffneten sich neue Möglichkeiten um Genomweite Assoziationsanalysen (GWAS) und Selektionssignatur-Studien in den einzelnen Rassen und Populationen durchzuführen. Beim Esel ist das Genom bis dato noch nicht vollständig entschlüsselt, es liegt noch kein Eselreferenzgenom vor, sondern lediglich sogenannte scaffolds – einzelne kürzere Sequenzstücke ohne genaue Struktur der chromosomalen Abfolge. Renaud et al. (2018) erarbeiteten das bislang vollständigste Arbeits-Assembly, basierend auf dem Esel „Willy“, welches 9021 scaffolds beinhaltet, wobei das längste gelesene Stück lediglich 84.Mb betrug (2.4 Gb bei Twighlight). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals die Populationsstruktur des weißen österreichisch-ungarischen Barockesels anhand von Pedigreedaten zu untersuchen. Zusätzlich wurde eine zehn Tiere umfassende Stichprobe versuchsweise mittels des Equinen 670k Affymetrix Genotypisierungs Arrays genotypisiert.

10.1.1 MATERIAL UND METHODE

Der Datenbankauszug der österreichischen Eselpopulation umfasste 390 tierindividuelle Datensätze. Jeder dieser Datensätze beinhaltet neben Namen, die Lebensnummern des Tieres, Vater und Mutter, das Geschlecht, das Geburtsjahr und die Fellfarbe. Dieser Pedigree wurde verwendet, um folgende Kennzahlen für die genetische Diversität zu berechnen: Inzuchtkoeffizienten, effektive Anzahl von Gründertieren fe, Anzahl Ahnen/Gründer die 50% des Genpools erklären (nA50). Als Gründertiere sind jene Tiere definiert, deren Vorfahren (ein oder beide Elternteile) nicht ermittelt werden können. Die effektive Anzahl von

Gründern (fe) bezeichnet jene Zahl von Gründern, die bei ausgeglichenen genetischen Beiträgen zur aktuellen Population dieselbe genetische Diversität erwarten lassen, wie sie in den Referenzpopulationen gemessen wird (Boichard et al.,1997). Die Pedigree-Analysen wurden mit dem Computerprogramm ENDOG 4.6 (Gutierrez und Goyache, 2005), die deskriptive Statistik und das Prozessieren der Pedigree-Daten wurden mit dem Software Paket SAS (2009) durchgeführt, wobei die Prozeduren proc sql und die einzelnen Datenstep-Funktionen für die Rohdatenbearbeitung und proc means und proc freq für die Berechnung von Mittelwerten und Häufigkeiten verwendet wurden.

10.1.2 ERGEBNISSE

Der Pedigree Auszug der Zuchtdatenbank beinhaltete 390 Tierdatensätze. Davon waren 146 Hengste 217 Stuten und 26 Wallache. Die Pedigreelänge betrug durchschnittlich 1.51 Generationen (Min. 0, Max. 6) mit einem Generationsaequivalent von 1.13 vollen Generationen. Von 116 Tieren war keine Abstammung bekannt. Ohne Abstammungslose Tiere ergab sich eine durchschnittliche Pedigreelänge von 2.15 Generationen und ein Generationsequivalent von 1.61 vollen Generationen. Von den insgesamt 390 Tieren waren 133 Tiere Gründer, wobei lediglich 68 Gründertiere genetische Beiträge zur aktuellen lebenden Population von 257 Eseln lieferten. Die effektive Anzahl an Gründertieren ergab 25 Tiere, wobei 17 Gründer bzw. 10 Ahnen 50% des Genpools erklärten. Die Inzucht der insgesamt 43 ingezüchteten Tiere lag durchschnittlich bei 21.3% und variierte von 10.9% bis 37.5%. Von 204 Tieren konnte aufgrund fehlender Pedigrees (< 1 Generation Abstammungsaufzeichnung) kein Inzuchtkoeffizient geschätzt werden.

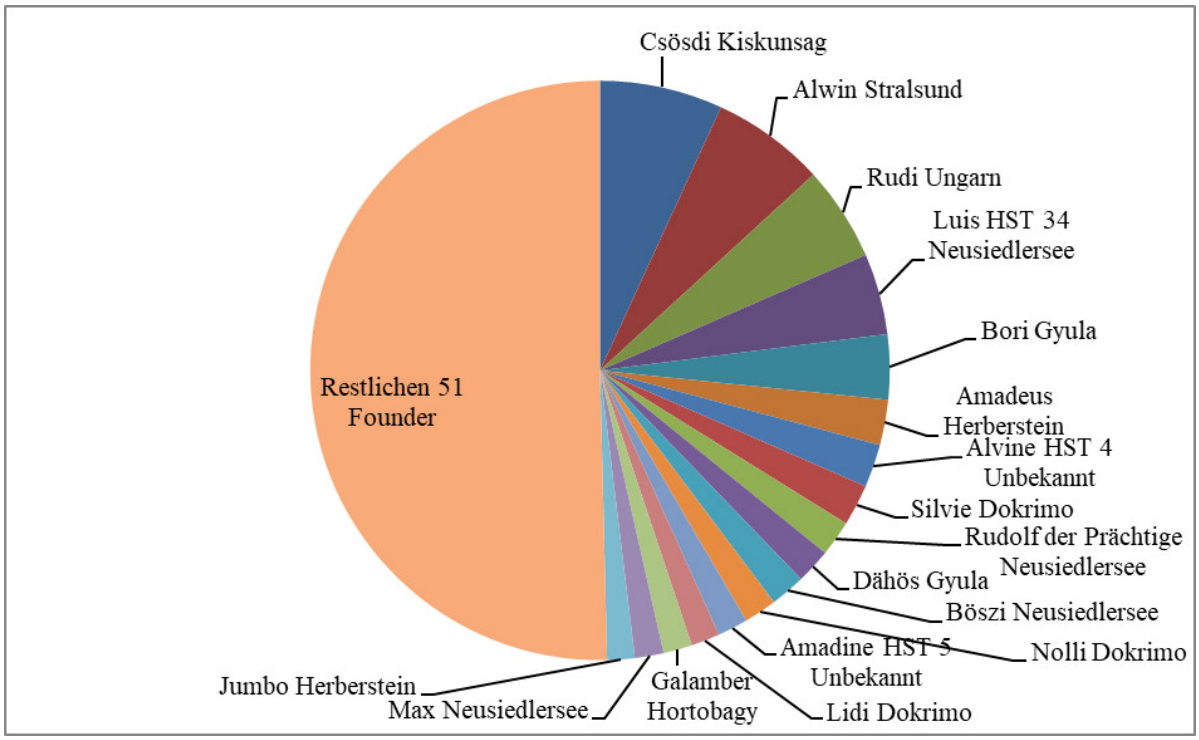


Abbildung 36: Die wichtigsten Gründertiere des Barockesels die 50% des Genpools bestimmen

In Abbildung 36 sind die Genanteile der 17 wichtigsten Gründertiere, die 50 Prozent des Genpools des österreichisch-ungarischen Barockesels bestimmen, dargestellt. Viele dieser Gründer sind gleichzeitig auch die wichtigsten Zuchttiere (Ahnen), wobei in beiden Fällen folgende fünf Eselhengste die bedeutendsten sind: Csöszdi Kiskunsag mit 9.8% Genanteil, Alwin Stralsund mit 8.9%, Didi Neusiedlersee mit 8.0 %, Luis HST 34 Neusiedlersee mit 6.5% und Rudi Ungarn mit 3.7% (Abb.36 und Tab.31).

TABELLE 31: DIE WICHTIGSTEN ZUCHTTIERE BEIM BAROCKESEL, DIE ZUSAMMEN 50% DES GENPOOLS BESTIMMEN; UB.=UNBEKANNT.

Name	Geschlecht	Geburtsjahr	Genanteil	Abstammung
Csöszdi Kiskunsag	H	1994	9,82%	ub.
Alwin Stralsund	H	1990	8,89%	ub.
Didi Neusiedlersee	H	2001	7,98%	ub.
Luis HST 34 Neusiedlersee	H	2000	6,47%	ub.
Rudi Ungarn	H	1998	3,65%	ub.
Amadeus Herberstein	H	1990	3,45%	ub.
Alvine HST 4 Unbekannt	S	1987	3,18%	ub.
Silvie Dokrimo	S	1993	2,92%	ub.
Rudolf der Prächtige Neusiedlersee	H	1997	2,63%	ub.
Dähös Gyula	S	1992	2,58%	ub.

In Abbildung 37 wird die durchschnittliche Verwandtschaft aller Esel mit der Gesamtpopulation geordnet nach Geburtsjahren dargestellt. Aus diesen Berechnungen ergeben sich innerhalb der wichtigsten Zuchttiere (blau markiert) zwei Gruppen: 1) eine Gruppe bestehend aus fünf Zuchttieren, die eine niedrige Verwandtschaft (bis zu 0.025) aufweisen (Tiere: Amadeus Herberstein, Alvine HST 4 Unbekannt, Silvie Dokrimo, Rudolf der Prächtige Neusiedlersee, Dähös Gyula) und 2) einem Cluster aus fünf Tieren mit einem hohen Verwandtschaftsgrad zur Population (0.045 bis 0.070).

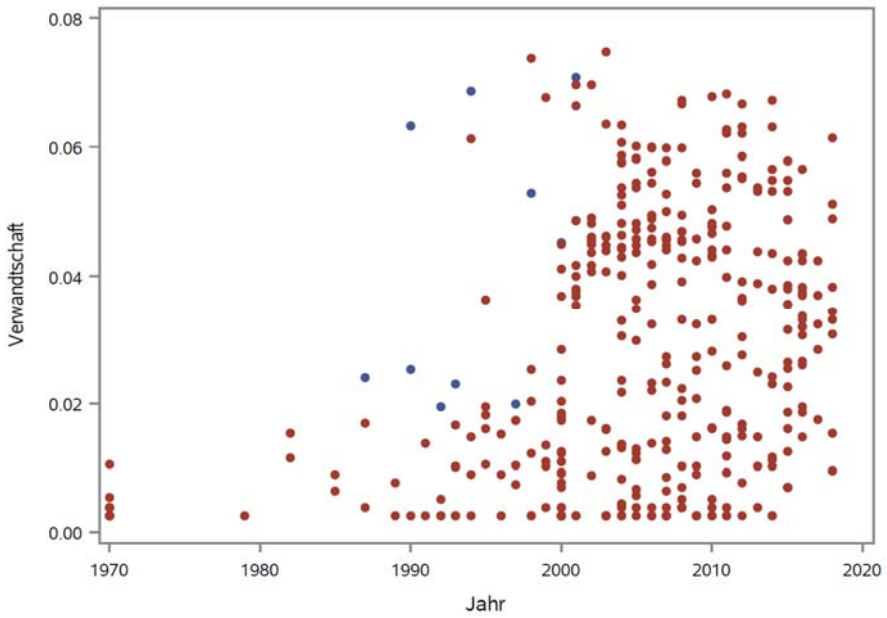


Abbildung 37: Durchschnittliche Verwandtschaft einzelner Zuchttiere mit der gesamten Population entlang der Zeitachse definiert durch das Geburtsjahr (blaue Markierung heben die wichtigsten Zuchttiere hervor).

Die effektiven Populationsgrößen in der österreichisch-ungarischen Barockeselpopulation variierten zwischen 25 (effektive Anzahl an Gründertieren/Ahnen), bzw. zwischen 18.07 und 19.18 (effektive Populationsgröße abgeleitet von der Inzuchtsteigerung pro Generation). Das Generationsintervall lag bei 8.31 Jahren mit einem Standardfehler von +- 0.47.

10.1.3 DISKUSSION

Es liegen für den Großteil der erfassten Esel bis dato nur kurze Pedigrees vor. Für jene Tiere, die über einen höheren Vollständigkeitsgrad der Aufzeichnungen verfügen, wurden hohe bis sehr hohe Inzuchtkoeffizienten, die von 10.9% bis 37.5% reichten, ermittelt. Um einer weiteren Inzuchtsteigerung entgegenzuwirken, wäre die Etablierung von Eselhengst-Genealogien empfehlenswert. Damit diese

Systematik für die einzelnen Züchter leicht nachvollziehbar ist, und die Hengstauswahl dadurch erleichtert ist, empfiehlt sich die Etablierung einer Nomenklatur, wie sie bei den traditionellen österreichischen Pferderassen angewandt wird. Entweder können alle Hengste innerhalb einer Linie mit demselben Anfangsbuchstaben gekennzeichnet werden, oder in Analogie zum Noriker kann eine Doppelnamennomenklatur eingeführt werden, die sich aus der Linienbezeichnung und einem individuell gegebenen Namen zusammensetzt. In der Pedigreestudie konnten einige ältere Zuchttiere identifiziert werden, die eine geringere Verwandtschaft zur Gesamtpopulation aufweisen, und züchterisch genutzt werden könnten, um zu einer Strukturbildung innerhalb der Population beizutragen.

10.1.4 PCA ANALYSE ANHAND DES SNP CHIP DATEN

Auf Basis der genomweit abgeleiteten Verwandtschaftsmatrix, konnte mit der Hauptkomponentenanalyse der gravierende genetische Unterschied zwischen Eselgenom und Pferdegenom gezeigt werden. Die aus sehr divergenten Pferderassen zusammengesetzte Stichprobe bildete einen sehr kompakten Cluster, der sehr weit vom Esel Cluster entlang der ersten Hauptkomponente entfernt war (Abb.38). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Pedigreeanalyse clusterten die einzelnen Esel eng aneinander.

