

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Tierzucht und Genetik
Leiter: O. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Mathias Müller

**Genetische Untersuchung zum Einfluss des Englischen Vollbluthengstes
„Darley Arabian“ in der heutigen Pferdezucht mittels Y-chromosomalen
Markern**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von
Annamarie Suan

Wien, im März 2023

Betreuerin: Dr. med. vet. Priv.-Dozin Barbara Wallner

Institut für Tierzucht und Genetik, Abteilung Molekulare Genetik

Veterinärmedizinische Universität Wien

Veterinärplatz 1, 1210 Wien

Begutachter: Mag. Dr. rer. nat. Sven Budik

Plattform für Besamung und Embryotransfer

Veterinärmedizinische Universität Wien

Veterinärplatz 1, 1210 Wien

DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin, Dr.med.vet. Barbara Wallner, bedanken, die mir im Entstehungsprozess dieser Diplomarbeit mit ihrem Fachwissen stets zur Seite gestanden ist, mir bei Schwierigkeiten und Unklarheiten immer weitergeholfen hat und viel Motivation, Zeit und Mühe in die Korrektur meiner Arbeit gesteckt hat. Vielen Dank für die Geduld, Unterstützung und Begleitung am Weg zur Erstellung dieser Arbeit!

Ich möchte mich außerdem bei Dr.med.vet. Doris Rigler bedanken, welche mir während den Laborarbeiten am Institut für Tierzucht und Genetik helfend und geduldig zur Seite stand.

Ein weiterer Dank geht an Lara Radovic, die mir an meinen ersten Tagen im Labor zu Hilfe gestanden ist und auch im Laufe der Laborarbeiten eine wichtige Ansprechperson blieb.

Ein Dankeschön geht auch an den Begutachter dieser Diplomarbeit, Mag. Dr .rer. nat. Sven Budik.

Ganz besonderer Dank geht jedoch an meine Eltern, welche mir das Studium der Veterinärmedizin erst ermöglichten und mich dabei seit Tag Eins in jeder Hinsicht bestärkten und motivierten. Ich möchte in diesem Zusammenhang einen extra Dank an meine Mutter, Annemarie Suan, aussprechen. Danke Mama, dass du mich durchgehend ermutigt und meinen Werdegang unterstützt hast. Egal wie komplex oder kompliziert die Themen waren, du hast immer versucht mir zu weiterzuhelfen und ohne deine psychische Unterstützung wäre die Studienzeit um einiges schwieriger gewesen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Vorstellung ausgewählter Pferderassen und deren Zuchtgeschichte	3
2.1.1. Englisches Vollblut	3
2.1.2. Quarter Horse	4
2.1.3. Traber	5
2.1.4. Warmblut	6
2.2. Der Einfluss Darley Arabian's und seiner Nachkommen auf die verschiedenen Pferderassen	7
2.3. Das Y-Chromosom beim Pferd	9
2.3.1. Eigenschaften des Y-Chromosoms	9
2.3.2. Vererbung des Y-Chromosoms	10
2.3.3. Rückverfolgung paternaler Genealogien	10
2.4. Bisheriger Stand der Wissenschaft bezüglich paternaler Abstammungslinien beim Pferd	11
2.5. Der phylogenetischer Hengststammbaum – Haplogruppe Tb-d	14
2.6. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	16
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1. Materialien	18
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	18
3.1.2. Bei der Laborarbeit verwendete Materialien	18
3.1.3. Verwendete technische und manuelle Geräte	18
3.1.4. Programme und Software	18
3.1.5. Verwendete Proben	19
3.1.6. Verwendeter Datensatz	19
3.2. Methoden	21
3.2.1. Zusammenstellung des Datensatzes	21
3.2.2. Rekonstruktion der väterlichen Linien	21
3.2.3. Genotypisierung	22
3.2.4. Prinzip der KASP® Technologie	23
3.2.5. Durchführung	24
4. ERGEBNISSE	36

4.1. Rekonstruktion paternaler Genealogien nach Darley Arabian basierend auf Pedigree Informationen	36
4.1.1. Englisches Vollblut.....	36
4.1.2. Quarter Horse	38
4.1.3. Traber	40
4.1.4. Warmblut	41
4.2. Verwendung neuer Y-chromosomaler Marker	43
4.3. Ergebnisse der Haplotypenanalyse	44
4.3.1. Haplotypenverteilung der Proben.....	45
4.3.2. Haplotypenverteilung in Bezug auf Rassen.....	47
4.4. Vergleich ermittelter HTen mit paternalen Genealogien aus dem Pedigree	51
4.4.1. Englisches Vollblut.....	51
4.4.2. Quarter Horse	52
4.4.3. Traber	53
4.4.4. Warmblut	53
4.4.5. Andere Rassen: Arabische Pferde, Lipizzaner, Appaloosa und Camargue	54
5. DISKUSSION.....	56
5.1. Analyse der angewandten Methode sowie Beurteilung von Vorteilen und Limitierungen der KASP® Technologie	56
5.2. Ursachen, Auswirkungen und Vermeidung von fehlerhaften züchterischen Aufzeichnungen in der Pferdezucht.....	57
5.3. Neue Erkenntnisse bezüglich der Haplogruppe Tb-dW und Neueinbindung ermittelter Hengstlinien	58
5.4. Neue Erkenntnisse bezüglich der Haplogruppe Tb-dW1 und Ursprünge neu ermittelter Haplotypen.....	61
5.5. Verbreitung von Hengstlinien nach Darley Arabian im Englischen Vollblut, Quarter Horse, Traber und Warmblut	64
5.6. Der Einfluss von Darley Arabian in der Gruppe „Andere Rassen“	66
5.6.1. Lipizzaner	66
5.6.2. Camargue Pferd.....	66
5.6.3. Appaloosa.....	67
5.6.4. Arabische Pferde	67
6. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	69
7. ZUSAMMENFASSUNG	70
8. SUMMARY	71
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72

10. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	74
11. TABELLENVERZEICHNIS.....	80
12. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	81
13. ANHANG	82
13.1. Haplotypenermittlung.....	82

1. EINLEITUNG

„Darley Arabian“ ist der einflussreichste Gründerhengst des Englischen Vollblutes und sein genetischer Einfluss kann heute neben dem Vollblut in zahlreichen weiteren Pferderassen gefunden werden.

Darley Arabian war ein brauner Araberhengst. Er wurde um 1700 in Aleppo (Syrien) von James Brewster Darley erworben und nur wenige Jahre später von diesem nach England weiterverkauft. Der Käufer war James Brewster's Bruder, welcher den Hengst mit einem Schreiben erhielt, in welchem James folgendes festhielt: *“...of the most esteemed race among the Arabs, both by sire and dam, and the name is called Mannicka”* (Academic dictionaries and encyclopedias, o.J). „Manicka“, auch Muniquis genannt, waren Pferde, welche in früheren Zeiten in Syrien und im Irak als Rennpferde eingesetzt wurden. Sie stammten von einer Araberlinie, welche durch Turkmenenpferde beeinflusst wurde, ab.

Informationen aus dem General Stud Book geben Hinweise darauf, dass Darley Arabian in den Jahren 1706-1719 in England (Yorkshire) zur Zucht eingesetzt wurde. Währenddessen zeugte er zahlreiche erfolgreiche Nachkommen, welche wiederum zu einflussreichen Zuchthengsten wurden. In seiner Linie finden sich somit beispielsweise Hengste wie Flying Childers (1715), Eclipse (1764), Bartlets Childers (1716) oder auch der bekannte Hengst Bulle Rock (1709). Dieser wurde im Jahr 1730 als erstes Englisches Vollblut in die Vereinigten Staaten von Amerika exportiert und bildete somit die Grundlage der amerikanischen Vollblutzucht (Weatherbys General Stud Book, o.J).

Man kann heute mit Sicherheit sagen, dass der Großteil Englischer Vollblüter, welche in der modernen Zucht sowie im Rennsport erfolgreich eingesetzt werden, auf Darley Arabian zurückgehen. Auch genetische Untersuchungen belegen seinen Einfluss. So wurde basierend auf Mikrosatellitenanalysen gezeigt, dass 95 % der männlichen Englischen Vollblüter einen einzigen gemeinsamen Vorfahren, und zwar Darley Arabian, hatten (Cunningham et al., 2001). Im Laufe der Zuchtgeschichte wurden Englische Vollbluthengste außerdem mit dem Ziel der Leistungssteigerung in vielen weiteren Rassen als Veredler verwendet, weshalb der Einfluss Darley Arabian's auch in einem Großteil der modernen Pferderassen zu finden ist (Cunningham et al. 2001).

Mittels der in dieser Arbeit angewendeten Methode der genetischen Analyse von Y-chromosomalen Markern ist es möglich, diese väterlichen Linien genetisch nachzuzeichnen. Der Einfluss von Darley Arabian kann somit nicht nur mithilfe schriftlich aufgezeichneten

Pedigree Daten, sondern auch über genetische Untersuchungen anhand von DNA-Proben nachgewiesen werden. Außerdem bietet diese Untersuchung die Möglichkeit zur Aufdeckung von Pedigree Fehlern und es wird die Beschreibung von unbekannten Hengststämmen mit Darley Arabian Einfluss ermöglicht.



Abbildung 1: Darley Arabian (Academic dictionaries and encyclopedias. <https://de-academic.com/dic.nsf/dewiki/302572> (Zugriff am 28.03.2022)).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Vorstellung ausgewählter Pferderassen und deren Zuchtgeschichte

Das Englische Vollblut wurde im Laufe der Zeit in zahlreiche Rassen eingekreuzt, wobei vor allem die Pferderassen Quarter Horse, Traber sowie Warmblutrassen betroffen sind. In den nachfolgenden Kapiteln 2.1.1. bis 2.1.4. werden die wichtigsten Eckdaten und nennenswerte Hengstlinien dieser Pferderassen aufgeführt.

2.1.1. Englischs Vollblut

Das Englische Vollblut, zu Englisch „Thoroughbred“, ist ein schlankes Pferd mit zierlichem Kopf und breiter Brust, welches bereits seit dem 18. Jahrhundert als Renn- sowie Springpferd eingesetzt wird. Diese Pferderasse zeichnet sich vor allem durch ihre Ausdauer und Schnelligkeit aus, weshalb sie im Laufe der letzten 200 Jahre mit vielen anderen Pferderassen kombiniert wurde, um deren Leistung und Eigenschaften zu verbessern.

Die selektive Zucht des Englischen Vollblutes begann bereits unter der Herrschaft von Jakob I. (1567–1625) und Karl I. (1625–1649). Zur Zucht wurden ausschließlich 43 Stuten, die sogenannten „Royal Mares“, sowie unter anderen die drei Gründerhengste Byerley Turk (~1679), Godolphin Arabian (~1725) und Darley Arabian (~1700) eingesetzt (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2017). Im Zuge dessen führte James Weatherby im Jahre 1791 das „General Stud Book“ ein, in welchem erstmals Stammbauminformationen festgehalten und veröffentlicht wurden. Das „General Stud Book“ wurde 1793 geschlossen und führt nur Englische Vollblüter, welche entweder direkt auf die Linien der Royal Mares oder auf definierte Gründerhengste zurückgehen. Heute sind nur mehr die väterlichen Linien von drei Gründerhengsten, und zwar den oben bereits erwähnten Hengsten Darley Arabian, Byerley Turk und Godolphin Arabian vertreten. Das „General Stud Book“ ist bis heute ein geschlossenes Zuchtbuch, es werden also keine Tiere anderer Rassen in das Englische Vollblut eingezüchtet und neu aufgenommene Pferde sind Abkommen der bereits registrierten Tiere. Die Zuchtunterlagen werden laufend aktualisiert und alle vier Jahre wird ein neuer Band veröffentlicht (Weatherbys General Stud Book o.J).

Einige einflussreiche Vollbluthengste des 20. Jahrhunderts aus der Linie von Darley Arabian seien hier erwähnt, beispielsweise Bold Ruler (1957), Northern Dancer (1961), Raise A Native (1961) und Storm Cat (1983).

2.1.2. Quarter Horse

Das American Quarter Horse (AQH) zeichnet sich grundsätzlich durch einen muskulösen stämmigen Körperbau sowie breitem Kopf und tiefer Brust aus. Im „AQHA Official Handbook of Rules and Regulations, Rule SHW350“ werden jene äußeren Merkmale aufgezählt, welche das ideale AQH aufweisen muss, beispielsweise ein wohlproportionierter gerader Hals, kurzer Rücken, lange Hüfte und Kruppe sowie einfärbige Fellfarbe (American Quarter Horse Association, o.J).

Hauptsächlich werden diese Pferde im Westernsport in Disziplinen wie Cutting oder Reining, sowie bei der Arbeit mit Rinderherden eingesetzt. Aufgrund dieser Einsatzbereiche sind Eigenschaften wie schnelles Anhalten und Wendigkeit besonders wichtig. Diese Fähigkeiten spiegeln sich auch in einem Zitat der American Quarter Horse Association aus dem Jahre 1940 wider. Dieses lautet: *“All Quarter Horses must be able to run a quarter mile in twenty-three seconds or show that they are capable of Quarter Horse Performance under ranch conditions.”* (AQHA Executive Committee meeting minutes, 1940).

Um 1600 entstand das AQH aus einer Kreuzung zwischen dem „Spanish Barb“, einer Rasse spanischer Abstammung, sowie englischen Pferden („English stock horses“), welche zu dieser Zeit in die USA importiert wurden. Diese Kreuzung wurde als „Celebrated American Quarter Running Horse“ bekannt und wurde erfolgreich bei Rennen eingesetzt. Diese Pferderennen waren namensgebend für die Rasse, da die Rennstrecken üblicherweise eine Länge von einer Viertelmeile (= quarter mile) hatten. Um die Ausdauer dieser Pferde zu verbessern, wurde 1752 der Englische Vollbluthengst „Janus“, ein direkter Nachkomme des Godolphin Arabian, importiert und zur Zucht eingesetzt (American Quarter Horse Association, o.J).

Das heutige AQH leitet sich genetisch höchstwahrscheinlich aus den folgenden Pferderassen ab: Spanish Barb, English Stock Horse, Englisches Vollblut sowie dem Mustang. Laut Aufzeichnungen wurden die Spanish Barbs schon im 17. Jahrhundert mit dem Englischen Vollblut gekreuzt und zur weiteren Zucht eingesetzt. Einer der bedeutendsten Hengste, welche die Zuchtgeschichte des AQH schon sehr früh geprägt hat, war der Hengst Steel Dust (1843). Er weist Darley Arabian in seiner väterlichen Abstammungslinie ab, was den frühen Einfluss des Englischen Vollblutes in die AQH-Zucht zeigt (Academic dictionaries and encyclopedias, o.J).

Bereits 1940 wurde die „American Quarter Horse Association“, kurz AQHA, gegründet. Sie besteht aus zahlreichen Mitgliedsverbänden und stellt das offizielle Rassenregister dar, in

welchem die Pedigree Daten von mehr als sechs Millionen Pferden dieser Rasse aufgezeichnet sind. Wimpy (1937) und Clabber (1936, auch bekannt als „Iron Horse“) waren die ersten zwei Hengste, welche in das Register aufgenommen wurden. Heute finden sich darin zahlreiche außergewöhnliche Hengstlinien: Three Bars (1940), Top Deck (1945) und Peppy San Badger (1974) sind nur einige davon. In diesem Register findet man auch sogenannte „Appendix Quarter Horses“. Dies sind Quarter Horses mit Vollblutanteil (AQH x Thoroughbred) und die einzige Kreuzung, welche in das AQHA-Register aufgenommen werden darf (American Quarter Horse Association, o.J).

In der sogenannten „AQHA Hall of Fame“ ist außerdem ein weiterer wichtiger Vertreter, welcher die QH-Zucht maßgebend prägte, aufgelistet: der Hengst Traveler (~ 1880). Die Geschichte um Traveler ist lückenhaft und seine Abstammung weitgehendst unklar. Bekannt ist jedoch, dass er in New York geboren wurde und Anfang 1900 in Texas zur Zucht eingesetzt wurde. Trotz unklarem Pedigree produzierte er einige der erfolgreichsten Nachkommen der AQH-Zuchtgeschichte und seine Linie ist bis heute vertreten (American Quarter Horse Association, o.J).

2.1.3. Traber

Der Begriff „Traber“ ist ein Sammelbegriff für die verschiedenen Traberrassen, welche ihren Ursprung in unterschiedlichen Ländern haben. Darunter fallen folgende Traberzuchten:

- American Standardbred (USA)
- Orlov Traber (Russland)
- Trotteur Français (Frankreich)

Grundsätzlich variiert das Aussehen der Traber sehr stark, da sich die Zucht vor allem auf Schnelligkeit und nicht auf äußere Merkmale fokussiert. Sie sind in fast allen Grundfarben vertreten. Ihr Stockmaß liegt in den meisten Fällen zwischen 150–165 cm und man findet sie sowohl als Vollblut- als auch kräftigeren Warmbluttyp. Alle Traber zeichnen sich durch eine starke und gut bemuskelte Hinterhand sowie Leistungsfähigkeit, schnelle Lernfähigkeit und Nervenstärke aus. Aufgrund dieser Eigenschaften werden Traber heute noch immer vorrangig im Trabrennsport eingesetzt, jedoch wird ihre Verwendung als Reit- und Freizeitpferd immer beliebter.

Je nach Rasse hat die Traberzucht ihren Ursprung in unterschiedlichen Ländern. Die Zucht der Orlow Traber begann um 1775 durch Graf Alexej Orlow-Tschesmenski am Chrenowskoi-Gestüt in Bobrow (Ridgeway, 2015). Das American Standardbred hat seinen Ursprung im Jahre 1788 mit dem Import des Vollbluthengstes Messenger (1780). Messenger, welcher in seiner väterlichen Abstammungslinie Flying Childers (1715) aufweist und sich somit auf Darley Arabian zurückführen lässt, wurde aus England in die USA exportiert und dort zu einem der einflussreichsten Gründerhengste des American Standardbreds (Coates, 1906). Die Geschichte des Trotteur Français geht in das 19. Jahrhundert zurück und hat seinen Ursprung in der Normandie, wo man damit begann, einheimische Stuten mit Norfolk-Trabern und Vollbluthengsten zu verpaaren (Edwards, 2006).

Vor allem der Hengst Hambletonian (1849), ein Urenkel Messenger's, wurde für die Zucht des Standardbreds eingesetzt und ein Großteil der heutigen Traber weist diesen in ihrer väterlichen Abstammungslinie auf (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2017). Die heute erfolgreichsten Hengstlinien gehen fast ausnahmslos auf Peter The Great (1895) bzw. dessen zwei einflussreichen Nachkommen Scotland (1925) und Volomite (1926) zurück (World Class Trotting, o.J).

2.1.4. Warmblut

Eine genaue Beschreibung der in dieser Arbeit untersuchten Warmblutrassen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weshalb hier nur auf die wichtigsten Eckdaten und häufigsten Warmblutrassen eingegangen wird.

Grundsätzlich ist das Warmblut ein mittelschweres Pferd, welches die Merkmale unterschiedlicher Pferdetypen kombiniert. Warmblüter sind in unzähligen Fellfarben vertreten und weisen mit ihrer Größe von durchschnittlich 160–170 cm ein gutes Mittelmaß auf. Ihr Körperbau ist muskulös und mit ihrem angenehmen Temperament sowie freundlichem Wesen entwickelten sich diese Pferde im Laufe der Zeit zu Allroundern im Pferdesport.

Zu den erfolgreichsten und beliebtesten Warmblutrassen zählen unter anderem der Hannoveraner, Holsteiner, Oldenburger oder Trakehner. Der Name gibt meist Aufschluss über das Zuchtgebiet. So findet man in Österreich vor allem das Österreichische Warmblut oder in der Schweiz das Schweizer Warmblut, welches aufgrund der Einkreuzung des Einsiedlers (Cavallo della Madonna) auch „moderner Einsiedler“ genannt wird (Hofmann, 2009).

Die Zuchtgeschichte der Warmblutpferde kann bis in das 18. Jahrhundert, bei gewissen Warmblutrassen bis in das 16. Jahrhundert, zurückverfolgt werden und hat ihren Ursprung in Europa. Die vorerst stämmigen Arbeitspferde wurden mit Tieren spanischer und arabischer Herkunft verpaart und deren Nachkommen erlangten somit einen wendigen und schlanken Körperbau. Im Laufe der Zeit wurden dann vermehrt Vollblüter und Trakehner zur Veredelung eingesetzt (Pferdezucht Austria, o.J).

Im Gegensatz zu anderen Rassen, mit Ausnahme der Trakehner, besteht in der Warmblutzucht ein offenes Stutbuch. Im Gegensatz zum geschlossenen Stutbuch dürfen hier Pferde anderer Rassen verpaart und in weiterer Folge in das Zuchtbuch aufgenommen werden. Die österreichische Warmblutzucht definiert die Aufnahme für Hengste in das Grundbuch folgendermaßen: *„Eingetragen werden alle männlichen Tiere, deren Mutter in die Hauptabteilung eines Zuchtbuches der Rasse Österreichisches Warmblut eingetragen ist und deren Vater ebenfalls in obiger Hauptabteilung oder in der Hauptabteilung einer anerkannten Fremdrasse lt. Anhang A eingetragen ist, so wie alle Hengste, welche die Kriterien für die Eintragung in das Haupthengstbuch nicht erfüllen.“* (Pferdezucht, Austria o.J).

Auf die Aufzählung der zahlreichen Hengstlinien der einzelnen Warmblutrassen wird in dieser Arbeit aufgrund des Umfangs verzichtet; im Zuge dessen wird auf entsprechende Fachliteratur verwiesen. Um jedoch einen groben Einblick zu geben, sind hier einige bedeutende Hengste, welche im Pedigree der heutigen verschiedenen Warmblutzuchten häufig zu finden sind, aufgelistet: Dark Ronald (1905), Coronel (1912), Phalaris (1913), Alter Kerl (1914), Landgraf (1914), Dampfross (1916), Goldfisch II (1934), Alme Z (1966), Disput (1967) und Sandro Z (1974). Auch in der Warmblutzucht wird die Bedeutung des Englischen Vollblutes klar und es kann eine direkte Verbindung hergestellt werden, denn die aufgelisteten Hengste weisen in ihrer väterlichen Abstammungslinie einen gemeinsamen Vorfahren, und zwar Darley Arabian, auf.

2.2. Der Einfluss Darley Arabian's und seiner Nachkommen auf die verschiedenen Pferderassen

In den letzten Jahrhunderten wurde die Pferdezucht immer organisierter, weshalb schon früh ein geringer Pool an leistungsstarken Zuchthengsten, die oftmals weltweit in der Zucht eingesetzt wurden, entstand. Aufgrund dieses Konzepts können moderne Pferderassen heute

auf einige wenige Gründerhengste zurückverfolgt werden (Wallner et al., 2017). Bei vielen Rassen wurde vor allem durch das Einkreuzen von Englischen Vollblütern versucht, deren Aussehen zu verändern sowie deren Leistung zu verbessern. Der Einfluss Darley Arabian's ist somit in den Rassen Quarter Horse (QH), Traber und Warmblüter, anhand von Pedigree Aufzeichnungen deutlich nachzuvollziehen.

Traber: Der „Gründerhengst“ des Standardbreds, Messenger (1780), kann über Mambrino (1768) auf Flying Childers (1715) zurückgeführt werden, welcher wiederum ein Sohn von Darley Arabian ist. Peter The Great (1895), aus der väterlichen Abstammungslinie nach Mambrino, ist einer der bedeutendsten Traberhengste der Zuchtgeschichte. Auch Hambletonian 10 (1849), ein Standardbred Hengst, welcher in der Traberzucht eingesetzt wurde, kann über die Hengstlinie Messenger auf Darley Arabian zurückgeführt werden (Coates, 1905).

Quarter Horse: Auch der Pedigree verschiedener QH-Hengstlinien weist Darley Arabian als Vorfahren auf. Dazu gehört beispielsweise der Hengst Peppy San Badger (1974), welcher den bekannten Hengst Whalebone, aus der Linie nach Darley Arabian, in seiner paternalen Abstammungslinie aufweist. Auch der Vollbluthengst Secretariat (1970) ist auf Darley Arabian's zurückzuführen. Andere Hengstlinien, welche auf den Englischen Vollbluthengst zurückgehen und aus der QH-Zucht nicht mehr wegzudenken sind, wären z.B Three Bars (1940), dessen Sohn Doc Bar (1956) sowie Go Man Go (1953).

Warmblut: Betrachtet man die Aufzeichnungen bezüglich der paternalen Abstammung von heute aktiven Warmbluthengsten, so kann auch hier ein Großteil der dominanten Hengstlinien auf Darley Arabian zurückgeführt werden. Ein bekannter Trakehner Zuchthengst ist beispielsweise Dampfross (1916), welcher den berühmten Hengst Eclipse (1764) in seiner väterlichen Abstammungslinie zeigt. Ein Sohn von Eclipse, King Fergus (1775), sowie der in dieser Linie vertretene Alme Z (1966), hatten Einfluss auf die Zucht des Französischen Reitpferdes. Auch die Zucht der Holsteiner wurde durch die Hengstlinie nach Darley Arabian, über Hengste wie beispielsweise Sandro Z (1974), beeinflusst. Auch erfolgreiche Hannoveraner Hengste, wie Alter Kerl (1914), Goldfisch II (1934) oder Disput (1967), stammen von Darley Arabian ab.

Der Einfluss von Darley Arabian war vorerst nur über schriftliche Pedigree Aufzeichnungen der verschiedenen Rassen nachvollziehbar. Es blieben jedoch auch viele seiner Einflüsse undokumentiert und immer wieder tauchen Hengststämme auf, deren Abstammung unklar ist.

Ein Beispiel hierfür ist der oben erwähnte Fall des QH Hengstes Traveler. Mittels Y-chromosomaler Haplotypenanalyse ist es nun aber möglich, die väterlichen Abstammungslinien genetisch nachzuweisen und dadurch fragliche Abstammungen nachzuvollziehen sowie eventuelle Fehler im Pedigree aufzudecken.

