

# Molekulargenetische Untersuchungen beim Einsiedler-Pferd

Ch. Riggenschbach<sup>1</sup>, G. Stranzinger<sup>1</sup>, P. A. Poncet<sup>2</sup>, M. L. Glowatzki<sup>3</sup>, J. Muntwyler<sup>3</sup>, C. Gaillard<sup>3</sup>, S. Rieder<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institut für Nutztierwissenschaften, Gruppe Züchtungsbiologie, ETH und Universität Zürich, <sup>2</sup>Haras National, Avenches, <sup>3</sup>Institut für Tiergenetik, -Ernährung und -Haltung der Universität Bern, <sup>4</sup>Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft, Zollikofen

## Zusammenfassung

Am Beispiel des *Einsiedler* Warmblutpferdes wurde der Frage nachgegangen, ob dieser historisch alte «Pferdeschlag» (Klosterzucht Einsiedeln) sich mittels molekularbiologischer Techniken von anderen Pferdepopulationen abgrenzen liesse. Der *Einsiedler* zeichnet sich durch systematische Linienzucht auf der Stutenseite aus. Im Vordergrund der Untersuchungen standen zwei *Einsiedler* Stutenlinien, die sich aufgrund von Abstammungseinträgen bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurückverfolgen lassen (N = 28). Als Vergleich dienten Vertreter von Warmblutrassen, aber auch typfremde Pferde (N = 52). Variationen im mitochondrialen Genom erwiesen sich als nur bedingt geeignet zur Abgrenzung der untersuchten Pferdepopulationen. Pferde unterschiedlichster Rassen können identische mtDNA Sequenzabschnitte besitzen. Beide *Einsiedler*-Stutenlinien vereinen Haplotypen die heute vor allem bei iberischen Pferderassen zu finden sind. Dies ist ein Hinweis auf die genetische Herkunft des Einsiedlers. Die *Klima* Stutenlinie enthielt einen mit *E. ferus przewalskii* homologen und somit phylogenetisch alten mtDNA Sequenzabschnitt. Die Analyse der Mikrosatellitendaten ergab, dass sich Pferde aus den beiden *Einsiedler* Stutenlinien zwar von typfremden Rassen abgrenzen lassen, nicht aber von vergleichbaren europäischen Warmblutrassen und englischem Vollblut.

Schlüsselwörter: Biodiversität, Einsiedler Pferd, Populationsdifferenzierung, mtDNA, Mikrosatelliten

## Molecular genetic studies on the “Einsiedler” horse population

In this study it was investigated whether the “*Einsiedler*” warmblood horse, a historically old horse population from central Switzerland (*Abbey of Einsiedeln*), is distinguishable from miscellaneous horse breeds, using molecular genetic techniques. The breeding history of *Einsiedler* horses is characterised by systematic line breeding through the dams. Therefore, two *Einsiedler* dam lines (N = 28), going back to the middle of the 19<sup>th</sup> century according to pedigree entries, were the focus of the survey. Random samples of diverse warmblood horse populations, but also samples from more distinct types of horse breeds, served as comparison populations (N = 52). Variation in the mitochondrial genome appeared to be only partially informative to demarcate the studied horses, as horses of distinct breeds may share identical mtDNA sequence fragments. Both dam lines revealed haplotypes commonly found in Iberian horse breeds. This is to take as an indication on the genetic origin of *Einsiedler* horses. Furthermore, the *Klima* dam line held a homologous mtDNA sequence fragment with *E. ferus przewalskii*. Therefore, this seems to be a phylogenetically old haplotype. The analysis of microsatellite loci revealed that horses from the two *Einsiedler* dam lines were in fact distinguishable from more distinct types of horses, but not from closely related European warmblood horse breeds and English thoroughbred.

Keywords: biodiversity, *Einsiedler* horse, population demarcation, mtDNA, microsatellites

## Einleitung

Das Benediktinerkloster Einsiedeln im Kanton Schwyz, gegründet im Jahre 934, gilt als das älteste Gestüt Europas, von dem wir schriftliche Überlieferungen besitzen (Huber, 1966). In der aus dem Jahre 1064 stammenden Urkunde von Heinrich IV. wird das Gestüt erstmals als solches erwähnt. Mit der Eröffnung des Gotthardpasses um 1230 war Einsiedeln auch eine

wichtige Stätte für die Handelsbeziehungen Richtung Süden. Woher und von welchem Typ die ersten Pferde waren, die dem Kloster zur Begründung seines Bestandes dienten, ist nicht überliefert. Es ist aber anzunehmen, dass diese von den Mönchen, die meistens aus dem Adels- oder Ritterstand stammten, selber mitgebracht wurden oder aus Schenkungen