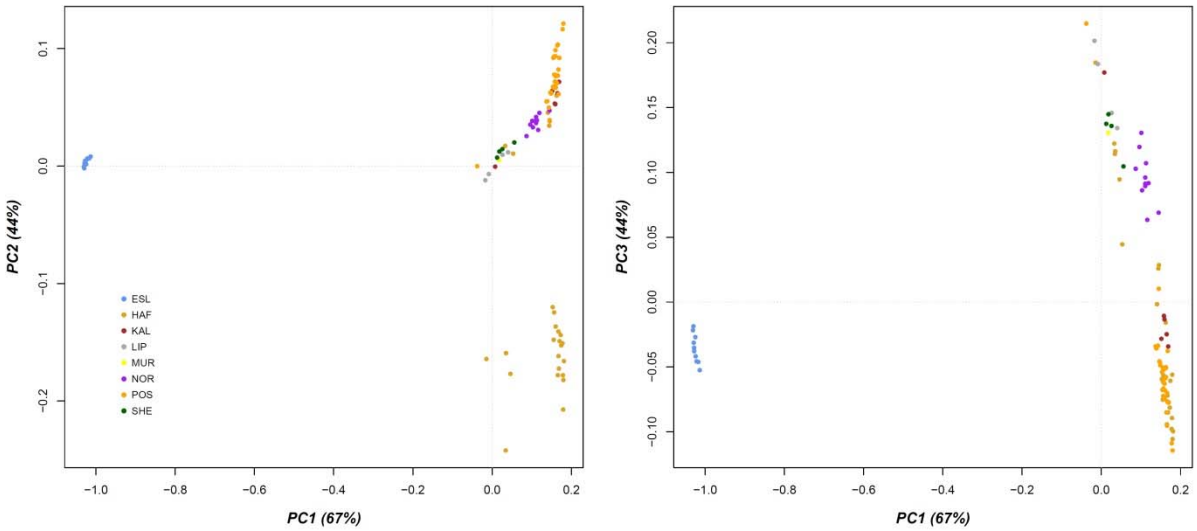


Abbildung 38: Hauptkomponentenanalyse anhand von genomweiten SNP Daten.

11 FARBGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM WEIßEN BAROCKESEL

Der weiße österreichisch-ungarische Barockesel ist eine Rarität, bei dem wie beim italienischen Asinara Esel, die weiße Fellfarbe ein wichtiges Rassemerkmal ist. Die Rassengeschichte des Barockesels ist noch nicht gänzlich geklärt. Es ist bekannt, dass weiße Esel bis ins 19. Jahrhundert in privaten Adelsgestüten gezüchtet wurden. Im Habsburger Hofgestüt Kladrub wurde eine kleine Eselherde zum Zwecke der Maultierzucht gehalten (Grilz-Seger und Druml, 2011), wobei ein Hinweis auf eine explizite Zucht auf weiße Fellfarben bislang fehlt. Während bei den österreichischen Pferderassen das Interesse an deren Zucht und Erhaltung im Laufe des 20. Jahrhundert ungebrochen war, setzte eine intensivere Auseinandersetzung mit den Barockeseln erst in den 1980ern ein. Die Wiederentdeckung einer weißen und morphologisch einheitlichen Eselpopulation im Zoo Herberstein und eines Esels in Ungarn war der Ausgangspunkt für die Revitalisierung dieser Rasse. Dabei wurden zwei Pärchen aus der Nukleus Herde von Herberstein in den Erfurter Zoo transferiert, diese Esel gelangten mit ihrer Nachzucht in weiterer Folge in den Stralsunder Zoo, wo bis heute eine Herde besteht (Altmann, 2002). In Österreich wurde in den 1990er Jahren eine bis heute bestehende Zuchtherde im Nationalpark Neusiedlersee/Illmitz etabliert. Gegenwärtig gibt es in Österreich drei Nukleus Herden (Zoo Herberstein, Schlosshof, National Park Neusiedler See und mehrere private Zuchtstätten). Rund 257 Tiere sind im Verein zur Erhaltung der Weißen Barockesel registriert.

Der italienische Asinara Esel, eine halbwild auf der gleichnamigen sardonischen Insel gehaltene Eselrasse, weist einen dem österreich-ungarischen Barockesel ähnlichen Farbphänotyp auf, der durch unpigmentierte Haut und Haare, weiße Hufe und blaue Augen charakterisiert ist (Utzeri, 2015). Während als genetische Ursache für die weiße Farbe des Asinara Esels eine rezessiv vererbte Mutation (c.604C>G) im Tyrosinase (*TYR*) Gen identifiziert wurde (Utzeri et al., 2015), ist der genetische Hintergrund der weißen Fellfarbe beim österreichisch-ungarischen Barockesel noch ungeklärt.

Generell spielte die Gattung Equus nicht nur eine modellhafte Rolle bei der Erforschung des Domestikationsprozesses, sondern insbesondere das Pferd stellte mit seinen vollständigen Pedigrees eine wichtige Quelle für die Erforschung der Vererbung der Fellfarbe dar. Auf Basis von Pedigreestudien wurden seit Anfang des 20. Jahrhunderts die meisten Erbregeln bei den einzelnen Farbvarianten ermittelt. Mit den neuesten genetischen Methoden konnten die Hypothesen nicht nur bestätigt und einzelne Gentests etabliert werden, sondern es wurde auch der den unterschiedlichen Fellfarben zugrundeliegende biochemische Mechanismus weitgehend aufgeklärt werden. Einen Überblick zu den bekannten Farbloci beim Pferd publizierte Rieder (2009). Der Esel weist eine dem Pferd vergleichbare Variabilität in der Fellfarbe auf, jedoch sind die Vererbungsmuster und die molekulargenetischen Ursachen wenig erforscht. Einen Grund dafür stellen auch die teilweise fehlenden oder inkomplett dokumentierten Pedigrees dar (vgl. Pedigreelänge Lipizzaner - max. 33 Generationen, im Schnitt 19 volle Generationen; Noriker – max. 32 Generationen, im Schnitt 13 volle Generationen, Haflinger max. 24 Generationen, im Schnitt 11 volle Generationen). Beim Esel ist die wissenschaftliche Erforschung der genetischen Grundlagen der Fellfarben noch in ihren Anfängen. Abitbol et al. (2014) gelang die Identifizierung einer rezessiv vererbten Variante (c.629T>C) im *MC1R* Gen, die für die rote (Fuchs) Fellfarbe beim Esel verantwortlich ist. Dieselbe Forschergruppe (Abitbol et al., 2015) assoziierte eine rezessiv vererbte Variante (c.349 T > C) im *ASIP* (agouti signaling protein) mit dem Fehlen der beim Esel typischen Aufhellungen der Haare um das Maul, die Augen, Bauchunterseite und Schenkelinnenseiten. Beide Varianten können mittlerweile auch mit einem Gentest getestet werden.

Die amerikanischen Wissenschaftler Phillip Sponenberg lieferte eine Klassifizierung der Fellfarben beim Esel, indem sie die Systematik und Nomenklatur beim Pferd als Referenz verwendete. Bei den Phänotypen wie sie beim österreich-ungarischen Barockesel vorliegen, differenzierte Sponenberg (2009) zwischen

ivory/cameo und weißgeborenen Varianten. Sponenberg (2009) zählt den ivory/cameo Phänotyp beim Esel in Analogie zu den Cream/Champagne und Perlino Phänotypen beim Pferd zu den Verdünnungen, und er beschrieb die Sichtbarkeit eines eventuell vorhandenen Aalstriches bzw. Schulterkreuzes als typisches Kennzeichen von ivory/cameo. Bei den weiß geborenen Eseln differenzierte Sponenberg (2009) zwischen zwei Varianten: zwischen Tieren mit weißem Fell und mit pigmentierten Augen und solchen mit weißem Fellkleid und blauen Augen (Sponenberg, 2009).

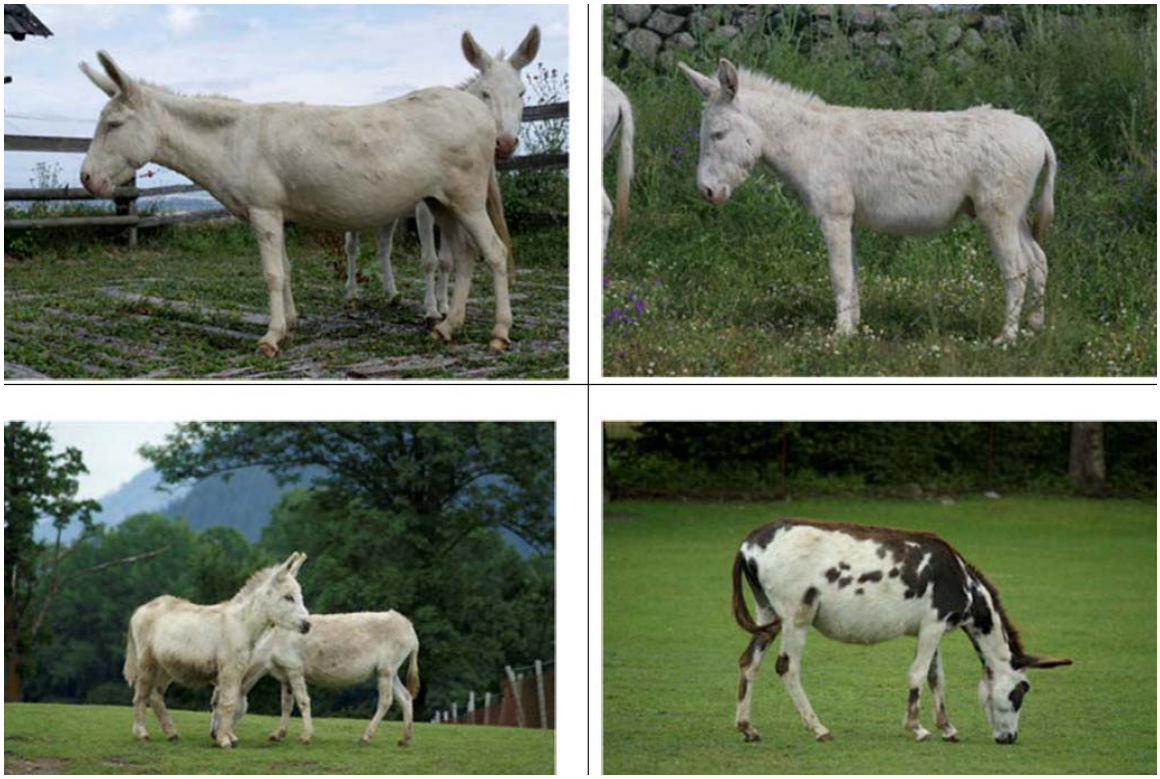


Abbildung 39: Verschiedene beim Esel vorkommende depigmentierte Phänotypen: oben links ein österr.-ungar. Barockesel, oben rechts ein Asinara Esel, unten links zwei Schimmel, unten rechts ein gescheckter Esel (Fotos Grilz-Seger, Schardax)

Gegenwärtig sind drei genetische Mutationen bekannt, die kausal für die Depigmentierung des Eselhaarkleids sind. Neben der zuvor genannten missense Mutation im *TYR* Gen (Utzeri et al., 2015), identifizierten Haase et al. (2015) zwei weitere Varianten im *KIT* Gen, welche weiße Fellfarbe und Scheckung hervorrufen. Die missense Mutation (c.662A>C) im Exon 4 des *KIT* Gens zeichnet sich verantwortlich für die Dominant White Färbung (weißes Fellkleid mit pigmentierten Augen, entdeckt bei einem weißen ungarischen Esel) und eine Variante, welche die splice donor site im *KIT* Gen beeinflusst (c.1978+2T>A) resultiert in einer beim Esel üblichen Scheckungsform (Abb.39). Das Ziel dieser Studie war es, die genetischen Hintergründe der spezifischen Fellfarbe des österreichisch-ungarischen Weißen Barockesels zu untersuchen. Nachdem der Esel im Vergleich zum Pferd eine wenig untersuchte Nutztierrasse darstellt, und die Fellfarbe des Barockesels in Österreich noch nicht Gegenstand der Forschung war, musste zuerst ein Überblick zu den fragmentarisch vorliegenden Informationen gewonnen werden. Diese Arbeit vermittelt somit einen Überblick zum aktuellen Forschungsstand beim Esel im Allgemeinen und gibt Hinweise, welche weiterführenden Untersuchungen notwendig wären.