2.3. Das Y-Chromosom beim Pferd

2.3.1. Eigenschaften des Y-Chromosoms

Grundsätzlich werden bei Säugetieren zwei Geschlechtschromosomen, auch Gonosomen genannt, unterschieden: das X-Chromosom und das Y-Chromosom. Während weibliche Tiere zwei X-Chromosomen besitzen, weisen männliche Tiere ein X-Chromosom sowie ein Y-Chromosom auf. Das Hauspferd gehört zur Gattung *Equus*, welche sich aus neun lebenden Arten zusammensetzt, darunter Pferde, Esel sowie Zebras. Obwohl diese Tiere derselben Gattung angehören besitzen sie eine unterschiedliche Anzahl an Chromosomen: während der Esel 62 und das Przewalski Pferd 66 Chromosomen besitzt, weist das Hauspferd 32 Chromosomenpaare, also 64 Chromosomen, auf (Bailey et al., 1998).

Mit ca. 40–50 Millionen Basenpaare (Mb) ist das Y-Chromosoms des Pferdes ungefähr gleich groß wie die kleinsten Autosome (Janečka et al., 2018). Das Y-Chromosom des Pferdes besteht zum Großteil aus verdichtetem Chromatin, auch Heterochromatin genannt. Nur ein Viertel besteht aus Euchromatin; dieses Segment befindet sich am distalen Ende des Y-Chromosoms und umfasst ca. 15 Mb. Dieser distale Bereich umfasst außerdem die Pseudoautosomale Region, kurz PAR genannt, welche während der Meiose am Crossing Over mit dem X-Chromosom beteiligt ist und eine Größe von 2 Mb aufweist.

Man ging lange Zeit davon aus, dass das Y-Chromosom von Säugetieren im Laufe der Entwicklung degenerierte und dessen Hauptaufgabe aufgrund des Verlustes funktioneller Gene alleine in der Geschlechtsdeterminierung liegt. In einer Studie aus dem Jahr 2018 wurden jedoch 52 Gene am Y-Chromosom des Pferdes identifiziert und es konnte festgestellt werden, dass deren Genprodukte zusätzlich Einfluss auf die biologischen Funktionen der männlichen Tiere haben. Das Y-Chromosom spielt somit eine wichtige Rolle bei der Fruchtbarkeit, Entwicklung männlicher Geschlechtsmerkmale sowie der Spermatogenese (Janečka et al., 2018).

2.3.2. Vererbung des Y-Chromosoms

Die Vererbung des Y-Chromosoms unterscheidet sich von jener der Autosome. Die männlich-spezifische Region des Y-Chromosoms (= male specific region, MSY) rekombiniert während der Meiose nicht mit dem X-Chromosom und wird daher direkt vom Vattertier auf die männlichen Nachkommen übertragen (Wallner et al., 2017). Diese MSY wird in der Literatur auch als „non recombining region of the Y-Chromosome“ (NRY) bezeichnet. Auch die mitochondriale DNA wird nur von einem Ahnen, und zwar der Mutter, vererbt (Poeggel, 2013). Siehe diesbezüglich auch Abbildung 2.

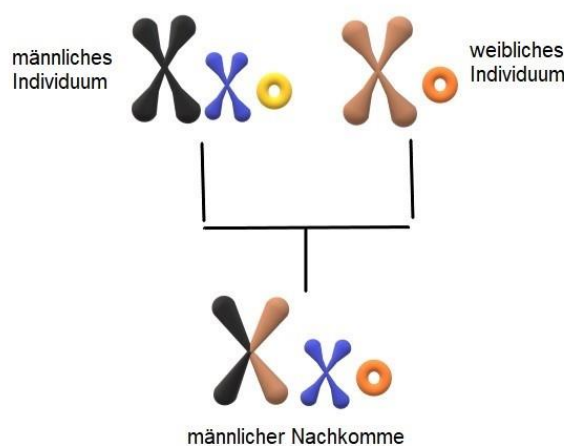


Abbildung 2: Autosomale, Y-chromosomale und mitochondriale Vererbung im Vergleich. Das große X (schwarz, braun, schwarz-braun) steht stellvertretend für alle Autosomen, das kleine X (blau) für das Y-Chromosom und der Kreis (orange) für die mitochondriale DNA. Während sich das autosomale Genom des Nachkommen zu gleichen Teilen aus mütterlichem und väterlichem Erbmaterial zusammensetzt (schwarz-braunes X), wird das Y-Chromosom nur vom Vater, die mitochondriale DNA nur von der Mutter an die Nachkommen vererbt.

2.3.3. Rückverfolgung paternaler Genealogien

Da die MSY/NRY ohne Rekombination an die nächste Generation weitergegeben wird, bedeutet dies, dass auch spontan auftretende Mutationen an die Nachkommen vererbt werden. Dies können sogenannte Insertionen und Deletionen, kurz „InDels“, oder Einzelnukleotid-Polymorphismen, auch Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) genannt, sein. Die Allele mehrerer Polymorphismen bilden Haplotypen (HTen). Über Y-chromosomale HTen ist es möglich, die paternalen Linien in Populationen nachzuvollziehen und Verwandtschaftsbeziehungen sowie gemeinsame Vorfahren darzustellen.

Die Polymorphismen können als Y-chromosomale Marker für die Charakterisierung väterlicher Linien bzw. Hengstgenealogien dienen. Weist ein Hengst einen bestimmten Haplotyp (HT) auf, so besitzen alle seine Nachkommen denselben HT. Ähnliche HTen können zu einer Haplogruppe (HG) zusammengefasst werden (Jobling et al., 1996). Die Verwandtschaftsbeziehungen der HTen können in einer phylogenetischen Baumstruktur dargestellt werden.

Während die Verwendung von Y-chromosomalen Markern zur Rückverfolgung von paternalen Genealogien in der Humangenetik längst etabliert ist, war dies bei Pferden aufgrund der geringen Sequenzdiversität des Y-Chromosoms nur erschwert möglich (Wallner et al., 2004). Durch Forschungsarbeiten der letzten Jahre (siehe Kapitel 2.4.) wurde es jedoch mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) möglich, auch bei Hengsten die paternalen Linien mittels Y-chromosomaler Marker nachzuvollziehen bzw. zu ergänzen.

2.4. Bisheriger Stand der Wissenschaft bezüglich paternaler Abstammungslinien beim Pferd

Die genetische Charakterisierung von paternalen Abstammungslinien beim Pferd ist aufgrund der geringen Sequenzdiversität des Y-Chromosoms schwieriger als bei anderen Tierarten. In einer Publikation, welche im Jahr 2013 unter dem Titel „Identification of genetic variation on the horse y chromosome and the tracing of male founder lineages in modern breeds“ (Wallner et al., 2013) veröffentlicht wurde, wurden erstmals Y-chromosomale Marker identifiziert, welche für die Rückverfolgung paternaler Linien beim Pferd von Bedeutung sind. Darin werden sechs HTen bei modernen Pferderassen beschrieben, welche sich alle deutlich von den zwei ermittelten HTen des Przewalski-Pferdes unterscheiden. In den modernen Pferderassen waren vor allem die HTen HT2 und HT3 häufig vertreten. Man fand heraus, dass sich die Mutation, welche zu HT3 führte, auf den berühmten Vollbluthengst Whalebone (1807) zurückführen lässt. Whalebone war wiederum ein Urenkel von Eclipse und dieser ein Nachkomme Darley Arabian's. Somit zeigte die Prävalenz des HT3 schon in frühen Arbeiten deutlich den Einfluss dieser paternalen Linie auf die moderne Pferdezucht (Wallner et al., 2013).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Forschungen durchgeführt und im Jahr 2017 neue Erkenntnisse in der Publikation „Y Chromosome Uncovers the Recent Oriental

Origin of Modern Stallions“ veröffentlicht. Hierbei wurden insgesamt 52 Pferde aus 21 verschiedenen Rassen, ein Esel sowie ein Przewalski- Pferd untersucht. Es wurden 1,46 Mb der MSY mittels NGS bei verschiedenen Individuen vergleichend sequenziert. Die Ergebnisse zeigten 53 Polymorphismen, aus welchen schlussendlich insgesamt 24 HTen rekonstruiert werden konnten (Wallner et al., 2017).

Es wurde gezeigt, dass sich der Großteil moderner Pferderassen in eine etwa 700 Jahre alte HG, die „Krongruppe“ einordnen lässt. Es wurde auch postuliert, dass die Vorherrschaft der Krongruppe durch den Import orientalischer Hengste entstand. Durch den Zuchteinsatz einiger weniger aus dem Orient stammender Gründerlinien wurden höchstwahrscheinlich autochthone HTen verdrängt.

Die HG T ist im Zuge dieser Arbeit besonders interessant, da sich hier die Englischen Vollblüter, die Warmblüter sowie teilweise Quarter Horses gruppieren. Es wurden außerdem die HTen der drei Gründerhengste des Englischen Vollblutes, und zwar Byerley Turk (1680), Godolphin Arabian (1724) und Darley Arabian (1700), in dieser HG determiniert. Die Nachkommen dieser Hengste waren alle in der HG Tb zu finden, wobei Darley Arabian der HT Tb-d zugeordnet wurde (Wallner et al., 2017). In dieser Arbeit wurde der Ursprung der Englischen Vollbluthengsten aus turkmenischen Linien postuliert.

In einer weiteren Publikation aus dem Jahr 2018 wurde festgestellt, dass asiatische Pferderassen eine höhere Diversität an HTen aufweisen und man konnte insgesamt acht private HTen für asiatische Pferde ermitteln. Es wurde außerdem bewiesen, dass die Achal-Tekkiner Tb-Haplotypen aufweisen und somit eine enge Verwandtschaft zu den Englischen Vollblütern gegeben sein muss (Felkel et al., 2018).

In einer weiteren Studie von Felkel et al. aus dem Jahr 2019 wurde die untersuchte Region der MSY auf 5,8 Mb erweitert und die Auflösung des Haplotypenbaums mittels Sequenzierung von 130 Pferden unterschiedlicher Rassen sowie neun Przewalski-Pferden verfeinert. In der Krongruppe konnten insgesamt 58 HTen unterschieden werden. In dieser Studie trugen mehr als 50 % der untersuchten Pferde einen HT der HG Tb. Zu diesen Tieren gehörten Pferde der Rassen Englisches Vollblut, Standardbred, Warmblüter, Quarter Horses, Freiburger, ein Lipizzanerhengst sowie Achal-Tekkiner.

Die HG Tb wurde durch das Englische Vollblut in den letzten 300 Jahren weit verbreitet und mittels Zusammenführung von Pedigree Aufzeichnungen der sequenzierten Tiere konnte man nun ein detaillierteres Bild der HG-Zugehörigkeit der drei Gründerhengste ermitteln. Darley

Arabian wird in dieser Studie erneut die HG Tb-d zugeschrieben, Godolphin Arabian Tb-oB3b und Byerley Turk Tb-oB1 (siehe Abb. 3).

Durch diese genaueren Erkenntnisse war es nun möglich, untersuchte Tiere in eine HG einzuordnen und eventuelle Fehler in deren Pedigree Aufzeichnungen aufzuzeigen. Wie bereits erwähnt, werden die Y-HTen, abgesehen von spontanen Mutationen, unverändert vom Vattertier an die Söhne weitergegeben. Mittels Neumutationen entstehen Polymorphismen, die für die Charakterisierung gewisser Zweiglinien verwendet werden können. Treten Unstimmigkeiten auf können über Y-HTen weit zurückreichende Fehler der Pedigree Aufzeichnungen nachgewiesen werden; ein Beispiel dafür ist der berühmte Vollbluthengst Galopin (1872). Laut Gestütsaufzeichnungen sollte Galopin auf Eclipse zurückgehen, jedoch wurde bei Nachkommen Galopin's der HT Tb-oB1 festgestellt. Dies beweist, dass Galopin nicht auf Eclipse zurückzuführen ist, da dieser den HT Tb-dW besaß und somit auch seine Nachkommen Tb-dW aufweisen müssten. Die Y-chromosomale Analyse hat somit gezeigt, dass es zur Aufzeichnung eines falschen Hengstes als Vater Galopin's kam (Felkel et al., 2019).

amerikanischen Sportpferden nachgewiesen werden, was wiederum den Einfluss des Englischen Vollbluthengstes bestätigte. Weiters wurde Tb-dW1 dem Hengst Whalebone zugeordnet (Wallner et al., 2017).

Die Abbildung 4 zeigt den aktuellsten Stand der HG Tb-d aus der Publikation „Y-Chromosomal Insights into Breeding History and Sire Line Genealogies of Arabian Horses“ (Remer et al., 2022). Insgesamt werden in dem genannten Paper 16 HTen basierend auf 27 Markern in Tb-d unterschieden. Auch hier zeigt sich, dass sich in der HG Tb-dW vorrangig Englische Vollblüter, zahlreiche Warmblutrassen sowie zum Teil Quarter Horses befinden. Die Gruppe Tb-dW lässt sich in weitere Unteräste aufteilen: Tb-dW1, Tb-dW2, Tb-dW3 und Tb-dW4. Der prominenteste HT ist Tb-dW1, was wiederum eindeutig den genetischen Einfluss der Whalebone-Linie auf die verschiedensten Rassen bestätigt (Remer et al., 2022). Bei den restlichen Untergruppen ist es zum Teil noch unklar, welche Hengstlinien sie determinieren und in welchen Rassen sie verbreitet sind. In Vorarbeiten wurde die Untergruppe Tb-dW2 den Nachkommen von Mercury (1778), einem Sohn von Eclipse, zugeordnet und dieser HT ist vor allem im Trakehner vertreten (Strele, 2021). Zwar konnte Tb-dW3 bei einigen Lipizzaner Proben detektiert werden, jedoch sind die Marker, welche diese Untergruppe determinieren, noch nicht vollständig validiert. Unter dem Ast Tb-dW4 sammeln sich vorrangig Quarter Horses, wobei diese auch vereinzelt in der Untergruppe Tb-dW1 zu finden sind (Wallner et al., 2017).

Die Häufigkeit des HT Tb-d in den vielen unterschiedlichen Rassen belegt bereits den Einfluss des Englischen Vollblutes auf die Pferdezucht. Trotzdem bedarf es weiterhin einer Entwicklung neuer Marker sowie Untersuchungen bezüglich der Häufigkeitsverteilung von verschiedenen HTen in unterschiedlichen Pferderassen (Remer et al., 2022).

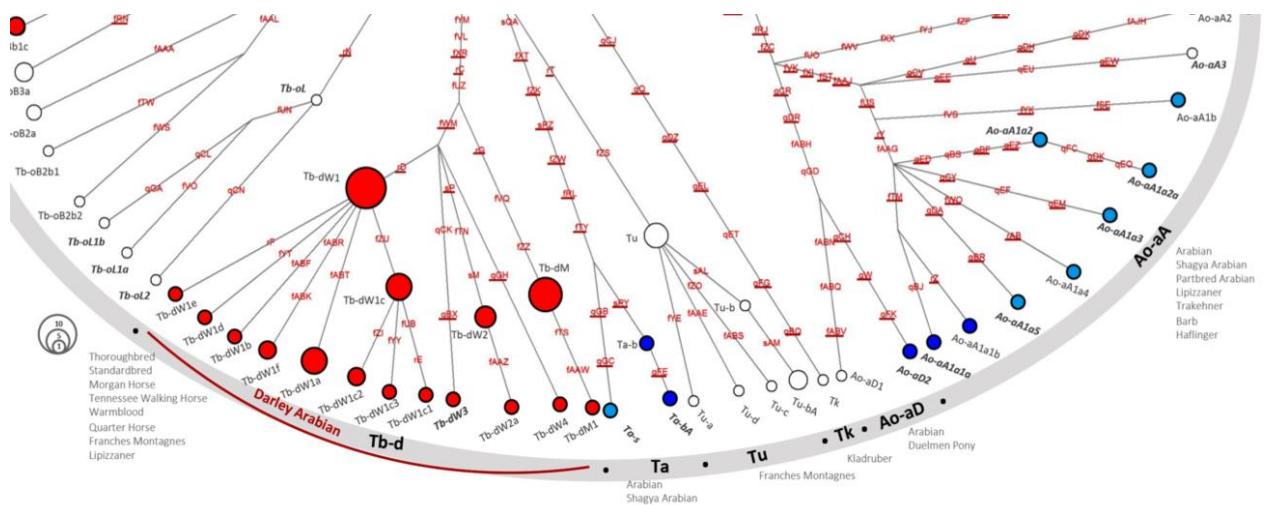


Abbildung 4: Ausschnitt aus dem MSY-HT-Netzwerk nach Remer et al. 2022. Die Haplotypen sind als Kreise dargestellt, wobei die Kreisgröße proportional zur Häufigkeit ist. Im äußeren Kreis sind die Krongruppen angegeben, die Rassen sind daneben aufgeführt. Die Tb-d Gruppe ist durch Darley Arabian begründet und mittels roter Linie markiert (Modifiziert nach Remer et al. 2022).

2.6. Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

Die meisten modernen Pferderassen sind das Ergebnis einer zentralisierten und organisierten Pferdezucht. Im Laufe der Zuchtgeschichte wurden Inzucht- und Linienzuchtkonzepte populär und die Anzahl der verwendeten Zuchthengste hat sich auf wenige erfolgreiche Deckhengste beschränkt. Durch diese Strategien wurde die gesamte Pferdepopulation stark beeinflusst, was sich folglich in der geringen genetischen Diversität der männlichen Tiere widerspiegelt (Fages et al., 2019).

Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass der Großteil der heute vertretenen Pferderassen von einigen wenigen Gründerhengsten abstammt, darunter der einflussreiche Vollbluthengst Darley Arabian (Wallner et al. 2017, Remer et al. 2022). Darley Arabian wurde im 18. Jahrhundert nach England gebracht und dort zur Zucht eingesetzt. Er gilt heute nachweislich als einer der wichtigsten Gründerväter des Englischen Vollbluts. Seine erfolgreichen Nachkommen wurden im Laufe der Zeit in der Zucht vieler anderer Rassen eingesetzt. Somit kann sein Einfluss in fast allen modernen Pferderassen, darunter beispielsweise Quarter Horses, verschiedene Warmblutpferde, Englisches Vollblut aber auch Traber nachgewiesen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels genetischer Untersuchung von Y-chromosomalen Markern, den Einfluss von Darley Arabian in der heutigen Pferdezucht zu beleuchten und diesen über

die väterlichen Linien nachzuvollziehen. Es können die Y-chromosomalen HTen-Daten den väterlichen Genealogien der beprobten Hengste aus dem Pedigree gegenübergestellt werden und damit ein Nachvollziehen der Hengstlinien nach Darley Arabian in den verschiedenen Rassen ermöglicht werden. Basierend auf den Ergebnissen können weiters eventuelle Fehler in Pedigree Aufzeichnungen entdeckt werden.

Des Weiteren ermöglicht die genaue Ausarbeitung der Y-chromosomalen Signaturen der Hengstlinien nach Darley Arabian einen Hinweis auf den Ursprung von Zuchthengsten, wenn dies nicht aus dem Pedigree möglich ist. Wenn Hengste einer Linie einen Y-HT nach Darley Arabian besitzen, kann ein undokumentierter Einfluss von diesem anhand der Ergebnisse festgemacht werden.

Das für diese Arbeit verwendete Material ist genomische DNA, welche zuvor aus Haarwurzelzellen isoliert wurde. Es handelt sich um Proben von männlichen Tieren, die sorgfältig ausgewählt wurden und deren Y-HTen basierend auf Genotypisierung von 14 Y-chromosomalen Marker ermittelt werden sollen. Von einem Teil der Tiere standen bereits Genotypisierungsergebnisse aus Vorarbeiten zur Verfügung, der Großteil der Proben wurde jedoch im Zuge meiner eigenen Laborarbeiten typisiert. Für die Rekonstruktion der väterlichen Linien werden Pedigree Aufzeichnung aus Zuchtbüchern und Online Datenbanken verwendet. Die Ermittlung der Y-chromosomalen HTen erfolgt mittels KASP® Technologie und Real-Time PCR. Die HTen der untersuchten Tiere werden rekonstruiert und den Aufzeichnungen der väterlichen Linien gemäß deren Pedigree gegenübergestellt.

Diese Arbeit und die damit verbundenen Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Veterinärmedizinischen Universität Wien genehmigt und unter Berücksichtigung der Richtlinien für gutes wissenschaftliches Arbeiten und nationaler Gesetzgebung anerkannt und bestätigt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller, Herstellungsort
2x KASP® Mastermix	LGC genomics (GB)
KASP® Assay mix	LGC genomics (GB)
Genomische DNA von männlichen Pferden, isoliert aus Haarwurzelzellen; in einer Konzentration von 3 ng/µl gelöst in TE	bereitgestellt vom Institut für Tierzucht und Genetik (Isolation mit Nexttec DNA Isolationskit der Firma Agrobigen)

3.1.2. Bei der Laborarbeit verwendete Materialien

Produkt	Hersteller, Herstellungsort
Pipettenspitzen gelb (20µl)	Sarstedt (GER)
Pipettenspitzen Filter Tips (10µl, 100µl, 200µl)	Greiner Bio One (AT)
Combitips advanced® 0,1ml	Eppendorf (AT)
Eppendorf Tubes	Eppendorf (AT)
96-well PCR Platte, Hard-Shell®, weiß	Bio-Rad (USA)
Microseal® Optische Folie	Biozym (GER)

3.1.3. Verwendete technische und manuelle Geräte

Produkt	Hersteller, Herstellungsort
Pipetten (20µl, 100µl, 200µl)	Gilson® (USA)
Elektronische Pipette	Eppendorf (AT)
Labnet MPS 1000 Plattentischzentrifuge	Sigma-Aldrich® (AT)
Tischzentrifuge	Eppendorf (AT)
Vortexer	IKA® (GER)
CFX Real-Time System C1000 Touch®	Bio-Rad (USA)

3.1.4. Programme und Software

Produkt	Hersteller, Herstellungsort
MS Excel®	Microsoft Office®, Microsoft Cooperation (USA)
MS Word®	Microsoft Office®, Microsoft Cooperation (USA)
Bio-Rad CFX Manager 3.1®	Bio-Rad (USA)

3.1.5. Verwendete Proben

Für diese Arbeit sollten für insgesamt 56 männliche Tiere unterschiedlicher Rassen die Y-chromosomalen HTen ermittelt werden. Zwei der Proben wurden auf Wunsch der Probenbereitsteller nicht im Detail untersucht und wurden deshalb für die weitere Ausarbeitung der Ergebnisse ausgeschlossen. Deshalb wurden in dieser Arbeit schlussendlich nur die DNA-Proben von 54 Tieren der Haplotypenanalyse unterzogen.

Die genomische DNA dieser Tiere wurde in isolierter Form zur Verfügung gestellt. Die DNA-Isolation wurde bereits für vorhergehende Untersuchungen mittels „Nexttec™ 1-Step DNA-Isolation Kit for Tissue & Cells“ von der Firma nexttec™ Biotechnologie GmbH aus Haarwurzelproben durchgeführt und entweder als Verdünnung (3 ng/µl) oder in Form von Stock Samples (unverdünnte Form) am Institut für Tierzucht und Genetik gekühlt oder gefroren gelagert.

Von weiteren 34 Proben standen die HTen-Ergebnisse bereits aus Vorarbeiten zur Verfügung (bereitgestellt von Mag. Doris Rigler, Mag. Viktoria Remer, Msc Lara Radovic). Die Daten wurden übernommen und konnten in die Analysen mitaufgenommen werden.

Während den Vorarbeiten zu dieser Diplomarbeit wurde auch versucht, Haarwurzelproben von weiteren heute lebenden aktiven Zuchthengsten zu erhalten. Dies wäre wünschenswert gewesen, da während der Recherche bezüglich heute aktiver Warmbluthengste deutlich wurde, dass eine nicht geringe Anzahl dieser auf Linien zurückgeht, von welchen keine oder nur wenige Proben am Institut für Tierzucht und Genetik verfügbar waren. Drⁱⁿ med.vet. Priv.-Dozⁱⁿ Barbara Wallner hat im Zuge dessen mehrere Gestüte kontaktiert und die telefonische Zusage für ca. 10 Proben von Warmblut Hengsten bekommen. Diese Proben sind jedoch leider nicht eingetroffen und konnten daher für die Untersuchungen dieser Diplomarbeit nicht herangezogen werden. Somit stützt sich die Arbeit auf die vorher genannte Anzahl an Proben.

3.1.6. Verwendeter Datensatz

Die insgesamt 88 Proben wurden nach zwei Kriterien ausgewählt. Einerseits wurden Tiere gewählt, welche Darley Arabian als Vorfahren in ihrem Pedigree aufweisen und auf Basis derer sublinienspezifische HTen ausgearbeitet werden konnten. Andererseits wurden Proben in die Untersuchung miteinbezogen, welche nachweislich, aufgrund von Vorarbeiten, den HT Tb-d tragen, ihr Pedigree jedoch keinen Hinweis auf einen Einfluss Darley Arabian's zeigt oder

deren Abstammung unklar ist. In Tabelle 1 ist ersichtlich, wie viele Tiere der einzelnen Rassen nach ihrem Pedigree und wie viele nach der Zugehörigkeit zu Tb-d ausgewählt wurden.

Aufgrund dieser Auswahlmethode kam es außerdem zustande, dass auch Proben anderer als die in den Kapiteln 2.1.1. bis 2.1.4. vorgestellten Rassen, deren Pedigree oder ermittelter HT einen Hinweis auf den Einfluss Darley Arabian's gab, in die Untersuchungen miteinbezogen wurden.

