

***Analyse der genetischen Variabilität der Lipizzanerrasse mittels  
molekular- und zytogenetischer Methoden***

**Abschlußbericht**

	<b><i>Inhalt</i></b>	<b><i>Seite</i></b>
<b>I</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	1
<b>II</b>	<b>Material &amp; Methodik</b>	1
1.	Untersuchte Gestüte	1
2.	Genetische Marker	3
3.	Zytogenetik	4
4.	Pedigreedaten	4
5.	Auswertesoftware	5
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	6
1	DNA-Mikrosatelliten	
1.1	Variabilität der untersuchten DNA-Mikrosatelliten-Marker	6
1.2	Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	9
1.3	Homozygotie und Inzuchtkoeffizient	9
1.4	Abstammungsüberprüfung mit Hilfe von DNA-Mikrosatelliten-Markern	11
1.5	Nullallele	12
1.6	Populationsdifferenzierung	14
2.	mt-DNA	
2.1	Mitochondrien-DNA Diversität	17
2.2	mt-DNA und Pedigree	18
3.	Zytogenetische Untersuchungen	
3.1	Allgemeiner Chromosomenstatus	22
3.2	PRINS-Telemoren-Analyse	22
<b>IV</b>	<b>Schlußfolgerungen</b>	25
<b>V</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	27
<b>VI</b>	<b>Anhang</b>	
1.	Zusatztabellen, Zusatzabbildungen	28
2.	Veröffentlichungen	43

## **I Einleitung und Problemstellung**

Vorrangiges Ziel des geförderten Projektes "Analyse der genetischen Variabilität der Lipizzanerrasse mittels molekular- und zytogenetischer Methoden" war es, die heute lebende Lipizzanerpopulation genetisch zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde von 566 Pferden aus acht europäischen Staatsgestüten Blutproben entnommen. Die Blutproben dienten als Ausgangsmaterial für die Typisierung von 22 autosomalen DNA-Mikrosatelliten (MS)-Markern sowie die Sequenzierung von definierten Mitochondrien(mt)-DNA-Abschnitten. Außerdem wurden aus den Blutproben Chromosomenpräparate hergestellt und zytogenetisch untersucht.

Die wichtigsten Ziele bzw. Fragen, die es zu untersuchen galt, waren folgende:

- Darstellung der genetischen Diversität des Lipizzaners mit Hilfe von DNA-MS- und mt-DNA-Markern
- Vergleich der genetischen Diversität des Lipizzaners mit der anderer Pferderassen
- Inwieweit kann über molekulargenetische Analysen der Inzuchtgrad eines Tieres abgeschätzt werden ?
- Ausmaß der genetischen Differenzierung der untersuchten Lipizzanerpopulationen (Gestüte)
- Einsatz und Validierung der DNA-MS- und mt-DNA-Analyse zur Überprüfung von Eltern-Nachkommen-Beziehungen bzw. ganzen Teilen von Stammbäumen (z.B. Stutenlinien)
- Überprüfung, ob der Chromosomenstatus innerhalb der Lipizzanerpopulation auffällige Aberrationen zeigt (PRINS-Telomeren- und Giemsa-Band-Technik)

Aufgrund der besonderen Rolle des Kladrubers als Mitbegründer der Lipizzanerrasse (Gründerhengst Favory 1779) wurden zu Vergleichszwecken zusätzlich 50 Kladruber (Schimmel und Rappen) aus den Gestüten Kladruby bzw. Slatinany mit in die Untersuchung einbezogen.

## **II Material & Methodik**

### **1. Untersuchte Gestüte**

In den Jahren 1997 und 1998 wurden im Verlauf von mehrtägigen Exkursionen in verschiedene Gestüte Blutproben (10 ml Vacutainer) von insgesamt 566 Lipizzanern und 50 Kladrubern gesammelt (Tabelle 1). Eine detaillierte Auflistung aller gesammelten Lipizzanerproben ist im Anhang (Tabelle A1) zu finden. Aus den Blutproben wurde für molekulargenetische Untersuchungen DNA isoliert. Außerdem wurden Chromosomenpräparate für zytogenetische Analysen hergestellt. Für mögliche spätere Untersuchungen wurde jeweils eine Blutprobe der Pferde am Institut für Tierzucht und Genetik der VMU, Wien, bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 1:** Besuchte Lipizzaner- bzw. Kladrubergestüte und Anzahl gesammelter Blutproben

Gestüt [Land]	Hengste	Stuten	gesamt
Beclean [RO]	4	24	28
Djakovo [HR]	15	40	55
Fagaras (Simbata de Jos) [RO]	9	81	90
Lipica [SLO]	19	40	59
Monterotondo [I]	13	50	63
Piber [A]	6	81	87
Spanische Reitschule (Piber) [A]	66	--	66
Szilvásvárad [H]	8	68	76
Topol'cianky [SL]	5	37	42
Kladruby [CZ]	10	20	30
Slatinany (Kladruby) [CZ]	10	10	20
total	165	451	616

Für die Auswertung bestimmter Fragestellungen wurde nicht auf den gesamten Datensatz zurückgegriffen ( $n = 566$  Lipizzaner). So wurden z.B. zur Untersuchung der genetischen Differenzierung solche Pferde nicht berücksichtigt, die nicht am jeweiligen Standort geboren waren oder deren Eltern nachweislich aus anderen Gestüten stammten (reduzierter Datensatz,  $n = 415$  Lipizzaner).

## 2. Genetische Marker

Die Analyse der genetischen Markern erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dovc (Institut für Tierzucht, Universität Ljubljana, Slowenien). Methodische Details finden sich in zwei Manuskripten [12, 13], die im Verlauf des Projektes publiziert wurden (siehe auch Anhang, Veröffentlichungen).

Insgesamt wurden 22 pferdespezifische DNA-MS-Marker, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, untersucht (Anhang, Tabelle A2). Die Marker wurden so ausgewählt, daß die erhaltenen Ergebnisse möglichst gut mit denen aus anderen Untersuchungen verglichen werden konnten. Zwölf der untersuchten Marker (Anhang, Tabelle A2) entsprechen dem Markersatz eines kommerziellen Testsystems ("StockMarks for Horses", Applied Biosystems, Wien), welches weltweit zur Abstammungskontrolle bei Pferden verwendet wird. Der Vorteil dieses Satzes besteht darin, daß die Marker in sogenannten "Multiplex-PCRs" gemeinsam amplifiziert und typisiert werden können. Für die Amplifikation der MS wurden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Primer verwendet, welche die Typisierung der Marker auf einem halbautomatischen Kapillarelektrophoresegerät (ABI310, Applied Biosystems) erlaubten. Für die Auswertung der Mikrosatellitendaten wurden die Softwareprogramme (GeneScan 2.1, Genotyper 2.0; Applied Biosystems) verwendet.

Neben den DNA-MS-Markern wurden zwei variable Segmente aus dem D-loop der mt-DNA amplifiziert und anschließend sequenziert (Anhang, Abbildung A1). Die Nukleotidabfolge der mt-DNA-Bereiche wurden ebenfalls auf einem ABI310 Kapillarelektrophoresegerät mit spezifischer Auswertesoftware (Sequence Navigator, Applied Biosystems) ermittelt.

### **3. Zytogenetik**

Peripheres Blut von 180 österreichischen Lipizzanern wurde in die Untersuchung einbezogen. Das Blut der Lipizzaner wurde mittels Concanavalin A bzw. Pokeweedstimulierung zum Wachstum von Lymphozyten veranlaßt. Nach 72 Stunden Kultur bei 37 °C wurden die Blutkulturen geerntet und eine Hypotonbehandlung in 0,075 M KCl und eine Fixation in Methanol/Eisessig (3:1) durchgeführt. Die Objektträger wurden in Äthanol gereinigt und auf Eis bei -20 °C gelagert. Ein Teil der Objektträger wurde für Untersuchungen mittels einer Trypsin-Giemsa (G)-Band-Technik verwendet. Ein anderer Teil der Objektträger wurde für die PRINS/Telomeren-Analysen geerntet. Als Primer für die telomerischen Sequenzen wurden 5'-TTAGGG und 5'-CCCTAA verwendet. Das Reaktionsgemisch mit einem Totalvolumen von 30 µl enthielt 3,0 µl 10x PCR Puffer (500 mM KCl, 100 mM TrisHCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH=8,3/20 °C), 0,6 µl jeden Primers (10 pM/µl), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1,5 µl Digoxigenin-11-dUTP (1 mM, Böhlinger Mannheim, GER) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl). Im PTC 2000 Thermal In Cycler (MJ Research, MA) wurden die Objektträger auf 95 °C (1 Minute) erhitzt, das Reaktionsgemisch zugeführt und mit einem 24 x 18 mm Deckglas abgedeckt. Die Denaturierung wurde bei 95 °C 5 Minuten weitergeführt. Dann folgte ein Annealingschritt bei 60 °C für 5 Minuten und ein Extensionsschritt bei 70 °C für 25 Minuten. Letztendlich wurden die Objektträger in Stoppuffer (50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH=8.0) 4 Minuten bei 70°C verbracht und dann dreimal in PBS (supplementiert mit Tween20, 0,2%) bei 37 °C gewaschen. Zum DIG-11-dUTP Nachweis wurde eine Schicht Anti-DIG-FITC Antikörperfragmente (40 µl/ml) verdünnt in PBT (PBS, 0,4% BSA, Amersham, IL), 0,1% Tween20 verwendet. Gegengefärbt wurde in Propidiumjodid (PI, 200 ng/ml) in 2xSSC Puffer. Dann wurden die Objektträger gewaschen und luftgetrocknet. Um das Fading zu verringern, wurde Antifading Medium (90% Glyzerol, 2,3% DABCO, pH=8,5) zugefügt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Mikroskopie erfolgte mittels eines Nikon Optiphot 2 (Nikon Inc., NY) Epifluoreszenzmikroskop. Der Nikonfiltermodul B-2A wurde dabei verwendet.

### **4. Pedigrees**

Die Erstellung der Pedigrees wurde von Herrn Prof. Sölkner und Mag. Zechner (Institut für Nutztierwissenschaften, Universität für Bodenkultur, Wien) durchgeführt. Aus Zuchtbuch-eintragen konnten Stammbäume rekonstruiert werden, die für die meisten Pferde bis ins 18. Jahrhundert zurückreichen. Insgesamt wurde mit den in die Untersuchung eingeschlossenen Pferden ein Stammbaum der Lipizzaner erstellt, der aus 3867 Individuen besteht und der bis zur dritten Vorfahrengeneration alle Vorfahren enthält. Je weiter zurück die Ahnenreihe verfolgt wurde, umso größer wurden die Lücken im Stammbaum. Nach 15 Generationen sind z.B. im Mittel nur noch 66 % aller Vorfahren eines Pferdes bekannt. Beispiele für Stammbäume sind im zweiten Zwischenbericht enthalten.

Aus den Stammbaumdaten wurden Parameter, wie z.B. der Inzuchtkoeffizient, die effektive Anzahl an Gründertieren, die effektive Anzahl an Gründergenomen und die effektive Anzahl an Vorfahren ermittelt. Da die Pedigree-Analyse kein Schwerpunkt dieses Projektes war, wird auf Detailergebnisse nicht eingegangen. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse aus der Stammbaumanalyse ist im Abschlußbericht für das EU-Projekt "Biotechnical methods in the

maintenance of genetic diversity in the Lipizzan horse breed" enthalten, der dem BMLF vorliegt. Bei der Diskussion der molekulargenetischen Analysen wird jedoch, wenn nötig, Bezug auf die Ergebnisse der Pedigree-Analyse genommen.

## 5. Auswertesoftware

Neben speziellen Programmen zur Datenaufnahme (Mikrosatelliten- und Sequenzanalyse) und zur Bearbeitung der Rohdaten, wurden zur populationsgenetischen Auswertung eine Reihe von zusätzlichen Programmen verwendet (Tabelle 2). Die meisten Programme können über das WWW heruntergeladen werden (WWW-Adressen siehe Literaturverzeichnis).

**Tabelle 2:** Verwendete Auswertesoftware

Programm	Hauptanwendungsgebiet	Referenz
Cervus	Berechnung von Allelfrequenzen, Ausschlußwahrscheinlichkeiten	[1]
Fstat	Fst-Werte	[2]
Genepop	Berechnung allgemeiner Parameter (z.B. Allel - und Genotypenfrequenzen; Test auf Hardy-Weinberg, etc.)	[3]
Genetix	Hauptkomponentenanalyse	[4]
Microsat	Genetische Distanzen	[5]
Phylip	Genetische Distanzen, Clusteranalyse	[6]
SPSS	allgemeines Statistikprogramm	

### **III Ergebnisse**

#### **1. DNA-Mikrosatelliten**

##### *1.1 Variabilität der untersuchten DNA-Mikrosatelliten-Marker*

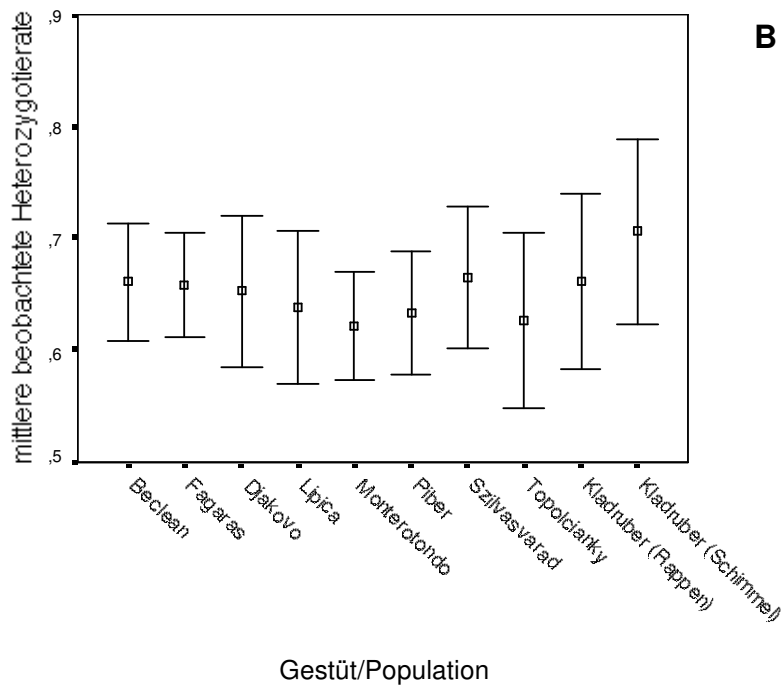
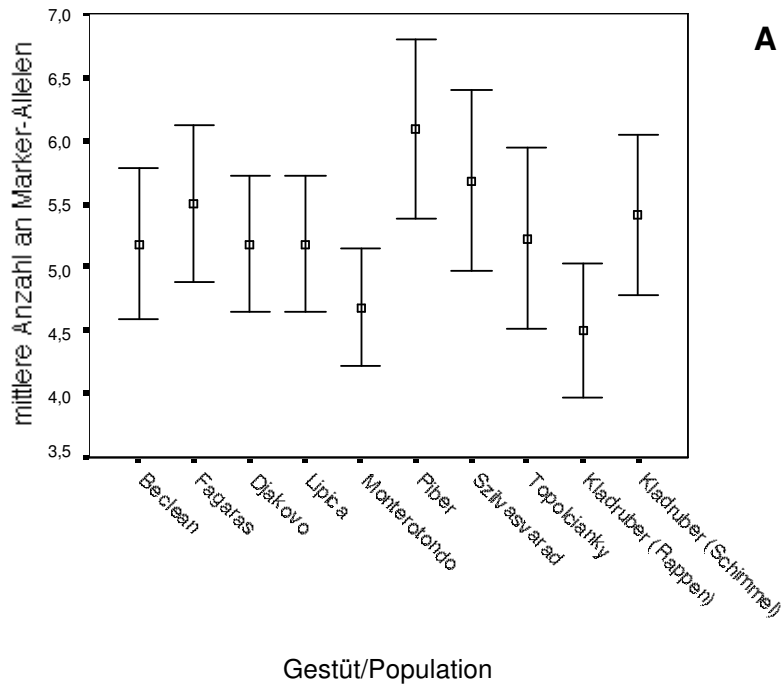
Insgesamt wurden für 22 untersuchte MS-Marker (Anhang, Tabelle A2) 153 verschiedene Allele identifiziert. Die mittlere Anzahl an Allelen, die für einen MS-Marker nachgewiesen werden konnte, betrug 6,95 (Maximum: 11; Minimum 3). Die mittlere Anzahl an Marker-Allelen unterschied sich zwischen den Gestüten signifikant (Kruskal-Wallis-Test,  $P < 0,01$ ; Abbildung 1A). Das Gestüt Piber zeigte im Vergleich zu Monterotondo und Kladrubern (Rappen) eine signifikant höhere Alleldiversität. Die höhere Diversität in Piber hängt jedoch vermutlich ursächlich mit den großen Unterschieden im Stichprobenumfang, der für die einzelnen Gestüte untersucht wurde, zusammen (siehe Tabelle 1 und Anhang, Tabelle A3). Je größer die untersuchte Stichprobe ist, umso wahrscheinlicher ist es, daß auch Allele, die nur in geringer Häufigkeit vorkommen, identifiziert werden und dann zur gesamten Alleldiversität beitragen.