11.1 MATERIAL UND METHODEN

Mit Mithilfe des Verbandes konnten neben bestehenden Proben aus der Abstammungskontrolle zusätzlich weiße ungarische Esel und farbige Esel in die Studie miteinbezogen werden. Insgesamt lagen von 39 weißen Österreichisch-Ungarischen Barockeseln Proben vorgesammelt. Zusätzlich standen Proben von einem

italienischen Asinara Esel, zwei weißen ungarischen Eseln ohne Abstammung, und drei farbigen ungarischen Eseln, die weiß gefärbte Nachkommen hatten, zur Verfügung. Als Vergleichsgruppe dienten die Haarproben von fünf farbigen Eseln (zwei Falben, ein Brauner und zwei Rappen), zwei Schimmel und zwei Schecken. Durch die Kooperation mit den italienischen Forschungspartnern konnten weitere Asinara Esel in die Analyse miteinbezogen werden. In einem ersten Schritt wurden eine Stichprobe der weißen Österreichisch-Ungarischen Barockeseln (n=14), zwei die italienischen, drei ungarischen Esel, zwei Schecken, ein Schimmel und ein brauner wurde auf die beiden Loci Dominant White (c.662A>C) und den Scheckungs- Locus (c.1978*2T>A) nach Haase et al. (2015) genetisch getestet. In einem zweiten Schritt wurde in Zusammenarbeit mit der italienischen Arbeitsgruppe die mit dem albinotischen Phänotyp beim Asinara Esel assoziierte rezessive Mutation (c.604C>G) im Tyrosinase (*TYR*) Gen in einer Stichprobe, die sich aus 41 Eseln zusammensetzte, genotypisiert. Diese Stichprobe umfasste 27 österreichisch-ungarische Barockesel, zwei weiße Esel aus Ungarn, drei farbige ungarische Eseln mit weißen Nachkommen, einen Asinara und sieben Tieren ohne Abstammungen.

11.2 ERGEBNISSE

Die Mutation auf dem Scheckungs-Locus (c.1978*2T>A) war bei den zwei gescheckten Eseln in heterozygoter Form vorhanden, alle anderen Tiere wiesen diese Mutation nicht auf. Die Mutation im Dominant White Locus (c.662A>C) konnte als Ursache für die weiße Fellfarbe des österreichisch-ungarischen Barockesel ausgeschlossen werden, keines der getesteten Tiere wies diese Mutation auf. (Tab.32). Bei einem einzigen Tier in der Stichprobe, einem Asinara Esel, lag die Mutation in heterozygoter Form vor. Durch die Genotypisierung des beim Asinara Esel mit dem depigmentierten Phänotyp assoziierten Locus (c.604C>G) im *TYR* Gen konnte diese Mutation als Verursacher der weißen Fellfarbe beim österreichisch-ungarischen Barockesel ausgeschlossen werden. Alle Barockesel waren homozygot *C/C* (Wildallel), ebenso alle anderen 12 Tiere mit unterschiedlichem Phänotyp. Lediglich beim Asinara Esel konnte das assoziierte *G* Allel nachgewiesen werden, das in homozygoter Form vorlag (*G/G*).

TABELLE 32: GENOTYPEN DER GETESTETEN ESEL AUF DEM SCHECKUNGS LOCUS (C.1978*2T>A) UND DEM DOMINANT WHITE LOCUS (C.662A>C)

Rasse	Farbe	Genotyp Scheckung	Genotyp Dominant White
ohne Abst.	Schimmel	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel, HUN	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel, HUN	Weiß	T/T	A/A
Österr.-ung. Barockesel, HUN	Weiß	T/T	A/A
Esel HUN	Grau / mit weißen Nachkommen	T/T	A/A
Esel, HUN	Grau / mit weißen Nachkommen	T/T	A/A
Esel, HUN	Schwarz mit weißen Nachkommen	T/T	A/A
Asinara	Weiß	T/T	A/A
Asinara	Weiß	T/T	**A/C**
ohne Abst.	Grauschecke (Dun)	**T/A**	A/A

Rasse	Farbe	Genotyp Scheckung	Genotyp Dominant White
ohne Abst.	Grauschecke (Dun)	**T/A**	A/A

Zusammenfassend kann damit konstatiert werden, dass die drei bislang bekannten Loci im *TYR* und *KIT* Gen, die mit einer Depigmentierung der Haut und der Haare beim Esel einhergehen, als Ursache für den charakteristischen Phänotyp des weißen österreich-ungarischen Barockesels ausgeschlossen werden können.

11.3 DISKUSSION

Durch die Genotypisierung bekannter Loci im *KIT* und im *TYR* Gen beim Weißen österreichisch-ungarischen Barockesel war es möglich, diese Mutationen als Ursache für die weiße Fellfärbung in der untersuchten Stichprobe auszuschließen. Obwohl der Farbphänotyp des Asinara und des Barockesels sehr ähnlich ist und durch depigmentierte Haut und Haare, weiße Hufe und blaue Augen charakterisiert ist, konnte die von Utzeri et al. (2015) beim Asinara identifizierte Mutation im *TYR* Gen bei keinem der österreichischen Barockesel nachgewiesen werden.

Nachdem die beiden weiteren bekannten Loci, Dominant White (c.662A>C) und der Scheckungs-Locus (c.1978*2T>A) (Haase et al., 2015), ebenfalls als Ursache für den Phänotyp der österreichisch-ungarischen Barockesels ausgeschlossen werden können, ergeben sich mehrere Hypothesen, die Ausgangspunkt weiterführender Analysen sein können. Eine mögliche Interpretation ist, dass beim Barockesel ein pseudoalbinotischer Phänotyp (ivory/cameo laut Sponenberg und Bellone (2017)) vorliegt, der durch bislang nicht identifizierte Verdünner in Analogie zu den Cream/Champagne und Perlino Fellfarben des Pferdes verursacht wird. Für diese Hypothese spricht das bei vielen Fohlen und Jungtieren des Barockesels vorhandene Restpigment im Fellkleid (Abb.40).

Abbildung 40: Österreich-ungarischer Barockesel mit Restpigment im Fohlenfell (Fotos Scoufal)

Eine weitere mögliche Interpretation der Ergebnisse wäre die mögliche Existenz einer bislang noch nicht identifizierten Mutation im Tyrosinase Gen. Diese Hypothese ist derzeit Gegenstand weiterführender Untersuchungen der italienischen Arbeitsgruppe und dürfte im Laufe des nächsten Jahres abgeschlossen sein. Im Falle eines negativen Resultats müssten vertiefende Untersuchungen durchgeführt werden. Laut den Ergebnissen dieses Forschungsprojektes könnten mögliche Kandidaten Gene, unter anderen die Gene *OCA2* und *SLC45A2*, die phänotypische Ähnlichkeiten in anderen Spezies hervorrufen, in Betracht gezogen werden (Holl et al., 2019; Chaduff et al., 2017; Winkler et al., 2014).

11.4 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Resultate der Studie haben eine Bedeutung für die Interpretation der Zuchtgeschichte und für das Zuchtprogramm beim Österreichisch-Ungarischen Barockesel, da wir daraus schließen können, dass keine direkte genealogische Verbindung zwischen dem phänotypisch ähnlichen italienischen Asinara Esel und dem Weißen Österreichisch-Ungarischen Barockesel besteht. Die Aufnahme von Asinara Esel in das Zuchtbuch des Österreichisch-Ungarischen Barockesels kann im Sinne der Generhaltung nicht empfohlen werden. Bei der Integration von weißen Eseln ohne Abstammung, insbesondere aus Ungarn, empfiehlt sich eine sorgfältige Exterieur Beurteilung, welche die Augenfarbe miteinschließt. Weiße Eseln mit pigmentierten Augen können Träger der Dominat White Mutation sein, die bislang nicht in der Barockeselpopulation segregiert. Bei fraglichen Tieren empfiehlt es sich mittels Gentest das Vorhandensein dieser Mutation zu verifizieren bzw. auszuschließen.

12 AUSBLICK

Im Zuge der wissenschaftlichen Auseinandersetzung im genannten Projekt eröffneten sich mehrere Hinweise und Fragestellungen, deren vertiefende und weiterführende Bearbeitung Erkenntnisse von wichtiger wissenschaftlicher und praktischer Relevanz erwarten lassen:

- Es besteht laut genomischen Profils ein möglicher Zusammenhang zwischen den Genen *OCA2/HERC2* und Aufhellungsvarianten des Fellkleides beim Pferd (Ursache für die sehr helle Fuchsfarbe beim Haflinger, die als mealy/pangare bezeichnet wird, sowie die Ursache für das Mehlmaul bei Braunen). Diese zwei Gene stehen im Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Publikationen in der Humangenetik und wurden beim Menschen mit den unterschiedlichen Haar-, Haut- und Augenfarben assoziiert.

- Es gibt Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Fuchsfarbe (*MC1R*), der Schimmelfarbe (*STX17*) und dem *UVSSA* Gen. *UVSSA* spielt eine wichtige Rolle im Reparaturmechanismus von UV induzierten DNA Schäden. Mutationen in diesem Gen führen beim Menschen zum UV-Hypersensitivitätssyndrom und zum Cockayne Syndrom. In unseren Vorarbeiten gibt es erste Hinweise, dass dieses Gen im Zusammenhang mit der Zucht auf Fellfarben und der geografischen Herkunft einer Rasse steht. Unterschiede in der Melanin Produktion, verursacht durch den Allelstatus des *MC1R* Gens, haben weitreichende Auswirkungen auf die Schutzwirkung gegen UV-Strahlung und dieser Gegenstand ist ein wichtiger Forschungsschwerpunkt der Humangenetik. Unsere bisherigen Ergebnisse lassen auch beim Pferd einen Zusammenhang zwischen *UVSSA* und den *STX17* und *MC1R* Loci vermuten.

- Die sehr ausgeprägten Selektionssignaturen um den *HOXB* Cluster beim Noriker und Lipizzaner dürften in Beziehung mit der elaborierten und langfristigen Selektion in der österreichischen Pferdezucht stehen. Weitere Untersuchungen könnten wichtige Einblicke in evolutionär relevante Fragestellungen zum *HOX* Cluster liefern.

- Die in diesem Projekt beim Lipizzaner identifizierten putativen Tumorsuppressor Gene (*SPRY4, NDFI1, HSP90AB1, IMPDH2*) stehen beim Menschen im Zusammenhang mit der Metastasierung von Melanomen und der Überlebensrate von Melanom Patienten. In weiterführenden Analysen könnte ein möglicher Einfluss dieser Gene auf die spezifische Melanom Genese beim Lipizzaner geprüft werden.

- Mit dem SNP AX-103594067(3g:79,543.439A>G) liegt ein genetischer Marker für die Mohrenkopffarbe beim Noriker vor. Ob dieser Marker auch für die Rassen, bei denen das roan spezifische *G* Allel und der Roan Haplotyp identifiziert worden ist (Quarter Horse, Murgese, Lipizzaner, Slowenisches Kaltblut, Belgier) genutzt werden kann, bedarf einer weiteren Verifizierung anhand einer größeren Stichprobe.

13 PUBLIKATIONEN

13.1 VERÖFFENTLICHTE PUBLIKATIONEN

– Grilz-Seger G, Druml T, Neuditschko M, Dobretsberger M, Horna M and Brem G (2019a): High-resolution population structure and runs of homozygosity reveal the genetic architecture of complex traits in the Lipizzan horse. BMC Genomics 20, 174.

– Grilz-Seger G, Druml T, Neuditschko M, Mesarič M, Cotman M, Brem G (2019b): Analysis of ROH patterns in the Noriker horse breed reveal signatures of selection for coat color and body size. Animal Genetics 50, 334-346.

– Grilz-Seger G, Druml T, Neuditschko M, Mesarič M, Cotman M, Brem G, Druml T (2019c): Changes in breeding objectives of the Haflinger horse breed from a genome-wide perspective. Züchtungskunde 91, 296-311.

– Grilz-Seger G, Neuditschko M, Ricard A, Velie BD, Lindgren G et al. (2019d): Genome-Wide Homozygosity Patterns and Evidence for Selection in a Set of European and Near Eastern Horse Breeds, Genes 10, doi: 10.3390/genes10070491.

13.1.1 PUBLIKATIONEN IN DRUCK BZW. IN VORBEREITUNG

– Grilz-Seger, G., Dobretsberger, M., Brem, G., Druml, T (2020): Study on distribution of coat color related alleles and white markings in a closed population of Lipizzan horses. Züchtungskunde, accepted, in Druck.

– Grilz-Seger, G, Reiter S., Neuditschko, M., Wallner, B., Horna, M., Velie BD, Lindgren G, Leeb T, Brem, G, Druml, T. (2020): A genome wide association analysis in Noriker horses identifies a SNP associated with roan coat color (in Vorbereitung)

13.2 POSTER

– Grilz-Seger, G., Neuditschko, M., Wallner, B., Horna, M., Brem, G., Druml, T. (2019): Association of roan coat color with *KIT* in Noriker draught horses. Poster Animal Science Days September 2019, Prag.