Rasse	Anzahl Proben	Ausgewählt nach Pedigree	Ausgewählt nach HT
Englisches Vollblut	18 (16)	18	0
Quarter Horse	17(8)	8	9
Traber	8 (2)	8	0
Freiberger	2 (0)	0	2
Camargue	2 (2)	0	2
Appaloosa	2 (2)	0	2
Araber	4 (4)	0	4
Partbred Araber	2 (2)	0	2
Lipizzaner	4 (0)	0	4
Pintabian	1 (1)	0	1
Shagya Araber	1 (1)	0	1
Schweizer Warmblut	1 (0)	1	0
Bayrisches Warmblut	1 (1)	1	0
Baden Württemberger	2 (1)	2	0
Holsteiner	3 (1)	3	0
Hannoveraner	4 (0)	4	0
Österreichisches Warmblut	4 (3)	4	0
Oldenburger	4 (2)	4	0
Trakehner	7 (7)	6	1
Westfale	1 (0)	1	0
Insgesamt	88 (54)	60	28

Tabelle 1: Anzahl der Proben des Datensatzes und Zuordnung zum Auswahlkriterium. Die Tabelle zeigt den Datensatz dieser Arbeit. Es wurden insgesamt 88 Proben von den hier aufgelisteten Rassen untersucht. Die in Klammer gesetzte Zahl (x), ersichtlich in der zweiten Spalte, zeigt, wie für wie viele dieser Proben die Genotypisierung im Labor durchgeführt wurde. Für die restlichen Proben standen bereits Genotypisierungsdaten zur Verfügung. In den Spalten 3 und 4 ist die Anzahl der Proben in Bezug auf das jeweilige Auswahlkriterium ersichtlich.

3.2. Methoden

3.2.1. Zusammenstellung des Datensatzes

Zu Beginn der Arbeit wurden Überlegungen zu den Pferderassen, welche in dieser Arbeit miteinbezogen werden sollten, getroffen. Da der Einfluss Darley Arabian's in der modernen Pferdezucht genauer beleuchtet werden soll und nach bisherigem Forschungsstand vor allem die Rassen Englisches Vollblut, Warmblut, Quarter Horse und Traber maßgeblich von diesem Gründerhengst beeinflusst wurden, lag der Fokus der Arbeit vorrangig auf diesen vier Pferderassen. Die Warmblutpferde werden in dieser Arbeit als eine große Gruppe angesehen, unterteilen sich jedoch in mehrere Warmblutrassen.

Nachdem eine Festlegung auf die zu verwendenden Pferderassen stattgefunden hatte, wurde eine Liste von aktiven Zuchthengste ermittelt und deren paternale Abstammungslinie aus dem Pedigree rekonstruiert. Dabei lag der Fokus auf jenen Hengsten bzw. Hengstlinien, welche aktuell in der österreichischen und deutschen Zucht eingesetzt werden. Ursprünglich entstand auf Basis dieser Informationen eine Liste von 351 Zuchthengsten. Davon waren 134 Warmblüter, 94 Englische Vollblüter, 44 Quarter Horses und 79 Traber.

3.2.2. Rekonstruktion der väterlichen Linien

Für die Rekonstruktion der väterlichen Linien wurden Aufzeichnungen aus Zuchtbüchern und Online Datenbanken verwendet. Es wurde auf die nachfolgenden Zuchtbücher sowie Online Datenbanken zurückgegriffen:

Für das Englische Vollblut wurden die Informationen aus dem „Direktorium für Galopprennsport und Vollblutzucht in Österreich“ (Direktorium für Galopprennsport und Vollblutzucht in Österreich, o.J), dem „Deutschen Galopp, ehem. „GERMAN RACING“ (Deutscher Galopp, o.J) sowie dem „Thoroughbred Stallion Guide online“ (Thoroughbred Stallion Guide online, o.J) entnommen. Die Informationen bezüglich der Warmbluthengste wurden der Zentralen Arbeitsgemeinschaft österreichischer Pferdezüchter (Pferd Austria. Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Pferdezüchter, o.J), dem Hengstverzeichnis 2021 Warmblut- und Spezialhengste für die Warmblutzucht in Bayern (Hengstverzeichnis 2021 Warmblut- und Spezialhengste für die Warmblutzucht in Bayern, 2021), dem Gestüt Sprehe (Gestüt Sprehe, o.J) sowie der Website International Horse Breeders (IBH, 2021) entnommen. Der „All American Quarter Horse Congress“ (All American Quarter Horse

Congress, 2022) lieferte Informationen zu den QH Hengsten, die Abstammung der ausgewählten Traberhengste wurde mittels dem „Trotting Stallions 2021“ (Matzka, 2021), einem weltweiten Katalog, bestehend aus einer Auflistung aktueller Traber Deckhengste, nachvollzogen. Weiters wurden folgende Online Datenbanken verwendet: Pedigree Query (Pedigree Online Thoroughbred Database, o.J), „Allbreedpedigree“ (Pedigree Online All Breed Database, o.J), Wheel of the Thoroughbred (Prominent Sire Lines in America, o.J), Horse Telex Pedigree (Horse Telex Pedigree, o.J) und Pedigree Database for Trotters (Pedigree Database for Trotters, o.J).

Die ermittelten paternalen Genalogien der 351 Tiere wurden anhand eines Diagramms (siehe auch Kapitel 4.) für jede Rasse dargestellt und über diese Darstellung die häufigsten Hengstlinien in den einzelnen Rassen ermittelt. Anhand der Rekonstruktion der paternalen Abstammungslinie aus dem Pedigree konnte festgestellt werden, von welchen Linien bereits Proben im Institut vorhanden waren. Da der Großteil der Hengste einigen wenigen Hengstlinien zuzuordnen war (siehe Kapitel 4.), konnte der Datensatz schlussendlich eingegrenzt werden (siehe Tab.1).

3.2.3. Genotypisierung

Bei der Genotypisierung wurden die Allele an ausgewählten Markern bestimmt. Dies ist grundsätzlich eine schnelle und kosteneffiziente Möglichkeit, Aufschluss über die genetische Information eines Individuums an definierten Genorten zu bekommen. Beinahe alle Methoden der Genotypisierung beruhen auf der PCR-Amplifikation. Die derzeit angewendeten Methoden kombinieren mindestens eines von vier Prinzipien der allelspezifischen Diskriminierung (Hybridisierung, Primer Extension, Ligation oder Restriktion) mit einer von vier verschiedenen Nachweistechiken (Fluoreszenz, Fluoreszenzpolarisation, Resonanzenergietransfer und Massenspektrometrie) (Innocenti, 2005). Die Genotypisierung kann also mit unterschiedlichen Verfahren durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die KASP® Technologie der Firma LGC genomics angewendet. Die HTen der Proben wurden anschließend anhand der Genotypisierungsergebnisse rekonstruiert.

3.2.4. Prinzip der KASP® Technologie

Die KASP® Technologie basiert auf kompetitiver allelspezifischer PCR und ermöglicht die bi-allelische Auswertung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), Insertionen und Deletionen (InDels) an spezifischen Loci. Für die Durchführung werden drei Komponenten benötigt: der KASP® Assay Mix, der KASP® Master Mix sowie die zu untersuchenden DNA. Die DNA-Proben werden zu dem SNP-spezifischen KASP® Assay Mix und dem universellen KASP® Mastermix gegeben. In weiterer Folge wird eine thermische Zyklusreaktion durchgeführt, gefolgt von einer Endpunkt-Fluoreszenzmessung.

Der KASP® Assay Mix besteht aus insgesamt drei Primern: zwei allelspezifische Vorwärtsprimer sowie ein gemeinsamer Rückwärtsprimer. Die Vorwärtsprimer weisen jeweils eine einzigartige „Tail sequence“ auf, welche die Bindung an eine der beiden fluoreszenzmarkierten Sonden ermöglicht. Diese Sonden werden auch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer Kassetten, kurz FRET-Kassetten, genannt und sind Teil des KASP® Mastermixes. Die beiden Sonden beinhalten jeweils einen Farbstoff: Hexachlorofluorescein (HEX) und 6-Carboxyfluorescein (FAM). Neben den beiden Sonden beinhaltet der KASP® Mastermix zusätzlich den passiven Referenzfarbstoff ROX™, die Taq Polymerase, MgCl₂ in einer Pufferlösung sowie freie Nukleotide.

Während des thermischen Zyklus kommt es zur Bindung der allelspezifischen Primer. Vorausgesetzt der Vorwärtsprimer ist an die „Tail sequence“ gebunden und wird gemeinsam mit dieser während der PCR zur Gänze eingebaut, werden die Fluorophore entweder als FAM oder HEX Signal emittiert. Ist der Genotyp an einem bestimmten SNP homozygot wird nur ein fluoreszierendes Signal erzeugt, ist er jedoch heterozygot wird ein gemischtes Signal ausgesendet. Zur Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde die Software Bio-Rad CFX Manager 3.1® verwendet und die Ergebnisse in Form von Cluster Plots dargestellt (LGC Biosearch Technologies, o.J).

Auf die detaillierte Durchführung der Real-Time PCR wird in Kapitel 3.2.5. näher eingegangen.



Abbildung 5: Bestandteile und einzelne Schritte des Ablaufs der KASP® Technologie (Modifiziert nach LGC Biosearch Technologies. <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/KASP-brochure.pdf> (Zugriff am 05.04.2022)).

3.2.5. Durchführung

3.2.5.1. Vorbereitung der Proben

Die DNA der zu untersuchenden 54 Proben war bereits in isolierter Form vorhanden, weshalb auf den genauen Vorgang der DNA-Isolation aus Haarwurzelpollen in dieser Arbeit nicht genauer eingegangen wird. Jene Proben, welche bereits in verdünnter Form (3 ng/µl) am Institut für Tierzucht und Genetik gelagert waren, wurden auch in dieser Form für die Genotypisierung verwendet. Dies waren 35 der insgesamt 54 männlichen Proben. Die restlichen 19 Proben waren als sogenannte „Stock Samples“, also in unverdünnter Form, eingefroren. Um so wenig DNA wie möglich zu verbrauchen, wurden von diesen DNA-Isolaten 1:2 Verdünnungen, bestehend aus 30 µl DNA und 30 µl TE (= 1x Tris EDTA), angefertigt und in dieser Zusammensetzung in den darauffolgenden Arbeitsschritten verwendet.

Wenn möglich wurden pro Tier jeweils 30 µl verdünnte DNA in ein Eppendorf Reaktionsgefäß aus Plastik pipettiert. Bei drei der 54 Proben konnten jedoch nicht 30 µl gewonnen werden und somit wurde in diesen Fällen mit weniger DNA gearbeitet. Um möglichst schonend mit den Verdünnungen umzugehen, wurden die DNA Lösungen während der gesamten Zeit der Laborarbeiten in Eppendorf Tubes bei Kühlschranktemperatur gelagert und nur für die nötigen Arbeitsschritte an Raumtemperatur gebracht.

3.2.5.2. Auswahl der Marker

In dieser Diplomarbeit wurden insgesamt 14 Marker, welche eine Zuordnung der Proben in eine der in Abb. 6 dieser Arbeit ersichtlichen Untergruppen der HG Tb-d ermöglichen, untersucht (siehe Tabelle 2). Die Auswahl der einzelnen Marker wurde grundsätzlich auf Basis des NGS Haplotypennetzwerks aus Felkel et.al 2019 und Remer et.al 2022 getroffen. In diesen Arbeiten wurden bereits die HTen der Nachkommen von Darley Arabian in der HG Tb-d beschrieben.

Die Genotypisierung von neun dieser Marker wurden bereits routinemäßig in früheren Arbeiten eingesetzt, wohingegen fünf Marker zum ersten Mal in dieser Arbeit angewendet wurden. Die Sequenzinformationen zu allen in dieser Arbeit untersuchten Markern sind Felkel et al. 2019 und Remer et al. 2022 zu entnehmen.

Bevor mit den PCR-Durchläufen begonnen werden konnte, musste entschieden werden, welche Proben auf welche Marker bzw. KASP® Assays untersucht werden sollten. Bei allen Arbeitsschritten sollte so material- und kostensparend wie möglich gearbeitet werden. Da bereits bekannt war, dass in den einzelnen Rassen unterschiedliche HTen erwartet werden (Felkel et al. 2019, Remer et al. 2022), wurde versucht, die PCR-Durchläufe dementsprechend zu organisieren. Dies war beispielsweise bei den Trabern möglich. In diesem Fall waren die Genotypisierungsdaten von sechs Tieren, welche ausnahmslos den HT Tb-dM (determiniert durch den Marker rG, siehe Abb 6) aufwiesen, vorhanden. Da auch aus vorherigen Arbeiten bekannt war, dass Tb-dM vorrangig Tiere der Rasse Traber umfasst, wurden jene Proben direkt auf den dementsprechenden Marker (rG) untersucht.

Alle der zu untersuchenden 54 Proben waren bereits auf den Marker rC untersucht und zeigten für diesen das abgeleitete Allel, was bedeutet, dass alle Proben grundsätzlich in die HG Tb-d einzuordnen waren. In weiterer Folge wurden im ersten Schritt die beiden Marker fWM und rG getestet, was eine Einteilung in die HG Tb-dW und Tb-dM ermöglichte. Wies nun eine Probe das abgeleitete Allel auf, so wurde sie der entsprechenden HG zugewiesen und, wenn vorhanden, die weiteren HTen dieser HG untersucht. Jene Proben, welche sich in Tb-dW sammelten, wurden anschließend auf den Marker rD getestet. Aufgrund der Tatsache, dass ein Großteil der Proben rD_1 aufwies, mussten die Marker qGH, qBX und sP (determinieren Tb-dW2 bis Tb-dW4) nur bei einigen wenigen Tieren angewendet werden. Da die meisten der 54 DNA-Proben in der HG Tb-dW1 zu finden waren, mussten am häufigsten die Marker fABT, fABF, fZU, rE, fYT, rF und fABR angewendet werden.

Das ancestrale Allel für einen Marker wird im weiteren Verlauf mit „_0“ gekennzeichnet, das abgeleitete Allel erhält die Bezeichnung „_1“. Weist nun eine Probe das abgeleitete Allel (z.B. rD_T_1) auf, so wird sie der entsprechenden HG zugewiesen, wird das ancestrale Allel detektiert, so wird die Probe auf andere HTen mit den entsprechenden Markern getestet.

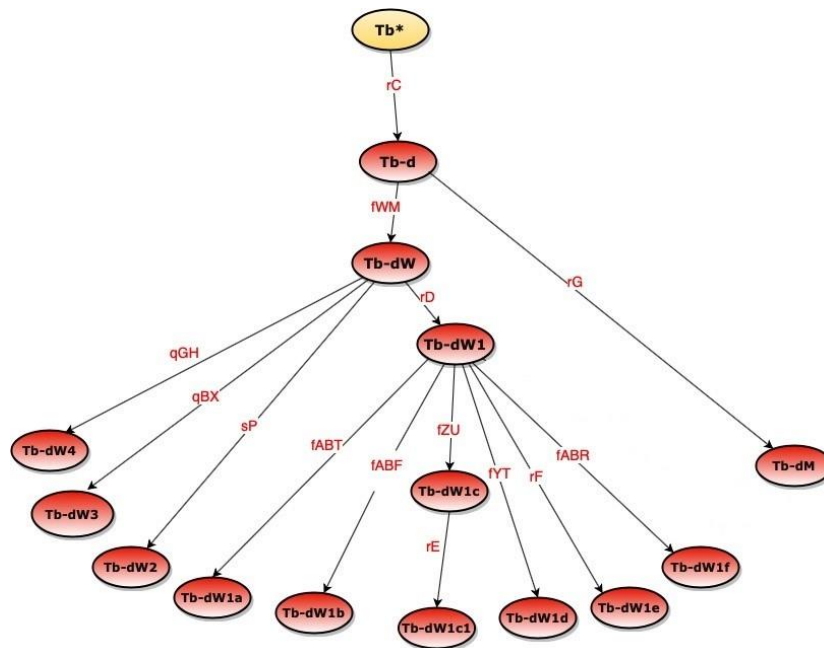


Abbildung 6: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Marker und deren zugeordnete HTen.

Marker	Allel 1	Allel 2	Haplotyp
rC	rC_T_0	rC_C_1	Tb-d
fWM	fWM_T_0	fWM_C_1	Tb-dW
rG	rG_A_0	rG_G_1	Tb-dM
rD	rD_TT_0	rD_T_1	Tb-dW1
rE	rE_A_0	rE_G_1	Tb-dW1c1
rF	rF_G_0	rF_C_1	Tb-dW1e
sP	sP_A_0	sP_C_1	Tb-dW2
qBX	qBX_A_0	qBX_T_1	Tb-dW3
qGH	qGH_G_0	qGH_A_1	Tb-dW4
fABT	fABT_A_0	fABT_G_1	Tb-dW1a
fABF	fABF_T_0	fABF_C_1	Tb-dW1b
fZU	fZU_T_0	fZU_C_1	Tb-dW1c
fYT	fYT_G_0	fYT_A_1	Tb-dW1d
fABR	fABR_G_0	fABR_A_1	Tb-dW1f

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der verwendeten Marker sowie die HTen, die das abgeleitete Allel (gekennzeichnet mit „_1“) determinieren. Jene Marker, die in der Tabelle eine kursive und fett gedruckte Schriftart aufweisen, wurden erstmals in dieser Arbeit verwendet (= „neue“ Marker).

Betrachtet man als Beispiel den Haplotypenbaum aus Abbildung 6, so weist eine Probe, welche Tb-dW1 besitzt, sicher das abgeleitete Allel („_1“) für rD auf. Ist dieselbe Probe nun einer der Untergruppen zuteilbar, beispielsweise Tb-dW1a, so weist sie auch hierfür das abgeleitete Allel auf. Es kann aber auch vorkommen, dass eine Probe grundsätzlich Tb-dW1 trägt und sie keiner weiteren Untergruppe zugeteilt werden kann (alle restlichen Marker dieser Gruppe zeigen dann das Allel „_0“).

3.2.5.3. Erstmals verwendete Marker

Die Marker fABT, fABF, fABR, fZU und fYT waren im Zuge der Diplomarbeit erstmalig in Verwendung und die entsprechenden Protokolle mussten im Labor etabliert werden. Zu Beginn wurden diese Assays unter Anwendung des in dem Kapitel 3.2.5.8. beschriebenen Real-Time PCR Temperaturprotokoll verwendet. Dieses Protokoll war für drei der fünf KASP® Assays (fYT, fABT, fABR) passend und somit konnten jene Ergebnisse erfolgreich ausgewertet werden.

Für die beiden Marker fABF und fZU waren diese PCR-Konditionen jedoch nicht angemessen und eine aussagekräftige Auswertung der PCR-Analyse war unter diesen Umständen nicht möglich. Aufgrund dessen wurde in weiterer Folge in mehreren Schritten versucht, das passende PCR-Protokoll für diese beiden Y-chromosomalen Assays zu finden (siehe Kapitel 3.2.5.11.).

3.2.5.4. Durchführung der KASP® Analyse

Vor jedem PCR-Durchlauf wurde ein Excel® Sheet, in welchem alle zu untersuchenden Proben sowie die zu untersuchenden KASP® Assays aufgelistet waren, erstellt. Eine Vorlage dazu wurde im Vorhinein vom Institut für Tierzucht und Genetik von Mag. med. vet. Doris Rigler zur Verfügung gestellt. Jedes Dokument wurde in gleicher Art und Weise aufbereitet, fortlaufend nummeriert (Muster: Kasp_X_AS, Datum) und beinhaltete Informationen zu den angewandten PCR-Konditionen, Volumen der verwendeten Reagenzien (2xKASP® Assay, Mastermix, DNA) sowie Anordnung der Proben auf der 96-well Platte. Zusätzlich zu den DNA-Proben der männlichen Tiere wurden folgende Kontrollen mitgeführt: DNA von zwei weiblichen Pferden, Positivkontrollen, sowie Negativkontrollen (= Wasser, ntc). Die weiblichen Proben geben weder ein HEX noch ein FAM Signal ab, da sie genetisch zwei X-Chromosomen

in weiterer Folge in ein Eppendorf Tube pipettiert, welches weiters beschriftet, gevortext sowie zentrifugiert wurde.

3.2.5.6. Befüllen der 96-well Platte

Für jede PCR-Analyse wurde eine weiße 96-well Platte der Firma Bio-Rad verwendet. Diese wurde schon vor der Herstellung des Mastermixes und auch während allen weiteren Arbeitsschritten auf Eis gelagert, da die KASP® Assaymixes eine kühle Umgebung benötigen. Für das Befüllen der Platte wurde die automatische Pipette von Eppendorf mit den 0,1 µl Pipettenspitzen verwendet. In jede Plattenvertiefung wurden jeweils 3,08 µl Mastermix pipettiert.

Zu diesen 3,08 µl Mastermix wurden schließlich in jede Vertiefung der Platte 3 µl DNA hinzugefügt. Dies geschah mit einer manuellen Pipette der Marke Gilson. Beim Befüllen der Platte mit der DNA wurde darauf geachtet, das Schema der Excel® Laboranweisung zu befolgen.

3.2.5.7. Weitere Bearbeitung der Platte

Nach dem Befüllen der 96-well Platte wurde diese mit einer durchsichtigen Folie (Microseal Folie) verschlossen, weiterhin auf Eis gelagert und durch eine Abdeckung vor Licht geschützt. In weiterer Folge wurde die Microseal Folie mithilfe eines Plastikspatels geglättet. Anschließend wurde die Platte für ungefähr 8–10 Sekunden zentrifugiert und schließlich im PCR-Gerät positioniert.

3.2.5.8. PCR-Durchlauf

Die Analyse der Proben wurde mittels CFX-Real-Time System 1000 Touch® von Bio-Rad durchgeführt. Die Anordnung der Proben auf der Platte wurde identisch von dem Excel® Mastermix Sheet in die Software übertragen und der PCR-Durchlauf gestartet. In Abbildung 8 sind die einzelnen Schritte des verwendeten Temperaturprotokolls aufgezählt und genauer beschrieben.

Häufig kommt es vor, dass Proben nach dem ersten Durchlauf keinem Allel eindeutig zugeordnet werden können, weshalb man zusätzliche Zyklen anschließen kann. Während eines sogenannten „Recycle Zyklus“ wird das Fluoreszenzsignal erneut verstärkt und in den meisten Fällen ist eine Zuordnung zu einem Allel nach ein bis zwei Recycle Durchläufen möglich. Die Schritte dieses Protokolls sind in Abbildung 9 ersichtlich. Grundsätzlich wurden bei den hier durchgeführten PCR-Analysen mindestens zwei Recycle Zyklen an den ersten PCR-Durchlauf angeschlossen.

Realtime PCR - Temperaturprotokoll				
Phase 1	Vorgang	Temperatur	Zyklusanzahl	Dauer
	Aktivierung	94°C	1 Zyklus	15 Minuten
Phase 2	Denaturierung	94°C	10 Zyklen	20 Sekunden
	Primerhybridisierung/ Elongation	61°C - 55°C*		60 Sekunden
Phase 3	Denaturierung	94°C	26 Zyklen	20 Sekunden
	Primerhybridisierung/ Elongation	55°C		60 Sekunden
Phase 4	Auslesen	37°C	1 Zyklus	1 Minute

* Temperatursenkung um 0,6°C pro Zyklus

Abbildung 8: In dieser Arbeit verwendetes Temperaturprotokoll für die KASP® Real-Time PCR.

Realtime PCR - Recycle Temperaturprotokoll				
Phase 1	Vorgang	Temperatur	Zyklusanzahl	Dauer
	Denaturierung	94°C	3 Zyklen	20 Sekunden
Phase 2	Primerhybridisierung/ Elongation	57°C		60 Sekunden

Abbildung 9: Temperaturprotokoll für den Recycle Zyklus.

3.2.5.9. Datenauswertung

Zur Datenauswertung wurde die Software Bio-Rad CFX Manager 3.1® verwendet, welche die Ergebnisse graphisch in Form eines Streudiagramms darstellt. Jeder Punkt im Diagramm ist repräsentativ für eine Probe und durch Vergleich mit den Positivkontrollen findet die Zuordnung zu einem Genotyp statt. Die X-Achse des Streudiagramms zeigt dabei die gemessenen Werte des FAM Fluoreszenzsignals, die Y-Achse repräsentiert die Werte des HEX Fluoreszenzsignals. Wird bei einer DNA-Probe das HEX Signal generiert, so wird dies in der Datenauswertung als „Allel 2“ bewertet und im Streudiagramm wird ein blauer Punkt entlang der Y-Achse sichtbar. Wird bei einer Probe das FAM Signal generiert, bekommt sie die Bezeichnung „Allel 1“ und zeichnet sich als oranger Punkt auf der X-Achse ab. Oft werden Proben auch als grünes Dreieck dargestellt, was bedeutet, dass sie sowohl ein FAM als auch ein HEX Signal aussenden; diese sind als heterozygot einzuordnen. Im Falle von autosomalen Markern sind heterozygote Proben üblich, im Falle der Y-chromosomalen Analyse sind jedoch klare FAM oder HEX Signale erwünscht. Als schwarze Punkte bzw. „No Call“ werden die „Leerlauf-Kontrollen“ (= Wasser) sowie jene Proben dargestellt, bei denen weder ein HEX noch ein FAM Signal feststellbar ist.

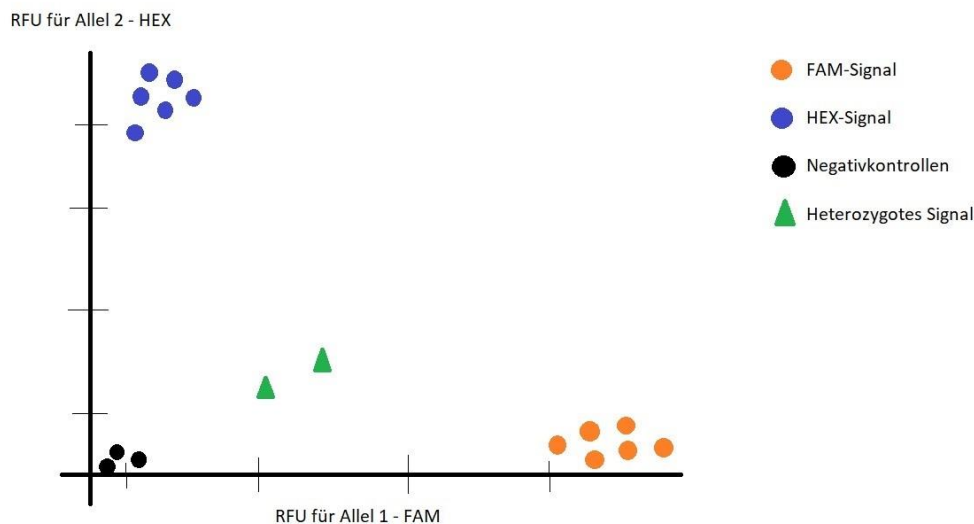


Abbildung 10: Streudiagramm bei der Auswertung einer KASP® Real-Time PCR. Vereinfachte Darstellung. Homozygote Proben senden entweder vermehrt HEX Fluoreszenzsignal aus und werden dann an der Y-Achse dargestellt oder emittieren das FAM Signal und werden dann an der X-Achse dargestellt. Heterozygote Proben werden mittig in Grün dargestellt, die schwarzen Punkte links unten stellen Proben dar, welche weder das FAM noch das HEX Fluoreszenzsignal aussenden.