stammten. Die Konsequenz davon war, dass Pferde verschiedenster Rassen, Typen und Herkunft ihren Weg in die Innerschweiz fanden. Zur Blütezeit (1500–1798) der Einsiedler Pferdezucht waren die Pferde des Gestüts über die Landesgrenzen hinaus berühmt und vor allem in Oberitalien unter dem Namen «Cavalli della Madonna» bekannt. Beim Franzoseneinfall 1798 unter Napoleon wurden nahezu alle Pferde aus den Stallungen des Klosters geraubt. Anfangs des 19. Jahrhunderts begann das Kloster Pferde des *alten Einsiedlerschlages* aus der Umgebung anzukaufen. 1840 wurde ein neues Zuchtbuch angelegt und von da an vor allem mit *Schwyzherhengsten* gezüchtet (Buck, 1932). Die Qualität der Pferde war allerdings nicht zufriedenstellend, was zum Import von männlichen Zuchtieren aus Yorkshire, der Normandie und nach 1900 von Hackney-Hengsten führte. Später wurde auch der Stutenbestand noch mit Anglo-Normänner und Holsteiner Pferden ergänzt. Mit der Gründung der Pferdezuchtgenossenschaft Einsiedeln 1906 versuchte man, in Zusammenarbeit mit der Stiftstatthalterei und den regionalen Pferdezüchtern auf ein gemeinsames Ziel hinzuarbeiten. Die Zuchtbuchführung, die stets Aufgabe der Statthalterei war, wurde 1945 durch die zentrale Herdebuchstelle in Avenches übernommen (Guldener, 1990). Heute werden die *Einsiedlerpferde* beim Zuchtverband CH-Sportpferde (ZVCH) eingetragen, der Mitglied beim Verband schweizerischer Pferdezuchtorganisationen (VSP) ist. Phänotypisch stellen die heutigen *Einsiedler* keine abgrenzbare Population dar, sondern reihen sich ein in das Bild des CH-Warmblut- oder gar des europäischen Warmblutsporthengstes. Die CH-Warmblutzucht verfolgt seit den 60-iger Jahren als Ziel ein multidisziplinäres Reit- und Sportpferd mit dem Selektionsschwerpunkt Springen. Auch diese Zuchtpopulation ist zu einem grossen Teil auf importierten Hengsten und Stuten begründet – Frankreich, Deutschland, Schweden – (Rizzoli, 2004). Trotz aller Heterogenität der Schweizer Warmblutpferdepopulation gilt es festzuhalten, dass sich die klösterliche Pferdezucht seit alters her über Stutenstämme und deren Zuchtlinien definierte. Diese sind denn auch als das beständige Element im Klostergestüt zu betrachten. Den Hengsten kam demgegenüber die Aufgabe zu, von aussen Entwicklung und Fortschritt in die lokale Stutenherde einzubringen.

Die bis heute gültige Einteilung der Einsiedler Stutenzuchtlinien stammt von Pater Albert Huber aus dem Jahre 1942. Er fasste den Gesamtbestand des Kloster-Gestüts in fünf Linien zusammen. Diese fünf Linien untersuchte er bezüglich Exterieur, Gesundheit, Fruchtbarkeit und Leistungsfähigkeit (Huber, 1966). Seinen Ausführungen, dem «Zuchtbuch der Stiftstatthalterei» (Band I. und II) und den Zusammenstellungen der Einträge der zentralen Herde-

buchstelle lässt sich entnehmen, dass zwei der fünf aktuellen Stutenlinien auf Importe zu Beginn des 20. Jahrhunderts zurückgehen. Eine davon ist die *Sella*-Linie, welche mit der 1908 zugekauften norddeutschen Stute *Zella* begründet wird. Die zweite ist die *Thea*-Linie. Diese Stutenlinie ist auf die 1920 eingeführte rassenreine Anglonormännerstute *Plumée* zurückzuführen. Pferde dieser beiden Linien wurden in der vorliegenden Studie nicht analysiert, da bei ihnen aufgrund ihrer Herkunft von vornherein nicht mit einem partikulären lokalen *Einsiedler* Genotyp zu rechnen war. Von den drei verbleibenden Linien besitzen zwei einen gemeinsamen Vorfahren (*Quarta/Manda*-Linie: *Zira* geboren 1869). Damit reduziert sich die hier untersuchte *Einsiedler* Pferdepopulation auf zwei Zuchtlinien. Beide lassen sich lückenlos von heute bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurückverfolgen. Eine der Linien ist die *Klima*-Linie. Sie geht auf die 1863 von Landammann Dügeli aus Lachen (SZ) zugekaufte Stute *Dügeli* (geboren 1858) zurück. Laut den Aufzeichnungen im Zuchtbuch stammte sie aus dem alten *Marchschlag*. Die zweite alte *Einsiedler* Stutenlinie wird als *Quarta/Manda*-Linie bezeichnet. Diese «Doppel-Linie», die sich 1869 auftrennte (gemeinsamer Ahne *Zira*), geht auf die Gründerstute *Meier* (ohne Geburtsdatumsangabe) zurück. Die *Manda*-Linie wird im Kloster-Gestüt schon seit längerer Zeit nicht mehr gezüchtet, hat sich aber ausserhalb des Klosters über weibliche Nachkommen bis zum heutigen Tag erhalten.

Genetische Varianz ist u. a. in Form von genomischer und mitochondrialer DNA-Variation darstellbar. Die mtDNA wird dabei fast ausschliesslich über die maternale Seite, die genomische DNA grundsätzlich von beiden Elternteilen auf die Nachkommen übertragen (Hill et al., 2002). Deshalb, und aufgrund des unterschiedlichen Mutationsverhaltens der beiden DNA Formen, steht je nach Fragestellung die Analyse des einen oder des anderen DNA Typs im Vordergrund. In den letzten Jahren hat eine Fülle von Studien zur Stammesgeschichte von Mensch und Tier die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten genetischer Informationen aufgezeigt (Zischler et al., 1995; Cavalli-Sforza, 1998; Oakenfull et al., 2000; Driscoll et al., 2002). Von besonderer Bedeutung für Nutztiere sind Erkenntnisse zur Domestikationsgeschichte und zur Entwicklung der heutigen Rassenpopulationen (Clutton-Brock, 1992; Vilà et al., 2001; Jansen et al., 2002; Bruford et al., 2003; Parker et al., 2004). Dabei interessieren die verwandtschaftlichen Beziehungen, Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Rassen und inwieweit sich diese genetisch voneinander abgrenzen lassen (Kim et al., 1999; Cañon et al., 2000; Cunningham et al., 2001; Kavar et al., 2002; Kelly et al., 2002; Mirol et al., 2002; Bjornstad et al., 2003; Tozaki et al., 2003). Die Möglichkeit