13.3 VORTRÄGE

– Grilz-Seger G. und Druml T. (2018) Farbzucht beim Pferd – Praktiken, Nomenklatur und genetischer Hintergrund, Feistritz/Gail (November 2018)

– Druml T (2019) Genpool, genetische Diversität und Inzucht, Teil I, Gestüt Piber (April 2019)

– Druml T (2019) Genpool, genetische Diversität und Inzucht, Teil II, Gestüt Piber (Mai 2019)

– Grilz-Seger (2019) Präsentation der Forschungsergebnisse des Projekt Farbgen, ARGE Noriker, Stadl Paura (Dezember 2019)

14 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb. Abbildung

bp Basenpaar

Chr Chromosom

ECA Equines Chromosom

F_{ST} Fixation Koefficient

Gene:

ADRM1 Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1

AKAP1 A-kinase anchoring protein 1

ALS2CL ALS2 C-terminal-like protein

ANKFN1 Ankyrin repeat and fibronectin type III domain containing 1

ARHGAP26 GTPase regulator associated with focal adhesion kinase

ARHGEF4 Rho guanine nucleotide exchange factor 4

ARIH2 Ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 2

ASIP agouti signaling protein

ATRIP ATR interacting protein

BANK1 B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1

B3GNT4 UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4

BCL7A BAF chromatin remodeling complex subunit BCL7A

BRAF B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

C11H17orf67 Chromosome 11 C17orf67 homolog

C16H3orf84 Chromosome 16 H17orf84 homolog

CABLES2 CDK5 and ABL1 enzyme substrate 2

CAPN11 Calpain-11

CBX1 Chromobox 1

CCDC12 Coiled-coil domain-containing protein 12

CCDC51 Coiled-coil domain containing 51

CCDC71 Coiled-coil domain containing 71

CDH Cadherin

CELSR3 Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3

CHD1L Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 Like

CLIP1 CAP-Gly domain containing linker protein 1

COIL Coilin; COPZ2: Coatomer Protein Complex Subunit Zeta 2

CTBP1 C-Terminal Binding Protein 1

CTDP1 CTD Phosphatase Subunit 1

COX11 Cytochrome c oxidase copper chaperone COX11

DALRD3 DALR anticodon binding domain containing 3

DELE1 DAP3 binding cell death enhancer 1

DGKE Diacylglycerol kinase epsilon

DIABLO Diablo IAP-binding mitochondrial protein

DMRT3 Doublesex and mab-3 related transcription factor 3

ECATH-2 Myeloid cathelicidin 2

ECATH-3 Myeloid cathelicidin 3

EDN3 Endothelin 3

EIF2AK4 Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4

ERC1 ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1

ERP44 Endoplasmic reticulum protein 44

EVX1 Even-skipped homeobox 1

FGF1 Fibroblast growth factor 1

FMO5 Flavin Containing Monooxygenase 5

FSTL4 Follistatin like 4; G: Genetic relationship matrix

GATA5 Transcription factor GATA-5

GLDC Glycine decarboxylase

GNA1 Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase

GNAQ G protein subunit alpha q

GNPDA1 Glucosamine-6-phosphate deaminase 1

GRIN2B Glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2B

HIBADH 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial

HOXA Homeobox A

HOXB Homeobox B

HLF HLF transcription factor

HMGA2 High mobility group AT-hook 2

HPD 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase

HRH3 Histamine H3 receptor

HSP90AB1 Equus caballus heat shock protein 90 alpha family class B member 1

IL31 Interleukin 31

IMPDH2 Inosine monophosphate dehydrogenase 2

INVS Inversin

IP6K2 Inositol hexakisphosphate kinase 2

IRAK3 Interleukin 1 receptor associated kinase 3

LASP1 LIM and SH3 protein 1

LCORL/NCAPG locus Ligand dependent nuclear receptor corepressor like / non-SMC condensin I complex subunit G

KDM4C Lysine demethylase 4C

KIF26B Kinesin family member 26B

KIT KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

KLHDC8B Kelch domain containing 8B

LAMA5 Laminin subunit alpha-5

LAMB2 Laminin subunit beta 2

LRRC43 Leucine rich repeat containing 43

LSM14B LSM family member 14B

MAEA Macrophage erythroblast attacher

MC1R Melanocortin 1 receptor

MLXIP MLX interacting protein

MSI2 Musashi RNA binding protein 2 mtDNA

MTG2 Mitochondrial ribosome-associated GTPase 2

NCKIPSD NCK interacting protein with SH3 domainM

NDFIP1 Nedd4 family interacting protein 1

NDUFAF3 NADH:Ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 3

NTM Neurotrimin

NFKBIE NF-kappa-B inhibitor epsilon

NME6 NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 6

NR4A3 Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3

OCA2 Melanocyte-specific transporter protein

OPCML Opioid-binding protein/cell adhesion molecule

OSBPL2 Oxysterol-binding protein-related protein 2

P4HTM Prolyl 4-hydroxylase, Transmembrane

PCDH1 Protocadherin 1

PCDH12 Protocadherin 12

PFKFB4 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4

PHACTR3 Phosphatase and actin regulator 3

PLEKHB2 Pleckstrin homology domain-containing family B member 2

PLXNB1 Plexin B1

PRKAB2 Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2

PSMA7 Proteasome subunit alpha type-7

PSMD9 Proteasome 26S subunit, non-ATPase 9

QARS Glutaminyl-TRNA synthetase

QRICH1 Glutamine rich 1

RALB Ras-like G-protein

RAS Resistance to audiogenic seizures

RBBP8NL RBBP8 N-terminal-like protein

RHOF Ras homolog family member F, filopodia associated

RNF14 Ring finger protein 14; ROH

SCPEP1 Serine carboxypeptidase 1

SETD1B SET domain containing 1B, histone lysine methyltransferase

SETD2 Histone-lysine N-methyltransferase SETD2

SHISA5 Shisa family member 5

SILV Silver

SLC26A6 Solute carrier family 26 member 6

SLC29A1 Solute carrier family 29 member 1

SLC35B2 Solute carrier family 35 member B2

SMYD3 SET and MYND domain containing 3

SNX11 Sorting nexin 11

SPRY4 Sprouty4

SS18L1 SS18L1 subunit of BAF chromatin remodeling complex

STX17 Syntaxin 17

RAD52 RAD52 homolog

TAF4 Transcription initiation factor TFIID subunit 4

TCTE1 T-complex-associated-testis-expressed 1

TMEM120B Transmembrane protein 120B

TMEM89 Transmembrane protein 89

TMIE Transmembrane inner ear expressed protein

TREX1 Three prime repair exonuclease 1

TTLL6 Tubulin tyrosine ligase like 6

TYR Tyrosinase

UCN2 Urocortin 2

UHRF2 Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 2

UQCRC1 Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1

USP19 Ubiquitin specific peptidase 19; UV: ultraviolet

UVSSA UV Stimulated Scaffold Protein A

WDR6 WD repeat domain 6

WDR66 WD repeat domain 66

ZFAT Zinc finger and AT-hook domain

ZNF831 Zinc finger protein 831

GO Gene Ontologie

HUN Ungarn

K Kluster

Kb Kilobase

L_{ROH} ROH Länge

MAF Minor Allel Frequenz

Mb Megabase

N_{ROH} durchschnittliche Anzahl der homozygoten Fragmente

n.s. nicht signifikant

österr.-ung. Österreichisch-ungarisch

PC Hauptkomponenten

PCA Hauptkomponentenanalyse

SD Standardabweichung

SNP Einzelnukleotid-Polymorphismus

ROH Homozygotieregion

S_{ROH} Summe ROH

Tab. Tabelle

Ub. unbekannt

UV Ultra-Violett

15 LITERATUR

Abitbol M, Legrand R, Tiret L (2014): A missense mutation in melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with the red coat colour in donkeys. Animal Genetics 45, 878-880.

Abitbol M, Legrand R, Tiret L (2015): A missense mutation in the agouti signaling protein gene (ASIP) is associated with the no light points coat phenotype in donkeys. Genetics Selections Evolution 47, doi:10.1186/s12711-015-0112-x.

Achmann R, Curik I, Dovč P, Kavar T, Bodo I, Habe F, Marti E, Sölkner J, Brem G (2004): Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. Anim Genet. 35, 285-292.

Alexander DH, Novembre J and Lange K (2009): Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. Genome Res. 19, 1655–1664.

Andersson LS, Larhammar M, Memic F,Wootz H, Schwochow D, Rubin CJ (2012): Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. Nature 488, 642–646.

Aranguren-Me´ndez JA, Jordana J, Gomez M (2001): Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNAmarkers. Genet. Sel. Evol 33, 433–442.

Arias JA, Keehan M, Fisher P, Coppieters W, Spelman R (2009): A high density linkage map of the bovine genome. BMC Genet. 10, doi.org/10.1186/1471-2156.

Artemenko Y, Lampert TJ, Devreotes PN (2014): Moving towards a paradigm: Common mechanisms of chemotactic signaling in Dictyostelium and mammalian leukocytes, Cell Mol Life Sci. 71/19, 3711–3747.

Beja-Pereira A, England PR, Ferrand N, Jordan S, Bakhiet AO et al. (2004): African Origins of the Domestic Donkey. Science 304, doi: 10.1126/science.1096008

Bellone RR, Forsyth G, Leeb T, Archer S, Sigurdsson S, Imsland F, Mauceli E, Engensteiner M, Bailey E, Sandmeyer L, et al. (2010): Fine-mapping and mutation analysis of TRPM1: a candidate gene for leopard complex (LP) spotting and congenital stationary night blindness in horses. Brief Funct Genomics. 9, 193–207.

Bellone R, Liu J, Petersen JL, Mack M, Singer-Berk M et al. (2017): A missense mutation in damage-specific DNA binding protein 2 is a genetic risk factor for limbal squamous cell carcinoma in horses. Int. J. Cancer 141, 342–353.

Bellone RR, Cothran EG, Ketchum MS (1998): Genetic variation in the rare donkey breed, Baudet du Poitou. Anim. Genet. 29, (Suppl. 1), 17.

Bellone R, Holl H, Setulari V et al. (2013): Evidence for a retroviral insertion in TRPM1 as the cause of congenital stationary night blindness and leopard complex spotting in the horse. PLoS ONE 8, e78280.

Bertolini F, Cardoso TF, Marras G, Nicolazzi EL, Rothschild MF, Amills M; AdaptMap consortium. (2018): Genome-wide patterns of homozygosity provide clues about the population history and adaptation of goats. Genet Sel Evol. 50/1, doi: 10.1186/s12711-018-0424-8.

Bligh J and Johnson KG (1973): Glossary of terms for thermal physiology. J Appl Physiol. 35/6, 941-961.

Bodemann BO, Orvedahl A, Cheng T, Ram RR, Ou Y, Formstecher E, Maiti M, Hazelett CC, Wauson EM, Balakireva M, Camonis JH, Yeaman C, Levine B, Michael A (2011): White RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. Cell. 144/2, 253–267.

Boehm AK, Seth M, Mayr KG, Fortier LA (2007): Hsp90 mediates insulin-like growth factor 1 and interleukin-1beta signaling in an age-dependent manner in equine articular chondrocytes. Arthritis Rheum. 56, 2335–2343.

Bordonaro S, Guastella AM, Zuccaro A, Criscione A, Tidona F, Marletta D (2009): Genetic diversity and inbreeding inthe pantesco donkey. Italian Journal of Animal Science 8, doi:10.1100/2012/648427.

Branicki W, Brudnik U and Wojas-Pelc A (2009): Interactions between HERC2, OCA2 and MC1R may influence human pigmentation phenotype. Ann. Hum. Genet. 73, 160-170.

Brem, G. hrsg. (2011): Der Lipizzaner im Spiegel der Wissenschaft, Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Wien.

Brooks SA, Makvandi-Nejad S, Chu E, Allen JJ, Streeter C, Gu E et al. (2010): Morphological variation in the horse: defining complex traits ofbody size and shape. Animal Genetics 41(Suppl. 2), 159–165.

Brooks S and Bailey E (2005): Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in Horses. Mamm. Genome 16, 893-902.

Brooks S, Lear T, Adelson L and Bailey E (2007): A chromsome inversion near the KIT gene and the Tobiano spotting pattern in horses. Cytogenet. Genome Res. 119, 225-230.

Browning SR, Browning BL (2010): High-resolution detection of identity by descent in unrelated individuals. Am J Hum Genet. 86, 526–539.

Ceballos FC, Joshi PK, Clark DW, Ramsay M and Wilson J (2018): Runs of homozygosity: window into population history and trait architecture. Nature Reviews Genetics 19, 220-234.

Chapman JR, Taylor MRG and Boulton SJ (2012): Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. Molecular Cell 47, 497-510.

Chowdhary B, Raudsepp T (2006): The horse genome. Genome Dyn. 2, 97-110.

Ciampolini R, Cecchi F, Mazzanti E, Ciani E, Tancredi M, De Sanctis B (2007): The genetic variability analysis of the Amiata donkey breed by molecular data. Italian Journal of Animal Science 6, 78–80.

Colli L, Perrotta G, Negrini R, Bomba L, Bigi D, Zambonelli P, Supplizi A, Luigi L, Ajmone-Marsan P (2012): Detecting population structure and recent demographic history in endangered livestock breeds. The case of the Italian autochthonous donkeys. Animal genetics 44, doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02356.x.

Cook D, Brooks S, Bellone R, Bailey E (2008): Missense Mutation in Exon 2 of SLC36A1 Responsible for Champagne Dilution in Horses. PLoS Genet 4(9):e1000195, doi:10.1371/journal.pgen.1000195

Cosseddu GM, Fraghì A, Mura L, Carta A, Cherchi R, Pau S (2001): Genetic relationships among donkey populations living in Sardinia. An analysis using molecular markers. 12, 25-33.

Curik I, Druml T, Seltenhammer M, Sundström E, Rosengren Pielberg G, Andersson L, Sölkner J (2013): Complex Inheritance of Melanoma and Pigmentation of Coat and Skin in Grey Horses. PLos Genetics 9, e1003248.

Curik I, Seltenhammer M, Sölkner J (2002): Quantitative genetic analysis of melanoma and grey level in Lipizzan horses. Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 2002; CD-ROM:Communication No. 05-09, August 19–23, Montpellier, France.

Dominy JE and Puigserver P (2013): Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins cold spring harb. Perspect Biol. 5/7, a015008.

Donnelly MP, Paschou P, Grigorenko E, Gurwitz D, Barta C et al. (2012): A global view of the OCA2-HERC2 region and pigmentation. Hum. Genet. 131, 683-696.

Dovč P, Kavar T, Sölkner H, Achmann R (2006): Development of the Lipizzan horse breed. Repro Dom Anim, doi:org/10.1111/j.1439-0531.2006.00726.x.