3.2.5.10. Rekonstruktion der Haplotypen

Die Rohdaten und die Allelzuordnungen wurden im nächsten Schritt in eine Excel® Datei exportiert. Aus dieser Tabelle können folgende Informationen entnommen werden: die Bezeichnung der Probe, der zugeordnete Allelstatus („Allel 1“, „Allel 2“, „Heterozygot“ oder „No Call“), die absoluten Werte des FAM und HEX Fluoreszenzsignals sowie der getestete Marker (siehe Tab. 3 auf Seite 33). In der zweiten Spalte („Call“) ist ersichtlich, ob die Proben vermehrt das HEX oder das FAM Signal emittieren und anhand dessen wird die Zuordnung zu Allel 1 und Allel 2 durchgeführt. In der ursprünglich vom Computer generierten Tabelle ist außerdem Spalte 3 vorerst nicht vorhanden, diese wurde im Nachhinein händisch mithilfe der Ergebnisse aus Spalte 2 und der verfügbaren Assay Informationen (siehe Tab. 2) erstellt. Dadurch wurde die Bestimmung der HTen der einzelnen Proben ermöglicht.

Die Tabelle 4 auf Seite 34 zeigt neben der Bezeichnung des Markers die Sequenzvarianten, welche Aufschluss über die Art des Polymorphismus geben. Es kann entweder eine Insertion, Deletion oder ein SNP vorhanden sein. Befindet sich nach der Bezeichnung des Markers nur ein einziger Buchstabe, wie es bei Marker fABT der Fall ist, so handelt es sich um ein SNP. Zwei oder mehr Buchstabenvariationen bedeuten, dass der Polymorphismus eine Insertion oder Deletion ist.

Sample	Call	(*)	RFU1	RFU2
AV-29	Allele 1	fABT_A_0	5304,31	2904,77
BW-293	Allele 1	fABT_A_0	6036,56	3052,33
fam-Ko	Allele 2	fABT_G_1	3832,90	3757,40
fam-Ko	Allele 1	fABT_A_0	5450,61	3067,69
fam-Ko	Allele 1	fABT_A_0	5616,35	3166,22
fam-Ko	Allele 1	fABT_A_0	5187,79	2978,27
female	No Call	fABT_NO_CAL L	3688,48	2764,04
female	No Call	fABT_NO_CAL L	3780,53	2810,79
ntc	No Call	fABT_NO_CAL L	3911,87	2868,81
ntc	No Call	fABT_NO_CAL L	3648,52	2717,11
Y_PR_03_002	Allele 1	fABT_A_0	5453,03	2973,75
Y_PR_03_004	Allele 2	fABT_G_1	4243,76	4046,76
Y_PR_03_005	Allele 1	fABT_A_0	5436,26	2961,75
Y_PR_03_007	Allele 1	fABT_A_0	5108,21	2887,62
Y_PR_03_011	Allele 2	fABT_G_1	3822,32	3688,79
Y_PR_03_014	Allele 1	fABT_A_0	5617,68	3024,79
Y_PR_03_026	Allele 1	fABT_A_0	6079,50	3128,49
Y_PR_03_029	Allele 1	fABT_A_0	5238,97	3009,18
Y_PR_99_078	Allele 1	fABT_A_0	5183,78	2838,44
Y_PR_99_136	Allele 1	fABT_A_0	5210,20	2820,27
Y_PR_99_142	Heterozygote	fABT_NO_CAL L	4500,63	4272,71
Y_PR_99_146	Allele 1	fABT_A_0	5410,98	3139,92
Y_PR_99_149	Allele 1	fABT_A_0	5568,67	3056,58
Y_PR_99_151	Allele 2	fABT_G_1	3815,78	3920,74
	Kasp 7			
	Allele 1 = fam	fABT_A_0		
	Allele 2 = hex	fABT_G_1		
File Name	Kasp_7_20220210_re c2.pcrd			
Created By User	admin			
Notes				
ID				
Run Started	02/10/2022 11:46:33 UTC			
Run Ended	02/10/2022 11:55:22 UTC			
Sample Vol	6			
Lid Temp	105			
Protocol File Name	Kasp recycling.prcf			
Plate Setup File Name	Kasp_7_20220210.plt d			
Base Serial Number	CT015406			
Optical Head Serial Number	785BR11361			
CFX Manager Version	3.1.1517.0823.			

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der PCR-Analyse mittels Excel®. Es wurden 16 Proben auf den Marker „fABT“ untersucht. Die Tabelle gibt Auskunft über den zugeordneten Allelstatus („Allel 1“ oder „Allel 2“). Spalte 3 (*) wurde händisch anhand der vorliegenden Informationen hinzugefügt. Im Anschluss an die Tabelle sind die Informationen bezüglich der verwendeten KASP® Real-Time PCR zu finden.

Allelzuordnung	SNP	Insertion/Deletion
Allel 1	fABT_A_0	rD_TT_0
Allel 2	fABT_G_1	rD_T_1

Tabelle 4: Bezeichnung der Allele von Marker fABT und rD gemäß Excel® Datei.

3.2.5.11. Etablierung neuer Marker und Erstellen neuer Temperaturprotokolle

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden erstmals neue Marker verwendet und es wurden für die beiden Marker fZU und fABF neue Temperaturprotokolle für die PCR-Durchläufe erstellt. Die Vorgehensweise zur Findung der passenden PCR-Konditionen umfasste die Testung von insgesamt vier PCR-Protokollen in folgender Reihenfolge:

- Standardprotokoll

Die Proben wurden zu Beginn mit den PCR-Konditionen des Standardprotokolls (siehe Abb. 8 in Kapitel 3.2.5.8.) untersucht. Die Vorgehensweise war ident zu jener der Verwendung von bereits etablierten Markern und es wurden die üblichen Kontrollproben mitgeführt.

- Protokoll „Kasp_step2_57“

Das Temperaturprofil „Kasp_step2_57“ ist ein bereits etabliertes Protokoll und stand in unveränderter Weise zur Verfügung. Es unterscheidet sich von dem Standardprotokoll durch eine verändertes Temperaturprofil (siehe Abb.11). In einem Probedurchlauf mit jeweils zwei „fam-Kontrollen“, zwei „hex-Kontrollen“, zwei „female-Kontrollen“ sowie zwei „ntc-Kontrollen“ wurden die beiden Marker fZU und fABF untersucht.

	A	B	C	D
1	PCR conditions:			read step
2	94°C	94°C	57°C	37°C
3	15 min	20 sec	1 min	1 min
4		37x		
5				

Abbildung 11: PCR-Protokoll „Kasp_step2_57“.

- Protokoll "Kasp_fZU"

Dieses Temperaturprofil wurde erstmals für diese Diplomarbeit erstellt. Es weist im Gegensatz zu den anderen Protokollen einen Temperaturgradienten (57 – 58 – 59 – 60°C) auf. Es findet in diesem Fall also während des PCR-Durchgangs für eine Minute lang eine stufenweise Erhöhung der Temperatur statt. Zusätzlich zu diesen veränderten Temperaturverhältnissen wurde 50 % der Proben außerdem vermehrt $MgCl_2$ hinzugefügt. Dies bedeutet, dass bei 50 % der Proben des Testdurchgangs dem Mastermix 0,04 μl $MgCl_2$ (50 mM) zugesetzt wurde. Für die anderen 50 % der Proben wurde in gleicher Weise H_2O verwendet. Schlussendlich befand sich in jeder Vertiefung insgesamt 3 μl Flüssigkeit, bestehend aus dem KASP Mastermix (2x KASP® Mastermix + KASP® Assay Mix), DNA sowie entweder $MgCl_2$ oder H_2O (siehe Abb.12).

Stock	Final	Component	x 1	
				28
		DNA	2,90	
		2xKASP	3.00	84.00
		KASPassaymix	0.084	2.35
		50 mM $MgCl_2$	0,040	1,12
		EV	6,02	
			aliquot	3,12

PCR Conditions:					read step
94°C	94°C	57-58-59-60	94°C	55°C	37°C
15min	20sec	1min	20sec	1min	1min
		10x			
				27x	

Abbildung 12: Mastermix und etabliertes PCR-Temperaturprotokoll für fZU („Kasp_fZU“).

- Standardprotokoll mit Erhöhung der $MgCl_2$ Konzentration

Das vierte Protokoll stellt das Standardprotokoll mit einer erhöhten $MgCl_2$ Konzentration dar. Die Temperaturverhältnisse gleichen in diesem Fall jenen des Standardprotokolls, jedoch wurde den zu testenden Proben und Kontrollproben zusätzlich 0,8 μl $MgCl_2$ (50mM) hinzugefügt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Rekonstruktion paternaler Genealogien nach Darley Arabian basierend auf Pedigree Informationen

Als erster Schritt dieser Diplomarbeit wurden die paternalen Linien in heute aktiven Zuchthengsten der Rassen Englisches Vollblut, Quarter Horse, Traber sowie verschiedener Warmblutrassen aus deutschen und österreichischen Zuchtgebieten analysiert und mittels Rekonstruktion der väterlichen Abstammungslinien aus dem Pedigree heute dominante Hengstlinien ermittelt. Anhand dieser Ergebnisse wurden in weiterer Folge die Proben für die Y-chromosomale HTen-Analyse ausgewählt (siehe Kapitel 3.1.6. Verwendeter Datensatz).

Die Tabellen 5, 6, 7 und 8 der Unterkapitel 4.1.1. bis 4.1.4. zeigen eine Übersicht der Linien ausgehend von Darley Arabian bis ungefähr in die 70er und 80er Jahre des 20. Jahrhunderts. Die heutigen Zuchthengste sind laut ihren Pedigree Aufzeichnungen auf diese paternalen Linien zurückführbar, werden jedoch nicht angezeigt um die Anonymität der Zuchttiere zu gewährleisten.

4.1.1. Englisches Vollblut

Wie bereits erwähnt, wurden insgesamt 94 Zuchthengste der Rasse Englisches Vollblut ausgewählt und deren Pedigree analysiert.

Die Betrachtung der Pedigree Daten zeigte, dass die heute im Einsatz stehenden Englischen Vollbluthengste auf einige wenige Hengstlinien zurückzuführen sind. 93 Tiere waren in der väterlichen Abstammungslinie von Birdcatcher (1833) vertreten. Nur ein Pferd, ein Nachkomme des Hengstes Surumu (1974), entstammte der Linie nach Camel (1822). Bei Englischen Vollbluthengsten ist vor allem der Einfluss Northern Dancer's (1961) zu beachten. Auf diese Linie konnten insgesamt 63 der 94 Proben zurückgeführt werden (siehe Tab. 5).

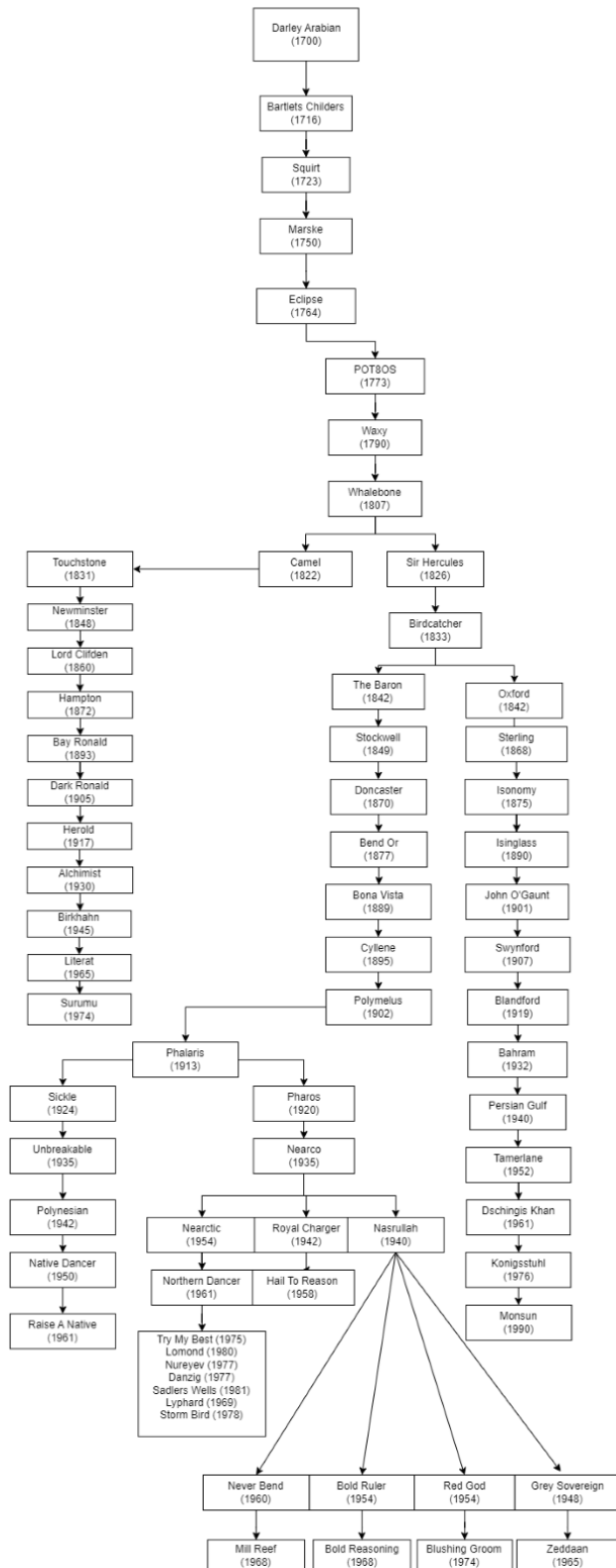


Abbildung 13: Häufig vertretene Zuchthengste der Rasse Englisches Vollblut.

Vorfahre	Anzahl der Zuchthengste	Anzahl der untersuchten Proben
Surumu (1974)	1	2
Raise A Native (1961)	12	2
Try My Best (1975)	5	-
Lomond (1980)	1	-
Nureyev (1977)	5	2
Danzig (1977)	30	2
Sadlers Wells (1981)	14	2
Lyphard (1969)	2	-
Storm Bird (1978)	6	1
Hail To Reason (1958)	4	-
Mill Reef (1968)	2	1
Bold Reasoning (1968)	2	-
Blushing Groom (1974)	2	2
Zeddaan (1965)	3	-
Monsun (1990)	5	1
Insgesamt	94	15

Tabelle 5: Auflistung der terminalen Zuchthengste aus Abb. 13. Angegeben ist die dazugehörigen Anzahl heute aktiver Vollbluthengste, die diese Linien vertreten. Die dritte Spalte zeigt die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proben bezogen auf die einzelnen Hengste.

4.1.2. Quarter Horse

Insgesamt wurden für 44 QH Hengste die paternalen Linien rekonstruiert (siehe Abb. 14). Der letzte gemeinsame Vorfahre aller einbezogenen QH Hengste war Whalebone (1807), von ihm ausgehend sind heute die Linien nach Sir Hercules und Camel vertreten. Wie aus Abbildung 14 und Tabelle 6 ersichtlich ist, konnten alle der 44 analysierten Hengste auf acht Linien zurückgeführt werden. Die beiden Hengstlinien Zippo Pine Bar (1969) und The Invester (1969) waren am häufigsten repräsentiert. Sie sind beide Söhne von Zippo Pat Bars (1964), einem aus der Linie nach Touchstone (1831) abstammenden Hengst. Es ist wichtig anzumerken, dass die zahlreichen heute aktiven QH Deckhengste, die sich in der väterlichen Linie vom Hengst Traveler ableiten lassen, hier nicht dargestellt sind.

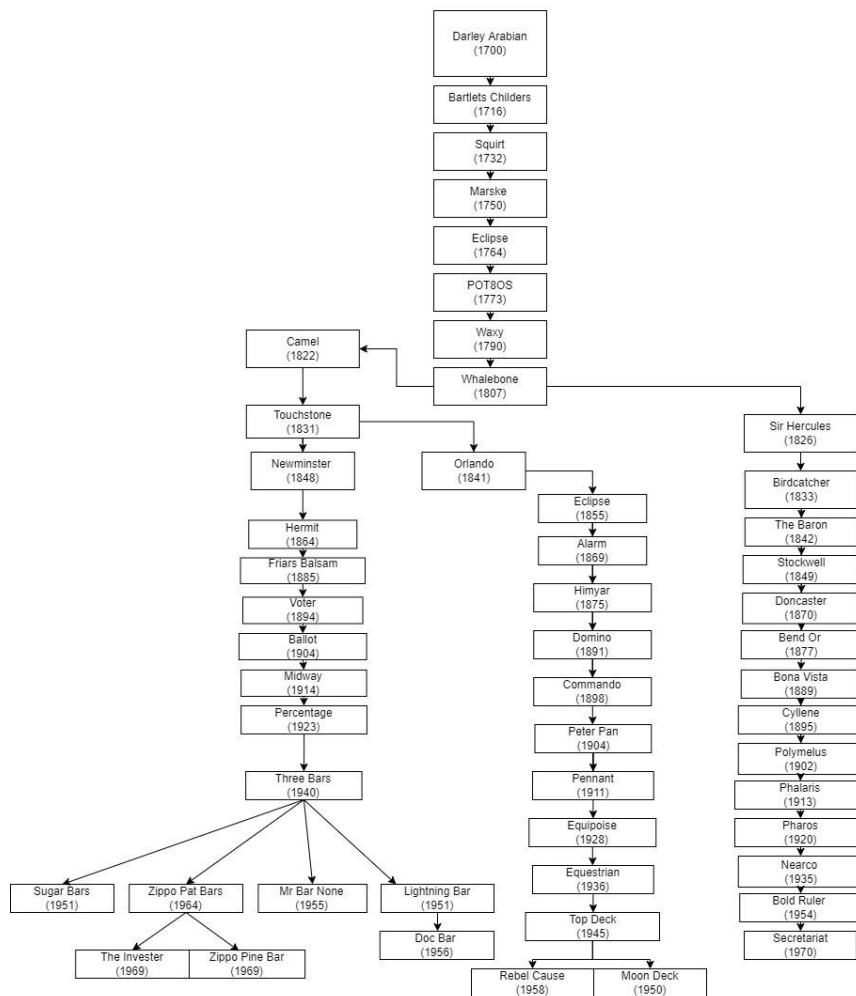


Abbildung 14: : Häufig vertretene Zuchthengste der Rasse Quarter Horse.

Vorfahre	Anzahl der Zuchthengste	Anzahl der untersuchten Proben
Sugar Bars (1951)	1	-
The Investor (1969)	12	2
Zippo Pine Bar (1969)	15	1
Mr Bar None (1955)	1	-
Doc Bar (1956)	3	3
Rebel Cause (1958)	3	-
Moon Deck (1950)	8	1
Secretariat (1970)	1	-
Insgesamt	44	7

Tabelle 6: Auflistung der terminalen Hengste aus Abb. 14. Angegeben ist die dazugehörigen Anzahl der heute aktiven Deckhengste, die diese Linien vertreten. Die dritte Spalte zeigt die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proben bezogen auf die einzelnen Hengste.

4.1.3. Traber

Betrachtet man die Stammbauminformationen der Traberhengste (insgesamt 79 Tiere), welche derzeit aktiv in der österreichischen und deutschen Traberzucht eingesetzt werden, ist erkennbar, dass nur zwei Hengstlinien vertreten sind: jene nach Peter Volo (1911) und Peter Scott (1909).

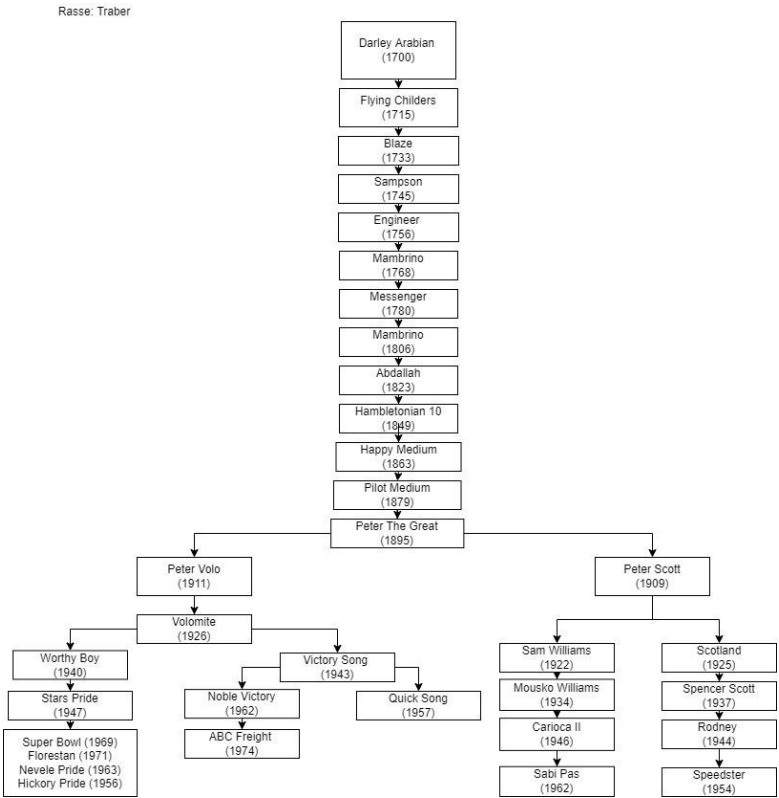


Abbildung 15: : Häufig vertretene Zuchthengste der Rasse Traber.

Vorfahre	Anzahl der Zuchthengste	Anzahl der untersuchten Proben
Super Bowl (1969)	8	2
Florestan (1971)	3	-
Nevele Pride (1863)	19	1
Hickory Pride (1956)	3	1
ABC Freight (1974)	3	-
Quick Song (1957)	11	-
Sabi Pas (1962)	15	2
Speedster (1954)	17	2
Insgesamt	79	10

Tabelle 7: Auflistung der terminalen Hengste aus Abb. 15. Angegeben ist die dazugehörigen Anzahl heute aktiver Zuchthengste der Rasse Traber, die diese Linien vertreten. Die dritte Spalte zeigt die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proben bezogen auf die einzelnen Hengste.

4.1.4. Warmblut

Es wurden die paternalen Linien von 134 Warmbluthengsten verschiedener Warmblutrassen ausgehoben und veranschaulicht. Wie in den beiden Abbildungen 16.a und 16.b ersichtlich ist, sind, im Vergleich zu den oben genannten Rassen, die Hengstlinien der Warmblutzucht sehr breit aufgestellt. Es stellen sich viele frühe Verzweigungen dar. Grundsätzlich konnten alle 134 Zuchthengste, deren Pedigree hier analysiert wurde, auf die folgenden drei Nachkommen des Englischen Vollbluthengstes Eclipse (1764) zurückgeführt werden: POT8OS (1773), King Fergus (1775) und Mercury (1778). Wie in Tabelle 8 gezeigt, sind die zwei am häufigsten vertretenen Zweiglinien nach Phalaris (1913) und Foxhunter (1929). Phalaris kann auf Sir Hercules (1826) (Abbildung 16.b), Foxhunter auf Camel (1822) (Abbildung 16.a) zurückgeführt werden. Diese zwei Hengste besitzen Whalebone als gemeinsamen väterlichen Ahnen. Das zeigt, dass dieser väterliche Ursprung auch in den 134 untersuchten Warmbluthengsten am prominentesten vertreten ist.

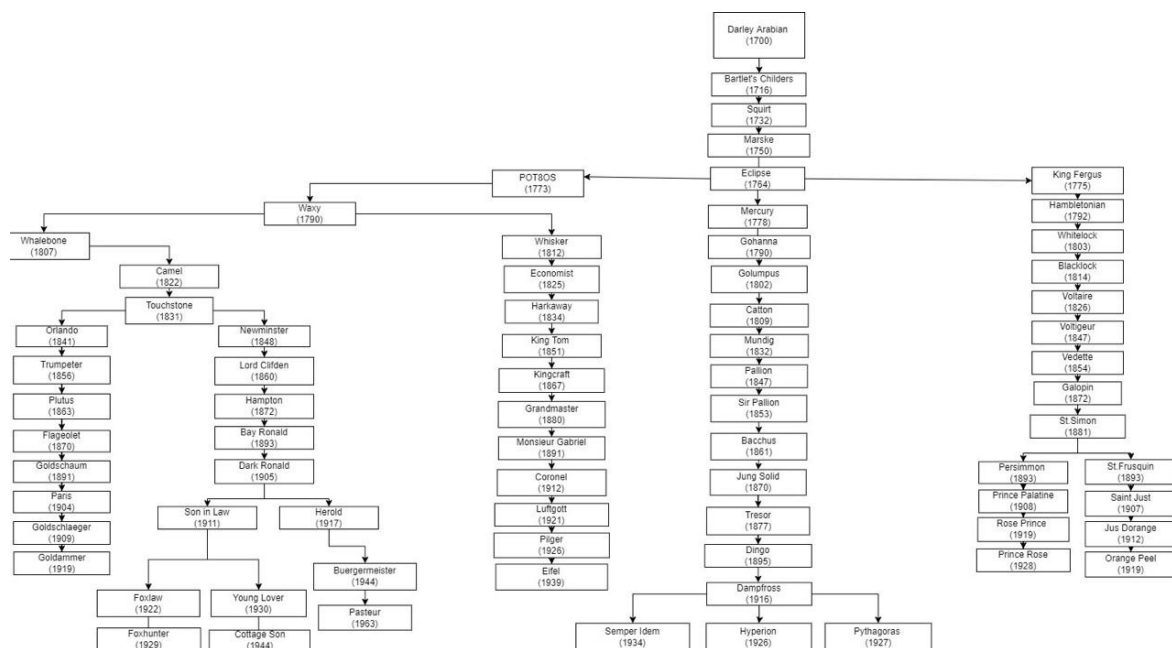


Abbildung 16.a: Häufig vorkommende Vorfahren in der Warmblutzucht.