mittels molekularbiologischer Methoden Tierpopulationen voneinander zu unterscheiden, respektive Einzeltiere mit hoher Sicherheit einer ganz bestimmten Tiergruppe zuzuordnen, hat Konsequenzen auf die Vermarktung von Rassetieren bzw. auf die Produktrückverfolgbarkeit und Forensik (Bjornstad und Roed, 2001 & 2002; Manel et al., 2002).

Im Zentrum der vorliegenden Untersuchung stand die Frage, ob sich verbleibende *Einsiedlerpferde* – basierend auf Pedigree-Informationen – genetisch (mtDNA- und nukleäre Mikrosatelliten DNA-Variation) von modernen Schweizer Warmblutsporthpferden und weiteren Pferderassen unterscheiden und abgrenzen lassen? Das Hauptaugenmerk lag dabei auf den beiden beschriebenen ältesten *Einsiedler* Zuchtstutenlinien (*Klima*; *Quarta/Manda*), von denen man zwar eine ursprünglich ausländische Abstammung Anfangs des 19. Jahrhunderts nicht absolut ausschliessen, aber auch nicht direkt bestätigen kann. Das nach Ende dieser Studie im Kloster wiederentdeckte und als verschollen geglaubte «Stutbuch A» von 1840 dürfte hier allenfalls zusätzliche Erkenntnisse bringen.

## Tiere, Material und Methoden

### Tiere

Der Probestumfang von insgesamt 80 Pferden setzte sich aus 28 *Einsiedlern* (*Klima*-Linie; *Quarta/Manda*-Linie) und einer Kontrollgruppe bestehend aus 52 Vertretern aus 11 verschiedenen Populationen zusammen. Die Stichprobe beinhaltet zu Vergleichszwecken schweizerisches und europäisches Warmblut, aber auch verschiedene typfremde Rassen. Tabelle 1 gibt dazu einen Überblick. Die Probenerhebung erfolgte bei den meisten Tieren durch Blutentnahme an

Tabelle 1: Pferdepopulationen und Probestumfang.

Pferdepopulationen	Anzahl Proben
Camargue (CA)	5
Comtois (CO)	3
Deutsch/Belgisches Warmblut (D/BEL)	3
<i>Einsiedler</i> (E) – ( <i>Klima</i> 14; <i>Quarta</i> 14)	28
Freiberger (FM)	5
Hannoveraner (HA)	1
Przewalski (PRZ)	1
Quarter Horse (QH)	9
Schweizer Warmblut (CH)	8
Selle Français (SF)	9
Unbekannte Herkunft (U) – inkl. mtDNA Referenzsequenz X79547	3
Englisches Vollblut (TB)	5
<b>Total</b>	<b>80</b>

der «vena jugularis externa» mit VACUETTE® EDTA Tubes (Greiner Bio-One Kremsmünster, Österreich). Bei einigen wenigen Pferden standen Haarproben (Haarwurzelzellen), aus Mähnen- oder Schweifhaaren, und bei einem männlichen Tier eine Gefriersamenprobe zur Verfügung.

### DNA-Isolierung aus Vollblut, Haarwurzelzellen und Hengstsamen

Die DNA-Isolation aus dem aufgeführten Probenmaterial erfolgte nach Standardmethoden wie sie beispielsweise bei Cañon et al. (2000) beschrieben sind, oder mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Roche Diagnostic (Mannheim D - Nr. 1796828) nach Angaben des Herstellers.

### PCR Amplifikation der mitochondrialen 12S rRNA und des D-Loop

Folgende Primerpaare kamen zur Verwendung: Eine modifizierte Version von L1091 und Hi478 für die 12S rRNA (Kocher et al., 1989).

L1091

5' CAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT 3'  
Hi478

5' GAGGGTGACGGGCGGTGTGT 3'

HorThr, Hor12s (Oakenfull et al., 1998) und eine modifizierte Version von IRD800 (Hill et al., 2002) für den D-Loop.

HorThr

5' CATTACCCTGGTCTTGTAACC 3'

Hor12S

5' GGCTAGGACCAAGCCTATGTG 3'

IRD800

5' GAATGGCCCTGAAGAAAGAACC 3'

Die einzelnen PCR-Reaktionen erfolgten nach Standardmethoden, gemäss den Angaben aus den oben erwähnten Referenzen.

### Sequenzierreaktion

Die Sequenzierung der aufbereiteten mtDNA Fragmente erfolgte mit einem «ABI PRISM 377 DNA Sequencer» (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers.

### Mikrosatelliten

Insgesamt 51 Mikrosatelliten Marker, verteilt über alle Autosomen und das X-Chromosom, wurden von jedem Tier genotypisiert (Tab. 2). Referenzen und Spezifikationen zu den einzelnen Markern sind unter

Tabelle 2: Erwartete Heterozygotiegrade ( $H_{exp}$ ) in den drei Populationen (1 Kontrollpopulation; 2 Quarta Stutenlinie; 3 Klima Stutenlinie), durchschnittliche Heterozygotiegrade ( $\bar{H}$ ), Werte für die genetische Differenzierung ( $G_{ST}$ ). Fett gedruckte Zahlen deuten auf signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht hin.