Druml T and Sölkner J (2011): Die Gründerpopulation der Lipizzanerrasse und deren Zuchtgeschichte anhand von Genanteilen. In:Brem G, editor. Lipizzaner im Spiegel der Wissenschaft. Wien:Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, 153–193.

Druml T, Grilz-Seger G, Brem G (2016): Effect of the glycogen synthase 1 (GYS1) mutation on traits in 169 Noriker draft horse stallions –a retrospective study. Arch Anim Breed. 59, 453–459.

Druml T, Grilz-Seger G, Neuditschko M, Brem G (2016): Association between population structure and allele frequencies of the glycogen synthase 1 mutation in the Austrian Noriker draft horse. Anim Genet. 48, 108-112.

Druml T, Horna M, Grilz-Seger G, Dobretsberger M, Brem G (2018): Association of body shape with amount of Arabian genetic contribution in the Lipizzan horse. Arch Anim Breed. 61, 79-85.

Druml T, Neuditschko M, Grilz-Seger G, Horna M, Ricard A, Mesaric M, Cotman M, Pausch H, Brem G (2018): Population Networks associated with Runs of Homozygosity reveal new Insights into the Breeding History of the Haflinger Horse. J Hered. 109, 384-392.

Druml T, Baumung R and Sölkner J (2008): Morphological analysis and effect of selection for conformation in the Noriker draught horse population. Livestock Science 115, 118-128.

Druml T, Baumung R and Sölkner J (2009) Pedigree analysis in the Austrian Noriker draught horse: genetic diversity and the impact of breeding for coat color on population structure. Journal of Animal Breeding and Genetics 126, 348–356.

Druml T, Sauer K, Elsbacher J, Grilz-Seger G und Brem G (2016): Analyse des Genpools, der genetischen Diversität und der Inzuchtverhältnisse der österreichischen Haflingerpopulation. Züchtungskunde 88, 379-394.

Druml T (2005): Das Noriker Pferd. Graz

Druml T. (2008): Implementierung einer Zuchtwertschätzung für die ARGE Noriker BMLFUW-Forschungsbericht 100340/1, Endbericht, Wien.

Druml T, Grilz-Seger G, Neuditschko M, Neuhauser B and Brem G (2017): Phenotypic and Genetic Analysis of the Leopard Complex Spotting in Noriker Horses. J. Hered, doi: 10.1093/jhered/esx039

Druml T, Grilz-Seger G, Horna M, Brem G (2018): Discriminant analysis of colour measurements reveals allele dosage effect of ASIP/MC1R in bay horses . Czech J. Anim. Sci. 63, 347-355.

Dwivedi VP, Bhattacharya D, Chatterjee S, Prasad DVR, Chattopadhyay D, Van Kaer L, Bishai WR, Das G. (2012): Mycobacterium tuberculosis Directs T Helper 2 Cell Differentiation by Inducing Interleukin-1β Production in Dendritic Cells. J Biol Chem. 287, 33656–33663.

Eisenbach M. (1999): Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. Dev Genet. 25, 87-94.

Elloumi M, Elj N EL, Zaouali M, Maso F, Filaire E, Tabka Z, Lac G (2005): IGFBP-3, a sensitive marker of physical training and overtraining. Br J Sports Med. 39/9, 604–610

Eskelinen EL and Saftig P (2009): Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecul Cell Res. 17937/4, 664-673.

Farber DB, Lolley RN (1976): Enzymic basis for cyclic GMP accumulation in degenerative photoreceptor cells of mouse retina. J Cycl Nucl Res. 2/3, 139–148.

Fernández A, Silió, L, Rodríguez C, Óvilo C (2006): Characterization of OCA2 cDNA in different porcine breeds and analysis of its potential effect on skin pigmentation in a red Iberian strain. Anim Genet. 37, 166-170.

Frischknecht M, Flury C, Leeb T, Rieder S and Neuditschko M (2016): Selection signatures in Shetland ponies. Anim. Genet. 47, 370-372.

García-Borrón JC, Abdel-Malek Z, Jiménez-Cervantes C (2014): MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation. Pigment Cell Melanoma Res. 27/5, 699-720.

Gatti R, De Palo EF, Antonelli G, Spinella P (2012): IGF-I/IGFBP system: metabolism outline and physical exercise, J Endoc Invest. 35 (7), 699-707.

Ghorbel MT, Cherif M, Jenkins E, Mokhtari A, Kenny D, Angelini GD, Caputo M (2010): Transcriptomic analysis of patients with tetralogy of Fallot reveals the effect of chronic hypoxia on myocardial gene expression, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 140/2, 337-345.

Gilmour A., Gogel BJ, Cullis BR, Thompson R et al. (2008): ASReml User Guide Release 3.0, VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK.

Grilz-Seger G und Druml T (2011): Lipizzaner Hengststämme. Vehling Verlag, Graz.

Grilz-Seger G und Druml T (2012): Das Noriker Pferd. Band II. Graz.

Grilz-Seger G und Druml T (2017): Stammbaumanalysen mit besonderer Berücksichtigung des österreichischen Noriker Pferdes in: Brem, G [Hrsg.]: Kaltblutpferde im Spiegel der Wissenschaft. Wien, Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, 439-470.

Grilz-Seger G, Neuhauser B, Druml T and Brem G (2017): Classification and nomenclature of the leopard complex spotting in the Noriker horse breed and its relevance for the breeding for color. Züchtungskunde 89, 359-374.

Grilz-Seger G und T Druml (2018): Handbuch Pferdefarben, Vehling Verlag, Graz.

Grilz-Seger G, Mesarič M, Cotman M, Neuditschko M, Druml T, Brem G (2018): Runs of Homozygosity and Population History of Three Horse Breeds With Small Population Size. J Equine Vet Science 71, 27-34.

Grilz-Seger G, Druml T, Neuditschko M, Dobretsberger M, Horna M and Brem G (2019a): High-resolution population structure and runs of homozygosity reveal the genetic architecture of complex traits in the Lipizzan horse. BMC Genom. 20, 174.

Grilz-Seger G, Druml T, Neuditschko M, Mesarič M, Cotman M and Brem G (2019b) Analysis of ROH patterns in the Noriker horse breed reveal signatures of selection for coat color and body size. Anim. Genet. doi:10.1111/age.12797.

Grilz-Seger G, Druml T, Neuditschko M, Mesarič M, Cotman M, Brem G, Druml T (2019c): Changes in breeding objectives of the Haflinger horse breed from a genome-wide perspective. Züchtungskunde 91, 296-311.

Grilz-Seger G, Neuditschko M, Ricard A, Velie BD, Lindgren G et al. (2019d): Genome-Wide Homozygosity Patterns and Evidence for Selection in a Set of European and Near Eastern Horse Breeds, Genes 10, doi: 10.3390/genes10070491.

Grilz-Seger G, Dobretsberger M, Brem G and Druml T: Untersuchungen zum Allelstatus einzelner Farbloci und Abzeichen beim Lipizzaner. Züchtungskunde, in press

Grilz-Seger, G., Neuditschko, M., Wallner, B., Horna, M., Brem, G., Druml, T. (2019f): Association of roan coat color with KIT in Noriker draught horses. Poster Animal Science Days, Prag.

Gu J, Orr N, Park SD, Katz LM, Sulimova G, MacHugh DE, Hill EW (2009): A genome scan for positive selection in thoroughbred horses. PLoS One. 4/6, e5767.

Guastella AM, Zuccaro A, Bordonaro S, Criscione A, Marletta D, D'Urso G (2007): Genetic diversity and relationshipamong the three autochthonous Sicilian donkey populationsassessed by microsatellite markers. Italian Journal of Animal Science 6, supplement 1, 143.

Gutierrez, JP and Goyache F (2005): A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information, J. Anim. Breed. Genet. 122, 172–176.

Haase B, Rieder S Leeb T (2015): Two variants in the *KIT* gene as candidate causative mutations for a dominant white and a white spotting phenotype in the donkey. Animal Genetic 46, 321-324.

Haase B, Brooks SA, Tozaki T, Burger D, Poncet PA, Rieder S, Hasegawa T, Penedo C, Leeb T (2009): Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. Anim Genet 40:623-629, 2009. Pubmed reference: 19456317, doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01893.x.

Haase B, Rieder S, Tozaki T, Hasegawa T, Penedo MC, Jude R, Leeb T (2011): Five novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. Anim Genet 42:337-339, 2011. Pubmed reference: 21554354, doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02173.x.

Hakim Muradov H, Boyd KK, Artemyev NO (2010): Rod phosphodiesterase-6 PDE6A and PDE6B subunits are enzymatically equivalent, J Biol Chem. 285, 39828-39834.

Hansen M, Knorr C, Hall AJ, Broad TE, Brenig B (2007): Sequence analysis of the equine SLC26A2 gene locus on chromosome 14q15→q21, Cytogenetic and Genome Research 118, 55–62.

Haus-, Hof- und Staatsarchiv, Oberstallmeisteramt, Sonderreihe, Allgemeines, diverse Akten des Kladruber, Koptschaner und Karster Hofgestüts (1819).

Haus-, Hof- und Staatsarchiv, Oberstallmeisteramt, Sonderreihe, Varia, Gestütsbuch von Halbthurn (1717-1726).

Hauswirth R, Haase B, Blatter M, Brooks SA, Burger et al. (2012): Mutations in MITF and PAX3 cause "splashed white" and other white spotting phenotypes in horses. PLoS Genet 8(4):e1002653, Pubmed reference: 22511888, doi: 10.1371/journal.pgen.1002653.

Hauswirth R, Jude R, Haase B, Bellone RR, Archer S, Holl H, Brooks SA, Tozaki T, Penedo MC, Rieder S, Leeb T (2013): Novel variants in the KIT and PAX3 genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. Anim Genet 44:763-5, Pubmed reference: 23659293, doi: 10.1111/age.12057.

Hendrickson SL (2013): A genome wide study of genetic adaptation to high altitude in feral Andean Horses of the páramo. BMC Evol Biol. 13, doi: 10.1186/1471-2148-13-273.

Hershberger RE, Pinto JR, Parks SB, Kushner JD, Li D, Ludwigsen S et al. (2009): Clinical and functional characterization of TNNT2 mutations identified in patients with dilated cardiomyopathy. Circ Cardiovasc Genet. 2/4, 306-313.

Higa M, Zhang X, Tanaka K, Saijo M (2016): Stabilization of Ultraviolet (UV)-stimulated Scaffold Protein A by interaction with Ubiquitin-specific Peptidase 7 is essential for Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair. J Biol Chem. 291/26, 13771-13779.

Hintz HF, Van Vleck LD (1979): Lethal dominant roan in horses. Journal of Heredity 70, 145-146.

Holl HM, Brooks SA, Archer S, Brown K, Malvick J, Penedo MC, Bellone RR (2016): Variant in the RFWD3 gene associated with PATN1, a modifier of leopard complex spotting. Animal Genetics 47, 91–101.

Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. Nature Protocols 4, 44-57.

Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP (1995): Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. Nat Genet. 11/4, 468-471.

Imsland F, McGowan K, Rubin CJ, Henegar C, Sundström E et al. (2016): Regulatory mutations in TBX3 disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses. Nat Genet. 48, 152-158.

Jagannathan V, Gerber V, Rieder S, Tetens J et al. (2018): Comprehensive characterization of horse genome variation by whole-genome sequencing of 88 horses. Anim Genet , doi: 10.1111/age.12753.

Jiang L, Campagne C, Sundström E, Sousa P, Imran S, Seltenhammer M, Pielberg G, Olsson MJ, Egidy G, Andersson L, Golovko A (2014): Constitutive activation of the ERK pathway in melanoma and skin melanocytes in Grey horses. BMC Cancer 14, 857-868.

Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Camacho-Hubner C, Clemmons DR (1993): Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. The Journal of Cell Biology 121/3, 679-687.

Jordana J, Folch P, Aranguren JA (2001): Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalonian donkey breed. J Anim. Breed. Genet. 118, 57–63.

Jordana J, Folch P, Sanchez A (1999): Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalonian don-keys. Bioch. Syst. Ecol.27, 791–798.

Kasarda R, Vostrý L, Moravčíková N, Vostrá-Vydrová H, Dovč P, Kadlečík O (2016): Detailed insight into genetic diversity of the Old Kladruber horse substructure in comparison to the Lipizzan breed. Acta Agr Scand, Section A — Anim Science 66, 67-74.

Kavar T, Brem G, Habe F, Sölkner J, Dovč P (2002): History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. Genet Sel Evol. 34, 635-548.

Kavar T, Habe F, Brem G, Dovč P (1999): Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. Anim Genet. 30, 423-430.

Kavar T, Ceh E, Dovc P (2012): A simplified PCR-based method for detection of gray coat color allele in horse. Molecular and Cellular Probes 26, 256-258.

Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, Bullinger L, Ball B, Zaidi S, Morgan K, Tam W, Paktinat M, Okabe R, Gozo M, Einhorn W, Lane SW, Scholl C, Frohling S, Fleming M, Ebert BL, Gilliland DG, Jaenisch R, Daley GQ (2010): Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. Nature Med. 16, 903-908.

Kimura B, Marshall F, Beja-Pereira A et al. (2013): Afr Archaeol Rev. 30, doi.org/10.1007/s10437-012-9126-8.

Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J, Zaghlool A, Linga R (2008): Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. Nature Genetics 40, 211–216.