In der gesamten untersuchten Lipizzanerpoblulation traten 19 Allele (12,4 %) mit einer Häufigkeit von weniger als 1 % auf. Das bedeutet, daß diese Allele nur bei sehr wenigen untersuchten Lipizzanern (bei ein bis 10 Pferden) nachgewiesen werden konnten. Für seltene Allele besteht im Vergleich zu häufigeren Allelen eine größere Gefahr durch Einflußfaktoren wie z.B. genetische Drift oder Selektion aus der Population verloren zu gehen. Unter der Annahme, daß die Variabilität von DNA-MS ein Maß für die gesamte genetische Diversität der Population ist, würde der Verlust von seltenen MS-Allelen auch einen Verlust für die Vielfalt an züchterisch relevanten Genomabschnitten, nämlich den Genen, bedeuten, der vermieden werden sollte. Interessanterweise traten 37 % der "seltenen" Allele nur in den beiden rumänischen Gestüten Fagaras und Beclean auf. Eine Erklärung für das Auftreten solcher "rumänischer" Allele könnte der vermehrte Einsatz von Stuten aus der rumänischen Landesucht zu Beginn des 20. Jahrhunderts sein. Wenn diese Allele tatsächlich authentische Lipizzanerallele und nicht das Resultat von Einkreuzungen anderer Rassen sind, dann stellen rumänische Lipizzaner möglicherweise eine wertvolle Reserve für den Genpool des Lipizzaners dar.

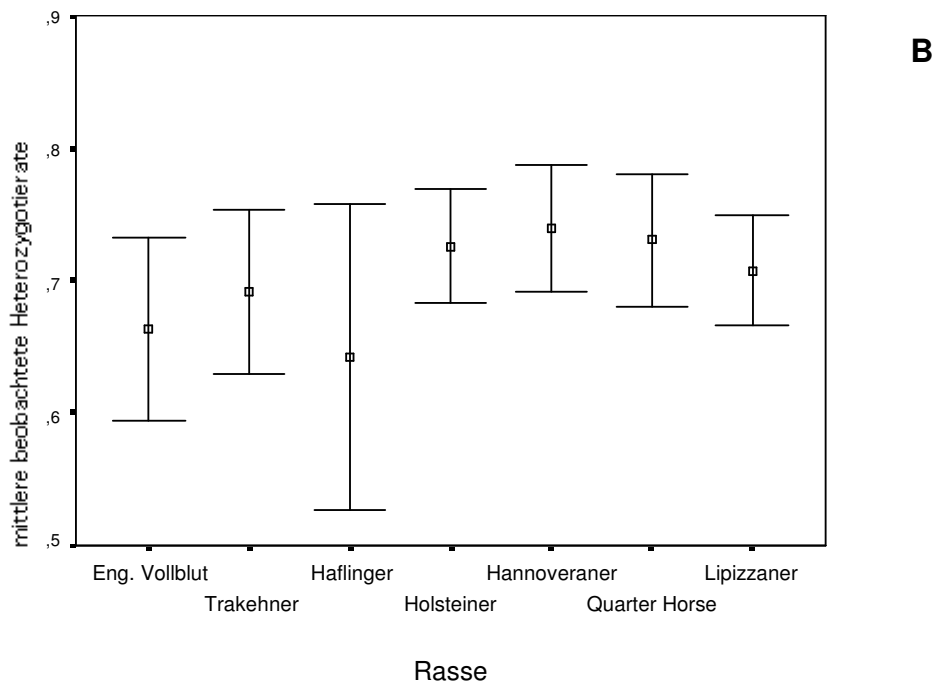
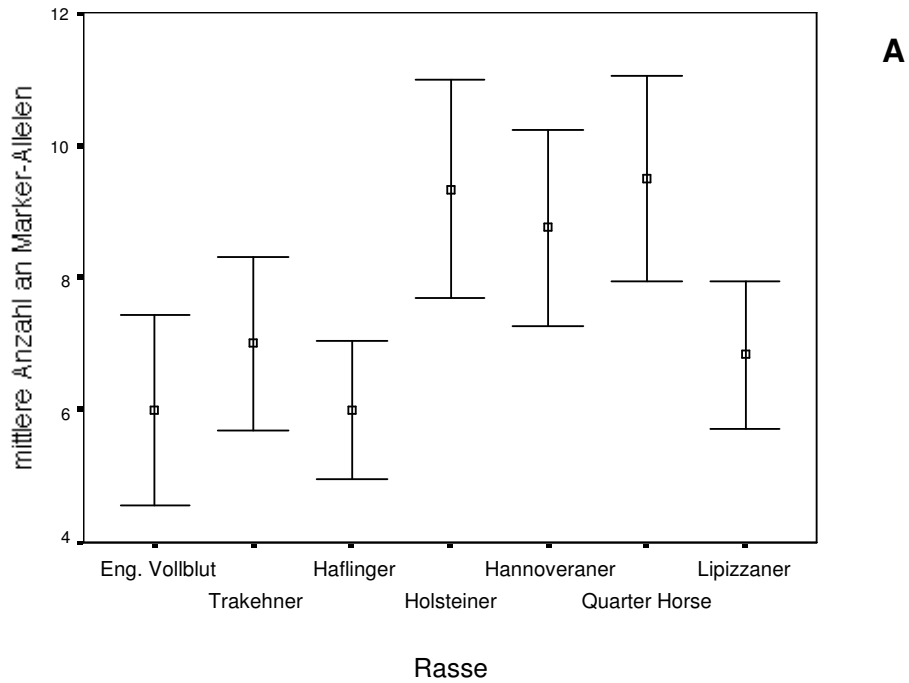
Die beobachtete Heterozygotierate der untersuchten MS-Marker variierte von 51 bis 82 % (gemittelt über Gestüte; Anhang, Tabelle A2). Die mittlere Heterozygotie (Mittelwert über alle Marker und Gestüte), die ein Maß für die genetische Diversität der Population darstellt, betrug 67 %. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Heterozygotierate zwischen den Gestüten festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test).

Obwohl der Lipizzaner eine vergleichsweise kleine Populationsgröße aufweist, ergibt der Vergleich der Alleldiversität bzw. der Heterozygotierate mit der anderer Rassen keine Hinweise auf ausgeprägte Rassenunterschiede oder eine eingeschränkte genetische Diversität des Lipizzaners (Abbildung 2A, B).

**Abbildung 1:** A) Anzahl an nachgewiesenen Allelen und B) beobachtete Heterozygotierate (Mittelwert über 22 MS-Marker  $\pm$  95 % Konfidenzintervall) in Lipizzanergestüten bzw. Kladrubern.



**Abbildung 2:** A) Anzahl an nachgewiesenen Allelen und B) beobachtete Heterozygotierate (Mittelwert über 12 MS-Marker [„StockMarks for Horses“]  $\pm$  95 % Konfidenzintervall) für ausgewählte Pferderassen (Daten aus [7,8]) und Lipizzaner





## 1.2 *Test auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht*

Unter bestimmten Voraussetzungen lassen sich in Populationen über die Hardy-Weinberg(H-W)-Gleichung und die erhobenen Populationsallelfrequenzen Erwartungswerte für die in der Population vorzufindenden Genotypenfrequenzen und damit auch für den erwarteten Anteil heterozygoter bzw. homozygoter Markerorte berechnen. Abweichungen von diesen Erwartungswerten, die sowohl positiv als auch negativ sein können, zeigen an, daß in der untersuchten Population Bedingungen, die für die Gültigkeit des H-W-Gesetzes notwendig sind, verletzt sind. Zum Beispiel führen beständige Paarungen unter nahe verwandten Tieren (Inzucht) zu einer Zunahme des Anteils homozygoter Markerorte im Vergleich zum Erwartungswert nach H-W. Obwohl sich die für eine beobachtete Abweichung zugrundeliegenden Ursachen nicht immer eindeutig ermitteln lassen - eine Zunahme der Homozygotierate kann neben Inzucht auch andere Ursachen haben (siehe unten) - können durch den Vergleich der zu erwarteten Werte mit den tatsächlich in der Population vorgefundenen Werten wichtige Aussagen bezüglich der Qualität der eingesetzten genetischen Marker bzw. der untersuchten Population getroffen werden.

Bei 176 Vergleichen (22 Marker x 8 Lipizzanergestüte) wurden in 23 Fällen ein signifikanter Homozygotenüberschuß nachgewiesen ( $P < 0,05$ ; Irrtumswahrscheinlichkeit nicht nach Bonferroni korrigiert), wobei auffiel, daß Abweichungen vor allem für zwei MS-Marker auftraten. In fünf Gestüten wurde für den Marker HMS3, in sieben Gestüten wurde für den Marker MPZ002 ein Überschuß an homozygoten Tieren gefunden. Wurden die Daten über alle Gestüte gepoolt, zeigte ein weiterer Marker, lex54, einen Homozygotenüberschuß, der an der Grenze zur statistischen Signifikanz lag. Für alle drei Marker wird angenommen, daß Nachweisschwierigkeiten bei bestimmten Allelen ("Nullallele") für die beobachteten Abweichungen von H-W verantwortlich sind (siehe auch III, 1.5).

Betrachtet man alle untersuchten MS-Marker, mit Ausnahme der Marker HMS3, MPZ002, lex54 und ASB2 (siehe III, 1.4 und 1.5), so sind für die einzelnen Gestüte keine signifikanten Abweichungen von H-W nachweisbar. Die molekulargenetischen Ergebnisse ergaben keinen Hinweis darauf, daß sich in den einzelnen Gestüten überwiegend nahe verwandte Tier fortpflanzen.

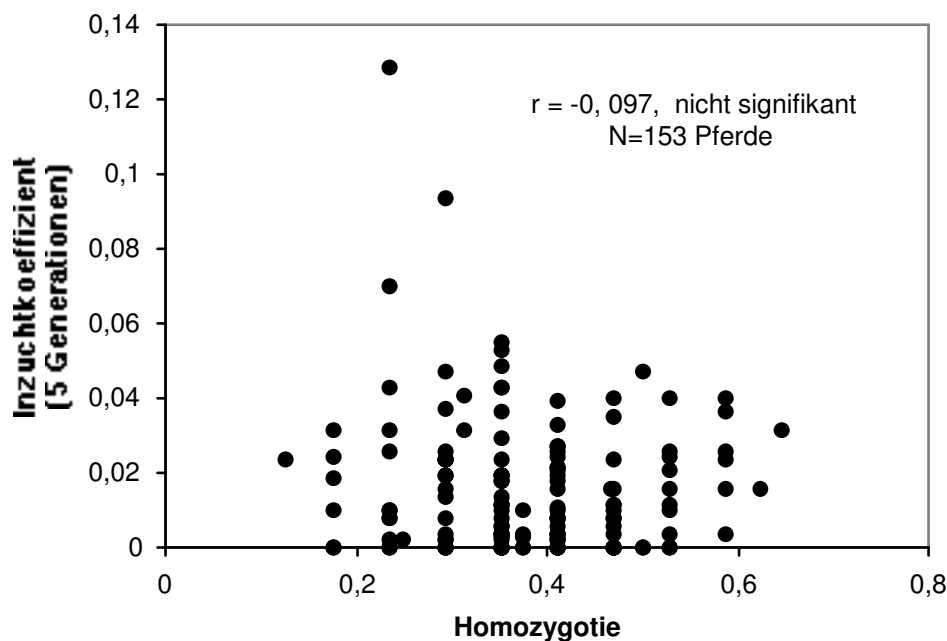
## 1.3 *Inzuchtkoeffizient und Homozygotie*

Unter Verwendung der gesammelten Pedigree-Informationen wurde überprüft, ob der aus dem Stammbaum berechnete individuelle Inzuchtkoeffizient mit der beobachteten Homozygotie (Anteil homozygoter Markerorte) eines Pferdes übereinstimmt. Theoretisch würde man erwarten, daß Inzuchtkoeffizient und Homozygotie eines Pferdes positiv miteinander korreliert sind, d.h. Tiere mit höheren Inzuchtkoeffizienten sollten im Mittel auch einen höheren Homozygotiegrad zeigen als Pferde mit niedrigem Inzuchtkoeffizienten. Am Beispiel der untersuchten Pferde aus dem Bundesgestüt Piber ist zu erkennen, daß keine signifikante positive Korrelation zwischen individueller Homozygotie (18 MS-Marker berücksichtigt) und individuellem Inzuchtkoeffizient gezeigt werden konnte (Abbildung 3). Das gleiche Ergebnis - kein Zusammenhang zwischen Inzuchtgrad und Homozygotie - wurde erhalten, wenn alle untersuchten Tiere berücksichtigt wurden. Das bedeutet, daß zumindest mit einfachen statistischen Verfahren allein aufgrund von

genetischen Untersuchungen keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Lipizzaner als "ingezüchtet", "weniger ingezüchtet" oder "nicht ingezüchtet" zu klassifizieren sind.