MS	$1H_{exp}$	$2H_{exp}$	$3H_{exp}$	$\bar{H}$	$G_{ST}$	MS	$1H_{exp}$	$2H_{exp}$	$3H_{exp}$	$\bar{H}$	$G_{ST}$
HMS 7	0.79	0.78	0.74	0.77	0.04	TKY 341	0.73	0.63	0.60	0.66	0.03
TKY 297	0.84	0.81	0.70	0.78	0.04	HTG 3	0.76	0.70	0.71	0.72	0.02
TKY 374	0.81	0.74	0.77	0.78	0.02	I-18	<b>0.75</b>	0.66	0.61	0.68	0.04
ASB 17	0.83	0.81	0.71	0.79	0.03	TKY 279	0.81	0.75	0.77	0.78	0.03
ASB 23	0.82	0.74	0.78	0.78	0.02	COR 7	0.73	0.73	0.70	0.72	0.02
HTG 7	0.69	0.56	0.64	0.63	0.04	TKY 287	0.71	0.75	0.68	0.71	0.06
TKY 337	0.77	0.71	0.75	0.74	0.02	LEX 54	0.68	0.65	0.61	0.65	0.03
HMS 6	0.73	0.63	0.63	0.66	0.03	LEX 73	0.76	0.49	0.40	0.55	0.07
LEX 33	0.84	0.83	0.62	0.76	0.04	TKY 321	0.86	0.80	0.78	0.81	0.02
HMS 5	0.63	0.51	0.55	0.56	0.02	UM 11	0.81	0.66	0.69	0.72	0.03
TKY 344	0.79	0.71	0.59	0.70	0.04	HTG 10	0.82	0.81	0.73	0.78	0.01
TKY 312	0.74	0.72	0.75	0.74	0.03	COR 22	<b>0.63</b>	0.63	0.65	0.64	0.01
SGCV 28	<b>0.68</b>	0.58	0.24	0.50	0.07	COR 55	<b>0.76</b>	0.47	0.40	0.55	0.06
AHT 5	0.80	0.73	0.71	0.75	0.03	TKY 301	0.80	<b>0.72</b>	0.75	0.76	0.03
HTG 4	<b>0.66</b>	<b>0.60</b>	0.62	0.62	0.02	AHT 4	0.73	0.70	0.60	0.68	0.04
HMS 3	0.77	0.73	0.66	0.72	0.04	TKY 394	0.82	0.74	0.62	0.73	0.06
HMS 2	0.74	0.65	0.44	0.61	0.04	COR 18	0.53	0.51	0.20	0.41	0.04
TKY 343	0.79	<b>0.54</b>	0.56	0.63	0.05	UM 5	<b>0.75</b>	0.68	0.65	0.70	0.05
COR 58	0.86	0.79	0.82	0.82	0.02	TKY 294	0.74	0.80	0.69	0.74	0.03
COR 69	0.78	0.63	0.65	0.68	0.04	TKY 333	0.84	0.75	0.79	0.80	0.03
LEX 78	0.50	0.44	0.26	0.40	0.05	UCDEQ 425	<b>0.77</b>	0.50	0.54	0.60	0.04
UM 32	0.67	<b>0.62</b>	0.46	0.58	0.08	ASB 43	0.70	0.67	0.61	0.66	0.01
ASB 2	0.82	0.73	0.78	0.78	0.04	TKY 325	0.83	0.73	0.80	0.80	0.03
HMS 1	0.67	0.60	0.46	0.58	0.06	VHL 20	0.83	0.80	0.74	0.79	0.03
HTG 6	<b>0.68</b>	0.64	0.64	0.65	0.04	AHT 31	0.76	0.46	0.49	0.57	0.06
Alle MS	0.75	0.67	0.63	0.68	0.04						

der Webseite des «Horse Genome Project» ([www.uky.edu/Ag/Horsemap/](http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/)) aufgeführt. Die Amplifikation der 51 Marker erfolgte über vier, am Institut für Tiergenetik, -Ernährung und -Haltung entwickelte, Multiplex-PCR-Reaktionen. Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mittels Kapillarsequenzierer (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Detaillierte Angaben dazu finden sich in Glowatzki-Mullis et al. (Publikation in Vorbereitung).

## Statistische Auswertungen

### Sequenzdaten

Alle mtDNA Sequenzen wurden mit der Referenzsequenz (GenBank-Zugriffsnummer X79547) von Xu und Arnason (1994) verglichen und mittels der Software «Wisconsin Package» (Accelrys, San Diego, CA, USA) auf Variationen geprüft. Variationen fanden sich letztlich in den folgenden Sequenzabschnitte

der 12S rRNA und des D-Loop (Positionsangaben gemäss Referenzsequenz):

12S rRNA: Position 738-859

D-Loop: Position 15485-15777

Das Programm «ClustalX» (Thompson et al., 1997) ermöglichte in einem weiteren Schritt die Darstellung des Vergleichs aller aufbereiteten Sequenzdaten in Form eines «multiplen Alignments».