Lamson G, Giudice LC, Cohen P, Liu F, Gargosky S, Müller HL, Oh Y, Wilson KF, Hintz RL, Rosenfeld RG. (1993): Proteolysis of IGFBP-3 may be a common regulatory mechanism of IGF action in vivo. Growth Regul. 1, 91-95.

Levine M (1999): Investigating the origins of horse domestication. Equine Veterinary Journal. 28, 6-14.

Librado P, Gamba C, Gaunitz C, Der Sarkissian C, Pruvost M. et al. (2017): Ancient genomic changes associated with domestication of the horse. Science. 356, 442-445.

Librado P, Fages A, Gaunitz Ch, Leonardi M, Wagner S, Khan N et al. (2016): The Evolutionary Origin and Genetic Makeup of Domestic Horses. Genetics 204, 423-434.

Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A (2010): PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 299, e145-61.

Ludwig A, Pruvost M, Reissmann M, Benecke N, Brockmann G et al. (2009): Coat color variation at the beginning of horse domestication. Science 324, doi: 10.1126/science.1172750.

Lyashchenko KP, Greenwald R, Esfandiari J, Lecu A, Waters WR, Posthaus H, Bodmer T, Janssens JP, Aloisio F, Graubner C, Grosclaude E, Piersigilli A, Schiller I (2012): Pulmonary Disease due to Mycobacterium tuberculosis in a Horse: Zoonotic Concerns and Limitations of Antemortem Testing. Vet Med Int., doi: 10.1155/2012/642145.

Makvandi-Nejad S, Hoffman GE, Allen JJ, CHU E, Gu E, Chandler AM, Loredo AI, Bellone RR, Mezey J G, Brooks SA, Sutter NB (2012): Four loci explain 83% of size variation in the horse. PLoS One 7, 1-6.

Makvandi-Nejad S, Hoffmann GE, Allen JJ, Chu E, Gu E, Chandler AM, Loredo AI, Bellone RR, Mezey JG, Brooks SA and Sutter NB (2012): Four loci explain 83% of size variation in the horse. PLoS One. 7, 1-6.

Malik S and Roeder RG (2005): Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex, Trends in Biochemical Sciences 30/5, 256-263.

Mariat D, Taourit S, Guérin G (2003): A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. Genet Sel Evol. 35, 119-33.

Marklund L, Moller MJ, Sandberg K, Andersson L (1996): A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. Mamm Genome. 7, 895-9.

Marklund L, Moller MJ, Sandberg K and Andersson L (1999): Close association between sequence polymorphism in the KIT gene and the roan coat color in horses. Mammalian Genome 10, 283-288.

Marshall JL, Chou E, Oh J, Kwok A, Burkin DJ, Crosbie-Watson RH (2012): Dystrophin and utrophin expression require sarcospan: loss of α7 integrin exacerbates a newly discovered muscle phenotype in sarcospan-null mice. Hum Molec Genet. 21/20, 4378-4393.

Martinez AN, Mehra S, Kaushal D (2013): Role of interleukin 6 in innate immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. J Infect Dis. 207, 1253-61.

Mastrangelo S, Tolone M, Sardina MT, Sottile G, Sutera AM, Di Gerlando R, Portolano B (2017): Genome-wide scan for runs of homozygosity identifies potential candidate genes associated with local adaptation in Valle del Belice sheep. Genet Sel Evol. 49/1, doi: 10.1186/s12711-017-0360-z.

Matassino D, Cecchi F, Ciani F, Incoronato C, Occidente M, Santoro L, Ciampolini R (2014): Genetic Diversity and Variability in two Italian Autochthonous Donkey Genetic Types Assessed by Microsatellite Markers, Italian Journal of Animal Science 13, doi: 10.4081/ijas.2014.3028

Mau C, Poncet PA, Bucher B, Stranzinger G and Rieder S (2004): Genetic mapping of dominant white (W), a homozygous lethal condition in the horse (Equus caballus). J. Anim. Breed. Genet. 121, 374-83.

McCue ME, Bannasch DL, Petersen JL, Gurr J, Bailey E, Binns MM, et al. (2012): A High Density SNP Array for the Domestic Horse and Extant Perissodactyla: Utility for Association Mapping, Genetic Diversity, and Phylogeny Studies. PLoS Genetics 8, e1002451.

McCue ME, Valberg SJ, Miller MB, Wade C, DiMauro S, Akman HO, Mickelson JR. (2008): Glycogen synthase (GYS1) mutation causes a novel skeletal muscle glycogenosis. Genomics. 91, 458-466.

McQuillan R, Leutenegger A, Abdel-Rahman R et al. (2008): Runs of homozygosity in European populations. American Journal of Human Genetics 83, 359-372.

Meiri S, Dayan T, Simberloff D (2006): The generality of the island rule re-examined. Journal of Biogeography 33, 1571–1577.

Metri R, Mohan A, Nsengimana J, Pozniak J, Molina-Paris C, Newton-Bishop J, Bishop D, Chandra N (2017): Identification of a gene signature for discriminating metastatic from primary melanoma using a molecular interaction network approach. Scient Rep. 7, 17314.

Metzger J, Karwath M, Tonda R, Beltran S, Águeda L, Gut M, Gut LG, Distl O. (2015): Runs of homozygostiy reveal signatures of positive selection for reproduction traits in breed and non-breed horses. BMC Genom. 16, doi:10.1186/s12864-015-1977-3.

Miyadera K (2014): Inherited retinal diseases in dogs: advances in gene/mutation discovery, Dobutsu Iden Ikushu Kenkyu 42/2, 79–89.

Mrschtik M and Ryan KM. (2015): Lysosomal proteins in cell death and autophagy. FEBS Journal 282: 1858-1870.

Muradov H, Boyd KK, Artemyev NO. (2010): Rod phosphodiesterase-6 PDE6A and PDE6B subunits are enzymatically equivalent. J Biol Chem. 285: 39828-39834.

Nehring A (1884): Fossile Pferde aus deutschen Diluvial-Ablagerungen und ihre Beziehungen zu den lebenden Pferden. Ein Beitrag zur Geschichte des Hauspferdes. Paul Parey, Berlin, Germany.

Neuditschko M, Khatkar MS and Raadsma HW (2012): Net View: A high-definition network-visualization approach to detect fine scale population structures from genome-wide patterns of variation. PLoS One 7, e48375.

Nguyen U, Mougin F, Simon-Rigaud M. et al. (1998): Influence of exercise duration on serum insulin-like growth factor and its binding proteins in athletes, Eur J Appl Physiol. 78/6, 533-537.

Norton EM, Avila F, Schultz NE, Mickelson JR, Geor RJ, McCue ME. (2019): Evaluation of an HMGA2 variant for pleiotropic effects on height and metabolic traits in ponies. J Vet Intern Med. doi.org/10.1111/jvim.15403

O'Brien RM and Granner DK (1996): Regulation of gene expression by insulin. Physiol Rev. 76/4:1109-1161.

Oda Y, Chalkley RJ, Burlingame AL, Bikle DD (2010): The transcriptional coactivator DRIP/Mediator Complex is involved in vitamin D receptor function and regulates keratinocyte proliferation and differentiation. Journal of Investigative Dermatology 130/10, 2377-2388.

Pearson JC, Lemmons D and McGinnis W (2005): Modulating HOX gene functions during animal body patterning. Nature reviews Genetics 6, 893-904.

Pemberton TJ, Absher D, Feldman MW, Myers RM, Rosenberg NA and Li JZ (2012): Genomic patterns of homozygosity in worldwide human populations. Am J Hum Gen 91, 275-292.

Peng J, Liu H, Liu C (2017): MiR-155 Promotes Uveal Melanoma Cell Proliferation and Invasion by Regulating NDFIP1 Expression. Technol Cancer Res Treat. 6, 1160-1167.

Peripolli E, Metzger J, de Lemos MVA, Stafuzza NB, et al. (2018): Autozygosity islands and ROH patterns in Nellore lineages: evidence of selection for functionally important traits. BMC Genom. 19/1, doi: 10.1186/s12864-018-5060-8.

Peripolli E, Stafuzza NB, Munari DP, Lima ALF, Irgang R, Machado MA, Panetto JCDC, Ventura RV, Baldi F, da Silva MVGB. (2018): Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (Bos indicus) dairy cattle. BMC Genom. 19/1, doi: 10.1186/s12864-017-4365-3.

Peripolli E, Munari DP, Siva MVGB., Lima ALF., Irgang R and Baldi F (2016): Runs of homozygosity: current knowledge and applications in livestock. Animal Genetics 48, doi: 10.1111/age.12526.

Petersen JL, Mickelson JR, Rendahl AK, Valberg SJ, Andersson LS, Axelson J et al., (2013): Genome-wide analysis reveals selection for important traits in domestic horse breeds. PLoS One 9, e.10003211.

Petersen JL, Mickelson JR , Cothran EG , Andersson LS , Axelson J. et al., (2013): Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. PLoS One 8, e54997.

Pielberg RG, Golovko A, Sundström E, Curik I, Lennartsson J (2008): A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. Nat Genet. 40, 1004–1009.

Pielberg RG, Mikko S, Sandberg K, Andersson L (2005): Comparative linkage mapping of the Grey coat colour gene in horses. Anim Genet. 36, 390-395.

Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD (2003): Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. J Physiol. 546, 851–858

Pruvost M, Bellone R, Benecke N, Sandoval-Castellanos E, Cieslak M, Kuznetsova T, Morales-Muñiz A, O'Connor T, Reissmann M, Hofreiter M, Ludwig A. (2011): Genotypes of predomestic horses match phenotypes painted in Paleolithic works of cave art. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 18626-18630.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, et al (2007): PLINK: a tool set for whole genome association and population-based linkage analyses. Am J Hum Genet. 81, 559–575.

Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. (1997): Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. Endocr Rev. 18/6, 801-31.

Reissmann M und GA Brockmann, (2008): Analyse verschiedener Langhaaraufhellungen beim Pferd. Züchtungskunde 80, 491 – 500.

Reissmann M, Bierwolf J and Brockmann GA (2007): Two SNPs in the SILV gene are associated with silver coat colour in ponies. Anim. Genetics 38, 1-6.

Renaud G, Petersen B, Seguin-Orlando A, Bertelsen MF, Waller A, Newton R, Paillot R, Bryant N, Vaudin M, Librado P, Orlando L (2018): Improved de novo genomic assembly for the domestic donkey, Science advanced, doi: 10.1126/sciadv.aaq0392.

Revera M, Van der Merwe L, Heradien M, Goosen A, Corfield VA, Brink PA, Moolman-Smook JC. (2007): Long-term follow-up of R403WMYH7 and R92WTNNT2 HCM families: mutations determine left ventricular dimensions but not wall thickness during disease progression. Cardiovasc J Afr. 18, 146-153.

Ricard A (2015): Does heterozygosity at theDMRT3gene makeFrench trotters better racers? Gen. Sel. Evol. 47 (1), pp.10.

Richardson BE, Lehmann R (2010): Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. Nat Rev Mol Cell Biol. 11/1, 37–49.

Richardson V, Parvatiyar M, Marshall J, Nguyen R, Jordan M, Roos K, Crosbie-Watson R. (2015): The role of sarcospan in cardiac sarcolemma organization and function; Physiol. 29/1, doi: 10.1096.

Rieder S, Taourit S, Mariat D, Langlois B, Guerin G. (2001): Mutation in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their associa¬tion to coat color phenotypes in horses (Equus caballus). Mamm Genome. 12, 450–455.

Rieder S, Hagger C, Obexer-Ruff G, Leeb T, Poncet PA (2008): Genetic Analysis of White Facial and Leg Markings in the Swiss Franches-Montagnes Horse Breed, Journal of Heredity 99, 130–136.

Rieder S (2009): Molecular tests for coat colours in horses. Journal of animal breeding and genetics. Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie 126, 415-24. 10.1111/j.1439-0388.2009.00832.x.

Rosenberg NA (2004): Distruct: a program for the graphical display of population structure. Mol Ecol Notes 4, 137–138.

Rossel S, Marshall F, Peters J, Pilgram T, Adams MD, O'Connor D (2008): Domestication of the donkey: Timing, processes, and indicators, Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 3715-3720.

Rossi TM, Pyle WG, Maxie MG, Pearl DL, Physick-Sheard PW. (2014): Troponin assays in the assessment of the equine myocardium. Equine Vet J. 46: 270-275.

Saleha S, Taj AK, Shaista Z. (2016): MC1R gene variants involvement in human OCA phenotype: Mini review, Open life Sciences 11, 142–150

SAS Institute (2009): SAS version 9.1. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.

Schaefer JR, Schubert M, Bailey E, Bannasch DL, Barrey K et al., (2017): Developing a 670k genotyping array to tag ~2M SNPs across 24 horse breeds. BMC Gen 18, doi:10.1186/s12864-017-3943-8.

Schubert M, Jónsson H, Chang D, Der Sarkissian C, Ermini L et al. (2014): Prehistoric genomes reveal the genetic foundation and cost of horse domestication. Proc Natl Acad Sci USA. 111/52, e5661-9.

Schwarz AJ, Brazel JA, Hintz RL, Mohan S, Cooper DM (1996): Acute Effect of Brief Low- and High-Intensity Exercise on Circulating Insulin-Like Growth Factor (IGF) I, II, and IGF-Binding Protein-3 and Its Proteolysis in Young Healthy Men. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81, 3492-3497.

Scocchi M, Bontempo D, Boscolo S, Tomasinsig L, Giulotto E, Zanetti M (1999): Novel cathelicidins in horse leukocytes. FEBS Letters. 457:459-464.