Es gibt mehrere Gründe, warum kein Zusammenhang zwischen Inzuchtgrad und Homozygotie gefunden wurde. Simulationsstudien (Baumung & Sölkner, Boku, Wien; siehe BMLF-Projekt 1137) ergaben, daß sehr viele MS-Marker untersucht werden müßten, damit die Homozygotie eines Tieres den wahren Autozygotiegrad (der mit dem Homozygotiegrad korreliert ist) widerspiegelt. Selbst wenn keine Beschränkung hinsichtlich der Untersuchungskosten für die Erhebung der Genotypen existieren würde und 100 Marker untersucht werden könnten, ist eine Aussage, ob ein Tier tatsächlich ingezüchtet ist momentan nur eingeschränkt möglich. Abstammungsüberprüfungen (siehe III, 1.4) haben zudem ergeben, daß die Stammbaumdaten der untersuchten Lipizzaner zum Teil falsch sind. Verkehrte Abstammungen führen dazu, daß fehlerhafte Inzuchtkoeffizienten errechnet werden, die keine eindeutige Beziehung zur Homozygotie mehr zeigen.

**Abbildung 3:** Korrelation zwischen individueller Homozygotie (Anteil homozygoter MS-Loci; 18 MS-Marker berücksichtigt) und individuellem Inzuchtkoeffizienten am Beispiel von Lipizzanern aus Piber.



#### 1.4 Abstammungsüberprüfung mit Hilfe von DNA-MS-Markern

Der relativ hohe Anteil an nachgewiesenen Fehl Abstammungen (je nach Untersuchung und Tierart werden zwischen 2 bis zu 20 % angegeben) bei verschiedenen Nutztierarten macht deutlich, daß neben einer formalen Dokumentation der Abstammung im Zuchtbuch, eine unabhängige

Überprüfung der Eintragungen notwendig ist. Für Pferde wurde in den letzten drei Jahrzehnten ein blutgruppenserologischer Abstammungsnachweis durchgeführt. Weltweit gesehen nimmt der Stellenwert der serologischen Verfahren innerhalb der Veterinärgenetik allerdings ab [9]. Neue DNA-gestützte Methoden, insbesondere die Analyse von MS-Markern spielen im Bereich der Abstammungsüberprüfung eine immer wichtigere Rolle. Ein Grund für die zunehmende Verbreitung von DNA-Tests liegt in den vergleichsweise geringen Anforderungen, die an das benötigte Probenmaterial gestellt werden. Sind für die Blutgruppentypisierung unbedingt frische Blutproben erforderlich, so kann für DNA-Tests unterschiedliches Probenmaterial wie Blut, Gewebe, Haarwurzeln oder Speichel verwendet werden. Das Grundprinzip der biologischen Abstammungskontrolle besteht darin, an einer größeren Anzahl von polymorphen Markerorten die Allele bei Eltern und Nachkommen festzustellen. Da das Muttertier bei Säugetieren mit Ausnahme von Embryotransfertieren in der Regel sicher angegeben werden kann, wird meist gefragt, ob ein bestimmtes männliches Tier als Vater in Frage kommt. Wenn der fragliche Nachkomme Allele hat, die nicht von der Mutter stammen können und beim angegebenen Vater nicht vorhanden sind, so ist die Elternschaft dieses Vatertieres zu bestreiten. Im Prinzip handelt es sich bei der Abstammungssicherung also um ein Ausschlußverfahren. Die allgemeine Vaterschaftsausschließungschance ist eine statistische Kenngröße, die beschreibt, welcher Anteil von Nichtvätern durch das Testsystem als solcher erkannt und ausgeschlossen wird. Die Ausschließungschance eines Tests hängt in erster Linie von der Anzahl und Variabilität der Marker ab. Je mehr variable Marker untersucht werden, umso größer ist die Sicherheit, mit der eine falsche Abstammung erkannt werden kann. Normalerweise müssen für einen aussagekräftigen Abstammungstest 10 bis 12 variable MS-Marker untersucht werden.

Die Ergebnisse der Untersuchung, zeigen daß MS-Marker sehr gut für die Abstammungsüberprüfung beim Lipizzaner geeignet sind. Bis auf Marker NVHQ18 sind alle anderen 21 untersuchten Marker (zum Teil mit Einschränkung, siehe III, 1.5) für einen DNA-Test nutzbar. Mit einem Standardsatz von 12 Marken (identisch mit Markern des StockMarks Kit for Horses) wird, wenn beide Elterntiere für den Test zur Verfügung stehen und die Abstammung für ein Elternteil als gesichert angesehen werden kann, eine Ausschließungschance von 99,959 % erreicht. Ist die Abstammung für beide Elternteile fraglich, liegt dieser Wert bei 98,756 %. Selbst wenn für eine Vaterschaft z.B. zwei Brüder in Frage kommen, kann mit einer Sicherheit von etwa 96 % der Nichtvater von der Vaterschaft ausgeschlossen werden (Voraussetzung: mütterliche Abstammung ist sicher und Mutter steht für den Test zur Verfügung). In schwierigeren Fällen, z.B., wenn als Putativ-Väter zwei Brüder in Frage kommen und die Mutter für den Test nicht zur Verfügung steht, müssen allerdings zusätzliche Marker untersucht werden.

Aufgrund der vorhandenen Pedigree-Informationen konnte für 112 Lipizzaner die väterliche und für 141 Tiere die mütterliche Abstammung überprüft werden. Die Ergebnisse der Überprüfung sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

**Tabelle 3:** Häufigkeit von FehlAbstammungen in Lipizzanergestüten

Gestüt [Land]	väterliche Fehl Abstammung (112 überprüft)	mütterliche Fehl Abstammung (141 überprüft)
Beclean [RO]	0	0
Djakovo [HR]	0	2
Fagaras (Simbata de Jos) [RO]	1	1
Lipica [SLO]	0	0
Monterotondo [I]	0	6
Piber [A]	0	0
Spanische Reitschule (Piber) [A]	0	0
Szilvásvárad [H]	1	1
Topol'cianky [SL]	0	1
total in %	1,8	7,8

Erstaunlicherweise war die mütterliche Abstammung weit häufiger falsch als die väterliche Abstammung. Auffällig war, daß im Gestüt Monterotondo 6 von 19 (32 %) überprüften Abstammungen nicht richtig waren. Nachgewiesene mütterliche Fehl Abstammungen wurde auch durch mt-DNA-Untersuchungen (siehe III, 2.2) bestätigt.

Da nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß den nachgewiesenen Fehl Abstammungen eine Verwechslung von Blutproben (bei der Blutentnahme oder im Labor) zugrunde liegen, sollte von den betroffenen Pferden zur Bestätigung der Ergebnisse eine B-Probe untersucht werden.

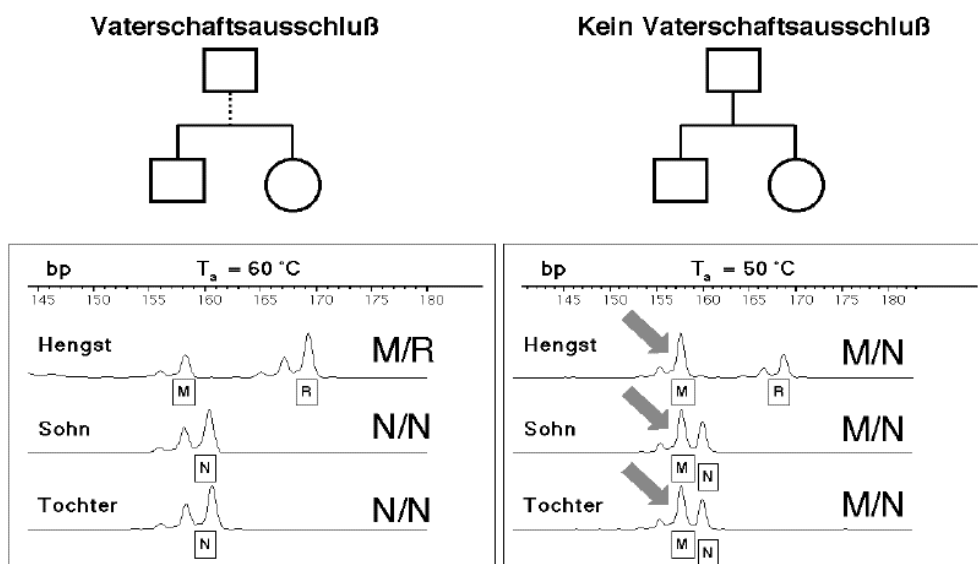
### 1.5 Nullallele

Der Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Identifizierung von MS-Allelen führt manchmal zu einem Problem: Bei einzelnen Individuen können Mutationen (Substitutionen, Insertionen, Deletionen) in den Primerbindungsstellen auftreten, welche die Amplifikation und damit den Nachweis bestimmter MS-Allele beeinflussen. Je nachdem, an welcher Position der Primerbindungstelle die Mutation auftritt, wird das betreffende Allel entweder gar nicht ("Nullallele") oder mit stark verminderter Effizienz amplifiziert. Beides kann dazu führen, daß eigentlich heterozygote Tiere als homozygot typisiert werden. Im schlimmsten Fall kann der Genotypisierungsfehler zum ungerechtfertigten Ausschluß eines tatsächlichen Elterntieres von der Elternschaft führen [10, 12].

Bei Abstammungsüberprüfungen (siehe oben) wurden relativ häufig Fälle entdeckt, bei denen nur ein einziger von 22 untersuchten Markern auf eine Fehl Abstammung hindeutete. In diesen Fällen

kk  
Ni  
Illi  
M  
wi  
Ai  
(S  
Fr

ier und  
eigt zur  
Genotyp  
hlossen  
PCR-  
1 Kinder  
mehr in



**Abbildung 4:** Amplifikationsprofile und Genotypen des MS-Markers HMS3 für einen Lipizzanerhengst und zwei seiner Nachkommen. R, M und N sind Allelbezeichnungen.

Als Ursache für das unterschiedliche Amplifikationsverhalten bei verschiedenen experimentellen Bedingungen (siehe unterschiedliche Peakhöhen von Allele M in Abbildung 4) konnte nach Klonierung und Sequenzierung von HMS3-Allelen eine Punktmutation in einer der beiden Primerbindungsstellen des Markers HMS3 ermittelt werden. Ein Nukleotid austausch von G nach A behindert eine Anlagerung des Primers und damit auch eine effiziente Amplifikation des mutierten Allels.

Für den Marker ASB2 konnten in beiden Primerbindungsstellen jeweils eine Punktmutation nachgewiesen werden. Hier handelt es sich um eine C nach T bzw. um eine G nach T Austausch. Weitere Einzelheiten sind in der im Druck befindlichen Publikation [12] aufgeführt. Da die Mutationen an beiden Markern bei Lipizzanern relativ häufig auftreten, sollten die Marker HMS3 und ASB2 nur mit Vorsicht für Abstammungsüberprüfungen bei Lipizzanern verwendet werden.

Weitere schwer oder nicht nachweisbare Allele könnten für die Marker Mpz002, lex54, UCD405, HTG10 und HMS7 existieren. Hierzu sind allerdings weiterführende Untersuchungen nötig.

## 1.6 Populationsdifferenzierung

Die Allelfrequenzverteilungen der untersuchten DNA-MS-Marker wiesen zwischen Gestüten Unterschiede auf. Für einige Marker konnten sogenannte "private Allele", d.h. Allele, die nur in einem Gestüt auftreten, nachgewiesen werden. In Lipica wurde zum Beispiel ein privates Allel für HMS1, in Beclean für VHL20 oder in Szilvásvárad für den Marker HTG10 gefunden. Da diese Allele äußerst selten auftreten – sie wurden jeweils nur bei einem Pferd nachgewiesen – muß man davon ausgehen, daß zufällige Mutationen für das Auftreten dieser seltenen Varianten verantwortlich sind. Deutliche Unterschiede im Auftreten von Allelen waren vor allem zwischen rumänischen Lipizzanern und Pferden anderer Lipizzanergestüte erkennbar (III, 1.1). In die Untersuchung mit aufgenommene Kladruher unterschieden sich hinsichtlich der auftretenden Allele bzw. ihrer Allelfrequenzen von allen Lipizzanerpopulationen. Trotz der historischen Beziehungen zwischen der Lipizzaner- und der Kladruberrasse, sind heute lebende Kladruher und Lipizzaner genetisch verschieden. Die genetischen Unterschiede zwischen Lipizzanern und Kladrubern sind sicher darauf zurückzuführen, daß für die Züchtung der Rassen auf unterschiedliche Genpools zurückgegriffen wurde und beide Rassen weitgehend unabhängig voneinander gezüchtet wurden.

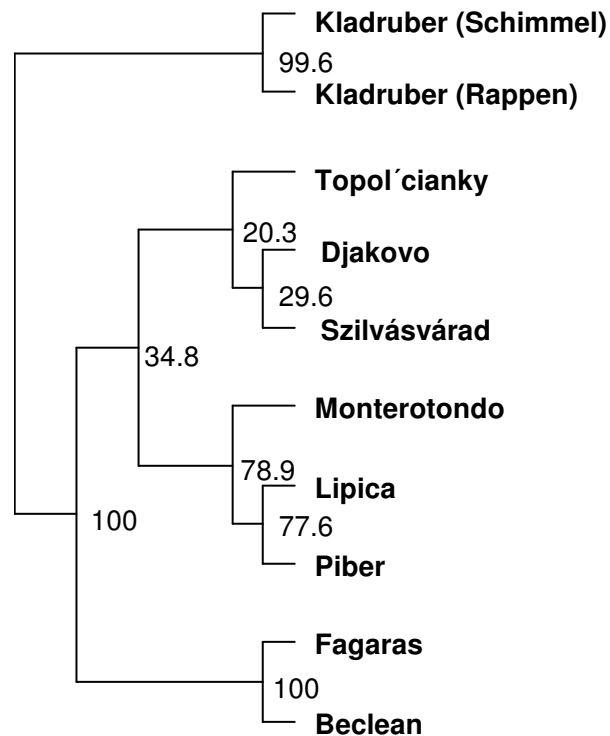
Um die genetische Differenzierung zwischen Lipizzanergestüten näher zu quantifizieren wurden  $F_{st}$ -Werte über jeweils zwei Gestüte berechnet. Der  $F_{st}$ -Wert beschreibt den Anteil der genetischen Variation, der aufgrund von genetischen Unterschieden zwischen Subpopulationen erklärt werden kann. Er kann zwischen einem theoretischen Minimum von 0 (d.h. keine genetische Differenzierung) und einem Maximum von 1 (vollständige genetische Differenzierung, d.h. Subpopulationen sind bezüglich alternativer Allele fixiert) schwanken. Alle berechneten  $F_{st}$ -Werte zeigten eine signifikante Differenzierung zwischen Gestütpaaren an. Die geringste Populationsdifferenzierung wurde zwischen den rumänischen Gestüten Fagaras und Beclean gefunden ( $F_{st} = 0,011$ ), die stärkste Differenzierung zwischen Topol'cianky und dem italienischen Gestüt Monterotondo ( $F_{st} = 0,101$ ). Der mittlere  $F_{st}$ -Wert für paarweise Vergleiche zwischen Lipizzanergestüten betrug 0,068 und zeigt damit eine geringe bis mäßige genetische Differenzierung zwischen den Gestüten an. Nur etwa 7 % der gesamten beobachteten genetischen Variation kann auf genetische Unterschiede zwischen Gestüten zurückgeführt werden, während 93 % der gesamten genetischen Variabilität der Lipizzaner innerhalb der Gestüte zu finden ist.  $F_{st}$ -Werte für paarweise Vergleiche zwischen Kladrubern und Lipizzanern waren signifikant höher als für paarweise Vergleiche zwischen Lipizzanergestüten (Abbildung 5). Der mittlere  $F_{st}$ -Wert von 0,132 für Vergleiche zwischen Kladrubern (Rappen) und Lipizzanern bzw. von 0,114 zwischen Kladrubern (Schimmel) und Lipizzanern weist auf eine stärkere genetische Differenzierung zwischen Kladrubern und Lipizzanern als zwischen verschiedenen Lipizzaner-Subpopulationen hin.