### Phylogenetische Analyse

Die Berechnung eines phylogenetischen Baumes aus dem kombinierten Sequenzdatensatz der 12S rRNA und des D-Loop erfolgte mittels der Analysesoftware «PHYLP» (Phylogeny Inference Package; Felsenstein, 2002). Zur Berechnung der Zuverlässigkeit des Ergebnisses diente das «Bootstrapping»-Verfahren. Es wurden 1000 Datensätze in «PHYLP» konstruiert und ein Konsensusbaum erstellt. Die graphische Darstellung des phylogenetischen Baumes erfolgte



mit dem Programm TreeExplorer Version 2.12 (Koichiro Tamura, 1997–1999; [http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/TE\\_man.html](http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/TE/TE_man.html)).

### Mikrosatellitendaten

Die je 51 Mikrosatellitengenotypen aller Pferde wurden in Excel erfasst und verwaltet. Die «Add-In» Zusatzfunktion von «The Excel Microsatellite Toolkit Version 3.1» (Park, 2001) erlaubte eine einfache Umformung der so geordneten Daten für verschiedene statistische Anwendungen und Programme. Es folgte eine Unterteilung der 79 Pferde (das mtDNA Referenzpferd X79547 besitzt keinen Mikrosatelliten Genotyp) in drei Populationen. Die erste (Kontrollpopulation) umfasste alle Vergleichspferde (N = 51), die zweite und dritte betraf die zwei ältesten *Einsiedler* Zuchtstutenlinien (N = je 14 Pferde/Population).

Mit dem Programm «GENETIX» Version 4.03 (Belkhir et al., 1996–2002) wurden die Allel- und Genotypfrequenzen für die Populationen berechnet. Aus den Allelfrequenzen bestimmte man den erwarteten Heterozygotiegrad, als Mass für die genetische Variabilität innerhalb der Populationen, sowie den durchschnittliche Heterozygotiegrad über die gesamte Stichprobe. Weiter erlaubte die Software «GENEPOP Version 3.4» (Raymond & Rousset, 1995) die Überprüfung der Populationen auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG). Anschliessend wurde, wiederum mit «GENETIX», der  $G_{ST}$ -Wert nach der Methode von Nei (1973, 1977) berechnet. Zusätzlich erstellte man mit «GENETIX» faktorielle Korrespondenzanalysen. Diese Analyse erlaubte es, auf Basis der Allelfrequenzen, Individuen in einen dreidimensionalen Raum zu projizieren und so zu gruppieren bzw. voneinander abzugrenzen. Die Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen über den Anteil gemeinsamer Allele («Allele Sharing»), in Form eines «Neighbour-Joining Tree», bildeten den Abschluss der Auswertungen (Bowcock et al., 1994; Bjornstad und Roed, 2001).

### Ergebnisse

Der kombinierte mtDNA Datensatz, bestehend aus einem Abschnitt der 12S rRNA und dem D-Loop, ergab für die 80 in die Analyse miteinbezogenen Pferde aus 12 Populationen, 27 verschiedene mitochondriale Haplotypen. Diese Haplotypen basieren auf der Kombination aller vorgefundenen variablen Nukleotid-Positionen in den sequenzierten mtDNA Abschnitten (Riggenbach, 2004). Für den 12S rRNA Bereich fanden sich insgesamt drei variable Positionen, im Abschnitt des D-Loop deren 31, im Vergleich zur Referenzsequenz (X79547). Die zwei *Einsiedler* Stutenlinien teilten sich in zwei voneinander getrennte Gruppen (Abb. 1; Haplotyp 6 sowie 26). Die

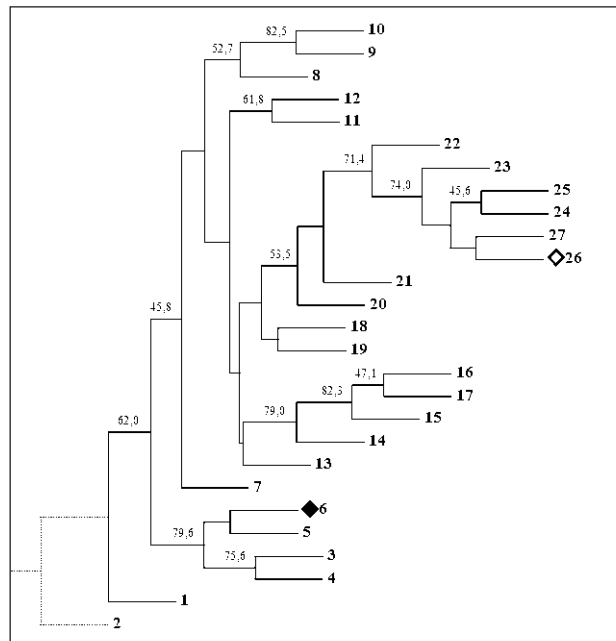


Abbildung 1: Maximum Likelihood Baum des kombinierten mtDNA Datensatzes. Zahlen neben den Astverzweigungen geben die «Bootstrap»-Werte in Prozent an; Werte unter 45% sind nicht aufgeführt. Die einzelnen Haplotypen sowie die Anzahl Pferde je Haplotyp lauten wie folgt (jeweils mit Rasse resp. Populationszugehörigkeit gemäss Tabelle 1):

1 1QH; 2 1PRZ; 3 1CA; 4 2CA, 1SF; 5 1FM; 6 14E (Quarta); 7 1SF; 8 1D/BEL; 9 1TB; 10 1TB; 11 1QH; 12 1U, 1TB; 13 1QH; 14 1SF; 15 1QH; 16 1D/BEL; 17 1D/BEL; 18 1CO, 1FM; 19 5CH; 20 1CO; 21 1QH; 22 2U; 23 2CH, 1FM, 1HA, 3QH, 4SF, 1TB; 24 1FM; 25 2CA, 1CH, 1FM, 1SF; 26 14E (Klima), 1CO, 1QH, 1TB; 27 1SF.

verwendete Nomenklatur für die Haplotypen folgte derjenigen aus den Arbeiten von Vilà et al. (2001) bzw. Jansen et al. (2002).