Seltenhammer MH, Heere-Ress E, Brandt S, Druml T, Jansen B, Pehamberger H, Niebauer GW (2004): Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma. Pigment Cell Res. 17, 674–681.

Seltenhammer MH, Simhofer H, Scherzer S, Zechner P, Curik I, et al (2003): Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzan horses. Equine Vet J. 35:153–157.

Shaverdashvili K, Zhang K, Osman I, Honda K, Jobava R, Bedogni B (2015): MT1-MMP dependent repression of the tumor suppressor SPRY4 contributes to MT1-MMP driven melanoma cell motility. Oncotarget. 6, 33512-33522.

Sherleen H, Pittler SJ, Xizhon H, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP. (1995): Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the α subunit of rod cGMP phosphodiesterase. Nat Genet. 11, 468–471.

Signer-Hasler H, Flury C, Haase B, Burger D, Simianer H, Leeb T and Rieder S (2012): A Genome-Wide Association Study Reveals Loci Influencing Height and Other Conformation Traits in Horses. PLoS One 7, e37282

Singh PP, Goyal A (2013): Interleukin-6: a potent biomarker of mycobacterial infection. Springerplus, doi:10.1186/2193-1801-2-686

Skerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, Risso A, Zanetti M (2001): Structural and Functional Analysis of Horse Cathelicidin Peptides. Antimicrob Agents Chemother, 45, 715–722.

Smith GA, Luk N, Newton RA, Roberts DW, Sturm RA, Muscat G. (2008): Melanocortin-1 Receptor signaling markedly induces the expression of the NR4A Nuclear Receptor Subgroup in melanocytic cells. J Biol Chem. 283/18: 12564-12570.

Sölkner J und Druml T (2011): in: Brem, G. hrsg.: Der Lipizzaner im Spiegel der Wissenschaft, Verlag der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, Wien.

Sponenberg DP (2009): Equine color genetics. 3rd ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 118.

Sponenberg P und Bellone R (2017): Equine color genetics, 4th edition, Ames: Wiley-Blackwell.

Starkey P and Starkey M (2000): Regional and world trends in donkey populations, in: Starkey P. and Fielding D. (eds),Donkeys, people and development. A resource book of the Animal Traction Network for Eastern and Southern Africa (ATNESA).ACP-EU Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation (CTA), Wageningen, The Netherlands. 244p. ISBN 92-9081-219-2.

Steinig EJ, Neuditschko M, Kathkar MS, Raadsma HW and Zenger KR (2015): Netview p: a network visualization tool to unravel complex population structure using genome-wide SNPs. Mol Ecol Res. 16, 216–227.

Stolz A, Ernst A, Dikic I (2014): Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. Nature Cell Biology 16, 495–501.

Südtiroler Haflingerzuchtverband (Hg.), (1995): Der Original Haflinger. Folio Verlag, Bozen, Italien.

Summermatter S, Santos G, Pérez-Schindler J, Handschin C. (2013): Skeletal muscle PGC-1α controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor α-dependent activation of LDH B and repression of LDH A. Proc Natl Acad Sci. 110 /21, 8738–8743.

Sundström E, Imsland F, Mikko S, Wade C, Sigurdsson S, Pielberg GR, Golovko A, Curik I, Seltenhammer M, Sölkner J, Lindblad-Toh K, Andersson L. (2012): Copy number expansion of the STX17 duplication in melanoma tissue from Grey horses. BMC Genom. 13, 365-378.

Takagishi T, Hara T, Fukada T. (2017): Recent Advances in the Role of SLC39A/ZIP Zinc Transporters In Vivo. Int J Mol Sci. 18/12: 2708.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Min Z, Liu G, Tsien JZ. (1999): Genetic enhancement of learning and memory in mice, Nature 401, 63-69.

Tennis MA, Van Scoyk MM, Freeman SV, Vandervest KM, Nemenoff RA, Winn RA (2010): Sprouty-4 inhibits transformed cell growth, migration and invasion, and epithelial-mesenchymal transition, and is regulated by Wnt7A through PPARgamma in non-small cell lung cancer. Mol Cancer Res. 8, 833-843.

Thierfelder L, Watkins H, MacRae C et al. (1994): Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: A disease of the sarcomere. Cell 77, 701-712

Thomer A, Gottschalk M, Christmann A, Naccache F, Jung K, Hewicker-Trautwein M, Distl O, Metzger, J. (2018): An epistatic effect of KRT25 on SP6 is involved in curly coat in horses. Scientific Reports, doi:org/10.1038/s41598-018-24865-3.

Thompson EA (2013): Identity by descent: variation in meiosis, across genomes, and in populations. Genetics 194, doi:10.1534/genetics.112.148825.

Utzeri VJ, Bertolini F, Ribani A, Schiavo G, Dall'Olio S, Fontanesi L (2016): The albinism of the feral Asinara white donkeys (Equus asinus) is determined by a missense mutation in a highly conserved position of the tyrosinase (TYR) gene deduced protein. Anim. Genet. 47, 120-124.

Vidale P, Piras FM, Nergadze SG, Bertoni N, Verini-Supplizi A, Adelson D, Guérin G and Giulotto E (2011): Chromosomal Assignment of Six Genes (EIF4G3, HSP90, RBBP6, IL8, TERT, and TERC) in four species of the Genus Equus. Anim Biotechn. 22:119-123.

Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S et al. (2009): Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. Science 326, 865–867.

Wagner HJ and M Reissmann (2000): New polymorphism detected in the horse MC1R gene. Anim. Genet. 31, 289-290.

Wallner B, Vogl C, Shukla P, Burgstaller JP, Druml T, Brem G (2013): Identification of Genetic Variation on the Horse Y Chromosome and the Tracing of Male Founder Lineages in Modern Breeds. PLos One 8, e6001.

Wang Q, Chen Q, Zhao K, Wang L, Wang L, Traboulsi EI. (2001): Update on the molecular genetics of retinitis pigmentosa. Opht Genet. 22/3, 133–154.

Wuebben EL, Mallanna SK, Cox JL, Rizzino A (2012): Musashi2 is required for the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. PLOS One 7, doi:10.1371/journal.pone.0034827.

Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. (2011): NF-κB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. Cell Res. 21/1: 146–158.

Wutke S, Benecke N, Sandoval-Castellanos E, Döhle Hj, Friedrich S et al. (2016): Spotted phenotypes in horses lost attractiveness in the Middle Ages. Sci Rep. 6, doi: 10.1038/srep38548.

Xu T, Nicolson S, Denton D, Kumar S. (2015): Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death. Cell Death Differ. 22/11, 1792–1802.

Yang GC, Croaker D, Zhang A, Manglick P, Cartmill T and Cass D (1989): A dinucleotide mutation in the endothelian-B receptor gene is associated with letal white foal syndrome (LWFS) – a horse variant of Hirschprung-disease (HSCR). Human Molecular Genetics 7, 1047-1052.

Zechner P, Sölkner J, Bodo I, Baumung R, Achmann R, Marti E, Habe F, Brem G (2002): Analysis of diversity and population structure in the Lipizzan horse breed based on pedigree information. Livest Prod Sci. 77, 137-146.

Zhang C, Ni P, Ahmad HI, Gemingguli M, Baizilaitibei A, Gulibaheti D, Fang Y, Wang H, Asif AR, Xiao C, Chen J, Ma Y, Liu X, Du Y and Zhao S. (2018): Detecting the Population Structure and Scanning for Signatures of Selection in Horses (Equus caballus) From Whole-Genome Sequencing Data. Evol Bioinformat. 14, 1–9.

16 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Minima, Maxima, Heritabilität (h^2) und deren Standardfehler (SE) für Abzeichen auf verschiedenen Körperregionen beim Lipizzaner. 24
Tabelle 2: Heritabilitäten (entlang der Diagonale), genetische Korrelationen (unterhalb der Diagonale) und phänotypische Korrelationen, oberhalb der Diagonale für Abzeichen am Kopf und den einzelnen Extremitäten. 24
Tabelle 3: SNP Genotypen Verteilung für SNP AX-103594067(3:g.79543439A>G) 28
Tabelle 4: LoKalisation, referenz allel (REF) und alternate allel (ALT) für die identifizierten Deletionen IN Region A (A1, A2, A3), den assoziierten Top-SNP (SNV) und die InDel in region B (B1) 29
Tabelle 5: Genotypenverteilung der vier identifizierten Varianten und die entsprechende Haplotypen 29
Tabelle 6: Mittelwerte, Standardabweichngen (SD), Minima und Maxima für die Variablen S_{ROH} (in Mb), N_{ROH}, L_{ROH} (in Mb) und F_{ROH} für die Gesamte Lipizzanerstichprobe, die Pferde des Gestüts Piber, des Gestüts Topol'čianky, und der Kroatischen und Ungarischen Stichproben. 35
Tabelle 7: Verteilung der ROHs und F_{ROH} (in %) in unterschiedlichen Längenklassen (0.5-1 Mb, 1-2 Mb, 2-4 Mb, 4-6 Mb, 6-8 Mb, 8-10 Mb, >10 Mb) beziehungsweise in cumulativen Längenklassen (<1 Mb, <2 Mb, <4 Mb, <6 Mb, <8 Mb, <10 Mb, total F_{ROH}) für die österreichische, Slowakische, Kroatische und ungarische und die Gesamte Stichprobe (Gesamt). 36
Tabelle 8: ROH Inseln, die in mehr als 50% der Tiere überlappen (ROH freq.) für das gesamte Lipizzaner Probe und die in den Inseln enthaltenen bekannten gene. 37
Tabelle 9: ROH Inseln, die in mehr als 50% der Tiere überlappen (ROH freq.) für die Lipizzaner Population von Piber und die in den Inseln enthaltenen bekannten gene. 39
Tabelle 10: ROH Inseln, die in mehr als 50% der Tiere überlappen (ROH freq.) für die Lipizzaner Population von Topol'čianky und die in den Inseln enthaltenen bekannten gene. 40
Tabelle 11: ROH Inseln, die in mehr als 50% der Tiere überlappen (ROH freq.) für die kroatischen Lipizzaner Stichproben von Lipik and Đakovo und die in den Inseln enthaltenen bekannten gene. 40
Tabelle 12: ROH Inseln, die in mehr als 50% der Tiere überlappen (ROH freq.) für die ungarische Lipizzaner Stichprobe von Szilvasvárad und die in den Inseln enthaltenen bekannten gene. 41
Tabelle 13: Gen Ontologie (GO) termini und KEGG pfade basierend auf den innerhalb von ROH INseln lokalisierten genen für die gesamte Lipizzaner Stichprobe 42
Tabelle 14: Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Minimum- und Maximumwerte für die Variablen S_{ROH} (in Mb), N_{ROH}, L_{ROH} (in Mb) und F_{ROH} 47
Tabelle 15: ROH Inseln und die darin lokalisierten Gene, die bei zumindest zwei der drei Haflinger Subpopulationen anzutreffen waren 49
Tabelle 16: SNP Genotypen für die Loci *LCORL/NCAPG*, *ZFAT* und *LASP1* in den drei Haflinger Subpopulationen von Südtirol, Österreich und Slowenien. 52
Tabelle 17: Mittelwerte, Standardabweichungen (SD), Minimum und Maximum Werte für die Variablen S_{ROH} (in Mb), N_{ROH}, L_{ROH} (in Mb) und F_{ROH} für das gesamte Sample und die Subpopulationen definiert durch die einzelnen Farbschläge Fuchs, Brauin, Rappe, Mohrenkopf, Tiger und Schecke. 57
Tabelle 18: Chromosomale Position, Länge und annotierte Gene innerhalb definierter ROH Inseln, die von mehr als 50% der Individuen geteilt werden. 58
Tabelle 19: Chromosomale Position, Länge und annotierte Gene innerhalb definierter ROH Inseln, die von mehr als 50% der Individuen geteilt werden, für die Noriker Fuchspopulation. 60
Tabelle 20: Chromosomale Position, Länge und annotierte Gene innerhalb definierter ROH Inseln, die von mehr als 50% der Individuen geteilt werden, für die Braune Noriker Stichprobe. 60
Tabelle 21: Chromosomale Position, Länge und annotierte Gene innerhalb definierter ROH Inseln, die von mehr als 50% der Individuen geteilt werden, für die Rappfarbene Noriker Stichprobe. 61
Tabelle 22: Chromosomale Position, Länge und annotierte Gene innerhalb definierter ROH Inseln, die von mehr als 50% der Individuen geteilt werden, für die Noriker Mohrenstichprobe. 61
Tabelle 23: Chromosomale Position, Länge und annotierte Gene innerhalb definierter ROH Inseln, die von mehr als 50% der Individuen geteilt werden, für die Noriker Tiger Stichprobe. 62
Tabelle 24: Gen Ontologie (GO) Termini und KEGG Pfade (P<0.05) basierend auf in ROH Inseln lokalisierten annotierten Genen für die gesamte Noriker Stichprobe 63
Tabelle 25: Genotypenfrequenzen für assoziierte SNPs nahe den Loci *LCORL/NCAPG, ZFAT, LASP1* aus der Studie von Makvandi-Nejad et al. (2012) für 174 Noriker und 28 Posavina Pferde 64
Tabelle 26: S_{ROH} Werte (in Mb), Summe der Länge der ROH inseln (in Mb), Anzahl ROH inseln und anzahl annotierter gene innerhalb ROH inseln, und Anzahl private Roh Inseln per Rasse 68