**Abbildung 5:** Vergleich der mittleren paarweisen  $F_{st}$ -Werte zwischen Lipizzanergestüten und zwischen Lipizzaner- und Kladruherpopulationen. (reduzierter Datensatz; Mittelwert  $\pm$  95 % Konfidenzintervall).



Als ein weiteres Maß für die genetische Ähnlichkeit zwischen Gestüten wurde der Anteil gemeinsamer Allele  $P_s$  zwischen Individuen verschiedener Gestüte für alle untersuchten Loci bestimmt [11]. Als Distanzmaß wurde  $1 - P_s$  verwendet. Abbildung 6 zeigt ein UPGMA-Dendrogramm, das auf Basis der genetischen Distanzen zwischen den untersuchten Gestüten berechnet wurde. Um die Sicherheit der Verzweigungspunkte abzuschätzen, wurde ein sogenannter "Bootstrap-Test" durchgeführt. Hohe Bootstrap-Werte (Maximalwert = 100) weisen darauf hin, daß die Äste, welche von einem Verzweigungspunkt ausgehen, tatsächlich eine genetisch ähnliche Gruppe bilden. Das Dendrogramm zeigt drei Hauptgruppen. In die erste Gruppe fallen die beiden Kladruberpopulationen. Die zweite Gruppe besteht aus den Lipizzanergestüten und läßt sich in 3 Untergruppen teilen. Eine Untergruppe bilden die rumänischen Gestüte. Relativ hohe Bootstrap-Werte unterstützen außerdem die Gruppierung der Gestüte Lipica, Piber und Monterotondo, während Verzweigungspunkte, welche die anderen Gestüte miteinander verbinden, aufgrund der niedrigen Bootstrap-Werte nicht als sehr robust anzusehen sind.

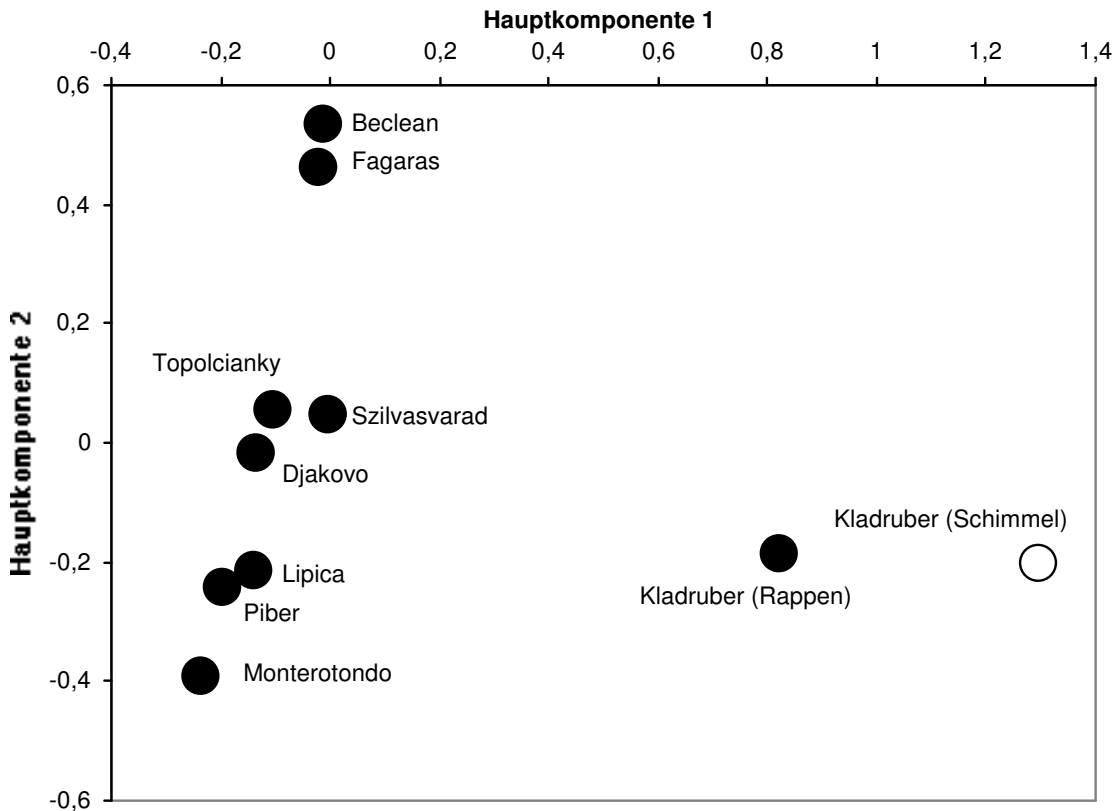
**Abbildung 6:** Rekonstruierter phylogenetischer Baum für die untersuchten Populationen auf Basis der genetischen Distanz  $1 - P_s$ . Die Zuverlässigkeit der Verzweigungen wird durch die Angabe der "Bootstrap-Werte" angezeigt.



Eine weitere Möglichkeit die Beziehung der untersuchten Gestüte graphisch darzustellen ist die Hauptkomponentenanalyse. Sie ist ein statistisches Verfahren das verwendet wird, um multivariate Daten zu vereinfachen. Abbildung 7 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse aus dem reduzierten Lipizzaner- bzw. Kladruherdatensatz. Der besseren Übersicht wegen wurden nur die Mittelwerte (über alle Individuen eines Gestüts) der Faktorladungen aufgetragen. Der Graph zeigt eine der phylogenetischen Analyse sehr ähnliche Gruppierung Gestüte. Wiederum sind die beiden rumänischen Gestüte stärker von den anderen Lipizzanergestüten separiert. Die Gestüte Lipica, Monterotondo und Piber bzw. Djakovo, Szilvásvárád und Topol'cianky gruppieren näher zusammen. Die Kladruher sind deutlich von den Lipizzanern abgesetzt.

**Abbildung 7:** Hauptkomponentenanalyse. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der Faktorladungen für die untersuchten Gestüte.





## 2. mt-DNA

### 2.1 Mitochondrien-DNA Diversität

Bisher wurden für 416 Pferde jeweils ein Teil des 5'- bzw. des 3'-Bereiches des D-loops sequenziert. Dabei wurden 37 Sequenzvarianten (Haplotypen) gefunden, die zum Teil auch schon bei anderen Pferderassen nachgewiesen wurden. Generell spiegelt die mt-DNA Haplotypendiversität des Lipizzaners die Zuchtgeschichte der Rasse wieder, in deren Verlauf mehrere Pferderassen zum Genpool des Lipizzaners beigetragen haben. Tabelle 4 faßt die Sequenzunterschiede der nachgewiesenen Haplotypen zusammen. Obwohl sich vier Haplotypengruppen erkennen lassen, repräsentieren diese nicht die unterschiedliche Herkunft bestimmter Stutenlinien (z.B. "Karster Ursprung" oder "arabischer Ursprung"). Tabelle 5 zeigt, wie häufig die Haplotypen in den einzelnen Gestüten auftraten. Die beiden häufigsten auftretenden Haplotypen waren die Typen "Capriola" (Deflorata) und "Batosta" (Africa). Die mt-DNA Haplotypenverteilungen in den einzelnen Gestüten führt zu den gleichen Schlüssen wie die Analyse der DNA-MS-Marker. In allen Gestüten gibt es eine zum Teil sehr große Überlappung im Hinblick auf Auftreten und Frequenz der einzelnen Haplotypen, vor allem bei den klassischen Stutenlinien. Vergleichsweise hoch ist die Überlappung zwischen den Gestüten Lipica, Monterotondo und Piber sowie zwischen Beclean und Fagaras. Sehr deutlich ist auch, daß vor allem in beiden rumänischen Gestüten, aber auch in Djakovo, Lipica und Szilvásvárád in Bezug auf die eingesetzten Zuchtstuten deutliche Unterschiede zu den anderen Gestüten bestehen (Tabelle 5).

## 1.2 *mt-DNA und Pedigree*

Ebenso wie die Vererbung von MS-Allelen Rückschlüsse über die Abstammung eines Tieres erlauben, so kann auch die Vererbung der mt-DNA für Abstammungsüberprüfungen genutzt werden. Mit Hilfe der mt-DNA lassen sich im Gegensatz zu autosomalen Markern (wie z.B. DNA-MS) Abstammungsfehler auch dann noch relativ einfach nachweisen, wenn nicht alle Vorfahren eines Nachkommertieres untersucht werden können. Im Gegensatz zu DNA-MS-Markern wird die mt-DNA jedoch immer von der Mutter an Nachkommen vererbt, die väterliche mt-DNA wird nicht an Nachkommen weitergegeben. Das bedeutet, daß alle Individuen eines Stammbaumes, die sich auf einen gemeinsamen mütterlichen Ursprung (z.B. Mutter-Nachkommen) zurückführen lassen, den gleichen mt-DNA Haplotyp besitzen müssen. Wenn Tiere aus einer mütterlichen Linie verschiedene mt-DNA Haplotypen aufweisen bedeutet dies, daß innerhalb der Linie eine Fehl Abstammung vorliegen muß.

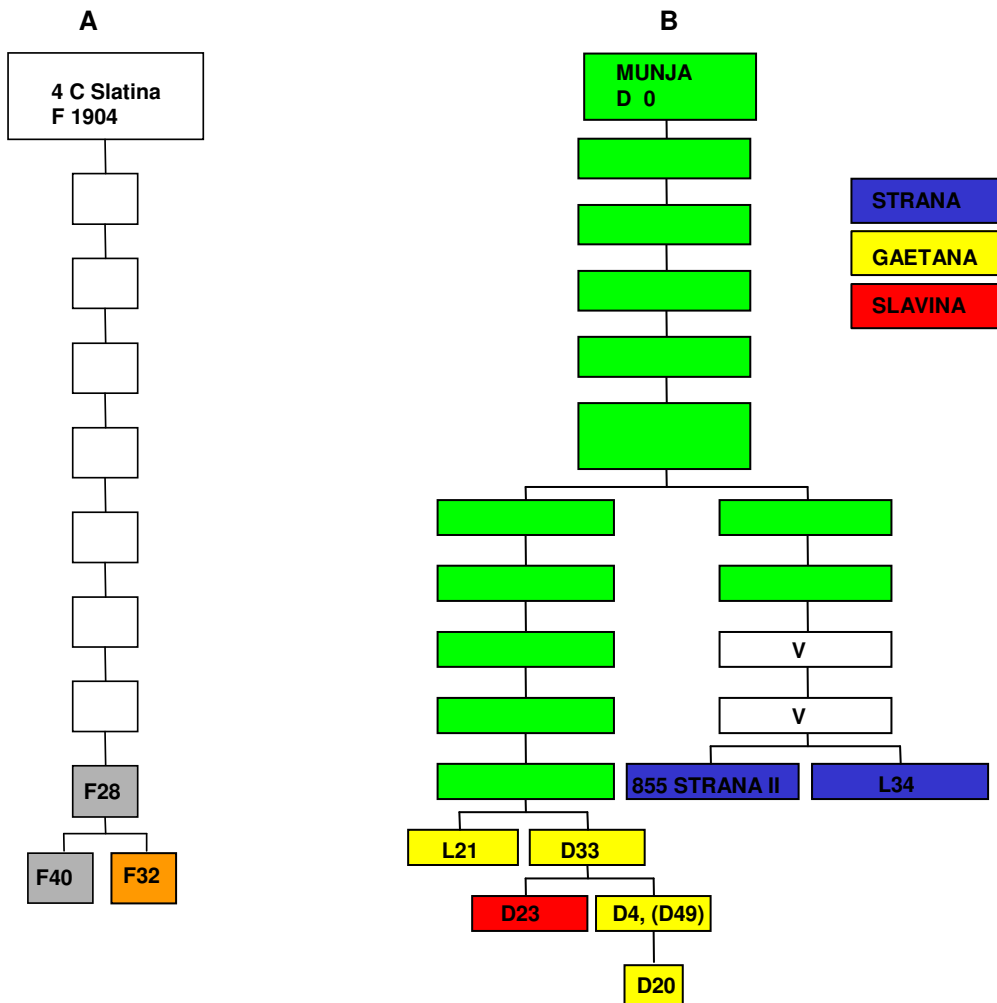
Bei insgesamt 56 im Datenmaterial enthaltenen mütterlichen Linien konnte in 16 Linien (28,5%) mindestens zwei verschiedene mt-DNA Haplotypen nachgewiesen werden. In einigen Fällen traten sogar drei verschiedene Haplotypen auf, d.h. für eine Reihe von mütterlichen Linien ist der dokumentierte Stammbaum offensichtlich nicht richtig. Abbildung 8 zeigt zwei der untersuchten Linien. In Abbildung 8A muß aufgrund der unterschiedlichen mt-DNA Haplotypen F28 als Mutter von F32 ausgeschlossen werden. Der Ausschluß von der Mutterschaft wurde durch MS-Analysen bestätigt. In Abbildung 8B ist der weiter verzweigte Stammbaum von Munja (Djakovo 1905) dargestellt. Auch hier konnte die mit mt-DNA nachgewiesene falsche Abstammung von D23 (Mutter ist nicht D33) mit DNA-MS untermauert werden. Der Stammbaum von Munja ist ein Beispiel dafür, daß in einer Linie mehrfach Abstammungsfehler auftreten können. So zeigen die untersuchten Tiere des linken einen anderen mt-DNA Haplotyp als die Tiere des rechten Astes des Stammbaums.



	Batosta	Capriola	Slavina	Betalka	Allegra	Dubovina	Gaetana	Gratiosa	Monteur	Wera	P	M	G	B	J	U	X	O	I	Q	R	V	Strana	Thais	Trompeta	L	H	D	E	A	K	S	T	Z	C	F	N
Beclean	1	5									4		3																1	4	1	1					
Fagaras	3	34									3	8	15																3	5	1	1	1	1	4	5	
Djakovo	3		5		1	3	5		2																	2	3	2	13								
Lipica	4	9	5	4	5	2	2	2	2	3													2	2	2												
Monterotondo	4	7	5	1	7	5		1	2					2	5	2	5																				
Piber	4	18	2	11	3	6	3	1		3	1	1	2	2	2	9		3	1																		
Szilvásvárad	12	20			7		1					5							19	6	2	1															
Topol'cianky	11	17	1				3			6																											
N	42	110	18	16	23	16	14	4	6	12	8	14	20	4	7	11	5	3	20	6	2	1	2	2	2	2	2	3	13	4	9	2	2	1	1	4	5
Haplotyp- häufigkeit	0,101	0,264	0,043	0,038	0,055	0,038	0,034	0,010	0,014	0,029	0,019	0,034	0,048	0,010	0,017	0,026	0,012	0,007	0,048	0,014	0,005	0,002	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	0,005	0,031	0,010	0,022	0,005	0,005	0,002	0,002	0,010	0,012

**Tabelle 5:** mt-DNA Haplotypenverteilung in den untersuchten Lipizzanergestüten

**Abbildung 8:** Beispiele für den Nachweis von Stammbaumfehlern über mt-DNA Haplotypen. A) Abstammungsfehler in direkter Nachkommenschaft. B) Mehrere Fehler in einer mütterlichen Linie. Gleichfarbige Felder entsprechen identischen Haplotypen. Direkte Abstammungsfehler (F28-F32 und D33-D23) wurden durch DNA-MS-Analysen bestätigt.