Abbildung 1 zeigt den, mit dem kombinierten mtDNA Datensatz berechneten «Maximum Likelihood» Baum. Die Topologie des Baumes besitzt als Ausgangspunkt den Haplotypen eines Przewalski Pferdes (Haplotyp 2). Die «Bootstrap»-Werte (in %) sind links neben den Verzweigungen aufgeführt. Werte unter 45% wurden nicht ausgewiesen. Über die gesamte Stichprobe von 80 Pferden betrachtet, fand sich der Haplotyp 6 nur beim *Einsiedler* und dies nur bei Pferden aus der *Quarta* Stutenlinie.

Von den 51 genotypisierten Mikrosatelliten Markern flossen Daten von 50, ausschliesslich auf autosomalen Chromosomen liegenden, Mikrosatelliten in die statistischen Berechnungen mit ein (Tab. 2). Insgesamt fanden sich für die Marker in der Stichprobe von 79 Tieren zwischen minimal drei (HMS5) und maximal 15 (TKY343) Allelen. Der Durchschnitt über alle Marker lag bei acht Allelen.

Alle 150 möglichen Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (50 Mikrosatelliten Marker  $\times$  3 Populationen) waren berechenbar. Elf

Tests lagen ausserhalb der Signifikanzgrenze ( $p < 0.05$ ) und wichen somit vom HWG ab. Über alle Mikrosatelliten hinweg lag der erwartete Heterozygotiegrad ( $H_{\text{expected}}$ ) für die einzelnen Populationen zwischen 0.63 und 0.75. Auf Ebene der einzelnen Marker fanden sich Werte zwischen 0.20 (COR18) und 0.86 (COR58 und TKY321). Die Ergebnisse der Werte für die genetische Differenzierung zwischen den Populationen ( $G_{ST}$ ) variierten von 0.01 bis 0.08 und lagen im Durchschnitt bei 0.04. In Tabelle 2 sind die Resultate aus den populationsgenetischen Berechnungen der Mikrosatelliten-Daten zusammengestellt.

Die Ergebnisse aus der faktoriellen Korrespondenzanalyse sind in Abbildung 2 (A, B, C) dargestellt. Die Serie zeigt das Verhalten der *Einsiedler* Stutenlinien im Vergleich zur Auswahl der Vergleichsindividuen. Die optische Darstellung der Populationen in den Abbildungen ist wie folgt definiert: Population ■: Kontrollpferde ( $N = 51$ ) – variable Vergleichspopulation; Population ■: Vertreter der *Quarta*-Linie ( $N = 14$ ); Population ■: Vertreter der *Klima*-Linie ( $N = 14$ ). Die Resultate aus der Analyse der Populationen gemäss dem Anteil an gemeinsamen Allelen («Allele Sharing») bestätigten die Ergebnisse aus der faktoriellen Korrespondenzanalyse und werden nicht weiter ausgeführt (Riggenbach, 2004).

## Diskussion

Die ausgewiesenen Haplotypen zeigten ein ausgesprochen heterogenes Bild sowohl zwischen wie auch innerhalb der einzelnen Populationen. Mit Ausnahme des Haplotypen 2 von *E. ferus przewalskii* war keiner spezifisch für eine bestimmte Gruppe von Pferden. Der Haplotyp 6 fand sich in der untersuchten Stichprobe zwar nur bei Tieren aus der *Quarta* Stutenlinie, doch ist anzunehmen, dass bei Erweiterung der Stichprobe früher oder später Pferde anderer Herkunft mit demselben mtDNA Muster auftauchen würden. Dies umso mehr, als keine der variablen Nukleotid-Positionen des «*Quarta* Haplotypen» ausschliesslich bei diesen Pferden anzutreffen war (Riggenbach, 2004). Im «Maximum Likelihood» Baum plazierten sich die beiden *Einsiedler* Stutenlinien deutlich entfernt voneinander. Dies lässt sich als Hinweis darauf interpretieren, dass beide Linien unterschiedlicher matrilinear Herkunft sind und somit keine unmittelbare gemeinsame Vergangenheit miteinander aufweisen. Alle Pferde innerhalb der *Einsiedler* Stutenlinien verfügten über einen jeweils identischen Haplotypen. Dies ist einerseits mit der relativ nahen Verwandtschaft der noch verfügbaren *Einsiedler* Pferde und andererseits mit der konsequenten Linienzucht des Klosters auf der Stutenseite zu begründen. Die