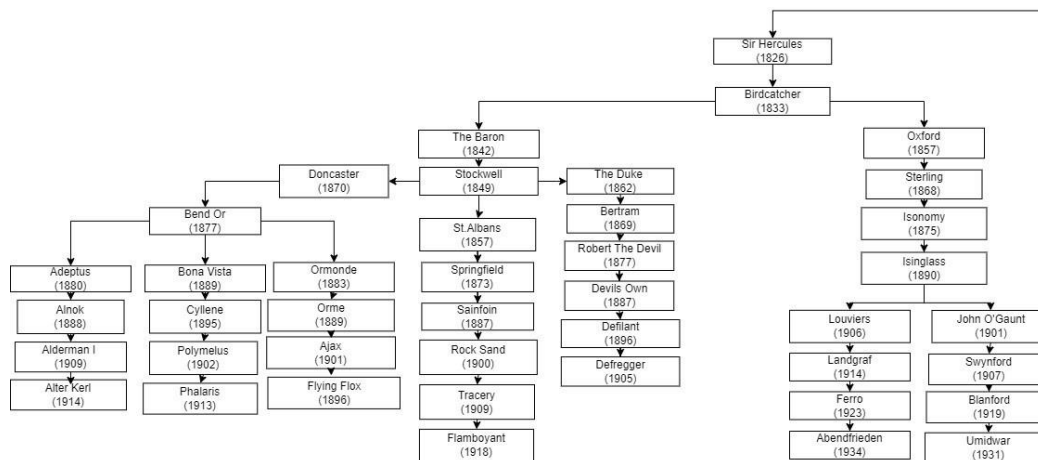


Abbildung 16.b: Fortsetzung von Abbildung 16a. Aufgrund des Ausmaßes wurde die Rekonstruktion der paternalen Linien auf zwei Abbildungen aufgeteilt, weshalb Abbildung 16a die Fortsetzung von Abb. 16b darstellt. Sir Hercules, ersichtlich auf 16b ist somit ein Nachkomme Whalebone's.

Vorfahre	Anzahl der Zuchthengste	Anzahl der untersuchten Proben
Alter Kerl (1914)	2	3
Phalaris (1913)	26	4
Flying Fox (1896)	1	1
Flamboyant (1918)	3	1
Defregger (1905)	15	2
Abendfrieden (1934)	4	-
Umidwar (1931)	3	-
Goldammer (1919)	1	2
Foxhunter (1929)	32	2
Cottage Son (1944)	6	3
Pasteur (1963)	8	2
Eifel (1939)	1	2
Semper Idem (1934)	5	-
Hyperion (1926)	2	-
Pythagoras (1927)	1	2
Prince Rose (1928)	10	1
Orange Peel (1919)	14	2
Insgesamt	134	27

Tabelle 8: Auflistung der terminalen Hengste aus Abb.16. Angegeben ist die dazugehörigen Anzahl der heute aktiven Warmbluthengste. Die dritte Spalte zeigt die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proben bezogen auf die einzelnen Vorfahren.

4.2. Verwendung neuer Y-chromosomaler Marker

Fünf Marker wurden in dieser Arbeit erstmalig genotypisiert. Die Assays für die Marker fABT (HT Tb-dW1a), fYT (HT Tb-dW1d) und fABR (HT Tb-dW1f) konnten ohne jegliche Veränderungen des bereits für die restlichen Marker verwendeten Standardprotokolls (siehe Abb.7) angewendet werden und erbrachten damit auswertbare Ergebnisse.

Die Assays für die Marker fZU (Tb-dW1c) und fABF (Tb-dW1b) funktionierten mit dem Standardprotokoll nicht. Bei fZU gaben die HEX Signale akzeptable Ergebnisse, jedoch waren die Werte der FAM Signale nicht zufriedenstellend. Der Marker fABF gab weder auswertbare HEX noch verwendbare FAM Signale.

Im Kapitel 3.2.5.11. wurde die Vorgangsweise der Erstellung neuer PCR-Temperaturprotokolle beschrieben. Wie dort zu lesen ist, kam zu Beginn das Temperaturprotokoll „Kasp_step2_57“ zur Anwendung, da vermutet wurde, dass die Temperatur des Standardprotokolls möglicherweise zu niedrig war. Die Ergebnisse zeigten eine geringe Verbesserung der HEX Signale von fZU. Im Fall von fABF konnte kein Unterschied zu den Ergebnissen des ursprünglichen Protokolls festgestellt werden. Der Marker fABF wurde an diesem Punkt für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit ausgeschlossen und es wurde weiter an der Etablierung des Assays für den Marker fZU gearbeitet.

Als nächstes wurde ein Temperaturprotokoll mit stufenweiser Erhöhung der Temperatur verwendet (siehe Abb. 12). Die Ergebnisse der PCR-Durchläufe zeigten eine deutliche Verbesserung der FAM Signale für den Assay fZU durch das veränderte Temperaturprofil. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Proben mit erhöhter MgCl_2 Konzentration und jenen Proben, denen lediglich H_2O zugesetzt wurde, festgestellt werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die erhöhte MgCl_2 Konzentration in diesem Fall keine signifikante Verbesserung erbringt. Deshalb wurde beschlossen, die veränderten Temperaturverhältnisse für die weiteren Analysen beizubehalten, die Zugabe von MgCl_2 jedoch nicht weiterzuführen.

Da man trotz hinreichender Ergebnisse des neuen Temperaturprotokoll „Kasp_fZU“ eine weitere Verbesserung der FAM Signale erreichen wollte, wurde für zwei Proben schlussendlich ein letzter Versuch mit dem ursprünglichen Protokoll durchgeführt, jedoch diesmal mit einer zusätzlichen Menge an MgCl_2 (0,8 μl , 50 mM). Die Zugabe dieser Menge an MgCl_2 erbrachte in diesem Experiment tatsächlich eine Verbesserung der FAM Signale. Die

Ergebnisse der beiden untersuchten Proben waren in diesem Fall auswertbar und konnten somit deutlich einem HT zugeordnet werden.

Es konnten also für den Marker fZU, mithilfe zwei in dieser Arbeit neu etablierten PCR-Protokollen auswertbare Ergebnisse erzielt werden. Es ist zu beachten, dass für den Großteil der Proben das Protokoll „Kasp_fZU“ verwendet wurde und dieses Protokoll daher die Wahl für weitere Untersuchungen darstellt.

4.3. Ergebnisse der Haplotypenanalyse

In dieser Arbeit wurden insgesamt 88 Tiere ausgewählt, die die bekanntesten Hengstlinien nach Darley Arabian vertreten sollen sowie Pferde, die laut Voruntersuchungen in die HG Tb-d fallen, laut Pedigree aber nicht eindeutig Darley Arabian zuzuordnen sind. Für 34 Proben lagen bereits vollständige Genotypisierungsdaten vor, 54 DNA Proben wurden in dieser Arbeit im Labor analysiert. Aufgrund der Tatsache, dass einige dieser Proben schon älter waren oder nur mehr sehr wenig DNA enthielten, kam es leider vor, dass eine Auswertung der Signale in manchen Fällen nicht möglich war und somit keine aussagekräftigen Ergebnisse geliefert wurden. Dies war bei drei der 54 DNA-Proben der Fall, weshalb schlussendlich nur die Ergebnisse von 85 Proben in die Analyse miteingeflossen sind.

Es war ursprünglich geplant, insgesamt 14 Y-chromosomale Marker zu untersuchen (siehe Tab. 2). Ein Marker (fABF) wurde jedoch ausgeschlossen, da keine eindeutigen Ergebnisse erzielt wurden, und somit kamen endgültig 13 Marker zur Verwendung.

Die unten abgebildete Tabelle 9 zeigt, wie viele Proben der jeweiligen Rassen ursprünglich zur Verfügung standen und wie viele davon schlussendlich für die Analyse verwendet werden konnten. Es ist ersichtlich, dass die drei nicht verwendeten Proben von folgenden Rassen stammten: Camargue Pferd, Baden-Württemberger sowie Trakehner.

Rasse	Anzahl der Proben gesamt	Anzahl der ausgewerteten Proben
Englisches Vollblut	18	18
Quarter Horse	17	17
Traber	8	8
Freiberger	2	2
Camargue Pferd	2	1
Appaloosa	2	2
Araber	4	4
Partbred Araber	2	2
Lipizzaner	4	4
Pintabian	1	1
Shagya Araber	1	1
Schweizer Warmblut	1	1
Bayrisches Warmblut	1	1
Baden Württemberger	2	1
Holsteiner	3	3
Hannoveraner	4	4
Österr. Warmblut	4	4
Oldenburger	4	4
Trakehner	7	6
Westfale	1	1
Gesamt	88	85

Tabelle 9: Anzahl der untersuchten DNA-Proben sowie Anzahl der am Ende auswertbaren Proben. Drei von insgesamt 88 Proben wurden nicht in die Auswertung inkludiert, da sie für manche Marker ein unzureichendes Signal lieferten.

4.3.1. Haplotypenverteilung der Proben

Die in dieser Arbeit analysierten 85 Proben konnten insgesamt 18 HTen zugeteilt werden (siehe Tab. 10). Der größte Teil der für diese Arbeit typisierten Proben, und zwar 21 Tiere (24,7 %), wies Tb-dW1 auf und konnte keiner der in weiterer Folge untersuchten Untergruppen zugeteilt werden. Eine dominante Untergruppe in dieser Arbeit stellte der HT Tb-dW1c dar, welcher 15 Tiere, also 17,65 %, umfasste. Alle Traber (9,4 % der Tiere im Datensatz) trugen den HT Tb-dM. Tb-dW4 stellte sich mit zehn Tieren auch als ein hochfrequenter HT dar. Der Rest der Proben teilt sich, wie in Tabelle 10 ersichtlich, auf die restlichen HTen auf.

Fünf der bereits genotypisierten Proben, und zwar jene nach der Hengstlinie King Fergus, wiesen einen HT nach Tb-oB1 auf. Auch zwei weitere HTen (Tb-dW1c2 und Tb-dW1c3) wurden ausschließlich bei den bereits genotypisierten Proben erfasst.

Haplotyp	Anzahl der Proben	Haplotypenverteilung in Bezug auf Rassen
Tb-dW1	21	Englisches Vollblut (6) Quarter Horse (2) Araber (4) Pintabian (1) Shagya Araber (1) Hannoveraner (1) Österreichisches Warmblut (2) Oldenburger (2) Trakehner (2)
Tb-dW1a [†]	8	Englisches Vollblut (8)
Tb-dW1c [†]	15	Englisches Vollblut (2) Quarter Horse (5) Appaloosa (2) Partbred Araber (2) Holsteiner (1) Österreichisches Warmblut (1) Oldenburger (1) Trakehner (1)
Tb-dW1c1	2	Bayrisches Warmblut (1) Holsteiner (1)
<i>Tb-dW1c2</i>	2	Holsteiner (1) Westfale (1)
<i>Tb-dW1c3</i>	1	Baden Württemberger (1)
Tb-dW1d [†]	1	Camargue Pferd (1)
Tb-dW1e	1	Schweizer Warmblut (1)
Tb-dW1f [†]	3	Hannoveraner (3)
Tb-dW2	3	Trakehner (3)
Tb-dW2a	1	Freiberger (1)
Tb-dW3	2	Lipizzaner (2)
Tb-dW3a	2	Lipizzaner (2)
Tb-dW4	10	Quarter Horse (10)
Tb-dM	8	Traber (8)
<i>Tb-oB1</i>	2	Englisches Vollblut (2)
<i>Tb-oB1b</i>	2	Freiberger (1) Österreichisches Warmblut (1)
<i>Tb-oB1c</i>	1	Oldenburger (1)
Gesamt	85	

Tabelle 10: Haplotypenverteilung und Anzahl der ermittelten Proben. Es konnten insgesamt 18 HTen ermittelt werden. Die fünf zusätzlichen, kursiv gekennzeichneten HTen wurden in Vorarbeiten ermittelt und umfassen ausschließlich bereits typisierte Proben. Jene HTen, welche erstmals in dieser Diplomarbeit detektiert werden konnten, sind in dieser Tabelle mit einem Kreuz (†) markiert. In Spalte 3 ist zusätzlich die Haplotypenverteilung in Bezug auf die einzelnen Rassen aufgeführt, dabei ist die absolute Anzahl der jeweiligen Proben in Klammer dargestellt.

4.3.2. Haplotypenverteilung in Bezug auf Rassen

Die Tabelle 11 zeigt die Haplotypenverteilung in Bezug auf die einzelnen Rassen sowie die absolute Anzahl der Proben, welche einen bestimmten HT aufweisen. Es wurden in dieser Tabelle die untersuchten Proben der Warmblutrassen in der Gruppe „Warmblut“, sowie die Proben der Rassen Camargue Pferd, Appaloosa, Araber, Partbred Araber, Lipizzaner, Pintabian, Shagya in der Gruppe „Andere Rassen“ zusammengefasst.

Rasse	Ermittelte Haplotypen und Probenanzahl
Englisches Vollblut	Tb-dW1 (6) Tb-dW1a (8) Tb-dW1c (2) Tb-oB1 (2)
Quarter Horse	Tb-dW1 (2) Tb-dW1c (5) Tb-dW4 (10)
Traber	Tb-dM (8)
Camargue Pferd	Tb-dW1d (1)
Appaloosa	Tb-dW1c (2)
Araber	Tb-dW1 (4)
Partbred Araber	Tb-dW1c (2)
Lipizzaner	Tb-dW3a (2) Tb-dW3 (2)
Pintabian	Tb-dW1 (1)
Shagya Araber	Tb-dW1 (1)
<i>Schweizer Warmblut</i>	Tb-dW1e (1)
<i>Bayrisches Warmblut</i>	Tb-dW1c1 (1)
<i>Baden Württemberger</i>	Tb-dW1c3 (1)
<i>Holsteiner</i>	Tb-dW1c (1) Tb-dW1c1 (1) Tb-dW1c2 (1)
<i>Hannoveraner</i>	Tb-dW1 (1) Tb-dW1f (3)
<i>Österr. Warmblut</i>	Tb-dW1 (2) Tb-dW1c (1) Tb-oB1b (1)
<i>Oldenburger</i>	Tb-dW1 (2) Tb-dW1c (1) Tb-oB1c (1)
<i>Trakehner</i>	Tb-dW1c (1) Tb-dW1 (2) Tb-dW2 (3)
<i>Westfale</i>	Tb-dW1c2 (1)
<i>Freiberger</i>	Tb-dW2a (1) Tb-oB1b (1)

Tabelle 11: Haplotypenverteilung in Bezug auf die einzelnen Rassen. In Klammer ist die absolute Anzahl der Proben, welche die jeweiligen HTen aufweisen angezeigt. Jene Rassen, welche kursiv und fett dargestellt sind, können in die Übergruppe „Andere Rassen“ eingeteilt werden. Jene Rassen, die hier kursiv abgebildet sind, werden der Hauptgruppe „Warmblut“ zugeteilt.

Um eine bessere Übersicht über die Haplotypenverteilung in den verschiedenen Rassen zu bekommen, wurden die Daten der Tabelle 11 unten als Kreisdiagramme dargestellt. Die Anzahl der ermittelten HTen ist in Prozent bezogen auf die Anzahl der untersuchten Tiere dieser Rasse/Rassegruppe angegeben.

- Englisches Vollblut

Die 18 Proben der Englischen Vollblüter gruppierten in insgesamt vier HTen, wobei Tb-dW1a mit 44,4 % den dominantesten HT darstellt. Insgesamt 33,3 % der untersuchten Englischen Vollbluthengste konnten der HG Tb-dW1 zugeordnet werden. Die restlichen Proben teilen sich mit jeweils 11,1 % gleichermaßen auf die beiden HTen Tb-dW1c und Tb-oB1 auf.

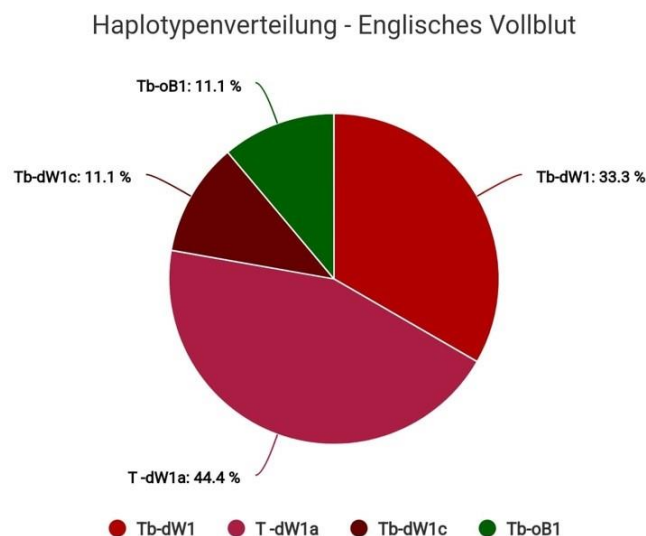


Abbildung 17: Haplotypenverteilung von insgesamt 18 Proben der Rasse Englisches Vollblut.

- Quarter Horse

Betrachtet man die drei ermittelten HTen der 17 untersuchten QH Proben, so kann festgestellt werden, dass der HT Tb-dW4 mit 58,8 % am häufigsten unter den Ergebnissen vertreten ist. Tb-dW1c konnte bei fünf Tieren, also 29,4 %, festgestellt werden. Zwei der Proben konnten Tb-dW1 zugeordnet werden.

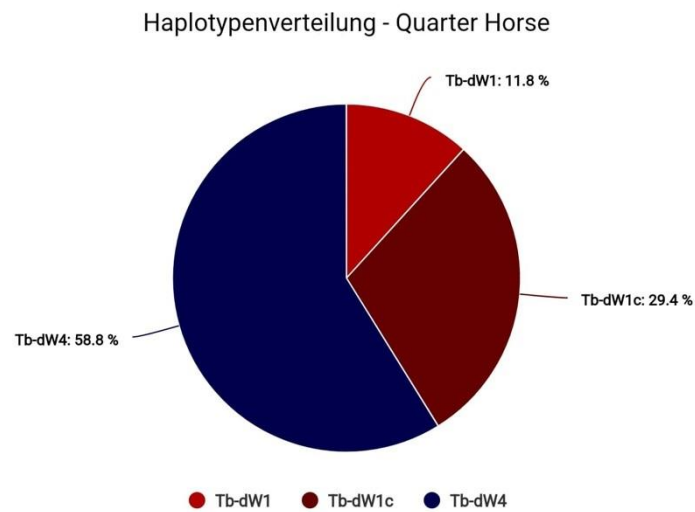


Abbildung 18: : Haplotypenverteilung von insgesamt 17 Proben der Rasse Quarter Horse.

- Traber

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben der Rasse Traber (insgesamt acht Proben) konnten ausnahmslos dem HT Tb-dM zugeordnet werden.

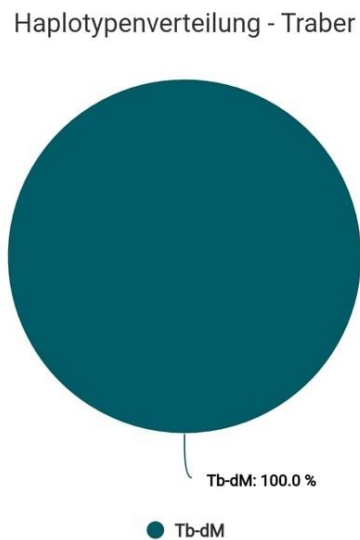


Abbildung 19: Haplotypenverteilung von insgesamt acht Proben der Rasse Traber.

- Warmblut

Unter den insgesamt 27 Proben der Rasse Warmblut konnten elf HTen festgestellt werden. Tb-dW1 sowie Tb-dW1c bildeten die dominanten HTen, wobei 25,9 % der Gesamtanzahl an Proben in Tb-dW1 sowie 14,8 % in Tb-dW1c gruppierten.

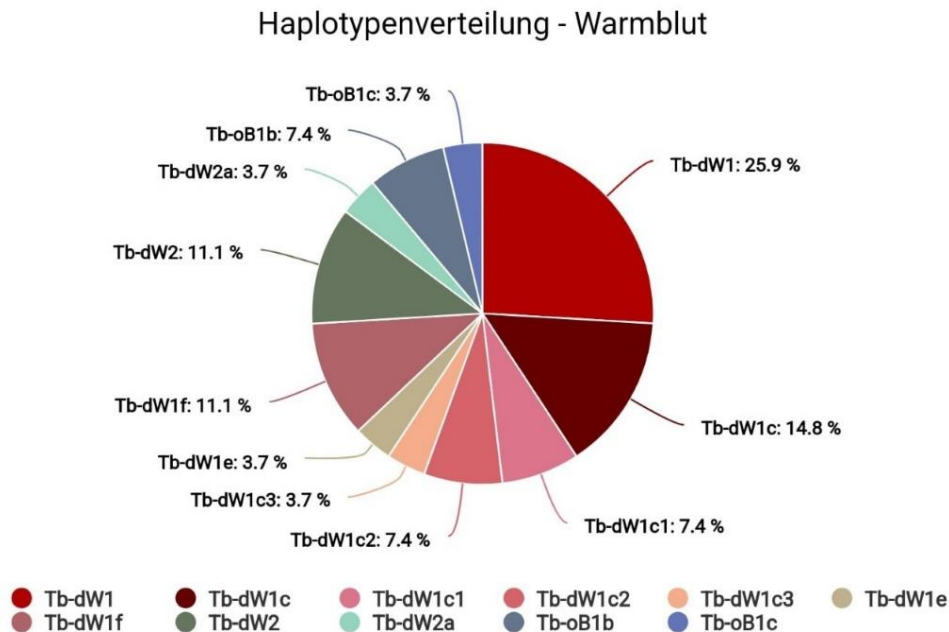


Abbildung 20: Haplotypenverteilung von insgesamt 27 Proben der Rasse Warmblut. Folgende Warmblutrassen sind vertreten: Westfale, Trakehner, Oldenburger, Österreichisches Warmblut, Hannoveraner, Holsteiner, Baden Württemberger, Bayrisches Warmblut, Schweizer Warmblut und Freiburger.

- Andere Rassen

Jene Tiere, welche der Gruppe „Andere Rassen“ angehören, wurden in dem dafür entsprechenden Kreisdiagramm zusammengefasst. Hierzu zählen die insgesamt 15 Proben der Rassen Appaloosa, Camargue Pferd, Araber, Shagya Araber, Partbred Araber, Pintabian und Lipizzaner. Insgesamt 40 % dieser Tiere wurden der HG Tb-dW1 zugeordnet, jeweils 13,3 % konnten dem HT Tb-dW3 sowie Tb-dW3a zugeteilt werden. Die HTen Tb-dW3 und Tb-dW3a wurden ausschließlich bei den vier Lipizzaner Proben detektiert, während der HT Tb-dW1c die Proben der Araber, Shagya Araber, Partbred Araber und Pintabian definierte (26,7 %). Der HT Tb-dW1d konnte nur bei einer Probe, dem Camargue Pferd, festgestellt werden.

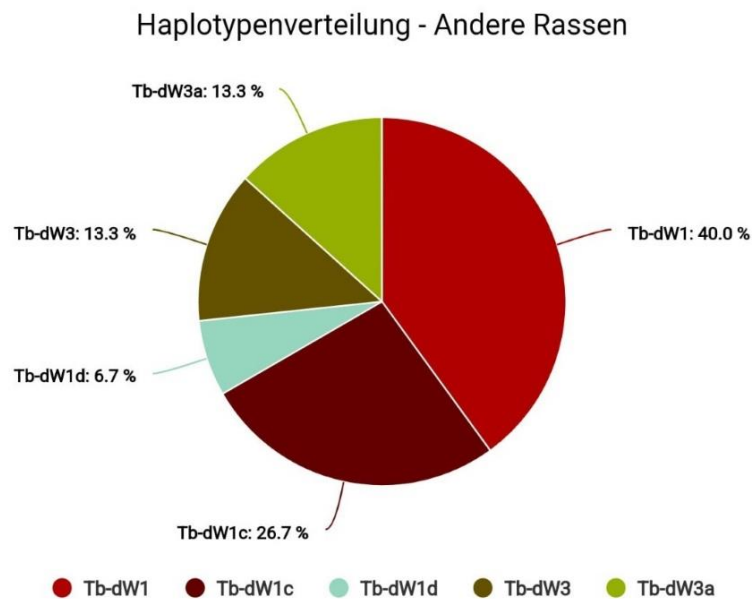


Abbildung 21: Haplotypenverteilung von insgesamt 15 Proben der Kategorie "Andere Rassen". Hierzu zählen die Proben folgender Rassen: Appaloosa, Camargue Pferd, Araber, Shagya Araber, Partbred Araber, Pintabian und Lipizzaner.

4.4. Vergleich ermittelter HTen mit paternalen Genealogien aus dem Pedigree

4.4.1. Englisches Vollblut

Der HT Tb-dW1a konnte grundsätzlich nur bei den Englischen Vollblütern nachgewiesen werden und stellte sich in dieser Rasse als ein dominanter HT dar. Acht der insgesamt 18 Proben wiesen diesen HT auf. Von diesen acht Proben konnten sieben auf den Hengst Northern Dancer (1961) zurückgeführt werden. Bei einer der acht Proben konnte zwar der HT Tb-dW1a festgestellt werden, jedoch weist dieses Pferd eine vollkommen andere väterliche Abstammungslinie wie die restlichen sieben Tiere auf. Aufgrund dessen kann in diesem Fall von einem Pedigree Fehler ausgegangen werden.