### 3. Zyto genetische Untersuchungen

#### 3.1 *Allgemeiner Chromosomenstatus*

Die aufgrund der Blutkulturen gewonnenen Chromosomenpräparationen wurden zuerst auf numerische Aberrationen hin untersucht. Hierbei zeigten sämtliche analysierten Tiere die normale diploide Chromosomenzahl ( $2n = 64$ ), ohne etwa durch Strukturänderungen (z.B. zentrische Fusionen) in dieser Zahl verändert zu sein. Auch mit Chromosomenbänderungsuntersuchungen (v.a. Trypsin-G-Banding) ließen sich keine Rearrangements oder andere Aberrationen feststellen. Beobachtete Unterschiede in der Länge der Y-Chromosomen waren zwischen Hengsten, die 6 unterschiedlichen Hengstlinien angehören, statistisch nicht signifikant [14].

#### 3.2 *PRINS-Telomeren-Analyse*

Der Nachweis von „Single Copy-Genen“, „Low Copy-Repeats“ und „High Copy-Repeats“ unter Verwendung von In Situ Hybridisierungsmethoden wurde im Verlaufe des letzten Jahrzehnts zwar stark weiterentwickelt, ist aber in erster Linie vom Zeit- und Müheaufwand her noch sehr modifizierbar. Im Rahmen dieser Bestrebungen befinden sich z. B. die Primed In Situ Labelling (PRINS) Verfahren, die in vielfacher Weise methodisch verbessert wurden. In Richtung repetitiver DNAs wurden hierbei auch bemerkenswerte methodische Weiterentwicklungen erreicht. Demgegenüber sind aber die punkto „Single Copy Genen“ gewonnenen Fortschritte punkto Empfindlichkeit und Wiederholbarkeit weiter nicht ausreichend und das Auftreten von Fehlern ist beachtlich. Die eine bedeutende Komponente der Telomeren darstellende DNA-Sequenz TTAGGG ist in wiederholten Folgen in Form von Tandemrepeats positioniert. In physiologischen Abläufen verkürzen sich die Tandemrepeats mit fortschreitender Zellteilungskapazität und fortschreitendem Alter. Aber auch pathologisch haben diese Bezirke v.a. aufgrund stabil terminal positionierter Lagen oder aber interstitiellen Lagen hohes Interesse und großen Stellenwert. Diese Problemstellungen sind v.a. in Rearrangements u.a. in Fehlbildungen, bei Fruchtbarkeitsstörungen und bei anderen Mängeln bedeutend.

Zur Darstellung der telomerischen DNA Regionen wurden bei Lipizzanern Experimente mit verschiedenen Annealingtemperaturen unter Verwendung der beiden Primer bei allen Tieren zwischen 50°C und 70°C durchgeführt. Hierbei erwiesen sich meist Annealingtemperaturen von 56°C bis 60°C als optimal. Als Primer erwies sich der Primer 5'-CCCTAA als vorteilhaft. Es zeigten sich bei den meisten Tieren und Präparaten starke telomerische Signale. In den durchgeführten Untersuchungen erwies sich bei den analysierten Tieren die verwendete PRINS Technik als Vereinfachung zur konventionellen FISH Technik. Sie ist rascher und weniger aufwendig und zeigt in der telomerischen DNA Darstellung deutliche Signale.

Im Zuge sorgfältig und wiederholt durchgeführter visueller Inspektionen zeigten sich bei allen analysierten Lipizzanern deutliche terminale Signale (Abbildung 9). Dies traf sowohl für die kurzen (p) als auch für die langen (q) Arme sämtlicher Chromosomen zu. Es wurde hierbei deutlich sichtbar, daß die Telomerenlänge durch genetische und andere Faktoren beeinflußt wird. Wichtig ist auch, daß in vergleichbaren Zelltypen in vergleichbaren mitotischen Phasen die Telomeren bei einem Lipizzaner länger sein können als bei einem anderen, jüngeren Lipizzaner. Im Laufe der Studien wurde eindeutig klar, daß die Telomerenlänge allein nicht als eindeutiger Indikator für das

Alter eines Individuums verwendet werden kann. Dies gilt sicherlich sowohl in der verwendeten visuellen Methode, als auch für verschiedene Meßtechniken in der Erfassung der PRINS/Telomeren Differenzen bei verschiedenen Chromosomen in den verschiedenen in der Analyse verwendeten lektinstimulierten peripheren Blutzelltypen der untersuchten Pferde. Die vorhandene Heterogenität des PRINS/Telomeren-Profiles der untersuchten Zellen repräsentierte sich in allen analysierten Lipizzanern. Diese Analysen erforderten daher eine große Zahl von Mitosen/individuellen Lipizzanern zur Erlangung akzeptabler Information über die Länge eines individuellen Telomers. Insgesamt war die interchromosomale Variation zweifelsfrei bemerkenswert und deutet auf eine Regulierung der Telomerenlängen über genetische und chromosomenspezifische Faktoren hin. Grundsätzlich konnte aber eine weitgehende Chromosomenidentifizierung im Rahmen der verwendeten Methodik in den Gruppen der Chromosomennummern 1-4 sowie 5-9 und auch 10-12 vorgenommen werden. Auch die Nummer 13 war aufgrund der charakteristischen Struktur bezüglich der Längen und Zentromerenlage gut definierbar und identifizierbar. Bei den Nummern 14-20 konnte ebenso noch eine gewisse Zuordnung in der verwendeten Technik erreicht werden; schwierig bis sehr unsicher war die Identifizierung jedoch zu einem großen Teil in zunehmendem Maße in absteigender Reihe bezüglich ihrer Größe in der verwendeten PRINS-Technik in den untersuchten Metaphasen im Chromosomenbereich 20-31.

Besonders interessant war das regelmäßige Vorhandensein terminaler Signale auch auf allen langen und kurzen Chromosomenarmen auch bei älteren Pferden etwa im Altersbereich von über 25 Jahren. Das regelmäßige und ordnungsgemäße Auftreten von terminalen Telomerensignalen bei den untersuchten Tieren auf allen Chromosomen ergab keine Hinweise auf eindeutige zytogenetische strukturelle Veränderungen wie etwa Rearrangements wie Translokationen oder Fusionen. In parallel durchgeführten numerischen Analysen, bei denen selektive differentielle Sichtbarwerdung der zentromerischen Bezirke in manchen Fällen weiter zur Chromosomenerkennung und -differenzierung von Stellenwert waren, wurden ebenfalls keine Veränderungen wie etwa Hyperdiploidien oder Hypodiploidien festgestellt.

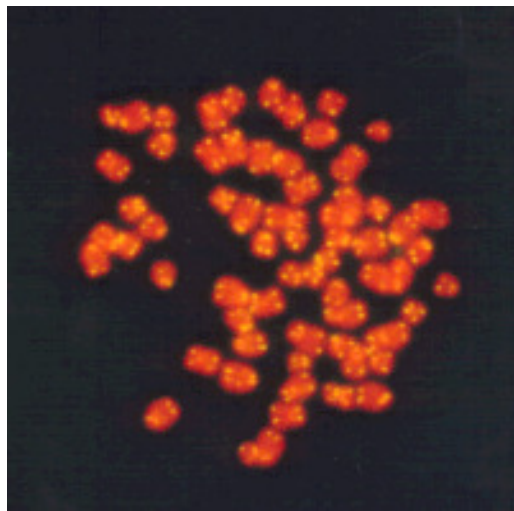
Die gewonnenen Ergebnisse in den verwendeten PRINS/Telomeren- und Giemsa-Band-Techniken erbrachten somit keine Beweise und Parameter für eindeutige telomeren(PRINS)assoziierte zytogenetische Defekte und damit potentiell verbundene Fruchtbarkeitsstörungen bei den untersuchten Lipizzanern. In zukünftigen Analysen in der genetischen Prophylaxe der Lipizzaner und anderer Pferderassen wären der Einsatz von Paintingtechniken und Meßtechniken in Kooperation mit den PRINS/Telomeren empfehlenswert und für feine Fehlpositionencharakterisierung von verlagerten terminalen Chromosomenstücken nach Schaffung und bei Verfügbarkeit geeigneter Proben vorteilhaft.

In den Interphasenanalysen waren die Telomeren gleichmäßig verteilt und es wurden keine Clusterungen von Telomeren beobachtet. Diese Gleichmäßigkeit der Verteilung der Telomeren über genomische Territorien wurde bei allen analysierten Lipizzanern vorgefunden und bei keinem der Tiere eine etwaige Besonderheit des Musters als pathogenetisches Merkmal entdeckt. Auch für die Interphasentelomerenanalyse war die verwendete PRINS-Technik sowohl hinsichtlich

Geschwindigkeit wie auch Sensitivität im Vergleich zur konventionellen FISH-Technik bei den durchgeführten Telomeren-PRINS vorteilhaft und gut geeignet.

Die in der vorliegenden Arbeit erstmals auch beim Pferd eingesetzten Methoden stellen einen wertvollen Kenntniszuwachs für die Veterinärmedizin im Falle des Lipizzaners dar. Sie werden bei etwaigen zukünftigen auftretenden zellgenetischen erbhygienischen Problemen sehr hilfreich diagnostisch eingesetzt werden können.

**Abbildung 9:** Beispiel für eine PRINS-Telomeren-Analyse. Amplifizierte Telomerebereiche sind als helle gelbe Punkte an den Chromosomenenden zu erkennen.





#### IV      **Schlußfolgerungen**

Aus den molekulargenetischen Analysen (DNA-MS und mt-DNA) des zur Verfügung stehenden Datenmaterials wurde deutlich, daß die Lipizzaner eine relativ homogene Population darstellen, die sich deutlich von den ihnen nahe stehenden Kladrubern unterscheidet. Eine stärkere genetische Differenzierung zwischen Lipizzanerpopulationen wäre überraschend gewesen, weil alle untersuchten Gestüte Beziehungen zur "Urpopulation" in Lipica aufweisen und eine Trennung der Lipizzaner in einzelne Gestüte erst vor relativ kurzer Zeit stattgefunden hat. Die Ausbildung von genetischen Unterschieden zwischen Populationen aufgrund von Mutation, Selektion und genetischer Drift ist jedoch ein Vorgang, der vergleichsweise langsam voranschreitet. Zu dem ist es in der Zuchtgeschichte des Lipizzaners immer wieder zur Zusammenführung einzelner Populationen (Gestüte) bzw. zum Austausch von Zuchttieren zwischen Gestüten gekommen. Dieser "Genfluß" trägt dazu bei, daß genetische Unterschiede zwischen Populationen fortdauernd nivelliert werden. Am genetisch ähnlichsten sind sich die Gestüte Lipica, Monterotondo und Piber. Lediglich die rumänischen Lipizzaner setzen sich von den restlichen Lipizzanergestüten relativ deutlich ab. Dies könnte vor allem daran liegen, daß in Rumänien häufiger auf Stutenlinien zurückgegriffen wurde, welche in den anderen Gestüten nicht zur Zucht eingesetzt wurden. Inwieweit die Stellung der rumänischen Gestüte im Hinblick auf die Gesamtdiversität des Lipizzaners besonders zu bewerten ist, sollte diskutiert werden.

Hinsichtlich der genetischen Diversität gibt es keine auffallenden Unterschiede zwischen den untersuchten Lipizzanergestüten. Lipizzaner weisen trotz der vergleichsweise geringen Populationsgröße keine geringere Alleldiversität oder Heterozygotie als andere Pferderassen auf. Die molekulargenetischen Daten lassen nicht erkennen, daß Verwandtschaftspaarung (Inzucht) im großen Ausmaß stattfindet. Zytogenetische Untersuchungen ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf auffällige Aberrationen, so daß sich die untersuchte Lipizzanerpopulation als "normale" Pferderasse darstellt.

Auffallend war, daß die genetischen Untersuchungen von DNA-MS und mt-DNA mehrfach Widersprüche zwischen tatsächlicher und der im Stammbaum dokumentierten Abstammung aufdeckten. Um auszuschließen, daß Probenverwechslungen für diese Ergebnisse verantwortlich waren, sollten in diesen Fällen B-Proben der betroffenen Tiere untersucht werden. Bei der Analyse von DNA-MS fiel insbesondere der vergleichsweise hohe Anteil (7%) an falschen Mutterschaften auf. Es zeigte sich, daß dieses Problem vor allem im italienischen Gestüt Monterotondo auftritt, wo jede dritte untersuchte Abstammung falsch war. Schwierigkeiten bei der Zuordnung von Fohlen und Mutter werden wahrscheinlich durch das in Monterotondo praktizierte Haltungssystem (Weidehaltung in Kleinherden) begünstigt. mt-DNA-Analysen konnten zudem belegen, daß in 28,5 % der untersuchten mütterlichen Linien mindestens einmal eine falsche Abstammung ins Zuchtbuch eingetragen wurde.

Da sich der Stammbaum der Lipizzaner zumindest teilweise als fehlerhaft darstellt, sind alle Berechnungen, die auf Grundlage des Stammbaums basieren, wie zum Beispiel die Berechnung des Blut- oder Genanteils und des Inzuchtkoeffizienten, verfälscht. Selbst wenn mit sehr großem Aufwand weitere genetische Untersuchungen durchgeführt werden würden, ließe sich das genaue Ausmaß der Fehler kaum klären. Eine nachträgliche Korrektur des Stammbaums, vor allem bei

älteren Generationen, würde außerordentlich arbeitsaufwendig sein und wahrscheinlich nicht alle Zweige des Pedigrees richtig rekonstruieren können.

Damit in Zukunft die Genauigkeit der Zuchtbucheintragungen verbessert werden kann, sollten in allen Gestüten Anstrengungen unternommen werden, die Fehl Abstammungsrate so weit wie möglich zu senken. Abstammungsüberprüfungen auf Basis der DNA-MS-Analyse wären hierzu absolut geeignet. Prinzipiell können die MS-Daten auch für Anpaarungsempfehlungen, wie sie in Piber durchgeführt werden, genutzt werden. Interessant wäre es zu prüfen, ob Empfehlungen die auf MS- bzw. Blutgruppendaten beruhen zum gleichen Schluss kommen. Günstig wäre es sicherlich, wenn die MS-Analysen von einem Zentrallabor durchgeführt werden würden, das die notwendige Expertise (z.B. Teilnahme an internationalem Vergleichstests) aufweisen kann. Besonderes Augenmerk sollte bei der Einführung eines DNA-Abstammungstests auch der ständigen Evaluierung des Testsystems gewidmet werden. Durch die genaue Charakterisierung von Nullallelen könnten wichtige Detailkenntnisse gewonnen werden, die auch für Abstammungstests bei anderen Rassen von internationalem Interesse sind. Da für die MS-Analyse kein empfindliches Probenmaterial, wie z.B. Blut, benötigt wird, könnten Proben in Form von Schleimhautabstrichen oder Haarwurzeln zum Abstammungstest eingesandt werden. Die DNA, die aus diesem Probenmaterial isoliert wird, könnte sehr gut eingelagert und auch für ergänzende genetische Untersuchungen genutzt werden. Gerade im Hinblick auf eine weitere Erforschung von genetischen Merkmalen des Pferdes - dies könnte z.B. die Charakterisierung von bestimmten Leistungsgenen, Resistenzgenen oder auch Genen, die für die Ausprägung bestimmter Erbkrankheiten wichtig sind, sein - wäre eine leicht zugänglich und optimal gemanagte Pferderasse, wie sie der Lipizzaner darstellt, wertvolles Untersuchungsmaterial für die Wissenschaft.