Tabelle 27: Rassen Überlappende ROH Inseln (Anfang und ende in Mb) und annotierte gene im Überlappungsbereich. 69
Tabelle 28: genotypenverteilung am *MC1R* locus (*T/T* = Fuchs; *T/C* or *C/C* = Kein Fuchs) 75
Tabelle 29: Mit Körpergröße assoziierte SNPs auf den mit körpergröße assoziierten Loci *LCORL/NCAPG, ZFAT* and *LASP1* und Genotyp Frequenzen beim Bosnischen Gebirgspferd und beim Exmoor Pony (n.s.=nicht signifikant). 76
Tabelle 30: Gene Ontologie Termini and KEGG Signalwege, die bei mehr als einer Rasse anzutreffen waren (BHp-Wert = Bonferroni korregierter p-Wert) 77
Tabelle 31: Die wichtigsten Zuchttiere beim Barockesel, die zusammen 50% des Genpools bestimmen; ub.=unbekannt. 82
Tabelle 32: Genotypen der getesteten Esel auf dem Scheckungs Locus (c.1978*2T>A) und dem Dominant White Locus (c.662A>C) 86

17 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Arbeitsfluss der Pixel basierenden Methode nach Druml et al. (2017) um Scheckungsmuster von Pferden aus Digitalbildern in Binärdaten umzuwandeln 12
Abbildung 2: Kanonische Varianzanalyse (links) von photometrischen Werten im CIE L*a*b System (rechts Messdaten in PC Farben umgewandelt) um die phänotypische Differenzierung von Pferden unterschiedlicher Allel Kombinationen von ASIP und MC1R darzustellen (Druml et al., 2017) 13
Abbildung 3: Populationsübergreifende Netzwerkgrafik auf Basis von HD 670k SNP Daten von sieben Pferderassen die historisch einen Einfluss auf den Haflinger, Lipizzaner und Noriker hatten. Dieses Netzwerk beinhaltet die genetische Distanz genetische Distanz (Länge der Verbindungslinien), genomische Verwandtschaft (Breite der Verbindungslinien), Admixture (Farbanteil in den einzelnen Kreisen) und Autozygotie (Größe der Kreise) (aus Druml et al., 2018) 14
Abbildung 5: Links der Hengst Conversano Bonavoja, homozygoter Milchschimmel; Abbildung 6: re. Favory Aquileja, ein kastanienbrauner Lipizzaner, eine Schattierung, die durch die Allel Kombination A/a E/E hervorgerufen wird (Fotos Druml) 22
Abbildung 7: Die Stute Cantata links als Fohlen und rechts als Dreijährige. Die Stute hat ein großes Kopfabzeichen, hohe Beinabzeichen und einen weißen Streifen am Brustkorb; Genotyp Splashed White; Dominant White: -/-; W20/W20 (- = Wildallel). (Fotos Lipizzanergestüt Piber). 23
Abbildung 8: Rechts die Schimmelstute Fama (Genotyp Splashed White; Dominant White: -/- ; W20/-) (- = Wildallel) mit einem gescheckten Hengstfohlen von Neapolitano Madar bei Fuß (Genotyp Splashed White; Dominant White: -/- ; W20/-). Links ein drei Tage Fohlen a.d. Porzellanscheckstute Cantata (vgl. Abb.2) (Genotyp Splashed White; Dominant White: -/-; W20/-) (Fotos Lipizzanergestüt Piber). 23
Abbildung 9: Manhatten Plot und Quantile-Quantile plot der GWAS Mohrenkopf (Noriker) versus Rappen (Noriker) (aus Grilz-Seger et al., 2019) 27
Abbildung 10: Mohrenköpfe (engl. blue roan) beim Murgesen (li.), Lipizzaner (mi.) und Noriker (re.) 27
Abbildung 11: Pedigree Beispiel für die Segregation des Roan Faktors beim Noriker Hengst NO180. Hengste sind als Rechtecke, Stuten als Kreise abgebildet (Mohrenköpfe sind grau, nicht-roan Phänotypen sind weiß gekennzeichnet) (aus Grilz-Seger et al., 2019f) 28
Abbildung 12: a) Darstellung der ersten drei Hauptkomponenten, die zusammen 35% der genetischen Varianz der untersuchten Lipizzaner Stichprobe erklären. (b) Grafische Darstellung der einzelnen Admixture Simulationsschritte (K von 2 bis 8) und die dabei errechneten individuellen Clusterzugehörigkeitskoeffizienten für Österreichische, Kroatische, Ungarische und Slowakische Lipizzaner (aus Grilz-Seger et al., 2019a) 33
Abbildung 13: Hochauflösende Netzwerkdarstellung von Lipizzanern aus den Gestüten Piber (Austria), Topol'čianky (Slowakei), Đakovo und Lipik (Kroatien) und Szilvasvárad (Ungarn). (a) Im oberen Netzwerk sind die einzelnen Pferde (Kreise) nach ihrem Herkunftsgestüt gekennzeichnet. Im unteren Netzwerk (b) beinhalten die individuellen Kreise auch die einzelnen Clusterzugehörigkeitskoeffizienten aus der Admixture Analyse. Die Größe der Kreise ist proportional zur genomischen Inzucht (S_{ROH}), und die Länge der Verbindungslinien stellt die genetische Distanz zwischen den Tieren dar, während die Breite der Verbindungslinien proportional zur genomischen Verwandtschaft ist (aus Grilz-Seger et al., 2019a) 34

Abbildung 14: Profile Plot von S_{ROH} versus N_{ROH}. Individuen sind als einzelne Punkte dargestellt (Đakovo/Kroatien = blau; Lipik/Kroatien = rot; Piber/Österreich = grün; Szilvasvárad/Ungarn = braun; Topol'čianky/Slowakei = violett). 37
Abbildung 15: a) Darstellung der ROH Inseln, die den HOXB Cluster auf ECA11:24.13-24.81 Mb beinhalten für die einzelnen Stichproben. In Abbildung b) wird eine ROH Insel auf ECA11:31.01-31.94 Mb gezeigt, welche die Gene C11H17orf67, DGKE, COIL, SCPEP1, AKAP1, MSI2 beinhaltet (aus Grilz-Seger et al., 2019a). 38
Abbildung 16: ROH Insel rund um das STX17 Gen (gekennzeichnet durch die zwei vertikalen roten Linien) auf ECA25:6.394.110-6.794.044. Die einzelnen Subpopulationen sind farblich gekennzeichnet: Österreich = blau, Slowakei = braun, Kroatien = rot, Ungarn = grün (aus Grilz-Seger et al., 2019a). .. 38
Abbildung 17: ROH Verteilung auf ECA8 in der gesamten Lipizzaner Stichprobe. Eine private ROH Insel ist hier für ungarische Lipizzaner ersichtlich (blaue Linie) und eine für die österreichischen Lipizzaner (rote Linie) (aus Grilz-Seger et al., 2019a). 41
Abbildung 18: A) Genetische Clusterzuordung mittels Admixture Analyse für die drei Stichproben Südtiroler (Italienischer), Slowenischer und Österreichischer Haflinger in den Simulationsszenarios K = 2-5. B) Netzwerkdarstellung der gesamten Haflingerstichprobe. Jeder Kreis entspricht einem Individuum, die Schattierung dem genetischen Cluster und die Größe entspricht dem Inzuchtgrad (F_{ROH}); die Länge der Verbindungslinien bezeichnet die genetische Distanz und die Breite der Linien den Verwandtschaftsgrad (aus Grilz-Seger et al., 2019c). 46
Abbildung 19: Verteilung der Summe an ROH Inseln (in Mb) über die einzelnen Chromosomen für die Südtiroler, die slowenische und die österreichische Haflingerstichprobe (aus Grilz-Seger et al., 2019c). 48
Abbildung 20: Darstellung der ROH Inseln (% der Tiere, die an der jeweiligen SNP Position ein ROH teilen) für die Südtiroler, slowenischen und österreichischen Haflinger auf Chromosom 3 (aus Grilz-Seger et al., 2019c). 49
Abbildung 21: Darstellung der ROH Inseln (% der Tiere die an der jeweiligen SNP Position ein ROH teilen) für die Südtiroler, slowenischen und österreichischen Haflinger am Chromosom 7 (aus Grilz-Seger et al., 2019c). 50
Abbildung 22: Darstellung der ROH Inseln (% der Tiere die an der jeweiligen SNP Position ein ROH teilen) für die Südtiroler, slowenischen und österreichischen Haflinger am Chromosom 1 (aus Grilz-Seger et al., 2019c). 50
Abbildung 23: Typwandel und Ergebnis des Umzüchtungsprozesses beim Haflinger: links der Südtiroler Hengst Hafling, geb. 1952, in der Mitte der slowenische Haflingerhengst Smog, geb. 1998 und rechts der österreichischen Haflingerhengst Aragon, geb. 2000 (Fotos Archiv Brabenetz/Mesarić/Kärntner Pferdezuchtverband) (aus Grilz-Seger et al., 2019c). 51
Abbildung 24: Darstellung der sechs Farbschläge, die beim Noriker gezüchtet werden plus deren prozentualer Anteil in der Population (Fotos Druml) 55
Abbildung 25: Hochauflösendes Populationsnetzwerk der untersuchten Noriker Pferde Stichprobe. Jede Kugel repräsentiert ein Individuum, die Farben markieren die Fellfarbe der jeweiligen Pferde (grau – Tiger, blau – Mohrenkopf, schwarz – Rappe, beige – Braun, rot – Fuchs, gelb – Schecke), und die Größe der Kugeln ist proportional zur individuellen Homozygotie (S_{ROH}). Die Länge der Verbindungslinien steht für die genetische Distanz und die Dicke für genetische Verwandtschaft (aus Grilz-Seger et al., 2019b). 56
Abbildung 26: Individuelle Verteilung der ROHs auf ECA3. Farben kennzeichnen die einzelnen Noriker Farbschläge (violett – Tiger, blau – Schecke, türkis – Rappe, grün – Mohrenkopf, orange – Fuchs, rot – Braun). In der unteren Abbildung sind die Frequenzen der Tiere die ein ROH gemeinsam haben illustriert (aus Grilz-Seger et al., 2019b). 59
Abbildung 27: Geografische Herkunft der 12 untersuchten Pferderassen (Thomas Druml) 66
Abbildung 28: PCA Plot der Population Stratifizierung der untersuchten Pferde aus zwölf verschiedenen Rassen. In der linken Grafik Darstellung von PC1 versus PC2, beide erkläre zusammen 39% der genomischen Varianz; in der rechten Abbildung Darstellung von PC1 versus PC3, die zusammen 37% der genomischen Varianz erklären. (AKT = Achal-Tekkiner, BMH = Bosnisches Gebirgspferd, EXP = Exmoor Pony, FT = French Trotter, GID = Gidran, HAF = Haflinger, LIP = Lipizzaner, NOR = Noriker, POS = Posavina, PAR = Vollblut Araber, SF = Selle Francais und SHA = Shagya Araber) ... 68
Abbildung 29: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA11 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d) 71
Abbildung 30: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA3 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d) 71

Abbildung 31: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA7 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d) 72
Abbildung 32: ROH Verteilung auf ECA7 in den Rassen French Trotter (rot) und Selle Francais (türkis). In der unteren Grafik wird die Überlappung der Homozygotie Regionen zwischen beiden Rassen veranschaulicht(aus Grilz-Seger et al., 2019d)..... 73
Abbildung 33: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA22 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d) 74
Abbildung 34: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA6 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d) 74
Abbildung 35: ROH Inseln (in mehr als 50% der Tiere innerhalb einer Stichprobe) pro Pferderasse auf ECA18 inklusive Gene spezifischen Interesses (aus Grilz-Seger et al., 2019d) 75
Abbildung 36: Verteilung der Homozygotie Regionen am Chromosom 3. Die Gene MC1R, BANK, SLC39A8, UVSSA, MAEA sind durch vertikale Balken hervorgehoben. Die einzelnen Linien des Plots geben die Frequenz der Tiere mit einer ROH Insel pro Rasse wieder, die Farben entsprechen folgenden Rassen : Achal-Tekkiner - purple; French Trotter - grün; Haflinger - rot; Gidran - gelb; Vollblut Araber - orange; Bosnisches Gebirgspferd - blau; Posavina - hellblau; Lipizzaner - pink; Noriker - schwarz; Shagya Araber - braun; Selle Francais - dunkelgrün; Exmoor Pony - türkis. 76
Abbildung 37: Die wichtigsten Gründertiere des Barockesels die 50% des Genpools bestimmen..... 81
Abbildung 38: Durchschnittliche Verwandtschaft einzelner Zuchttiere mit der gesamten Population entlang der Zeitachse definiert durch das Geburtsjahr (blaue Markierung heben die wichtigsten Zuchttiere hervor). 82
Abbildung 39: Hauptkomponentenanalyse anhand von genomweiten SNP Daten..... 83
Abbildung 40: Verschiedene beim Esel vorkommende depigmentierte Phänotypen: oben links ein österr.-ungar. Barockesel, oben rechts ein Asinara Esel, unten links zwei Schimmel, unten rechts ein gescheckter Esel (Fotos Grilz-Seger, Schardax) 85
Abbildung 41: Österreich-ungarischer Barockesel mit Restpigment im Fohlenfell (Fotos Scoufal)..... 87

Bundesministerium
Nachhaltigkeit und Tourismus

ISBN bitte laut Impressum