Sechs weitere Tiere hatten einen sehr ähnlichen paternalen Stammbaum, sie konnten alle in der väterlichen Linie auf Phalaris zurückgeführt werden, nicht jedoch über die Hengstlinie nach Northern Dancer (Abbildung 13). Diese Tiere gruppierten in der HG Tb-dW, konnten jedoch nicht dem HT Tb-dW1a zugeordnet werden.

Unstimmigkeiten fielen bei der Betrachtung zweier weiterer Vollblüter auf. Diese Tiere hatten den Hengst Galopin in ihrer väterlichen Linie und die genetischen Untersuchungen ergaben,

dass die besagten Proben einen HT der Gruppe Tb-oB1 aufweisen. Der Fehler in den Abstammungsaufzeichnungen des Hengstes Galopin wurde bereits in Felkel et. al 2019 beschrieben und dieser wurde hier auch bei den untersuchten Tieren bestätigt. Die Y-chromosomalen Untersuchungen konnten somit bestätigen, dass diese zwei untersuchten Pferde in der väterlichen Linie nicht von Darley Arabian, sondern vermutlich vom Gründerhengst Byerley Turk abstammen.

Die zwei Englischen Vollblüter nach dem Hengst Surumu (1974) trugen den HT Tb-dW1c. Diese Linie leitet sich vom Hengst Touchstone (1831) ab, welcher auch in anderen Rassen mit dem HT Tb-dW1c in Verbindung gebracht werden kann (siehe auch in Kapitel 4.4.2. Quarter Horse).

4.4.2. Quarter Horse

Fünf der insgesamt 17 QH Proben wiesen den HT Tb-dW1c auf. Diese Tiere können in der väterlichen Linie alle auf den bereits oben erwähnten Englischen Vollbluthengst Touchstone (1831), zurückgeführt werden (siehe Abb. 14). Fraglich blieben in diesem Zusammenhang die Genotypisierungsergebnisse von zwei QH Proben, welche in ihrem Pedigree Touchstone aufwiesen, deren Y-chromosomale Untersuchung jedoch keine auswertbaren PCR-Ergebnisse für fZU lieferte. In beiden Fällen konnten die Proben lediglich dem Knotenpunkt Tb-dW1 zugeordnet werden, die Untersuchung des Markers fZU ergab kein Ergebnis („No Call“). Es ist fraglich, wieso dies der Fall war, da die beiden Proben bei allen anderen Markern auswertbare Ergebnisse erbrachten und somit ein Problem der DNA-Isolate, beispielsweise ein Qualitätsverlust, ausgeschlossen werden kann. Eine Erklärung könnte jedoch sein, dass der neue Marker fZU anfälliger auf Störungen ist und die besagten Proben daher als „No Call“ detektiert wurden. Um die HTen dieser beiden Pferde schlussendlich doch noch zu ermitteln, könnte man versuchen, neue Haarwurzelproben dieser Tiere anzufordern und eine erneute DNA-Isolierung sowie Genotypisierung durchzuführen. Dies hätte den zeitlichen Rahmen dieser Diplomarbeit gesprengt, weshalb die beiden Proben ihrem letzten ermittelten HT (Tb-dW1) zugeordnet wurden.

Der HT Tb-dW4 war bei elf Proben zu finden und dieser HT beschränkte sich ausschließlich auf die QH Proben. Rekonstruiert man die väterliche Abstammungslinie dieser elf männlichen Pferde, so findet sich der QH Hengst King (1932) als letzter gemeinsamer Vorfahre. Die paternale Linie dieses Hengstes endet mit einem der einflussreichsten Zucht- und Rennpferde

der AQH Zuchtgeschichte, dem bereits erwähnten Hengst Traveler. Die Vorfahren Traveler's sind unbekannt, jedoch weisen die Ergebnisse der Y-chromosomalen Untersuchungen auf den Einfluss Darley Arabian's hin.

4.4.3. Traber

Die in dieser Arbeit untersuchten Traber (insgesamt acht Proben) konnten alle dem HT Tb-dM zugeordnet werden. Die untersuchten Proben gingen ausnahmslos auf den gemeinsamen Vorfahren Peter The Great (1895) zurück, welcher der Rasse Standardbred angehörte. Betrachtet man die Stammbaumaufzeichnungen dieser Pferde so wird deutlich, dass nur wenige Hengste dominieren. Alle acht Tiere gehen auf zwei Hengstlinien (Peter Scott, Peter Volo) zurück (siehe Abb. 15). In der paternalen Abstammungslinie aller untersuchten Pferde ist Mambrino (1806) zu finden, welcher als letzter Englischer Vollbluthengst in den Aufzeichnungen dieser Traber aufgelistet ist. Wie bereits in früheren Kapiteln erwähnt, ist Mambrino ein Nachkomme von Flying Childers (1715), welcher wiederum ein Sohn Darley Arabian's ist. Es gab keine Unstimmigkeiten zwischen Pedigreedaten und Genotypisierungsergebnissen.

4.4.4. Warmblut

Zu den in dieser Diplomarbeit untersuchten Warmblutpferden waren Proben folgender Rassen angehörig: Westfale, Trakehner, Oldenburger, Österreichisches Warmblut, Hannoveraner, Holsteiner, Baden Württemberger, Bayrisches Warmblut, Schweizer Warmblut und Freiburger. Durch die zahlreichen unterschiedlichen Rassen und dem heute weit verbreiteten Zuchteinsatz der Warmblüter bestand eine breitere Aufzweigung von Hengstlinien und dementsprechend konnte eine Vielzahl an HTen festgestellt werden (siehe Abb.20).

Der bereits oben erwähnte HT Tb-dW1c war in vier Warmblütern nachweisbar. Vergleicht man die paternalen Linien dieser vier Tiere, so konnte festgestellt werden, dass auch in dieser Rassegruppe zwei der Pferde auf den bereits bei Vollblütern und QH beschriebenen Ahnen Touchstone (1831) zurückgehen. Ein Tier nach Phalaris dürfte falsch zugeordnet worden sein, dieses sollte erwartungsgemäß Tb-dW1 tragen. Die vierte Probe mit Tb-dW1c, ein Trakehner, geht laut Pedigree Aufzeichnungen auf eine vollkommen andere Hengstlinie zurück, nämlich die Linie des Araberhengstes Koheilan Adjuze (1876). Die HTen der Araber finden sich jedoch

auf ganz anderen Ästen der Krongruppe (Remer et al., 2022), weshalb sich in diesem Fall die Stammbaumaufzeichnungen und HTen in diesem Fall nicht vereinbaren lassen. Es kann daher im Fall des untersuchten Trakehners auch von einem Fehler in den Aufzeichnungen der väterlichen Abstammungslinie ausgegangen werden.

Zwei Warmblüter wiesen den HT Tb-dW1c1 auf und besitzen als letzten gemeinsamen Vorfahren den Hengst Capitol I (1975). Capitol I leitet sich in seiner paternalen Linie von Touchstone ab. Bei dem HT Tb-dW1c1 handelt es sich somit um einen erst kürzlich entstandenen HT und die Ergebnisse der Y-chromosomalen Analyse stimmen mit den Pedigree Aufzeichnungen überein.

Pferde, welche in ihrer väterlichen Abstammungslinie Mercury (1778) aufwiesen (Trakehner und Freiburger), konnten Tb-dW2 zugeordnet werden. Eine Probe der Rasse Freiburger konnte dem HT Tb-dW2a zugewiesen werden. Vergleicht man die Informationen bezüglich der väterlichen Abstammung dieses Freiburgers mit jenen der Trakehner, so konnte man feststellen, dass diese als letzten gemeinsamen Vorfahren den Hengst Dampfross (1916) aufweisen. Lediglich eine Trakehner Probe mit dem HT Tb-dW2 geht laut Stammbaumaufzeichnungen nicht auf Mercury zurück, sondern über Eifel (1939) zu Waxy (1790). Dieses Tier sollte eigentlich Tb-dW oder Tb-dW1 tragen. Es muss hier dementsprechend von einem Fehler in den schriftlichen Aufzeichnungen oder einer falsch zugeordneten Probe ausgegangen werden.

Die drei Proben, welche den HT Tb-dW1f aufweisen, konnten alle auf den gemeinsamen Vorfahren Althof (1919) zurückgeführt werden, welcher in der väterlichen Abstammungslinie von Birdcatcher zu finden ist.

Der HT Tb-dW1e konnte nur bei einem Schweizer Warmblut detektiert werden, welches auch über Birdcatcher auf Darley Arabian rückführbar ist. Die HTen Tb-dW1f und Tb-dW1e zeigten somit keine Unstimmigkeiten zwischen dokumentierter Abstammung und Y-Analyse.

4.4.5. Andere Rassen: Arabische Pferde, Lipizzaner, Appaloosa und Camargue

Weiters wurden die Proben von insgesamt 15 Tieren der Rassen Araber, Shagya Araber, Partbred Araber, Pintabian, Camargue Pferd, Appaloosa sowie Lipizzaner untersucht.

Die vier untersuchten Lipizzaner gehören dem Hengststamm nach Tulipan (1860) an und der Pedigree gab vorerst keinen Hinweis auf einen Einfluss Darley Arabian's. Die Tiere wiesen jedoch die HTen Tb-dW3 und Tb-dW3a auf. Alle vier Lipizzaner gehen väterlicherseits auf den Hengst Tulipan Arkahogy (1898) zurück und die Linie teilt sich weiters in zwei Zweige nach Tulipan Titania (1909) und Tulipan Ira (1912). Die zwei Lipizzaner nach Tulipan Titania trugen den HT Tb-dW3a, die beiden anderen Proben nach Tulipan Ira trugen den HT Tb-dW3.

Bezüglich der acht Araber und verwandten Rassen konnte festgestellt werden, dass sechs Tiere Tb-dW1 aufwiesen, also keiner weiteren Untergruppe zugeordnet werden konnten. Zwei Partbred Araber zeigten den HT Tb-dW1c. Die Aufzeichnungen der paternalen Abstammung dieser beiden Pferde zeigten in beiden Fällen eine unterschiedliche Hengstlinie. Der Einfluss von Darley Arabian konnte somit auch in diesen Araberproben nachgewiesen werden.

Der HT Tb-dW1d wurde nur bei einer Probe, und zwar einem Camargue Pferd, festgestellt. Die Y-chromosomale Analyse weist somit auch in dieser Rasse auf den Einfluss Darley Arabian's hin. Es konnte jedoch in diesem Fall kein Abgleich mit den Pedigree Aufzeichnungen stattfinden, da die Aufzeichnungen für dieses Pferdes lückenhaft waren. Der letzte aufgelistete Hengst ist Felibre (1972), es gab aber keine schriftlichen Hinweise über den Einfluss von Darley Arabian.

5. DISKUSSION

5.1. Analyse der angewandten Methode sowie Beurteilung von Vorteilen und Limitierungen der KASP® Technologie

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung des Allelstatus von zuvor definierten Markern mittels KASP® Technologie an DNA-Isolaten, welche von Haarwurzelproben aus Mähnenhaaren stammten, durchgeführt. Die Probengewinnung, also die Entnahme der Mähnenhaare zur anschließenden DNA-Isolierung ist eine nicht-invasive Methode und kann auch von Laien, wie beispielsweise den Pferdebesitzern selbst, problemlos durchgeführt werden (Watts et al., 2012). Die Möglichkeit des Einfrierens der DNA-Isolate erlaubt es außerdem, Proben über mehrere Jahre zu lagern und für spätere Analysen wiederzuverwenden, ohne dass diese einen nennenswerten bzw. nicht akzeptablen Qualitätsverlust erleiden (Safarikova et al., 2021). Aus diesem Grund konnte auch im Zuge dieser Arbeit auf ältere Proben zurückgegriffen werden, welche in fast allen Fällen gut auswertbare Ergebnisse lieferten. Nur drei der insgesamt 88 in dieser Arbeit untersuchten Proben mussten aufgrund mangelhafter Ergebnisse von weiteren Analysen ausgeschlossen werden. Die Verwendung archivierter DNA-Isolate ermöglichte somit eine rasche Zusammenstellung des Datensatzes und eine arbeitsintensive Beschaffung und Aufbereitung der Haarwurzelproben konnte umgangen werden. Des Weiteren kam für die anschließende Genotypisierung die KASP® Technologie zum Einsatz. Diese Methode stellte sich während der Laborarbeiten als ein sehr zeit- und kostengünstiges Verfahren zur Untersuchung der Proben dar und es konnte innerhalb kurzer Zeit eine Vielzahl von Proben mit geringem Aufwand untersucht werden (LGC Biosearch Technologies, o.J).

Auch Limitierungen dieser Genotypisierungsstrategie konnten während der Laborarbeiten festgestellt werden. Die Haplotypenanalyse ist nämlich nur dann aussagekräftig, wenn die Tiere einen bereits beschriebenen HT aufweisen. Es können somit Proben lediglich bekannten HTen zugewiesen werden. Besitzt eine Probe also einen bislang unbeschriebenen HT, wird diese an einem internen Knotenpunkt des Baumes lokalisiert. Dieses Phänomen wird auch als „Ascertainment Bias“ bezeichnet und hat zur Folge, dass potenziell vorhandene private HTen nicht determiniert werden können (Remer et al., 2022). Dies könnte bei 21 der insgesamt 85 auswertbaren Proben dieser Arbeit der Fall gewesen sein. Jene Proben wurden eventuell in der basalen HG Tb-dW1 eingegliedert, weil ihr eigentlicher HT mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht detektierbar war. Die Proben könnten also private HTen tragen, welche zum jetzigen Standpunkt noch nicht beschrieben wurden. Zwar stellt diese Gegebenheit einen

Nachteil dar, da nicht die gesamte Auflösung des phylogenetischen Stammbaumes erreicht wird, jedoch erhält man durch die Typisierung Aufschluss darüber, welche Proben zur Vervollständigung eventuell einer Sequenzierung unterzogen werden könnten. In Folgearbeiten könnte man also jene 21 Proben, deren letzter determinierter HT Tb-dW1 war, einer Hoch-durchsatz Sequenzierung unterziehen und dadurch deren private HTen ermitteln. Schlussendlich wäre es dann möglich, die einzelnen HTen zu beschreiben und den phylogenetischen Stammbaum zu erweitern bzw. zu vervollständigen.

5.2. Ursachen, Auswirkungen und Vermeidung von fehlerhaften züchterischen Aufzeichnungen in der Pferdezucht

Bereits in Vorarbeiten wurde das Potential der Y-chromsomalen Analyse zur Detektion früher Pedigreefehler gezeigt (Felkel et al. 2019, Remer et al. 2022). So wurden bereits in der Forschungsarbeit von Felkel et al. 2019 Fehler im Pedigree des Hengstes Galopin (1872) offengelegt (siehe Kapitel 2.4.).

Auch in dieser Arbeit konnten fünf Proben, welche laut ihrem Pedigree auf Galopin zurückzuführen sind, dem HT Tb-oB1 zugeordnet werden und somit die Erkenntnisse aus Felkel et.al 2019 bestätigt werden. Weiters konnten Pedigree Fehler in einem Englischen Vollblut, einem Holsteiner und einem Trakehner festgestellt werden.

Die Ursachen von Unstimmigkeiten zwischen Pedigree und den Ergebnissen der Y-chromsomalen Untersuchungen können vielfältig sein. In der Arbeit von Strele (2021) wurden beispielsweise Pedigree Fehler in der Trakehnerzucht mit der Verbringung der Tiere nach dem zweiten Weltkrieg in Verbindung gebracht. Dabei wurde spekuliert, dass Trakehner, welche im Zuge der Kriegshandlungen erbeutet wurden, in weiterer Folge falschen Vorfahren zugeordnet wurden (Strele, 2021). Weitere Fehlerquellen sind außerdem Verwechslungen der Proben während der genetischen Analyse, bereits falsch identifizierte Elterntiere oder menschliche Fehler bei der Dokumentation, wie z.B Tippfehler bei der Dateneingabe (Oliehoek et al., 2009).

Da der züchterische Wert von Tieren von der Abstammung abhängt, ist ein fehlerfreier Pedigree sowohl für Züchter als auch Käufer von großer Bedeutung. Durch die genetische Analyse mittels Y-chromsomalener Marker wird die Ermittlung von sowohl länger zurückliegenden als auch aktuellen Pedigree Fehlern ermöglicht. Werden Unstimmigkeiten beim Abgleich von Ergebnissen der genetischen Untersuchungen und dem Pedigree

festgestellt, so könnte man in weiterer Folge versuchen, die Ursache dieser Fehler aufzudecken. Um herauszufinden, ob es sich tatsächlich um einen Fehler in den schriftlichen Aufzeichnungen handelt oder doch eher um eine fehlerhafte Probenanalyse, könnte eine erneute Probenentnahme und Aufbereitung der DNA erfolgen.

5.3. Neue Erkenntnisse bezüglich der Haplogruppe Tb-dW und Neueinbindung ermittelter Hengstlinien

Der HT Tb-dW ist bekanntlich begründet durch den Englischen Vollbluthengst Eclipse (Felkel et al. 2019). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben auch neue Erkenntnisse zu sowohl Tb-dW sowie den drei Subgruppen Tb-dW2, Tb-dW3 und Tb-dW4. Durch die gewonnenen Informationen können diese HTen nun bestimmten Hengstlinien zugeordnet werden. Die unten dargestellte Abbildung 22 veranschaulicht die Einbindung neuer Hengstlinien bezogen auf die HG Tb-dW anhand des für diese Diplomarbeit verwendeten Haplotypenbaumes.

- Tb-dW

In dieser Arbeit konnte die bereits 2019 beschriebene Annahme aus Felkel et al. (Eclipse als begründender Hengst für Tb-dW) bestätigt werden. Die HG Tb-dW konnte in allen Proben, die in ihrer väterlichen Abstammungslinie auf den Vollbluthengst Eclipse zurückgehen, nachgewiesen werden. Es konnte herausgefunden werden, dass die Mutation „fWM“, welche für die HG Tb-dW verantwortlich ist, in einem der folgenden Hengste entstanden sein muss: Eclipse (1764), Marske (1750), Squirt (1732) oder Bartlets Childers (1716).

- Tb-dW2

Der HT Tb-dW2 wurde bei Trakehnern detektiert. Alle in dieser Diplomarbeit beprobten Pferde, welche dem HT Tb-dW2 zugeordnet wurden, können auf den Hengst Dampfross (1916) zurückgeführt werden. Der Hengst Dampfross leitet sich laut Pedigree von Eclipse über Mercury (1778) ab (siehe auch Abb. 16). Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass Tb-dW2 in Verbindung mit dem Hengst Mercury stehen könnte (Strele, 2021). In dieser Arbeit konnte nun Dampfross als prägende Hengstlinie für die Verbreitung dieses HT ermittelt werden. Die

Mutation „sP“, welche zum HT Tb-dW2 führte, muss folglich irgendwann zwischen den beiden Hengsten Dampfross (1916) und Mercury (1778) passiert sein.

- Tb-dW3 und Tb-dW3a

Die HTen Tb-dW3 und Tb-dW3a konnten ausschließlich bei Lipizzanern detektiert werden. Alle Tiere, die Tb-dW3 tragen, können in der väterlichen Linie auf den Hengst Tulipan (1860) zurückgeführt werden. Tulipan's Vorfahren sind bis heute weitgehendst unbekannt. Laut Fachliteratur entstand der Hengststamm Tulipan auf einem Gestüt in Kroatien, Terezovac (Grilz-Seger und Druml, 2011). Durch die Verpaarung von Pferden „alter Linien“ des Gestüts mit spanisch-neapolitanischen Pferden entstand die durch ihr auffallendes Exterieur (mächtiger Hals, barocker Ramskopf) gekennzeichnete Hengstlinie.

Aufgrund der Tatsache, dass alle beprobten Lipizzaner des Hengststamms Tulipan den HT Tb-dW3 aufwiesen, kann man Tulipan als begründenden Hengst für diesen HT festlegen. Betrachtet man die Ergebnisse weiter und vergleicht die Pedigree Aufzeichnungen der Pferde mit den HTen Tb-dW3 und Tb-dW3a, so kann man folgendes feststellen: Der HT Tb-dW3 muss schon vom Hengst Tulipan Akarhogy (1898), auf welchen alle beprobten Lipizzaner zurückzuführen sind, getragen worden sein. Die Untergruppe Tb-dW3a ist später durch Neumutation entstanden, und zwar zwischen den Hengsten Tulipan Trofetta V-4 (1986) und Tulipan Titania (1909). Betrachtet man nun die Tatsache, dass der HT Tb-dW dem Vollbluthengst Eclipse zuzuordnen ist, so konnte folgende bisher unbekannte Erkenntnis gewonnen werden: Tulipan Akarhogy weist eine Assoziation zu Eclipse auf. Es konnte somit der genetische Einfluss des Englischen Vollblutes, genauer gesagt Darley Arabian's, erstmals im Lipizzaner-Hengststamm Tulipan nachgewiesen werden.

- Tb-dW4

Eine weitere interessante Erkenntnis dieser Arbeit stellen die Ergebnisse bezüglich des HT Tb-dW4 dar. Dieser HT wurde nur in der Rasse QH detektiert und alle untersuchten Pferde gehen in ihrer väterlichen Linie auf einen Hengst zurück: Traveler (1880). Die Geschichte zu Traveler wurde bereits im Kapitel 2.1.2. beleuchtet und es steht fest, dass Informationen zur Herkunft Traveler's sowie dessen Vorfahren bis heute nicht verfügbar sind (Goodhue et al., 1994).

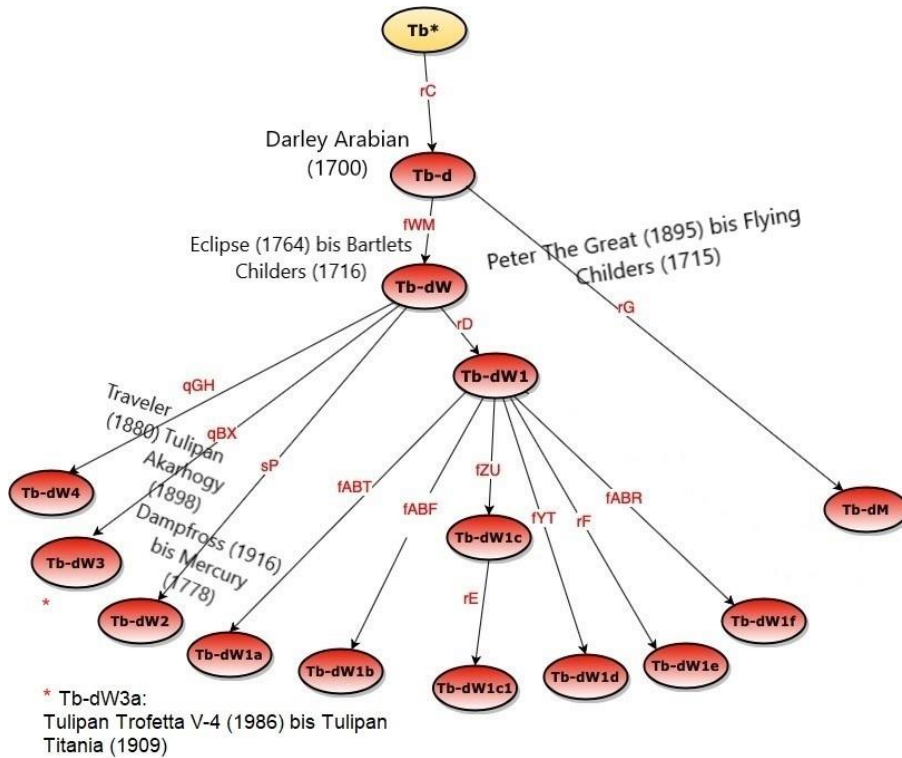


Abbildung 22: Tb-Haplotypenbaum und die Hengstlinien, denen die HTen zugeordnet werden können. Angegeben ist die Spanne in der jeweiligen Hengstlinie, in der die Mutation aufgetreten sein kann. Der HT Tb-dW3a wurde mit einem roten Stern (*) hinzugefügt, da der dargestellte HT-Baum nur jene Marker bzw. HTen umfasst, welche für die Laborarbeiten dieser Arbeit verwendet wurden. Der HT Tb-dW3a wurde bei bereits fertig typisierten Proben detektiert und ist daher nicht als roter Kreis abgebildet.

An welchem Punkt der Zuchtgeschichte die Mutationen für Tb-dW2, Tb-dW3 und Tb-dW4 entstanden sind, kann nicht genau gesagt werden und könnte Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein.

5.4. Neue Erkenntnisse bezüglich der Haplogruppe Tb-dW1 und Ursprünge neu ermittelter Haplotypen

Der Ursprung von Tb-dW1 wurde im Hengst Whalebone (1807) postuliert (Wallner et al. 2017 und Felkel et al. 2019). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, so konnte man in der HG Tb-dW1 durch die Einbindung neuer Y-chromosomaler Marker einige hochfrequente HTen dieser HG festmachen. In einigen Fällen konnte der Ursprung der HTen in der Zuchtgeschichte detektiert werden. In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit ermittelten dominanten Subgruppen von Tb-dW1 sowie Ursprünge erstmals ermittelter HTen diskutiert.

- Tb-dW1a

Dieser HT wird durch den Marker fABT determiniert. Aufgrund der Tatsache, dass jener Marker in dieser Diplomarbeit zum ersten Mal zur Verwendung kam, war es möglich, Pferde erstmals diesem HT zuzuordnen. Tb-dW1a zeigte sich nur in den Englischen Vollblütern und stellte sich dort als hochfrequenter HT dar. Es wurde gezeigt, dass dieser HT seinen Ursprung relativ spät in der Zuchtgeschichte hat und dieser durch eine sehr kürzlich entstandene Mutation determiniert wird. Nur Pferde, die den Hengst Northern Dancer (1961) in ihrer väterlichen Abstammungslinie aufwiesen, waren in Tb-dW1a einzugliedern. Die Mutation, welche für Tb-dW1a verantwortlich ist, muss im Hengst Northern Dancer (1961) oder seinem Vater Nearctic (1954) entstanden sein. Somit konnte in dieser Arbeit der HT Tb-dW1a als Signal für eine der einflussreichsten Linien des Englischen Vollblutes, jener nach Northern Dancer (1961), ermittelt werden.