## V Literaturverzeichnis

- [1] Marshall, TC, Slate, J, Kruuk, LEB & Pemberton, JM (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7(5): 639-655. <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/>
- [2] J. Goudet (1995). Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. *J. Heredity*. 86(6): 485-486. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- [3] Raymond M. & Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86:248-249. <ftp://ftp.cefe.cnrs-mop.fr/genepop/>
- [4] Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*.139(1):463-71. <http://human.stanford.edu/microsat/microsat.html>
- [5] Belkhir K. et al. 2000 GENETIX 4.0, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France). <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm>
- [6] Felsenstein, J (1993). Phylip (Phylogeny Inference Package), Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/>
- [7] Bowling AT, Eggleston-Stott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E (1997). Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics* 284, 247-252.
- [8] Wimmers K, Ponsuksili S, Schmoll F, Hardge T, Hazipanagiotou A, Weber J, Wostmann S, Olek K, Schellander K. (1998). Effizienz von Mikrosatellitenmarkern des internationalen Standards zur Abstammungsbegutachtung in deutschen Pferdepopulationen. *Züchtungskunde*, 70, 233-241.
- [9] Bowling AT (1996). *Horse Genetics*. CAB International, Wallingford, UK
- [10] Eggleston-Stott ML, Delvalle A, Dileanis S, Wictum E, Bowling AT (1997). A single base transversion in the flanking region of an equine microsatellite locus affects amplification of one allele. *Animal Genetics* 28, 438-440.
- [11] Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 368(6470):455-7.
- [12] Achmann R, Huber T, Wallner B, Dovc P, Müller M, Brem G. (2001). Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse. *Animal Genetics*, in Druck.
- [13] Kavar T, Habe F, Brem G, Dovc P (1999). Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Animal Genetics* 30, 423-430.
- [14] Hazas G, Kovacs A, Mayr B, Marti E, Eder C, Brem G, Bodo I (1999). Investigation of Y-chromosome length variation in the Lipizzan horses. *Cytogenet Cell Genet* 85, 94.

## **VI Anhang**

### **1. Zusatztabelle, Zusatzabbildungen**

**Tabelle A1:** 566 Lipizzaner, für die Blutproben entnommen wurden.

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
B001	Beclean	III	Hengst
B002	Beclean	NXXVIII	Hengst
B003	Beclean	SCXIV	Hengst
B004	Beclean	SCXVIII	Hengst
B005	Beclean	486CXXII-114	Stute
B006	Beclean	452CXXIII-46	Stute
B007	Beclean	538CXXVI-4	Stute
B008	Beclean	570CXXVI-18	Stute
B009	Beclean	655FXXXI-81	Stute
B010	Beclean	463MXXXV-23	Stute
B011	Beclean	MXXXVI-26	Stute
B012	Beclean	606MXXXVII-74	Stute
B013	Beclean	651MXXXIX-11	Stute
B014	Beclean	MXLII-3	Stute
B015	Beclean	650NXXVI-61	Stute
B016	Beclean	656NXXVI-64	Stute
B017	Beclean	664NXXVI-68	Stute
B018	Beclean	627PXIV-58	Stute
B019	Beclean	PXV-18	Stute
B020	Beclean	PXVIII-4	Stute
B021	Beclean	SCXI-2	Stute
B022	Beclean	514SCXII-48	Stute
B023	Beclean	533SCXIII-8	Stute
B024	Beclean	637SCXIV-29	Stute
B025	Beclean	SCXVI-6	Stute
B026	Beclean	TXIII-2	Stute
B027	Beclean	564TXIII-12	Stute
B028	Beclean	632TXIII-27	Stute
D001	Djakovo	730TROFETTAIX	Stute
D002	Djakovo	741ZENTAIII	Stute
D003	Djakovo	411ZENTAX	Stute
D004	Djakovo	423MUNJAI	Stute
D005	Djakovo	373ZENTA	Stute
D006	Djakovo	446KRABBEXVIII	Stute
D007	Djakovo	517BATOSTAXLXII	Stute
D008	Djakovo	565KRABBEVII	Stute
D009	Djakovo	569ZENTAII	Stute
D010	Djakovo	586ZENTAXI	Stute
D011	Djakovo	638MARAVIII	Stute
D012	Djakovo	557BATOSTAIII	Stute
D013	Djakovo	442ALLEGRAXXX	Stute
D014	Djakovo	396ZENTAVIII	Stute
D015	Djakovo	394SANTAXL	Stute
D016	Djakovo	487ZENTAVII	Stute
D017	Djakovo	716MARAL	Stute
D018	Djakovo	724MIMAXIII	Stute
D019	Djakovo	709GAETANAXVII	Stute
D020	Djakovo	612MUNJAIV	Stute
D021	Djakovo	613MIMAXIII	Stute
D022	Djakovo	398MONTENEGRAXXVIII	Stute
D023	Djakovo	712MUNJAVII	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
D024	Djakovo	508GAETANAXVIII	Stute
D025	Djakovo	766MIMAXIV	Stute
D026	Djakovo	692BATOSTAIV	Stute
D027	Djakovo	665MIMAXII	Stute
D028	Djakovo	699KRABBEVII	Stute
D029	Djakovo	694TOPLICAXXIV	Stute
D030	Djakovo	646TROFETTAX	Stute
D031	Djakovo	714ZENTAXIII	Stute
D032	Djakovo	644SLAVONIAXIX	Stute
D033	Djakovo	320MUNJA	Stute
D034	Djakovo	420TOPLICAXVII	Stute
D035	Djakovo	589KRABBEXXI	Stute
D036	Djakovo	611TROFETTAIX	Stute
D037	Djakovo	715ZENTAX	Stute
D038	Djakovo	463P BATOSTAIL-4	Hengst
D039	Djakovo	696M ZENTAI-4	Hengst
D040	Djakovo	642MONTENEGRAXL	Stute
D041	Djakovo	560SLAVONIAXVIII	Stute
D042	Djakovo	623TOPLICAXXIII	Stute
D043	Djakovo	227F BATOSTAXLVIII	Hengst
D044	Djakovo	744M KRABBEXVII-5	Hengst
D045	Djakovo	632F BATOSTAIL-5	Hengst
D047	Djakovo	547C ZENTAX-2	Hengst
D048	Djakovo	767T ZENTAX-4	Hengst
D049	Djakovo	689M MUNJAI-2	Hengst
D050	Djakovo	755T ZENTAXI-1	Hengst
D051	Djakovo	731M KRABBEXVIII-2	Hengst
D052	Djakovo	751S BATOSTAXLXII-1	Hengst
D053	Djakovo	671M TROFETTAV-5	Hengst
D054	Djakovo	684M TROFETTAVIII-2	Hengst
D055	Djakovo	700M GAETANAXV-3	Hengst
D056	Djakovo	753S TOPLICAXVII-4	Hengst
F001	Fagaras	NXXIX	Hengst
F002	Fagaras	MXXXIX	Hengst
F003	Fagaras	FXXXV	Hengst
F004	Fagaras	CXXIX	Hengst
F005	Fagaras	TXIV	Hengst
F006	Fagaras	SCXVII	Hengst
F007	Fagaras	CXXXIII	Hengst
F008	Fagaras	PXIX	Hengst
F009	Fagaras	NXXX	Hengst
F010	Fagaras	505CXXIV-9	Stute
F011	Fagaras	536CXXVI-11	Stute
F012	Fagaras	675SCXIV-58	Stute
F013	Fagaras	669CXXVI-71	Stute
F014	Fagaras	583PXIII-40	Stute
F015	Fagaras	600CXXV-34	Stute
F016	Fagaras	495CXXII-119	Stute
F017	Fagaras	633CXXVII-5	Stute
F018	Fagaras	649FXXXI-72	Stute
F019	Fagaras	565CXXV-22	Stute
F020	Fagaras	640FXXXI-55	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
F021	Fagaras	673MXLI-13	Stute
F022	Fagaras	684MXXXIX-20	Stute
F023	Fagaras	621MXXXV-86	Stute
F024	Fagaras	601CXXVI-28	Stute
F025	Fagaras	645NXXVI-43	Stute
F026	Fagaras	509MXXXVI-61	Stute
F027	Fagaras	611CXXV-36	Stute
F028	Fagaras	599SCXIV-10	Stute
F029	Fagaras	483NXXV-8	Stute
F030	Fagaras	594PXIV-44	Stute
F031	Fagaras	597PXIII-45	Stute
F032	Fagaras	662CXXV-70	Stute
F033	Fagaras	654FXXXI-80	Stute
F034	Fagaras	692TXIV-11	Stute
F035	Fagaras	685CXXVI-73	Stute
F036	Fagaras	511PXII-15	Stute
F037	Fagaras	646NXXVI-47	Stute
F038	Fagaras	639CXXVII-7	Stute
F039	Fagaras	686MXXXIX-26	Stute
F040	Fagaras	694PXIX-8	Stute
F041	Fagaras	691SCXV-20	Stute
F042	Fagaras	689CXXVI-76	Stute
F043	Fagaras	687SCXIV-67	Stute
F044	Fagaras	690NXXVI-80	Stute
F045	Fagaras	693CXXIX-2	Stute
F046	Fagaras	658SCXIV-57	Stute
F047	Fagaras	459TX-81	Stute
F048	Fagaras	623MXXXVII-90	Stute
F049	Fagaras	626PXIV-57	Stute
F050	Fagaras	674PXV-24	Stute
F051	Fagaras	545MXXXVII-28	Stute
F052	Fagaras	641PXV-6	Stute
F053	Fagaras	589MXXXV-77	Stute
F054	Fagaras	559CXXVI-16	Stute
F055	Fagaras	642TXIII-41	Stute
F056	Fagaras	496CXXII-120	Stute
F057	Fagaras	521MXXXVII-9	Stute
F058	Fagaras	604FXXXII-19	Stute
F059	Fagaras	696SCXIV-74	Stute
F060	Fagaras	695SCXIV-72	Stute
F061	Fagaras	659TXIV-6	Stute
F062	Fagaras	537CXXVI-7	Stute
F063	Fagaras	670SCXIV-62	Stute
F064	Fagaras	530MXXXVII-19	Stute
F065	Fagaras	644MXXXVIII-15	Stute
F066	Fagaras	566FXXXI-26	Stute
F067	Fagaras	578FXXXII-14	Stute
F068	Fagaras	544MXXXVII-24	Stute
F069	Fagaras	657SCXIV-55	Stute
F070	Fagaras	666PXXVII-1	Stute
F071	Fagaras	562PXIV-26	Stute
F072	Fagaras	688SCXIV-71	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
F073	Fagaras	498FXXXI-5	Stute
F074	Fagaras	660CXXVI-62	Stute
F075	Fagaras	625NXXVI-17	Stute
F076	Fagaras	548PXIV-10	Stute
F077	Fagaras	542MXXXV-61	Stute
F078	Fagaras	582NXXV-53	Stute
F079	Fagaras	539FXXXI-20	Stute
F080	Fagaras	540FXXXI-21	Stute
F081	Fagaras	490PXI-19	Stute
F082	Fagaras	546NXXV-39	Stute
F083	Fagaras	701SCXV-23	Stute
F084	Fagaras	700SCXV-21	Stute
F085	Fagaras	699PXIX-7	Stute
F086	Fagaras	697FXXXIV-15	Stute
F087	Fagaras	535CXXV-9	Stute
F088	Fagaras	647TXIV-4	Stute
F089	Fagaras	672CXXVI-63	Stute
F090	Fagaras	698MXXXIX-28	Stute
L001	Lipica	60SAMIRAXXII	Stute
L002	Lipica	694WERAXI	Stute
L003	Lipica	37CAPRIOLAXXVII	Stute
L004	Lipica	849GAETANAXX	Stute
L005	Lipica	975SLAVAIX	Stute
L006	Lipica	979STEAKAXX	Stute
L007	Lipica	670CAPRIOLAXIV	Stute
L008	Lipica	855STRANAI	Stute
L009	Lipica	881THAISXXXII	Stute
L010	Lipica	29BETALKAXXIII	Stute
L011	Lipica	873GRATIOSAI	Stute
L012	Lipica	955GRATIOSAIII	Stute
L013	Lipica	4BATOSTAX	Stute
L014	Lipica	945MONTEAURAXIX	Stute
L015	Lipica	36TROMPETAXXXVIII	Stute
L016	Lipica	960TROMPETAXXXV	Stute
L017	Lipica	93SLAVINAXIX	Stute
L018	Lipica	904CANISSAXXII	Stute
L019	Lipica	82ALLEGRAXLVI	Stute
L020	Lipica	931BONADEAXVII	Stute
L021	Lipica	950FAMOSAI	Stute
L022	Lipica	766WERAXII	Stute
L023	Lipica	956BETALKAXXI	Stute
L024	Lipica	99CAPRIOLAXXIX	Stute
L025	Lipica	115BETALKAXXIV	Stute
L026	Lipica	100GAETANAXXX	Stute
L027	Lipica	112THAISXXXIX	Stute
L028	Lipica	110SLAVINAXX	Stute
L029	Lipica	95BATOSTAXII	Stute
L030	Lipica	117BATOSTAXIII	Stute
L031	Lipica	726BATOSTAIII	Stute
L032	Lipica	883ALLEGRAXLII	Stute
L033	Lipica	934SAMIRAXVIII	Stute
L034	Lipica	724STRANAI	Stute



Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
L035	Lipica	665CANISSAXVI	Stute
L036	Lipica	985MONTEAURAXX	Stute
L037	Lipica	834DUBOVINAXXIV	Stute
L038	Lipica	887SLAVINAXVI	Stute
L039	Lipica	14CAPRIOLAXXV	Stute
L040	Lipica	957BONADEAXIX	Stute
L041	Lipica	738S STEAKA	Hengst
L042	Lipica	580M MONTEAURA	Hengst
L043	Lipica	859N ALLEGRAXXVI	Hengst
L044	Lipica	843P GAETANAXV	Hengst
L045	Lipica	973N CAPRIOLAXIV	Hengst
L046	Lipica	10C MONTEAURAXI	Hengst
L047	Lipica	947F ALLEGRAXXVI	Hengst
L048	Lipica	847F CAPRIOLAXIV	Hengst
L049	Lipica	840P ALLEGRAXXVI	Hengst
L050	Lipica	85F CANISSAXXII	Hengst
L051	Lipica	987P ALLEGRAXXVI	Hengst
L052	Lipica	42N SLAVINAXIV	Hengst
L053	Lipica	919S ALLEGRAXXVI	Hengst
L054	Lipica	952N CAPRIOLAXIV	Hengst
L055	Lipica	923P THAISXXI	Hengst
L056	Lipica	72C THAISXXIII	Hengst
L057	Lipica	31N BONADEAVIII	Hengst
L058	Lipica	70N CAPRIOLAXIV	Hengst
L059	Lipica	857N WERAXI	Hengst
M001	Monterotondo	P ODINA	Hengst
M002	Monterotondo	S RADURA	Hengst
M003	Monterotondo	M MIRABELLA	Hengst
M004	Monterotondo	S UBERTA	Hengst
M005	Monterotondo	M RARA	Hengst
M006	Monterotondo	F ROSALIA	Hengst
M007	Monterotondo	S MIRABELLA	Hengst
M008	Monterotondo	P OFELIA	Hengst
M009	Monterotondo	N RENNAIL	Hengst
M010	Monterotondo	P VIRTUOSA	Hengst
M011	Monterotondo	F REBECCA	Hengst
M012	Monterotondo	FRAGOLA	Stute
M013	Monterotondo	RITA	Stute
M014	Monterotondo	FIORINA	Stute
M015	Monterotondo	FARISEA	Stute
M016	Monterotondo	BRENTA	Stute
M017	Monterotondo	FIAMMA	Stute
M018	Monterotondo	CRISTINA	Stute
M019	Monterotondo	ROSALIA	Stute
M020	Monterotondo	CURIOSA	Stute
M021	Monterotondo	FULVIA	Stute
M022	Monterotondo	RACHELE	Stute
M023	Monterotondo	SERENA	Stute
M024	Monterotondo	NORMA	Stute
M025	Monterotondo	URANIA	Stute
M026	Monterotondo	PIERINA	Stute
M027	Monterotondo	REGINA	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
M028	Monterotondo	M MORA	Hengst
M029	Monterotondo	SABA	Stute
M030	Monterotondo	QUIRINA	Stute
M031	Monterotondo	FRIDA	Stute
M032	Monterotondo	RARA	Stute
M033	Monterotondo	SAVA	Stute
M034	Monterotondo	RUGIADA	Stute
M035	Monterotondo	TINA	Stute
M036	Monterotondo	RADURA	Stute
M037	Monterotondo	USILIA	Stute
M038	Monterotondo	VIRTUOSA	Stute
M039	Monterotondo	QUAZIA	Stute
M040	Monterotondo	ARIOSA	Stute
M041	Monterotondo	CALMA	Stute
M042	Monterotondo	DESIRE	Stute
M043	Monterotondo	REBECCA	Stute
M044	Monterotondo	TELESIA	Stute
M045	Monterotondo	SESSANA	Stute
M046	Monterotondo	VISTOSA	Stute
M047	Monterotondo	740C MIRABELLA	Hengst
M048	Monterotondo	DIVINA	Stute
M049	Monterotondo	VANESIA	Stute
M050	Monterotondo	REBELLA	Stute
M051	Monterotondo	DANIELA	Stute
M052	Monterotondo	UBERTA	Stute
M053	Monterotondo	COSMA	Stute
M054	Monterotondo	QUALIFICATA	Stute
M055	Monterotondo	COLETTA	Stute
M056	Monterotondo	RENNAI	Stute
M057	Monterotondo	CASTA	Stute
M058	Monterotondo	QUIETA	Stute
M059	Monterotondo	VALENCIA	Stute
M060	Monterotondo	CAPRIOLA	Stute
M061	Monterotondo	KITTY	Stute
M062	Monterotondo	ISTRIA	Stute
M063	Monterotondo	P SESSANA	Hengst
P001	Piber	FAMOSA	Stute
P002	Piber	MATERIA	Stute
P003	Piber	DUBOVINAXX	Stute
P004	Piber	TUECSOEK	Stute
P005	Piber	ODA	Stute
P006	Piber	DUBA	Stute
P007	Piber	DAHES	Stute
P008	Piber	BELLADONA	Stute
P009	Piber	RUBINA	Stute
P010	Piber	AMABILA	Stute
P011	Piber	MEDEA	Stute
P012	Piber	ALLEGRA	Stute
P013	Piber	WERAXIV	Stute
P014	Piber	BONAVISTA	Stute
P015	Piber	MIMA	Stute
P016	Piber	CATTINARA	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
P017	Piber	SAVONA	Stute
P018	Piber	PRIAMA	Stute
P019	Piber	THEODORA	Stute
P020	Piber	ROBINA	Stute
P021	Piber	ROMIDA	Stute
P022	Piber	TROPEA	Stute
P023	Piber	GAETANA	Stute
P024	Piber	REGINA	Stute
P025	Piber	BELLAMIRA	Stute
P026	Piber	NAUTIKA	Stute
P027	Piber	GIDRANE	Stute
P028	Piber	BONAVOJA	Stute
P029	Piber	MASCULA	Stute
P030	Piber	BISERKA	Stute
P031	Piber	GENERALE	Stute
P032	Piber	RUSTICA	Stute
P033	Piber	VERONA	Stute
P034	Piber	TROMPETA	Stute
P035	Piber	BLANCA	Stute
P036	Piber	SANTUZZA	Stute
P037	Piber	S BRITANICA	Hengst
P038	Piber	P DUBOVINA	Hengst
P039	Piber	S BEJA	Hengst
P040	Piber	S DUBOVINA	Hengst
P041	Piber	N STELLA	Hengst
P042	Piber	S DAGMAR	Hengst
P043	Piber	VIRTUOSA	Stute
P044	Piber	WATTA	Stute
P045	Piber	GRAINA	Stute
P046	Piber	BARTONIA	Stute
P047	Piber	DANESIA	Stute
P048	Piber	BRIOSIA	Stute
P049	Piber	SERENA	Stute
P050	Piber	TOSCANA	Stute
P051	Piber	CAECILIA	Stute
P052	Piber	CONTESSA	Stute
P053	Piber	MARA	Stute
P054	Piber	MORA	Stute
P055	Piber	FABIOLA	Stute
P056	Piber	GARBA	Stute
P057	Piber	MALAGA	Stute
P058	Piber	PATRIZIA	Stute
P059	Piber	RIGA	Stute
P060	Piber	AGA	Stute
P061	Piber	ALLORA	Stute
P062	Piber	MADERA	Stute
P063	Piber	BASILA	Stute
P064	Piber	ALBA	Stute
P065	Piber	AQUILEJA	Stute
P066	Piber	BIONDELLA	Stute
P067	Piber	BONADEA	Stute
P068	Piber	BELLORNATA	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
P069	Piber	BELLA	Stute
P070	Piber	BONA	Stute
P071	Piber	MALINA	Stute
P072	Piber	THEODOROSTA	Stute
P073	Piber	ALLEGRAXXXVI	Stute
P074	Piber	RECOLTA	Stute
P075	Piber	UNDINE	Stute
P076	Piber	GRAVISA	Stute
P077	Piber	SESSANA	Stute
P078	Piber	POMPEA	Stute
P079	Piber	ANCONA	Stute
P080	Piber	BLANKETTA	Stute
P081	Piber	KERKA	Stute
P082	Piber	BELLAVISTA	Stute
P083	Piber	CONFITERA	Stute
P084	Piber	DISTINTA	Stute
P085	Piber	KITTY	Stute
P086	Piber	BONITA	Stute
P087	Piber	BELLISSIMA	Stute
P088	Spanische Reitschule	S MANTUAI	Hengst
P089	Spanische Reitschule	S RINDUNICA	Hengst
P090	Spanische Reitschule	C SOLA	Hengst
P091	Spanische Reitschule	P MANTUAI	Hengst
P092	Spanische Reitschule	S PRIAMA	Hengst
P093	Spanische Reitschule	C DAGMAR	Hengst
P094	Spanische Reitschule	S EUROPAI	Hengst
P095	Spanische Reitschule	P SAMBATA	Hengst
P096	Spanische Reitschule	C UNDINE	Hengst
P097	Spanische Reitschule	N KITTYII	Hengst
P098	Spanische Reitschule	F SUPERBA	Hengst
P099	Spanische Reitschule	C MANTUA	Hengst
P100	Spanische Reitschule	C TOSCANA	Hengst
P101	Spanische Reitschule	C ISABELLA	Hengst
P102	Spanische Reitschule	S ALLEGRA	Hengst
P103	Spanische Reitschule	P MANTUA	Hengst
P104	Spanische Reitschule	C AMATA	Hengst
P105	Spanische Reitschule	S CAECILIA	Hengst
P106	Spanische Reitschule	P SERVOLA	Hengst
P107	Spanische Reitschule	F ALEA	Hengst
P108	Spanische Reitschule	C AMATA	Hengst
P109	Spanische Reitschule	C CORVINA	Hengst
P110	Spanische Reitschule	S TUECISOEK	Hengst
P111	Spanische Reitschule	N PASTIME	Hengst
P112	Spanische Reitschule	N NIMAI	Hengst
P113	Spanische Reitschule	C NIMA	Hengst
P114	Spanische Reitschule	C CALCEDONA	Hengst
P115	Spanische Reitschule	F DAGMAR	Hengst
P116	Spanische Reitschule	S TROMPETA	Hengst
P117	Spanische Reitschule	M FABIOLA	Hengst
P118	Spanische Reitschule	S MANTUAI	Hengst
P119	Spanische Reitschule	N NIMA	Hengst
P120	Spanische Reitschule	M PLATANAI	Hengst

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
P121	Spanische Reitschule	S NARENTA	Hengst
P122	Spanische Reitschule	S DUBOVINA	Hengst
P123	Spanische Reitschule	S FAMOSA	Hengst
P124	Spanische Reitschule	S SUPERBA	Hengst
P125	Spanische Reitschule	S DUBOVINA	Hengst
P126	Spanische Reitschule	F RALUCA	Hengst
P127	Spanische Reitschule	S MATERIA	Hengst
P128	Spanische Reitschule	S RALUCA	Hengst
P129	Spanische Reitschule	F ALEAI	Hengst
P130	Spanische Reitschule	F PLUTONA	Hengst
P131	Spanische Reitschule	M BELLAMIRA	Hengst
P132	Spanische Reitschule	M BASOWIZZA	Hengst
P133	Spanische Reitschule	S GALANTA	Hengst
P134	Spanische Reitschule	N NICOLETTA	Hengst
P135	Spanische Reitschule	C TOSCANA	Hengst
P136	Spanische Reitschule	N SERENA	Hengst
P137	Spanische Reitschule	S MONTE DORA	Hengst
P138	Spanische Reitschule	F ROMANA	Hengst
P139	Spanische Reitschule	C TOSCANA	Hengst
P140	Spanische Reitschule	M STORNELLA	Hengst
P141	Spanische Reitschule	C NOBLESSA	Hengst
P142	Spanische Reitschule	N MADAR	Hengst
P143	Spanische Reitschule	N ORIANA	Hengst
P144	Spanische Reitschule	P DUBOVINA	Hengst
P145	Spanische Reitschule	S THEODORA	Hengst
P146	Spanische Reitschule	M ROXANA	Hengst
P147	Spanische Reitschule	N MALINA	Hengst
P148	Spanische Reitschule	C TIBERIA	Hengst
P149	Spanische Reitschule	F GRAINA	Hengst
P150	Spanische Reitschule	C BELLA	Hengst
P151	Spanische Reitschule	C UNDINE	Hengst
P152	Spanische Reitschule	F SESSANA	Hengst
P153	Spanische Reitschule	N ALLEGRA	Hengst
S001	Szilvásvár	173CXXIII	Stute
S002	Szilvásvár	161CXXIII	Stute
S003	Szilvásvár	190MXXX	Stute
S004	Szilvásvár	SCX-38	Stute
S005	Szilvásvár	PXXX-8	Stute
S006	Szilvásvár	PXXX-5	Stute
S007	Szilvásvár	158CXXIII	Stute
S008	Szilvásvár	64PXXVII	Stute
S009	Szilvásvár	SXI-9	Stute
S010	Szilvásvár	206MIX	Stute
S011	Szilvásvár	219SXI	Stute
S012	Szilvásvár	169PXXVIII	Stute
S013	Szilvásvár	156TIII	Stute
S014	Szilvásvár	101CXXII	Stute
S015	Szilvásvár	185FXXIV	Stute
S016	Szilvásvár	MXXX-21	Stute
S017	Szilvásvár	203SCX	Stute
S018	Szilvásvár	142FXXIII	Stute
S019	Szilvásvár	NXXIII-16	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
S020	Szilvásvár	MXXX-18	Stute
S021	Szilvásvár	FXXVI-3	Stute
S022	Szilvásvár	207FXXV	Stute
S023	Szilvásvár	212FXXV	Stute
S024	Szilvásvár	191PXXIX	Stute
S025	Szilvásvár	193TIII	Stute
S026	Szilvásvár	109SCVIII	Stute
S027	Szilvásvár	120PXXVII	Stute
S028	Szilvásvár	134MXXIX	Stute
S029	Szilvásvár	11IX	Stute
S030	Szilvásvár	204TIII	Stute
S031	Szilvásvár	TVI-14	Stute
S032	Szilvásvár	CXXIV-26	Stute
S033	Szilvásvár	2IX	Stute
S034	Szilvásvár	112CXX	Stute
S035	Szilvásvár	168TIV	Stute
S036	Szilvásvár	91CXXII	Stute
S037	Szilvásvár	186IXI	Stute
S038	Szilvásvár	157TIII	Stute
S039	Szilvásvár	148SCVIII	Stute
S040	Szilvásvár	41FXXIII	Stute
S041	Szilvásvár	TIV	Hengst
S042	Szilvásvár	CXXIV	Hengst
S043	Szilvásvár	TVI	Hengst
S044	Szilvásvár	MXXX	Hengst
S045	Szilvásvár	PXXXI	Hengst
S046	Szilvásvár	SXII	Hengst
S048	Szilvásvár	59IX	Stute
S049	Szilvásvár	104MXXVIII	Stute
S050	Szilvásvár	105NXX	Stute
S051	Szilvásvár	143FXXIII	Stute
S052	Szilvásvár	147FXXIII	Stute
S053	Szilvásvár	150PXXVII	Stute
S054	Szilvásvár	152CXXIII	Stute
S055	Szilvásvár	155MXXIX	Stute
S056	Szilvásvár	172FXXIV	Stute
S057	Szilvásvár	182TIII	Stute
S058	Szilvásvár	200PXXIX	Stute
S059	Szilvásvár	202SCX	Stute
S060	Szilvásvár	208FXXV	Stute
S061	Szilvásvár	209FXXV	Stute
S062	Szilvásvár	216CXXIV	Stute
S063	Szilvásvár	TVI-1	Stute
S064	Szilvásvár	188MXXX	Stute
S065	Szilvásvár	CXXIV-14	Stute
S066	Szilvásvár	214NXXIII	Stute
S067	Szilvásvár	CXXIII-50	Stute
S068	Szilvásvár	TVI-12	Stute
S069	Szilvásvár	139SCVIII	Stute
S070	Szilvásvár	213FXXV-22	Stute
S071	Szilvásvár	192PXXIX-4	Stute
S072	Szilvásvár	195PXXIX-6	Stute