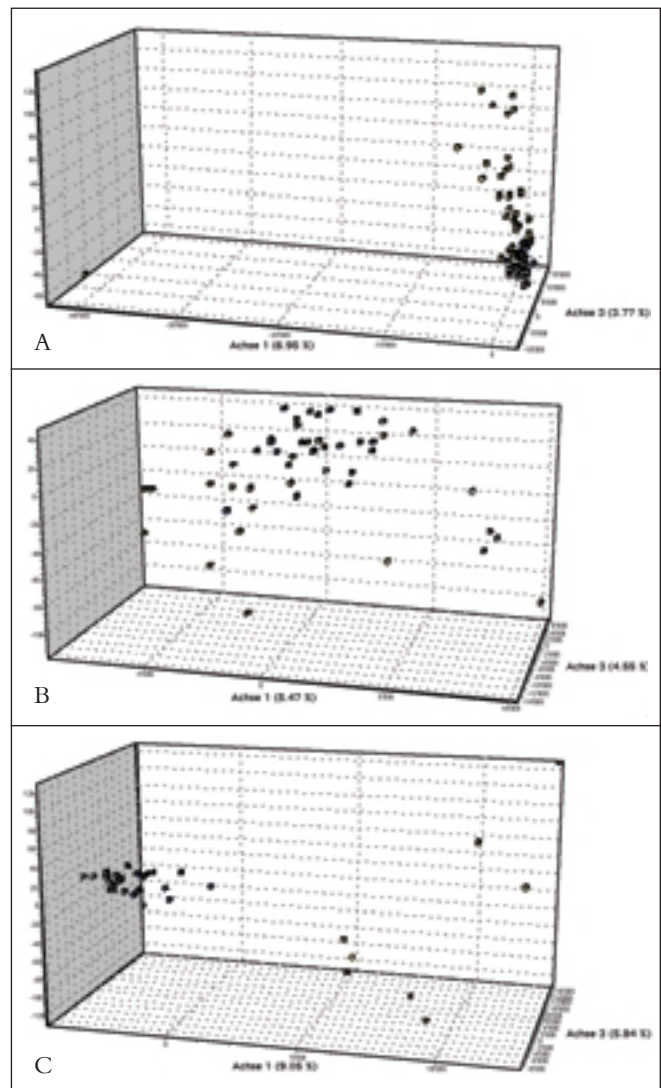


Abbildung 2: Faktorielle Korrespondenzanalysen.  
 A – Alle domestizierten Pferde der Stichprobe ( $N=78$ ) mit *E. ferus przewalskii* ( $N = 1$ ). Die ersten drei Achsen erklären 15.2% der genetischen Variation zwischen den Populationen.  
 B – Alle Warmblutpferde (8 CH, 3 D/BEL, 1 HA, 9 SF, 2 U;  $N = 23$ ) mit den beiden *Einsiedler* Stutenlinien ( $N = 28$ ). Die ersten drei Achsen erklären 14.9% der genetischen Variation zwischen den Populationen.  
 C – Alle Kaltblutpferde (3 CO, 5 FM;  $N=8$ ) mit beiden *Einsiedler* Stutenlinien ( $N = 28$ ). Die ersten drei Achsen erklären 21.9% der genetischen Variation zwischen den Populationen.

identischen Haplotypen sind auch ein Hinweis auf die Richtigkeit der Abstammungseinträge. In beiden Stutenlinien (*Klima*; *Quarta*/*Manda*) lässt sich diese Richtigkeit über gemeinsame Vorfahren und deren heute noch lebende Nachkommen für zwei Zeitfenster von 134 resp. 66 Jahren prüfen.

In Anlehnung an die Nomenklatur von Vilà et al. (2001) und Jansen et al. (2002) teilten sich die beiden *Einsiedler* Linien in die «Cluster-Gruppen» A (*Quarta*) und D3 (*Klima*) ein (nur D-Loop mtDNA Sequenz berücksichtigt). Diese beiden «Cluster-Gruppen» umfassen einen hohen Anteil an Pferden aus Popula-

tionen iberischen Ursprungs. Insbesondere innerhalb der mtDNA «Cluster-Gruppe D» fand Jansen et al. (2002) ein Haplotypfrequenzmaximum bei iberischen (Andalusier und Lusitanos) und nordafrikanischen Pferden (Berber). In ganz Europa waren iberische Pferde seit der Renaissance bekannt und geschätzt als ausgezeichnete Reitpferde. Es bestand ein reger Handel zwischen den Königshäusern und der Kirche, was zu einer Verbreitung iberischer Genetik in ganz Europa und so vermutlich auch bis nach Einsiedeln führte.

Der 12S rRNA Haplotyp der *Klima* Stutenlinie entspricht demjenigen von *E. ferus przewalskii*. Im Gegensatz dazu besitzt die 12S rRNA Sequenz der *Quarta* Linie einen von *E. ferus przewalskii* abweichenden Haplotypen. Ein identisches 12S rRNA Sequenzmuster zwischen Vertretern von *E. caballus* und *E. ferus przewalskii* kann als Hinweis auf eine gemeinsame Herkunft und damit auch auf das stammesgeschichtliche Alter des Haplotypen interpretiert werden. Von *E. ferus przewalskii* abweichende 12S rRNA Sequenzmuster sind demgegenüber als vermutlich entwicklungsgeschichtlich jüngeren Datums zu taxieren.