- Tb-dW1b

Auch Tb-dW1b ist durch einen Y-chromosomalen Marker bestimmt (fABF), welcher in dieser Arbeit erstmals zur Verwendung kommen sollte. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, musste dieser Marker aufgrund qualitativ unzureichender Ergebnisse aus den Untersuchungen ausgeschlossen werden. Entsprechend dieser Tatsache konnten auch keine Proben dem HT Tb-dW1b zugeordnet werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die in dieser Arbeit analysierten Tiere diesen HT nicht grundsätzlich aufweisen könnten. Es ist also möglich, dass einige der Proben, die im Zuge dieser Diplomarbeit Tb-dW1 zugeordnet wurden, eigentlich den HT Tb-dW1b tragen. Es sollte daher in weiteren Forschungsarbeiten in

Erwägung gezogen werden, weiter an der Etablierung des PCR-Protokolls zu arbeiten oder einen alternativen Genotypisierungssassay für den Y-chromosomalen Marker fABF zu designen. In weiterer Folge könnten die entsprechenden Proben ein weiteres Mal untersucht werden, denn mit einem funktionierenden Assay könnten in Zukunft Proben diesem möglicherweise dominanten HT zugeordnet werden.

- Tb-dW1c

Der HT Tb-dW1c, determiniert durch den Marker fZU, konnte im Zuge dieser Diplomarbeit vorrangig im QH festgestellt werden, war jedoch auch im Warmblut, Appaloosa sowie Englischen Vollblut und Araber vertreten. Die Stammbaumanalysen ergaben, dass Tb-dW1c höchstwahrscheinlich durch den Hengst Touchstone (1831) oder seinen Vater Camel (1822), verbreitet wurde. Aufgrund der gegebenen Informationen ist die Mutation fZU, welche für den HT Tb-dW1c verantwortlich ist, somit schon sehr früh in der Zuchtgeschichte aufgetreten und es handelt sich somit um einen vergleichsweise „alten“ HT. Dies erklärt auch, warum Tb-dW1c in vielen verschiedenen Zweiglinien zu beobachten ist.

- Tb-dW1c1

Bei zwei Warmblütern wurde der HT Tb-dW1c1 festgestellt. Anhand der Informationen bezüglich ihrer paternalen Abstammung konnte der Ursprung dieses HT einem der folgenden Hengste zugeordnet werden: einem der zwei Holsteiner Hengsten Capitol I (1975) und Capitano (1968) oder den Englischen Vollblütern Corporal (1963), Cottage Son (1944) und Young Lover (1930).

- Tb-dW1e

Der HT Tb-dW1e konnte zwar nur in einer Probe, einem Schweizer Warmblut, nachgewiesen werden, jedoch war es trotzdem möglich, Aufschlüsse über den Ursprung dieses HT zu gewinnen. So muss Tb-dW1e in einem der folgenden Hengste passiert sein: Apart (1975), Angelo (1962), Oliveri (1953), Macherio (1941), Ortello (1926), Teddy (1913), Ajax (1901), Flying Fox (1896), Orme (1889) oder Ormonde (1883). Um einen genaueren Zeitpunkt der

Mutation zu ermitteln, wäre es nötig, eine größere Anzahl an Proben dieser väterlichen Abstammungslinien auf Tb-dW1e zu untersuchen.

- Tb-dW1f

Auch der HT Tb-dW1f steht in Verbindung zu einem erstmals verwendeten Marker (fABR). Er konnte nur in den Warmblutrassen, und zwar bei Hannoveranern, nachgewiesen werden. Der jüngste gemeinsame väterliche Vorfahre dieser Tiere war der Hengst Althof (1919). Dies lässt darauf schließen, dass Tb-dW1f wahrscheinlich erst kürzlich zwischen den Hengsten Althof (1919) und Adeptus (1880) entstanden ist.

- Tb-dW1

Die basale HG Tb-dW1 konnte in dieser Arbeit relativ frequent in den Warmblütern, Englischen Vollblütern sowie arabischen Pferden festgestellt werden. Es konnte hier eine genauere Zuordnung zum Ursprung dieses HT ermittelt werden. Die Mutation für Tb-dW1 (rD) muss den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge entweder in Waxy (1790) oder POT8OS (1773) passiert sein. Insgesamt wurden 21 der 85 Proben diesem HT zugeschrieben. Es war weiters auffallend, dass viele der beprobten Tiere in keine Subgruppe von Tb-dW1 eingegliedert werden konnten. Neben der Möglichkeit, dass diese Tiere wirklich diesen HT besitzen, könnte es sein, dass sie eine noch nicht ermittelte Mutation auf der NRY tragen und daher einem privaten HT, welcher bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht erforscht wurde, angehören. Es könnte auch sein, dass ein Teil dieser Proben den HT Tb-dW1b besitzt, da der Marker für diesen HT in dieser Arbeit nicht verwendet werden konnte.

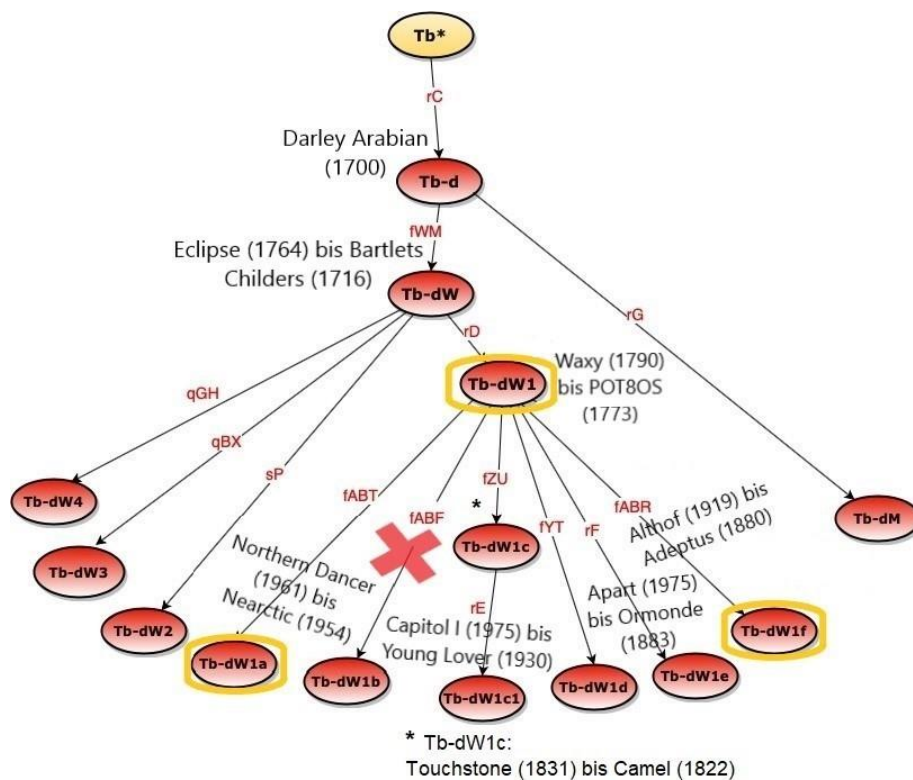


Abbildung 23: Tb-Haplotypenbaum und die Hengstlinien, denen die Sub-HTen von Tb-dW1 zugeordnet werden können. Angegeben ist die Spanne in der jeweiligen Hengstlinien, in der die Mutation aufgetreten sein kann. Hochfrequente HTen sind zusätzlich gelb markiert. Der HT Tb-dW1b (Marker fABF) ist mit einem roten Kreuz gekennzeichnet, da dieser von den Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

5.5. Verbreitung von Hengstlinien nach Darley Arabian im Englischen Vollblut, Quarter Horse, Traber und Warmblut

Im Kapitel 4.1. wurden bereits die heute zur Zucht eingesetzten Hengste dargestellt. Für die Y-Analysen dieser Arbeit wurden Tiere dieser Linien beprobt. Vergleicht man die in den jeweiligen Rassen häufig vertretenen Hengstlinien, so kann man feststellen, dass einige Hengste rasseübergreifend in der Zucht eingesetzt wurden und der Einfluss von Darley Arabian ausgeprägt ist.

Die Englischen Vollblüter werden vor allem durch die Linie nach Northern Dancer (1961) geprägt. Ein Großteil der untersuchten Proben konnte auf diesen Hengst zurückgeführt werden. Northern Dancer ist bekanntlich in der väterlichen Abstammungslinie nach Phalaris (1913), dessen Einfluss bei genauer Betrachtung nicht nur im Englischen Vollblut, sondern auch in den Aufzeichnungen der Quarter Horses sowie Warmblüter gefunden werden konnte.

Als „Leading Sire in Great Britain and Ireland (1925, 1928)“ und „Leading broodmare sire in Great Britain and Ireland (1937, 1941, 1942)“ wurde dieser Hengst zu einem der heute nachweislich wichtigsten Zuchthengste der modernen Pferdezucht (Thoroughbred Heritage Portraits, o.J). Der züchterische weltweite Erfolg von Northern Dancer und seiner Nachkommen ist nun auch mit dem HT Tb-dW1a nachvollziehbar.

Eine weitere relativ häufig verbreitete Hengstlinie, die nun mittels Y-Haplotyp nachzuvollziehen ist, ist jene nach Touchstone (1831). Tb-dW1c ist typisch für diese Linie und der HT konnte im Zuge dieser Arbeit im Englischen Vollblut, Warmblut sowie dem QH nachgewiesen werden. Am frequentesten war Tb-dW1c in den QH Proben zu finden, wo vor allem Doc Bar (1956), der Nachkomme Touchstone's, einen prominenten Vertreter darstellt. Auch Touchstone trug in den Jahren 1842, 1843, 1848 und 1855 den Titel „Leading sire in Great Britain and Ireland und, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, wurden seine Nachkommen weltweit als Veredler der vorher genannten Rassen eingesetzt (Thoroughbred Heritage Portraits, o.J).

Eine weitere häufig vertretene Linie ist jene nach Galopin (1872) bzw. King Fergus (1775). Sie wurde sowohl im Englischen Vollblut als auch im Warmblut detektiert. Wie in Kapitel 2.4. bereits erklärt, besteht die Problematik rund um Galopin darin, dass es bei ihm mit großer Wahrscheinlichkeit zur Aufzeichnung eines falschen Pedigrees gekommen ist und die männlichen Nachkommen HTen nach Byerley Turk tragen. Die Analysen und Pedigrees zeigen, dass diese Hengstlinie in der heutigen Pferdezucht aktiv und breit vertreten ist.

Eine weitere dominante Hengstlinie, welche im Zuge dieser Arbeit ermittelt wurde, ist die Linie nach Peter The Great (1895). Der Standardbred Hengst trug den HT Tb-dM und konnte im untersuchten Datensatz ausschließlich bei den Traber Proben detektiert werden. Der Einfluss der Traberlinien auf andere Rassen in Bezug auf die Verbreitung von Tb-dM mittels Y-Untersuchung könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein-

Bei Beachtung der Pedigree Daten und Ergebnissen der Y-chromosomalen Analyse konnte demnach gezeigt werden, dass einige Hengstlinien heute in mehr als einer Rasse vertreten sind. Vor allem jene Zuchten, welche offene Stutbücher besitzen, wurden mit dem Englischen Vollblut zur Leistungssteigerung verpaart und weisen daher zum Teil idente Hengstlinien auf. Bei der Zucht des Englischen Vollblutes besteht andererseits, wie zu Beginn erwähnt, ein geschlossenes Zuchtbuch (Weatherbys General Stud Book, o.J). Dies erklärt, wieso keine Hengstlinien anderer Rassen im Englischen Vollblut zu finden sind.

5.6. Der Einfluss von Darley Arabian in der Gruppe „Andere Rassen“

In dieser Arbeit wurden auch Proben „anderer Rassen“ untersucht. Dazu kamen Lipizzaner, das Camargue Pferd, arabische Pferde und der Appaloosa.

5.6.1. Lipizzaner

Im Hengststamm Tulipan der Lipizzaner konnte in dieser Arbeit erstmals die Assoziation zum Hengst Eclipse bewiesen werden. Es stellt sich nun die Frage, wo die Ursprünge dieser Linie zu finden sind. Der Stamm Tulipan hat seinen Ausgangspunkt am Lipizzanergestüt Terezovac (Kroatien) und laut Aufzeichnungen wurden die ersten vier Generationen auch an diesem Gestüt gezogen (Grilz-Seger und Druml, 2011). Der HT Tb-dW3 wurde schon vom Hengst Tulipan Akarhogy (1898) getragen, der die vierte Generation nach Tulipan darstellt. In der Fachliteratur ist sehr wenig über die ersten Pferde am Gestüt bekannt, man weiß nur, dass die Linie Tulipan durch die Anpaarung von „alten Linien“ des Gestüts entstand (Grilz-Seger und Druml, 2011). Genauere Informationen zu deren Pedigrees sind jedoch nicht vorhanden und somit ein Einfluss des Englischen Vollblutes zu Beginn der Zuchtgeschichte nicht ausschließbar. Eine weitere Theorie, über welche spekuliert werden kann, baut auf dem Vorhandensein von Vollblütern am damaligen Gestüt und der Frage, ob zu der Zeit der Linienbegründung neben Lipizzanern auch andere dort gehalten wurden, auf. Dies ist nicht unwahrscheinlich, denn schon die schriftlichen Aufzeichnungen von 1906 sprechen vom Vorhandensein von Lipizzanern, Nonius Pferden sowie Anglo-Arabern am Gestüt (State Stud Farm Lipik, 2017).

5.6.2. Camargue Pferd

Aufgrund der Tatsache, dass das Stutbuch des Camargue Pferdes 1970 erstellt wurde und erst 1990 geschlossen wurde, ist über die Ahnen der heutigen Pferde dieser Rasse wenig bekannt. Im Stutbuch gibt es sogar Eintragungen mit der Abkürzung OI.TC („Abstammung unbekannt, im Camarguetyp stehend“) (Silvester, 2002).

Bei Betrachtung der väterlichen Abstammung des untersuchten Camargue Pferdes mit dem HT Tb-dW1d konnte kein Hinweis auf Darley Arabian gefunden werden, der letzte bekannte Vorfahre ist der Hengst Felibre (1972), dessen Pedigree unbekannt ist. Durch die genetische Analyse konnte jedoch der Einfluss des Englischen Vollblutes bestätigt werden und dieses

Pferd konnte mittels Y-chromosomaler Untersuchung auf Darley Arabian zurückgeführt werden.

Wie genau es zu der Einkreuzung des Englischen Vollblutes in das Camargue Pferd gekommen ist, ist zu dem jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Es benötigt mit Sicherheit größere Datensätze von Proben dieser Rasse um weitere Erkenntnisse zu gewinnen und so bleibt diese Thematik Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten.

5.6.3. Appaloosa

Insgesamt wurden auch beim Appaloosa nur zwei Tiere mit unbekanntem Pedigree untersucht, welche beide dem HT Tb-dW1c zugeordnet werden konnten. Hier muss, wie beim Camargue Pferd angemerkt werden, dass die Proben auf das Vorhandensein der HG Tb-d vorselektiert waren.

Grundsätzlich weist der Appaloosa eine sehr lange Zuchtgeschichte auf, die vor allem bei dem einheimischen Volk „Nez Percé“ (Idaho, USA) beheimatet war. Im Jahr 1877 fand der sogenannte „Nez Percé Krieg“ statt, bei welchem viele Pferde geflüchtet sind oder von der amerikanischen Armee eingenommen und weiterverkauft wurden (The Appaloosa Museum, o.J). Eine Theorie wäre, dass bereits zu dieser Zeit eine nicht dokumentierte Verpaarung von Tieren verschiedener Rassen, darunter dem Englischen Vollblut, vonstattenging.

Ein weiterer erwähnenswerter Diskussionspunkt in diesem Zusammenhang ist, dass die Rasse Appaloosa ein offenes Stutbuch besitzt, bei dem die Einkreuzung anderer Rassen erlaubt ist. Seit 1983 beschränkt sich dies auf die Rassen Quarter Horse, Araber und Englisches Vollblut. Der Zusammenhang zwischen Quarter Horse, Englischem Vollblut und Appaloosa wird auch in den Y-Analysen deutlich. So trugen die untersuchten Appaloosas Tb-dW1c, ein HT den auch viele der untersuchten Quarter Horses zeigten.

Wie schon beim Camargue Pferd, wären auch beim Appaloosa weitere Untersuchungen anhand größerer Datensätze der nächste wichtige Schritt.

5.6.4. Arabische Pferde

Diese Arbeit umfasste die Proben von insgesamt acht arabisch geprägten Pferderassen, darunter Shagya Araber, Pintabian, Vollblutaraber und Partbred Araber. Keines der

untersuchten Tiere wies Darley Arabian in der väterlichen Abstammungslinie auf, jedoch konnte über Haplotypenanalysen sein Einfluss bei diesen Tieren nachgewiesen werden.

Wie aus früheren Arbeiten bekannt ist, finden sich die Araber in anderen Haplogruppen, vor allem Subtypen von Ao-a oder Tb-oB, jedoch nicht Tb-dW (Remer et al., 2022). Die in dieser Diplomarbeit untersuchten Araber waren basierend auf Vorarbeiten vorselektiert (Tb-dW1 Träger) und laut Stammbaumangaben stammen sie väterlicherseits von unterschiedlichen Gründertieren ab. Fast alle wurden der basalen HG Tb-dW1 zugeordnet. Wann und wo die Einkreuzung des Englischen Vollblutes in die Araber passiert ist, ist anhand der Y-Ergebnisse nicht festzumachen. Die zwei untersuchten Partbred Araber wiesen Tb-dW1c auf. Da dieser HT jedoch weit verbreitet ist, ist auch hier kein Ursprung der Einkreuzung zu postulieren.

6. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde basierend auf Y-Analysen der Einfluss des Gründerhengstes Darley Arabian in der heutigen Pferdezucht in unterschiedlichen Rassen nachgewiesen. Einerseits umfassen die Erkenntnisse dieser Diplomarbeit Pferderassen, von denen der Einfluss des Englischen Vollblutes bekannt ist, andererseits wurden auch Rassen, deren Pedigree keinen Hinweis auf Darley Arabian gibt, miteinbezogen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Grundlage für weitere Studien dienen, da gezeigt wurde, dass noch immer einige beprobte Pferde im internen Knotenpunkt Tb-dW1 gruppieren und deren HTen noch nicht ausreichend definiert sind. In weiterführenden Untersuchungen könnten entsprechende Tiere ausgewählt, mittels Sequenzierung deren private HTen ermittelt und der phylogenetische Stammbaum um derzeit unbekannte Äste erweitert werden.

Weiters konnte in einigen Fällen der ungefähre Zeitpunkt, wann die HTen-determinierenden Mutation entstand, bestimmt werden. Dies wäre auch für die restlichen HTen wünschenswert, denn in vielen Fällen ist die Spanne, in der die Mutation passiert ist, noch sehr groß. Eine weitere Eingrenzung der Zeitspanne wäre durch das Einbeziehen gut ausgewählter Proben möglich. Die genaue Kenntnis der HTen der Zweiglinien nach Darley Arabian kann in Zukunft bei Pferden mit lückenhaftem Pedigree oder bei Pedigree Fehlern hilfreich sein, da man nun über Y-Analysen die väterliche Abstammungslinie eines Pferdes besser ableiten kann.

In dieser Arbeit wurden weiters insgesamt fünf neue Marker erstmalig getestet, von welchen drei einwandfrei funktionierten. Für einen Marker wurde im Zuge der Laborarbeiten das Protokoll dahingehend etabliert, dass verwendbare Ergebnisse ermittelt werden konnten. Für einen der Marker konnte kein passendes PCR-Protokoll erstellt werden, weshalb dieser von den Untersuchungen ausgeschlossen werden musste. Die Erstellung eines passenden Genotypisierungsassays sollte Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein, sodass die Proben auch dem entsprechenden HT zugeordnet werden können.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen deutlich den Einfluss Darley Arabian's und seiner Nachkommen in der Pferdezucht. Die Daten beschränken sich derzeit auf einige ausgewählte Pferderassen. Die Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Rassen könnte in Zukunft dazu beitragen, bisher unerforschte Bereiche der Pferdztuchtgeschichte aufzudecken.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zuchtgeschichte der meisten modernen Pferderassen ist aufgrund organisierter Zuchtkonzepte durch eine geringe Anzahl von Gründerhengsten geprägt. Die Untersuchung von Y-chromosomalen Markern ermöglicht es heute, die väterliche Abstammungslinie von Hengsten genetisch nachzuvollziehen und dadurch neue Erkenntnisse bezüglich deren Einfluss und Zuchteinsatz zu gewinnen. „Darley Arabian“, ein Araberhengst geboren um 1700, stellt einen der einflussreichsten Hengste des Englischen Vollblutes dar.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Darley Arabian in der heutigen Pferdezucht anhand der Untersuchung von Y-chromosomalen Markern beleuchtet. Es wurden männliche Pferde der Rassen Englisches Vollblut, Quarter Horse, Warmblut und Traber, welche die wichtigsten Linien nach Darley Arabian repräsentieren, auf Y-chromosomale Haplotypen untersucht. Darüber hinaus wurden auch Pferde anderer Rassen, deren Stammbauminformationen keinen Hinweis auf Darley Arabian geben, miteinbezogen. Für die Haplotypenanalyse wurde genomische DNA aus Haarwurzelzellen von insgesamt 88 männlichen Pferden verwendet. Die Ermittlung der Haplotypen wurde basierend auf 14 Y-chromosomalen Markern mittels der KASP™-Technologie durchgeführt. Fünf Y-chromosomale Marker wurden erstmalig in dieser Diplomarbeit angewendet.

Die untersuchten Proben konnten insgesamt 18 verschiedenen Haplotypen zugeteilt werden, wobei die Warmblüter das größte Haplotypenspektrum aufwiesen. Für einige einflussreiche Zweiglinien nach Darley Arabian konnten linienspezifische Haplotypen ermittelt werden.

Der Einfluss Darley Arabian's wurde auch in einigen arabischen Pferden nachgewiesen und erstmalig in den Rassen Camargue Pferd, Appaloosa und Lipizzaner detektiert. Bezüglich der Lipizzaner konnte erstmals eine Assoziation zwischen dem bekannten Hengststamm Tulipan und Darley Arabian hergestellt werden. Überdies konnte Traveler (~ 1800), einer der einflussreichsten Hengste in der Rasse Quarter Horse, von bisher unbekannter Abstammung, einer klaren Hengstlinie nach Darley Arabian zugeordnet werden.

Zusammenfassend konnte der rassenübergreifende Einfluss von Darley Arabian in der heutigen Pferdezucht bestätigt werden und interessante Erkenntnisse bezüglich der Verbreitung des Englischen Vollblutes in verschiedenen Rassen gewonnen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden eine Grundlage für weiterführende Forschungsarbeiten.

8. SUMMARY

Due to organized breeding concepts, the breeding history of most modern horse breeds is characterized by a small number of founder stallions. Nowadays it is possible to genetically trace the paternal lineage of a stallion through the analysis of Y-chromosomal markers and therefore gain insight into their genetic. "Darley Arabian", an Arabian stallion born around 1700, represents one of the most influential stallions of the English Thoroughbred.

In this diploma thesis, Y-chromosomal analysis was applied to investigate the influence of Darley Arabian in today's modern horse breeds. Y-chromosomal haplotypes of male horses, covering the breeds English Thoroughbred, Quarter Horse, Warmblood and Trotter, which represent the most important paternal lineages after Darley Arabian, were determined. In addition, horses from other breeds, whose pedigree information did not indicate a connection to Darley Arabian, were included. The genomic DNA, which has been extracted from hair root cells, of a total of 88 male horses was used for the Y-haplotype analysis. Haplotypes were determined based on 14 Y-chromosomal markers using the KASP™ technology. Furthermore, five out of these Y-chromosomal markers were used for the very first time throughout the working process of this thesis.

The samples were assigned to a total of 18 different Y-haplotypes, whereas the Warmblood horses showed the most pronounced haplotype diversity. Lineage-specific Y-haplotypes could be determined for some branch lines after Darley Arabian.

Also, the influence of Darley Arabian was detected in other horse breeds like the Arabian horse breeds and for the first time in the Camargue horse, Appaloosa and Lipizzaner. Regarding the group of Lipizzaners, an association between the sire line Tulipan and Darley Arabian was observed. Furthermore, Traveler (~ 1800), one of the most influential Quarter Horse stallions whose origin was so far in doubt, could be assigned to a stallion line after Darley Arabian.

In summary, it was possible to concisely trace the influence of Darley Arabian in Thoroughbreds and other modern horse breeds. The results of this thesis build the basis for further research.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.-	Abbildung
AQH-	American Quarter Horse
AQHA-	American Quarter Horse Association
bzw.	beziehungsweise
EDTA-	Ethylediamintetraacetat
FAM-	6-Carboxy-Fluorescein
FRET-	fluorescence resonant energy transfer
HEX-	Hexachloro-Fluorescein
HG-	Haplogruppe
HT-	Haplotyp
HTen-	Haplotypen
InDels-	Insertionen und Deletionen
KASP-	Kompetitive Allel-spezifische PCR
Mb-	Megabasen
MgCl ₂ -	Magnesiumchlorid
MSY-	male specific region
mtDNA-	mitochondriale DNA
NGS-	Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken
NRY-	non-recombining region of the Y chromosome
ntc-	No template control
PAR-	Pseudoautosomale Region
PCR-	Polymerase Chain Reaction
QH-	Quarter Horse

SNP-	Single Nucleotide Polymorphism
Tab.-	Tabelle
VB-	Vollblut
WB-	Warmblut
z.B.-	zum Beispiel

10. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

2022 Stallions: All American Quarter Horse Congress / AQHA / OQHA / NRHA / NCRHA / NCHA (2022). Online verfügbar unter <https://www.quarterhorsecongress.com/news/2022-stallions>, zuletzt geprüft am 12.02.2022.