Laborcode	Gestüt	Name	Geschlecht
S073	Szilvásvárad	198PXXIX-13	Stute
S074	Szilvásvárad	IXIII-2	Hengst
S075	Szilvásvárad	218NXXIII-20	Stute
S076	Szilvásvárad	SCX-43	Stute
S077	Szilvásvárad	SCX-6	Hengst
T001	Topol'cianky	C VI GAETANA	Hengst
T002	Topol'cianky	F XI RESEDA	Hengst
T003	Topol'cianky	M X MAHONIA	Hengst
T004	Topol'cianky	N XII MAHONIA	Hengst
T005	Topol'cianky	N X MAHONIA	Hengst
T006	Topol'cianky	525CORVETTA	Stute
T007	Topol'cianky	542BALETKA	Stute
T008	Topol'cianky	510CASTILLA	Stute
T009	Topol'cianky	457BOJANA	Stute
T010	Topol'cianky	528BELINDA	Stute
T011	Topol'cianky	562ROMKA	Stute
T012	Topol'cianky	540BONITA	Stute
T013	Topol'cianky	511GRETA	Stute
T014	Topol'cianky	371CAPRA	Stute
T015	Topol'cianky	428MONTEDORA	Stute
T016	Topol'cianky	440MALVINA	Stute
T017	Topol'cianky	461TIMRAVA	Stute
T018	Topol'cianky	441GAETA	Stute
T019	Topol'cianky	294ROSETTA	Stute
T020	Topol'cianky	493MATRA	Stute
T021	Topol'cianky	458ROMA	Stute
T022	Topol'cianky	456TALIA	Stute
T023	Topol'cianky	427COMTESAI	Stute
T024	Topol'cianky	406CASANOVA	Stute
T025	Topol'cianky	326ROMANA	Stute
T026	Topol'cianky	430TUJA	Stute
T027	Topol'cianky	355TESALIA	Stute
T028	Topol'cianky	585MARKIZA	Stute
T029	Topol'cianky	587MIRANA	Stute
T030	Topol'cianky	589BELETRIA	Stute
T031	Topol'cianky	588TORYSA	Stute
T032	Topol'cianky	590BRENDA	Stute
T033	Topol'cianky	586GALANKA	Stute
T034	Topol'cianky	316ROSANA	Stute
T035	Topol'cianky	526RAGACA	Stute
T036	Topol'cianky	533TRAKIA	Stute
T037	Topol'cianky	545BONETA	Stute
T038	Topol'cianky	544SOREYA	Stute
T039	Topol'cianky	541BOSNA	Stute
T040	Topol'cianky	479BOJA	Stute
T041	Topol'cianky	557MEDUZA	Stute
T042	Topol'cianky	563CARMEN	Stute

**Tabelle A2:** Details zu den untersuchten DNA-Mikrosatelliten-Markern

Marker	Chr	Acc. no	5'- Primersequenzen -3'	Label	MgCl <sub>2</sub>	T <sub>a</sub>
VHL20	30	X75970	CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	FAM	2.0	60
HTG4	9	AF169165	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	FAM	2.0	60
AHT4	24	?	AACCGCCGTAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	FAM	2.0	60
HMS7	1	X74636	CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	FAM	2.0	60
HTG6	15	AF169167	CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT GTTCACTGAAGTTCAAATTCTGCT	TET	2.0	60
HMS6	4	X74635	GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCA	TET	2.0	60
HTG7	4	AF169291	CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	HEX	2.0	60
HMS3	9	X74632	CCAACTCTTTGTACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	HEX	2.0	60
AHT5	6	?	ACGGACACATCCCTGCCTGC GCAGGCTTAGGGGGCTCAGC	TET	2.0	60
ASB2	15	X93516	CCACTAAGTGTCTGTTTTCAGAAGG CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	TET	2.0	60
HTG10	21	AF169294	CAATTCCC GCCC ACCCCCGGCA TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT	HEX	2.0	60
HMS2	10	X74631	CTTGCACTCGAATGTGTATTAATG ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG	HEX	2.0	60
HMS1	15	X74630	CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	TAMRA	1.5	56
HMS8	19	X74637	GGTGAGGAATTATCTCTTTGAAGG GCAGGTAGGATTGGATAGGTACAT	FAM	1.5	56
NVHEQ18	10	AF011404	GGAGGAGACAGTGGCCCCAGTC GCTGAGCTCTCCCATCCCATCG	TAMRA	1.5	60
UCDEQ405	25	AF000010	ACCTCGTCTGGCTGTGTGTAAG ACTTGCTGTGCGACTCTG	TAMRA	2.0	60
UCDEQ437	3	U67408	CTGTTCTGGGCAGGCTTCTCTA TTGCTGGCTTGGCTGGTC	FAM	2.0	TD
UCDEQ505	16	U67421	ATCACTCTCTGTTGAGATAAC GGGATTTCTCTTTCTC	TAMRA	2.5	58
Mpz002	?	Z28342	?	?	?	?
AHT21	?	?	TCCAAGTTGCTGAATGGATC ACGGCCTGATTCTCTCTTTG	FAM	2.0	58
LEX053	23	AF075655	TTATTCTGCTTCGTANATGA ACACACTTGGGTTCAAATC	FAM	2.0	60
LEX054	18	AF075656	TGCATGAGCCAATTCCTTAT TGGACAGATGACAGCAGTTC	TAMRA	2.0	TD

Für die Marker AHT4, AHT5, MPZ002 und AHT21 lagen zum Zeitpunkt der Berichtslegung nicht alle Detailinformationen vor.

Abkürzungen:

Chr. : Chromosom

Acc. no.: GenBank Accession number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Genbank/index.html>)

T<sub>a</sub>: Annealingtemperatur der Primer

TD: "Touch down PCR" von 65 °C bis 52 °C (-1%/Zyklus) plus zusätzliche 21 Zyklen bei 52 °C



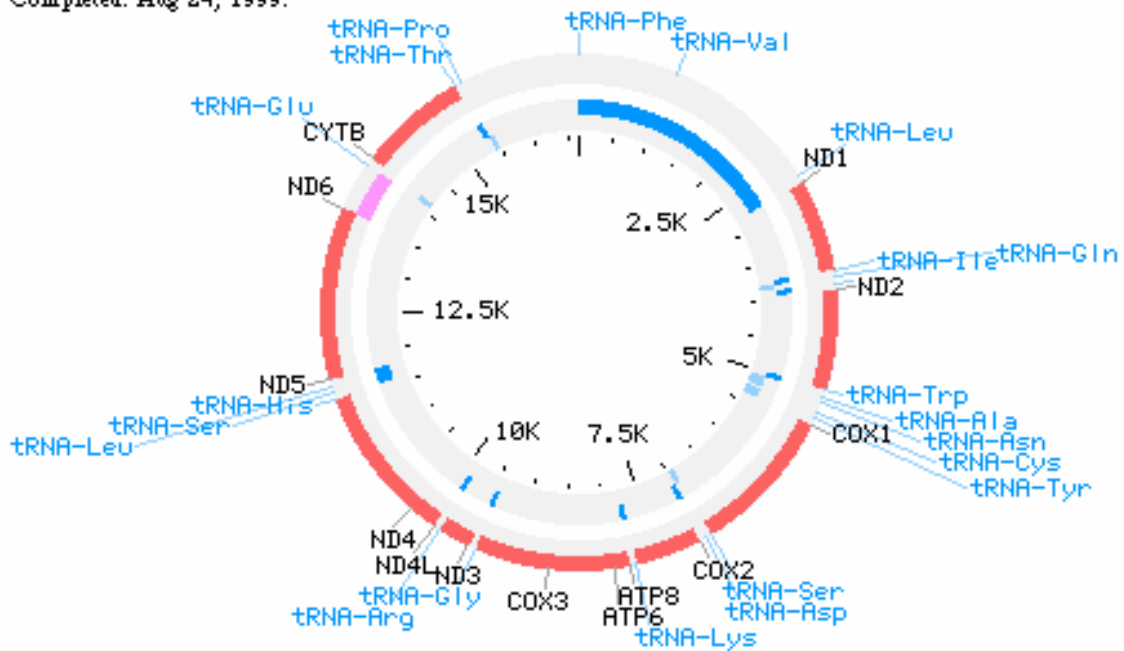
**Tabelle A3:** Anzahl an Allelen (A) und beobachtete Heterozygotierate ( $H_{obs}$ ) für 22 DNA-MS für Pferde aus verschiedenen Lipizzaner- und Kladrubergestüten

Locus	N	B 28	F 90	D 50	L 59	M 60	P 153	S 76	T 42	Kbl 12	Kgr 30	Li 561
VHL20*	A	7	5	6	7	6	8	6	7	5	7	9
	$H_{obs}$	0.93	0.81	0.72	0.85	0.72	0.73	0.75	0.71	0.71	0.87	0.77
HTG4*	A	6	6	4	4	4	6	6	5	4	5	6
	$H_{obs}$	0.62	0.78	0.46	0.78	0.71	0.65	0.59	0.60	0.63	0.67	0.66
AHT4*	A	4	4	6	6	4	6	5	5	6	7	7
	$H_{obs}$	0.63	0.70	0.74	0.66	0.66	0.78	0.64	0.81	0.94	0.87	0.73
HMS7*	A	5	5	7	7	6	6	7	7	4	6	7
	$H_{obs}$	0.70	0.78	0.76	0.64	0.79	0.69	0.75	0.79	0.59	0.87	0.75
HTG6*	A	5	6	4	5	5	6	5	4	3	5	6
	$H_{obs}$	0.41	0.47	0.46	0.67	0.62	0.57	0.55	0.50	0.29	0.47	0.57
AHT5*	A	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5	6
	$H_{obs}$	0.71	0.77	0.84	0.84	0.67	0.71	0.79	0.81	0.82	0.73	0.75
HMS6*	A	6	6	4	4	4	6	4	5	5	4	6
	$H_{obs}$	0.56	0.67	0.58	0.64	0.63	0.69	0.72	0.71	0.29	0.80	0.64
ASB2*	A	5	6	6	5	6	6	6	6	5	6	7
	$H_{obs}$	0.70	0.69	0.80	0.86	0.81	0.74	0.64	0.66	0.76	0.93	0.77
HTG10*	A	5	6	6	6	5	7	8	6	4	7	10
	$H_{obs}$	0.64	0.58	0.70	0.65	0.63	0.74	0.64	0.86	0.59	0.80	0.68
HTG7*	A	3	3	3	3	3	3	3	3	4	3	3
	$H_{obs}$	0.48	0.58	0.76	0.50	0.66	0.70	0.70	0.62	0.76	0.27	0.65
HMS3*	A	6	6	5	5	4	7	6	6	5	6	7
	$H_{obs}$	0.74	0.64	0.69	0.59	0.55	0.52	0.57	0.62	0.88	0.57	0.78
HMS2*	A	6	6	6	5	5	8	8	7	4	4	8
	$H_{obs}$	0.61	0.65	0.82	0.71	0.68	0.75	0.80	0.62	0.76	0.80	0.74
HMS1	A	3	3	3	4	3	3	3	2	2	3	5
	$H_{obs}$	0.61	0.53	0.64	0.56	0.48	0.52	0.58	0.43	0.35	0.60	0.53
HMS8	A	4	4	5	5	5	5	4	4	5	5	5
	$H_{obs}$	0.68	0.64	0.72	0.76	0.67	0.59	0.61	0.48	0.76	0.70	0.67
NVHQ18	A	8	9	8	8	7	8	9	7	8	8	11
	$H_{obs}$	0.82	0.71	0.82	0.81	0.71	0.77	0.89	0.81	0.82	0.57	0.82
UCD505	A	5	7	6	7	5	9	8	9	5	7	10
	$H_{obs}$	0.68	0.63	0.70	0.66	0.60	0.80	0.84	0.76	0.59	0.90	0.73
AHT21	A	4	5	4	5	5	7	6	4	4	6	7
	$H_{obs}$	0.68	0.62	0.56	0.22	0.38	0.40	0.67	0.43	0.71	0.87	0.51
Mpz002	A	4	5	5	5	5	5	5	4	3	3	5
	$H_{obs}$	0.61	0.47	0.21	0.55	0.39	0.38	0.22	0.09	0.53	0.28	0.59
UCD405	A	5	6	5	5	5	6	6	5	4	6	7
	$H_{obs}$	0.71	0.74	0.52	0.44	0.60	0.51	0.65	0.56	0.59	0.73	0.61
UCD437	A	8	8	6	5	5	8	6	6	5	4	9
	$H_{obs}$	0.50	0.65	0.60	0.54	0.59	0.53	0.74	0.55	0.71	0.73	0.65
lex54	A	5	5	5	5	3	4	4	4	5	6	7
	$H_{obs}$	0.67	0.52	0.52	0.46	0.51	0.49	0.48	0.57	0.65	0.67	0.58
lex53	A	5	5	5	4	4	5	5	4	4	6	5
	$H_{obs}$	0.86	0.84	0.74	0.67	0.62	0.67	0.81	0.79	0.82	0.83	0.72
Mittelwert A		5.18	5.50	5.18	5.18	4.68	6.09	5.68	5.23	4.50	5.41	6.95
SE A		0.28	0.30	0.26	0.26	0.22	0.34	0.34	0.34	0.25	0.31	0.41
Mittelwert $H_{obs}$		0.661	0.658	0.653	0.640	0.621	0.633	0.665	0.625	0.662	0.705	0.677
SE $H_{obs}$		0.025	0.022	0.032	0.033	0.023	0.027	0.031	0.038	0.038	0.040	0.018

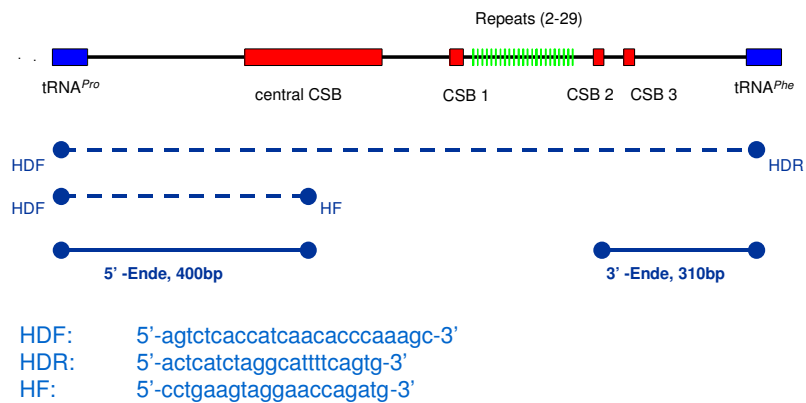
Gestütskodierung: B, Becclean. F, Fagaras. D, Djakovo. L, Lipica. M, Monterotondo. P, Piber. S, Szilvásvárad. T, Topol'cianky. Kbl, Kladruber (Rappen). Kgr, Kladruber (Schimmel). Li, Lipizzaner. N: Stichprobenumfang. SE: Standardfehler. \* Marker des StockMarks Kits.

**Abbildung A1:** Organisation (t-RNAs und Gene) der Mitochondrien-DNA (16660 bp) und Struktur der D-loop Region des Pferdes. CSB, konservierte Sequenzregion. HDF, HDR und HF sind Primer, die für die Amplifikation bzw. Sequenzierung des D-loops verwendet wurden.

Accession: [NC\\_001640](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001640)  
 Total Bases Sequenced: 16660 bp  
 Completed: Aug 24, 1999.



### D-loop



## **VI Anhang**

### **2. Veröffentlichungen**