A., Love, C. C., Varner, D. D., Bellott, D. W., Murphy, W. J., Chowdhary, B. P. & Raudsepp, T. (2018). Horse Y chromosome assembly displays unique evolutionary features and putative stallion fertility genes. *Nature Communications*, 9(1). DOI 10.1038/s41467-018-05290-6.

All Breed Database (o.J.): All Breed Database. Pedigree Online. Online verfügbar unter <https://www.allbreedpedigree.com/>, zuletzt geprüft am 12.01.2022.

AQHA Home - AQHA. (o. J.): American Quarter Horse Association. Online verfügbar unter <https://www.aqha.com/de/>, zuletzt geprüft am 28.03.2022.

Bailey, E. & Binns, M. M. (1998). The Horse Gene Map. *ILAR Journal*, 39(2–3), 171–176. DOI 10.1093/ilar.39.2-3.171.

Coates, H. T., & Fleming, G. (1906). A short history of the American trotting and pacing horse. Philadelphia: The J. C. Winston co.

Cunningham, E. P., Dooley, J. J., Splan, R. K. & Bradley, D. G. (2001). Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Animal Genetics*, 32(6), 360–364. DOI 10.1046/j.1365-2052.2001.00785.

Darley Arabian (o.J.): Academic dictionaries and encyclopedias. Online verfügbar unter <https://de-academic.com/dic.nsf/dewiki/302572/>, zuletzt geprüft am 28.03.2022.

Deckhengste - Gestüt Sprehe (o. J.). Online verfügbar unter <https://www.gestuet-sprehe.de/de/deckhengste/>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

Deutscher Galopp (o.J.). Online verfügbar unter <https://www.deutscher-galopp.de/gr/vollblutzucht/deckhengste.php>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

Direktorium für Galopprennsport und Vollblutzucht in Österreich (o.J.). Online verfügbar unter <http://www.direktorium-galopp.at/pages/zucht.php>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

Edwards, E. H. (2006). *Pferde - Die neue Enzyklopädie*. München: Dorling Kindersley.

Felkel, S., Vogl, C., Rigler, D., Dobretsberger, V., Chowdhary, B. P., Distl, O., Fries, R., Jagannathan, V., Janečka, J. E., Leeb, T., Lindgren, G., McCue, M., Metzger, J., Neuditschko, M., Rattei, T., Raudsepp, T., Rieder, S., Rubin, C. J., Schaefer, R. & Wallner, B. (2019). The horse Y chromosome as an informative marker for tracing sire lines. *Scientific Reports*, 9(1). DOI 10.1038/s41598-019-42640-w.

Fages, Antoine, Kristian Hanghøj, Naveed Khan, Charleen Gaunitz, Andaine Seguin-Orlando, Michela Leonardi, Christian McCrory Constantz, et al. 2019. "Tracking Five Millennia of Horse Management with Extensive Ancient Genome Time Series." *Cell* 177 (6): 1419-1435.e31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.049>.

Felkel, S., Vogl, C., Rigler, D., Jagannathan, V., Leeb, T., Fries, R., Neuditschko, M., Rieder, S., Velie, B., Lindgren, G., Rubin, C. J., Schlötterer, C., Rattei, T., Brem, G. & Wallner, B. (2018). Asian horses deepen the MSY phylogeny. *Animal Genetics*, 49(1), 90–93. DOI 10.1111/age.12635.

Goodhue, J., Holmes, F., Livingston, P. & Simmons, D. (1994). *Legends 2: Outstanding Quarter Horse Stallions And Mares: Outstanding Quarter Horse Stallions and Mares (A Western Horseman Book, Band 2) (Illustrated)*. Western Horseman.

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

Hengstverzeichnis 2021 Warmblut- und Spezialhengste für die Warmblutzucht in Bayern (2021). Online verfügbar unter <https://docplayer.org/206334187-Hengstverzeichnis-2021-warmblut-und-spezialhengste-fuer-die-warmblutzucht-in-bayern.html>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

Hofmann, H. (2009). *Cavalli della Madonna – wie weiter?*. Doxmedical. Online verfügbar unter https://www.rosenfluh.ch/media/doxmedical/2009/01/Cavalli_della_Madonna.pdf, zuletzt geprüft am 08.10.2022.

HorseTelex. (o. J.): *Horse Telex Pedigree*. Online verfügbar unter <https://www.horsestex.de/home>, zuletzt geprüft am 12.01.2022.

How does KASP work. (o. J.): LGC Biosearch Technologies. Online verfügbar unter <https://www.biosearchtech.com/how-does-kasp-work>, zuletzt geprüft am 05.04.2022.

Innocenti, F. (2005). Pharmacogenomics: Methods and protocols. Methods in molecular biology, volume 311. New York, NY, USA: Springer.

Janečka, J. E., Davis, B. W., Ghosh, S., Paria, N., Das, P. J., Orlando, L., Schubert, M., Nielsen, M. K., Stout, T. A. E., Brashear, W., Li, G., Johnson, C. D., Metz, R. P., Zadjali, A. M.

Jobling MA, Samara V, Pandya A, Fretwell N, Bernasconi B, Mitchell RJ, Gerelsaikhan T, Dashnyam B, Sajantila A, Salo PJ, Nakahori Y, Disteche CM, Thangaraj K, Singh L, Crawford MH & Tyler-Smith C. 1996. Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males. Human molecular genetics, 5 (11): 1767–1775. DOI 10.1093/hmg/5.11.1767.

Leading Sires. (o. J.): Thoroughbred Stallion Guide. Online verfügbar unter <http://www.stallionguide.com/leading-sires/>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

M Safarikova, Ales Kubena, Věra Franková, Tomáš Zima & Marta Kalousová. (2021). The Effects of Different Storage Conditions and Repeated Freeze/Thaw Cycles on the Concentration, Purity and Integrity of Genomic DNA. Folia Biologica, 67(1), 10–15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34273262/>

McCue M, Neuditschko M, Rieder S, Schlötterer C & Brem G. 2017. Y Chromosome Uncovers the Recent Oriental Origin of Modern Stallions. Current biology: CB, 27 (13): 2029-2035.e5. DOI 10.1016/j.cub.2017.05.086.

Nikolaus Matzka (2021). Trotting Stallions 2021. Online verfügbar unter http://www.breedingtrotters.com/_Media/stallions_2021_kopie.pdf, zuletzt geprüft am 12.01.2022.

Oliehoek, P. A. & Bijma, P. (2009). Effects of pedigree errors on the efficiency of conservation decisions. Genetics Selection Evolution, 41(1). DOI 10.1186/1297-9686-41-9.

PCR-based Genotyping with KASP. (o. J.): LGC Biosearch Technologies. Online verfügbar unter <https://www.biosearchtech.com/support/education/kasp-genotyping-reagents/kasp-overview>, zuletzt geprüft am 05.04.2022.

Pferdezucht Austria (o.J.). Online verfügbar unter <https://www.pferdezucht-austria.at/main.aspxkat1=2119&kat2=2815&kat3=656>, zuletzt geprüft am 29.03.2022.

Pferdezucht Austria (o.J.). Online verfügbar unter https://www.pferdezucht-austria.at/download/zap/zuchtbuch/Zuchtbuch_OesterrWarmblut_Oberoesterreich.pdf, zuletzt geprüft am 29.03.2022.

Pferd Austria. Zentrale Arbeitsgemeinschaft österreichischer Pferdezüchter (o.J.). Online verfügbar unter <https://www.pferdezucht-austria.at/main.asp?kat1=107&kat2=2789&kat3=695>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

Phalaris (o. J.): Thoroughbred Heritage Portraits. Online verfügbar unter <https://www.tbheritage.com/Portraits/Phalaris.html>, zuletzt geprüft am 15.10.2022.

Poeggel, G. (2013). Kurzlehrbuch Biologie (3. Auflage). Stuttgart: Thieme.

Prominent Sire Lines in America. (o. J.): UKnowledge. Online verfügbar unter https://uknowledge.uky.edu/world_yome_arabian_roots_sires/1/, zuletzt geprüft am 12.01.2022.

Remer, V., Bozlak, E., Felkel, S., Radovic, L., Rigler, D., Grilz-Seger, G., Stefaniuk-Szmukier, M., u. a. (2022). Y-chromosomal insights into breeding history and sire line genealogies of Arabian horses. *Genes*, 13(2). DOI 10.3390/genes13020229.

Ridgeway, W. (2015). The origin and influence of the thoroughbred horse. Cambridge, England: Cambridge University Press.

Silvester, H. W. (2002). Wilde Pferde der Camargue. München: Kneesebeck.

State Stud Farm Lipik. (2017). History of Stud Farm. Online verfügbar unter <http://ergela-lipik.org/en/history-of-stud-farm/>, zuletzt geprüft am 14.10.2022.

Strele, J. (2021). Genetische Untersuchung zu paternalen Linien ausgewählter russischer Pferderassen. [Diplomarbeit Veterinärmedizinische Universität Wien], Veterinärmedizinische Universität Wien. <https://phaidra.vetmeduni.ac.at/open/o:1068>

The Appaloosa Museum (o.J.): History of the Appaloosa. Online verfügbar unter <https://archive.ph/2008.01.18-212732/http://www.appaloosamuseum.org/cms/default.asp?contentID=521>, zuletzt geprüft am 15.10.2022.

The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2017). Standardbred | breed of horse. Encyclopedia

Britannica. Online verfügbar unter <https://www.britannica.com/animal/Standardbred>, zuletzt geprüft am 28.03.2022.

The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2017). Thoroughbred | breed of horse. Encyclopedia Britannica. Online verfügbar unter <https://www.britannica.com/animal/Thoroughbred>, zuletzt geprüft am 28.03.2022.

Thoroughbred Horse Pedigree Query (o. J.). Online verfügbar unter <https://www.pedigreequery.com> , zuletzt geprüft 12.01.2022.

Touchstone (o. J.). Thoroughbred Heritage Portraits. Online verfügbar unter <https://www.tbheritage.com/Portraits/Touchstone.html>, zuletzt geprüft am 15.10.2022.

Wallner B, Palmieri N, Vogl C, Rigler D, Bozlak E, Druml T, Jagannathan V, Leeb T, Fries R, Tetens J, Thaller G, Metzger J, Distl O, Lindgren G, Rubin C-J, Andersson L, Schaefer R, McCue M, Neuditschko M, Rieder S, Schlötterer C & Brem G. 2017. Y Chromosome Uncovers the Recent Oriental Origin of Modern Stallions. *Current biology: CB*, 27 (13): 2029-2035.e5. DOI 10.1016/j.cub.2017.05.086.

Wallner B, Piumi F, Brem G, Müller M & Achmann R. 2004. Isolation of Y chromosomespecific microsatellites in the horse and cross-species amplification in the genus *Equus*. *The Journal of heredity*, 95(2):158-64. DOI 10.1093/jhered/esh020.

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 (4): e60015. DOI 10.1371/journal.pone.0060015.

Warmblood (2021). International Horse Breeder. Online verfügbar unter <https://ihb.com.au/warmblood/>, zuletzt geprüft am 10.01.2022.

Watts, L. M., Browne, J. A. & Murphy, B. A. (2012). Investigation of a non-invasive method of assessing the equine circadian clock using hair follicle cells. *Journal of Circadian Rhythms*, 10(0), 7. DOI 10.1186/1740-3391-10-7.

Weatherbys General Stud Book (o.J.). Online verfügbar unter <https://www.weatherbys.co.uk/general-stud-book/bloodstock-studbook/history-of-the-general-stud-book>, zuletzt geprüft am 08.09.2022.

World Class Trotting (o.J.). Online verfügbar unter
http://www.worldclasstrotting.com/TRAVHASTAR/PDF_Artiklar/5-ModernTrottingSirelines.pdf, zuletzt geprüft am 28.03.2022.

11. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Anzahl der Proben des Datensatzes und Zuordnung zum Auswahlkriterium.	20
Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der verwendeten Marker	26
Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der PCR-Analyse mittels Excel®.	33
Tabelle 4: Bezeichnung der Allele von Marker fABT und rD gemäß Excel® Datei.	34
Tabelle 5: Auflistung der terminalen Zuchthengste aus Abb. 13.....	38
Tabelle 6: Auflistung der terminalen Hengste aus Abb. 14.....	39
Tabelle 7: Auflistung der terminalen Hengste aus Abb. 15.....	40
Tabelle 8: Auflistung der terminalen Hengste aus Abb.16.....	42
Tabelle 9: Anzahl der untersuchten DNA-Proben sowie Anzahl der am Ende auswertbaren Proben.....	45
Tabelle 10: Haplotypenverteilung und Anzahl der ermittelten Proben.	46
Tabelle 11: Haplotypenverteilung in Bezug auf die einzelnen Rassen.	47
Tabelle 12: Haplotypenermittlung Englisches Vollblut, Teil 1	82
Tabelle 13: Haplotypenermittlung Englisches Vollblut, Teil 2	82
Tabelle 14: : Haplotypenermittlung Quarter Horse, Teil 1.....	83
Tabelle 15: Haplotypenermittlung Quarter Horse, Teil 2.....	83
Tabelle 16: Haplotypenermittlung Traber, Teil 1.....	84
Tabelle 17: Haplotypenermittlung Traber, Teil 2.....	84
Tabelle 18: Haplotypenermittlung Warmblüter, Teil 1.....	85
Tabelle 19: Haplotypenermittlung Warmblüter, Teil 2.....	86
Tabelle 20: Haplotypenermittlung „Andere Rassen“, Teil 1	87
Tabelle 21: Haplotypenermittlung „Andere Rassen“, Teil 2	87

12. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darley Arabian	2
Abbildung 2: Autosomale, Y-chromosomale und mitochondriale Vererbung im Vergleich.	10
Abbildung 3: Detaillierte Ansicht der Haplogruppe Tb.	14
Abbildung 4: Ausschnitt aus dem MSY-HT-Netzwerk nach Remer et al. 2022.	16
Abbildung 5: Bestandteile und einzelne Schritte des Ablaufs der KASP® Technologie.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Marker und deren zugeordnete HTen.	26
Abbildung 7: : Beispiel eines oben beschriebenen Excel® Dokuments.	28
Abbildung 8: In dieser Arbeit verwendetes Temperaturprotokoll für die KASP® Real-Time PCR.....	30
Abbildung 9: Temperaturprotokoll für den Recycle Zyklus.	30
Abbildung 10: Streudiagramm bei der Auswertung einer KASP® Real-Time PCR.....	31
Abbildung 11: PCR-Protokoll „Kasp_step2_57“.....	34
Abbildung 12: Mastermix und etabliertes PCR-Temperaturprotokoll für fZU („Kasp_fZU). ...	35
Abbildung 13: Häufig vertretene Zuchthengste der Rasse Englisches Vollblut.....	37
Abbildung 14: : Häufig vertretene Zuchthengste der Rasse Quarter Horse.	39
Abbildung 15: : Häufig vertretene Zuchthengste der Rasse Traber.....	40
Abbildung 16.a: Häufig vorkommende Vorfahren in der Warmblutzucht.....	41
Abbildung 17: Haplotypenverteilung von insgesamt 18 Proben der Rasse Englisches Vollblut.	48
Abbildung 18: : Haplotypenverteilung von insgesamt 17 Proben der Rasse Quarter Horse.	49
Abbildung 19: Haplotypenverteilung von insgesamt acht Proben der Rasse Traber.	49
Abbildung 20: Haplotypenverteilung von insgesamt 27 Proben der Rasse Warmblut.....	50
Abbildung 21: Haplotypenverteilung von insgesamt 15 Proben der Kategorie “Andere Rassen”.	51
Abbildung 22: Tb-Haplotypenbaum und die Hengstlinien, denen die HTen zugeordnet werden können.....	60
Abbildung 23: Tb-Haplotypenbaum und die Hengstlinien, denen die Sub-HTen von Tb-dW1 zugeordnet werden können.....	64

13. ANHANG

13.1. Haplotypenermittlung

Tabelle 12: Haplotypenermittlung Englisches Vollblut, Teil 1

Probe	rC (Tb-d)	rG (Tb-dM)	fWM (Tb-dW)	rD (Tb-dW1)	fABT* (Tb-dW1a)	fZU* (Tb-dW1c)
P101454	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_03_002	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_03_005	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_03_007	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_03_014	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
P050257/0	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_G_1	
P070483	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_G_1	
P080543	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_G_1	
P080615	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_G_1	
P080616	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_G_1	
P110374	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_G_1	
Y_PR_03_004	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_G_1	fZU_T_0
Y_PR_03_011	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_G_1	
P090603	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
P090719	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
Y_PR_03_012	rC_T_0					
Y_PR_03_019	rC_T_0	rG_A_0		rD_TT_0		
P070452	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0

Tabelle 13: Haplotypenermittlung Englisches Vollblut, Teil 2

Probe	rE (Tb-dW1c1)	fYT* (Tb-dW1d)	rF (Tb-dW1e)	fABR* (Tb-dW1f)	sP (Tb-dW2)	qBX (Tb-dW3)	qGH (Tb-dW4)	fABF* (Tb-dW1b)
P101454	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
Y_PR_03_002	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_005	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_007	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_014	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
P050257/0	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P070483	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P080543	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P080615	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P080616	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P110374	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
Y_PR_03_004	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_011	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
P090603	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P090719	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
Y_PR_03_012								
Y_PR_03_019								
P070452	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			

Tabelle 14: : Haplotypenermittlung Quarter Horse, Teil 1

Probe	rC (Tb-d)	rG (Tb-dM)	fWM (Tb-dW)	rD (Tb-dW1)	fABT* (Tb-dW1a)	fZU* (Tb-dW1c)
AV-15	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT A 0	fZU no call
AV-28	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT A 0	fZU no call
AV-21	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT no call	fZU C 1
AV-29	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT A 0	fZU C 1
AV-48	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT no call	fZU C 1
AV-56	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT A 0	fZU C 1
AV-6	rC C 1	rG A 0		rD DEL 1	fABT A 0	fZU C 1
AV-32	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-33	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-34	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-35	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-46	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-54	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-57	rC C 1	rG A 0	fWM no call	rD TT 0		
AV-66	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
AV-68	rC C 1	rG A 0	fWM C 1	rD TT 0		
BW-239wh	rC C 1	rG A 0	fWM no call	rD TT 0		

Tabelle 15: Haplotypenermittlung Quarter Horse, Teil 2

Probe	rE (Tb-dW1c1)	fYT* (Tb-dW1d)	rF (Tb-dW1e)	fABR* (Tb-dW1f)	sP (Tb-dW2)	qBX (Tb-dW3)	qGH (Tb-dW4)	fABF* (Tb-dW1b)
AV-15	rE A 0	fYT G 0	rF G 0	fABR G 0	sP A 0		qGH G 0	
AV-28	rE A 0	fYT G 0	rF G 0	fABR G 0	sP A 0		qGH G 0	
AV-21	rE A 0	fYT no call	rF no call	fABR G 0	sP A 0		qGH no call	
AV-29	rE A 0	fYT G 0	rF G 0	fABR G 0	sP A 0		qGH G 0	
AV-48	rE no call	fYT G 0	rF G 0	fABR no call	sP A 0		qGH G 0	
AV-56	rE A 0	fYT G 0	rF G 0	fABR G 0	sP A 0		qGH G 0	
AV-6	rE A 0	fYT G 0	rF G 0	fABR G 0	sP A 0		qGH G 0	
AV-32	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-33	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-34	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-35	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-46	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-54	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-57	rE A 0		rF G 0		sP A 0		qGH A 1	
AV-66	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
AV-68	rE A 0		rF G 0		sP A 0	qBX A 0	qGH A 1	
BW-239wh	rE A 0		rF G 0		sP A 0		qGH A 1	

Tabelle 16: Haplotypenermittlung Traber, Teil 1

Probe	rC (Tb-d)	rG (Tb-dM)	fWM (Tb-dW)	rD (Tb-dW1)	fABT* (Tb-dW1a)	fZU* (Tb-dW1c)
P070663	rC_C_1	rG_G_1		rD_TT_0		
P070674	rC_C_1	rG_G_1	fWM_T_0	rD_TT_0		
P070842	rC_C_1	rG_G_1	fWM_T_0	rD_TT_0		
P090314	rC_C_1	rG_G_1	fWM_T_0	rD_TT_0		
P102557	rC_C_1	rG_G_1		rD_TT_0		
P102603	rC_C_1	rG_G_1	fWM_T_0	rD_TT_0		fZU_T_0
P113097		rG_G_1	fWM_T_0	rD_TT_0	fABT_A_0	
P113114	rC_C_1	rG_G_1	fWM_T_0	rD_TT_0		

Tabelle 17: Haplotypenermittlung Traber, Teil 2

Probe	rE (Tb-dW1c1)	fYT* (Tb-dW1d)	rF (Tb-dW1e)	fABR* (Tb-dW1f)	sP (Tb-dW2)	qBX (Tb-dW3)	qGH (Tb-dW4)	fABF* (Tb-dW1b)
P070663	rE_A_0 imp		rF_G_0		sP_A_0			
P070674								
P070842								
P090314								
P102557	rE_A_0 imp		rF_G_0		sP_A_0			
P102603					sP_A_0	qBX_A_0	qGH_G_0	
P113097	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0	qBX_A_0	qGH_G_0	
P113114								

Tabelle 18: Haplotypenermittlung Warmblüter, Teil 1

Probe	rC (Tb-d)	rG (Tb-dM)	fWM (Tb-dW)	rD (Tb-dW1)	fABT* (Tb-dW1a)	fZU* (Tb-dW1c)
P050039/1	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
P080123	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
P112428	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
P080287/0wh	rC_T_0	rG_A_0		rD_TT_0		
BW-385*	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		fZU_no_call
BW01	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
P060077/0	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
FM0238	rC_C_1	rG_A_0		rD_TT_0		
FM1178	rC_T_0	rG_A_0		rD_TT_0		
NGS044	rC_C_1			rD_DEL_1		
NGS049	rC_C_1			rD_DEL_1		
NGS054	rC_C_1			rD_DEL_1		
BW-372	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
P070011	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
HOL01	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
HOL02	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
OLD01	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
P080053	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
P080014	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
OLD02	rC_T_0	rG_A_0		rD_TT_0		
RAO310	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		
BW-394*				rD_DEL_1		fZU_no_call
Y_PR_03_029	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_03_056	rC_C_1			rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_03_026	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
Y_PR_03_030	rC_C_1	rG_A_0	fWM_no_call	rD_TT_0		
Y_PR_03_126	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_TT_0		
Y_PR_03_138	rC_C_1	rG_A_0	fWM_C_1	rD_TT_0		
WF01	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		

Tabelle 19: Haplotypenermittlung Warmblüter, Teil 2

Probe	rE (Tb-dW1c1)	fYT* (Tb-dW1d)	rF (Tb-dW1e)	fABR* (Tb-dW1f)	sP (Tb-dW2)	qBX (Tb-dW3)	qGH (Tb-dW4)	fABF *(Tb-dW1b)
P050039/1	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P080123	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P112428	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P080287/0wh	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			
BW-385*	rE_A_0		rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
BW01	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			
P060077/0	rE_G_1		rF_G_0		sP_A_0			
FM0238	rE_A_0		rF_G_0		sP_C_1			
FM1178	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			
NGS044								
NGS049								
NGS054								
BW-372	rE_A_0		rF_G_0	fABR_A_1	sP_A_0			
P070011	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
HOL01	rE_G_1		rF_G_0		sP_A_0			
HOL02	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			
OLD01	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			
P080053	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
P080014	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0			
OLD02	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			
RAO310	rE_A_0		rF_C_1		sP_A_0			
BW-394*	rE_no_call			fABR_G_0	sP_A_0	qBX_no_call		
Y_PR_03_029	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_056	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_026	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0				
Y_PR_03_030	rE_A_0		rF_G_0		sP_C_1			
Y_PR_03_126					sP_C_1	qBX_A_1		
Y_PR_03_138					sP_C_1	qBX_A_1		
WF01	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0			

Tabelle 20: Haplotypenermittlung „Andere Rassen“, Teil 1

Probe	rC (Tb-d)	rG (Tb-dM)	fWM (Tb-dW)	rD (Tb-dW1)	fABT* (Tb-dW1a)	fZU* (Tb-dW1c)
S97041	rC_C_1	rG_A_0		rD_TT_0		
S97043	rC_C_1					
D97048	rC_C_1					
D97050	rC_C_1					
BW-294*	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1		fZU_no_call
Y_PR_03_051	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_05_061	rC_C_1			rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_05_107	rC_C_1			rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_no_call
Y_PR_05_137	rC_C_1			rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_05_171				rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_05_211				rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_T_0
Y_PR_05_039	rC_C_1			rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
Y_PR_05_105	rC_C_1			rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
Y_PR_08_004	rC_C_1		fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
Y_PR_08_005	rC_C_1		fWM_C_1	rD_DEL_1	fABT_A_0	fZU_C_1
BW-293	rC_C_1	rG_A_0		rD_DEL_1	fABT_A_0	

Tabelle 21: Haplotypenermittlung „Andere Rassen“, Teil 2

Probe	rE (Tb-dW1c1)	fYT* (Tb-dW1d)	rF (Tb-dW1e)	fABR* (Tb-dW1f)	sP (Tb-dW2)	qBX (Tb-dW3)
S97041	rE_A_0		rF_G_0		sP_A_0	qBX_T_1
S97043						qBX_T_1
D97048						qBX_T_1
D97050						qBX_T_1
BW-294*	rE_no_call			fABR_G_0	sP_A_0	
Y_PR_03_051	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_061	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_107	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_137	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_171	rE_A_0	fYT_no_call	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_211	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_039	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_05_105	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0		
Y_PR_08_004	rE_A_0	fYT_G_0	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0	qBX_A_0_jz_181115
Y_PR_08_005	rE_A_0	fYT_G_0	rF_no_call	fABR_G_0	sP_A_0	qBX_A_0_jz_181115
BW-293	rE_A_0	fYT_A_1	rF_G_0	fABR_G_0	sP_A_0	

* rot markiert = von der Analyse ausgeschlossene Proben