Zur Abgrenzung heutiger Pferderassen bzw. -populationen erwiesen sich die Variationen (Haplotypen) des mitochondrialen Genoms als nur bedingt geeignet. Einerseits beleuchten sie nur die weibliche Erblinie, andererseits bestätigt auch die vorliegende Studie, dass Pferde verschiedenster Rassenzugehörigkeit identische mtDNA Sequenzabschnitte aufweisen können. Als Beispiel (Abb. 1) sei hier der mtDNA Haplotyp 26, mit Einsiedler, Comtois, Quarter Horse und Vollblut erwähnt. Jansen et al. (2002) gruppieren im «Cluster D1» neben einem hohen Anteil an iberischen Pferderassen auch Vertreter anderer Rassen wie Shire, Araber, Isländer. Die verschiedenen Haplotypen in den untersuchten Populationen zeigen, dass Pferde von ihrer Nutzung her primär die Mobilität des Menschen beeinflussten und auf diese Weise an geographisch unterschiedlichen Orten genetische Spuren hinterliessen. Weiter wird damit auch erklärbar, weshalb auf der Ebene der mtDNA entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft zwischen Pferdepopulationen feststellbar ist, auf der Ebene der Phänotypen aber deutliche Unterschiede vorliegen können (Björnstad et al., 2003; Krüger, 2003).

Die Untersuchung der nukleären DNA Variation mittels Mikrosatelliten Loci erlaubte es im vorliegenden Kontext, neben den *Einsiedler* Stutenlinien, auch den Beitrag der Hengste zu quantifizieren. Die Anzahl und Häufigkeit der Markerallele in den untersuchten Populationen variierten. Insgesamt fanden sich jedoch über alle 50 Mikrosatelliten hinweg keine Allele,

welche absolut oder bezüglich ihrer Frequenz nur oder hauptsächlich bei *Einsiedler* Pferden zu finden gewesen wären (Tab. 2).

Bei den Tests auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wies die Kontrollpopulation 1 am meisten signifikante Abweichungen auf (Tab. 2). Dies ist mit der heterogenen Populationszusammensetzung (Vollblut, Warmblut, Kaltblut, Przewalski) und dem unterschiedlichen Anteil an Vertretern je Population zu erklären (Tab. 1). In Population 2 (*Quarta/Manda*-Linie) lassen sich die Abweichungen mit der einerseits kleinen Stichprobe und andererseits mit der unterschiedlichen Entwicklung dieser Stutenlinie in und ausserhalb des Klosters interpretieren (Trennung in zwei Sublinien – *Quarta/Manda* – vor 134 Jahren). Die Population 3 (*Klima*-Linie) erwies sich mit keiner einzigen signifikanten HWG Abweichung als ausgewogenste Stichprobe. Der durchschnittliche erwartete Heterozygotiegrad über alle drei Populationen hinweg ist mit 0.68 hoch (Tab. 2). Neben dem erwartungsgemäss hohen Heterozygotiegrad der Kontrollpopulation weisen aber auch die beiden *Einsiedler* Stutenlinien mit 0.67 bzw 0.63 hohe Werte auf. Hier kommt vermutlich die genetische Breite der verschiedenen eingesetzten Vätertiere zum Ausdruck. Der hohe Heterozygotiegrad innerhalb der Populationen und das Fehlen von populationspezifischen Allelen, führte zu einem insgesamt tiefen Wert für die genetische Differenzierung ( $G_{ST} = 0.04$ ; Tab. 2). Belässt man in der Kontrollpopulation 1 nur noch typpfremdere Rassen, wie Camargue, Comtois und Freiburger, so steigt der Wert der genetischen Differenzierung deutlich an ( $G_{ST} = 0.08$ ). Diese Resultate sind vergleichbar mit solchen aus ähnlichen Studien im Bereich der domestizierten Pferderassen (Björnstad et al., 2000; Cañon et al., 2000).

Die faktorielle Korrespondenzanalyse hat sich zur optischen Darstellung von Mikrosatelliten Allel-Information, als besonders geeignet erwiesen. Abbildung 2 macht auf eindrückliche Weise das Verhalten und die Beziehungen zwischen den Tieren in Abhängigkeit der eingesetzten Stichprobe deutlich. Ein einzelnes Przewalski Pferd grenzt sich prominent von den domestizierten Pferden ab. Alle Hauspferde ballen sich dabei zu einer recht einheitlichen Gruppe zusammen (Abb. 2A). Werden *E. ferus przewalskii* sowie bis auf die Warmblüter alle typpfremden Rassenvertreter aus der Kontrollpopulation weggelassen, bildet sich eine «Wolke», die keine Aussage über die Zugehörigkeit eines Einzeltieres zu einer ganz spezifischen Warmblutpopulation mehr zulässt (Abb. 2B). Eine deutliche populationspezifische Abgrenzung lässt sich dagegen beim Vergleich der beiden *Einsiedler* Stutenlinien mit typpfremden Rassen wie Comtois und Freiburger aufzeigen (Abb. 2C). Damit wird klar, dass sich



aktuell *Einsiedler* Pferde genetisch zwar von typfremden Pferderassen unterscheiden lassen, nicht aber von Pferden aus vergleichbaren Warmblutpopulationen. Aufgrund der hier untersuchten Daten gilt letzteres allerdings nicht nur für die *Einsiedler*, sondern insgesamt für die europäischen Warmblutpferderassen. Dies erstaunt, in Anbetracht des internationalen Genetikhandels in der Sportpferdezucht, über alle Rassengrenzen hinweg, eigentlich wenig. Rassensbegriffe unterliegen von Menschen definierten Zweckmässigkeiten. Sie basieren zwar auf biologischen Gemeinsamkeiten, sind aber nicht als absolute Einheiten zu sehen, sondern unterliegen dynamischen Prozessen, die sich je nach Anforderungen und Wünschen verändern und formen lassen. Letzlich sind es Herdebuchorganisationen, die bestimmen was eine Rassenzugehörigkeit zulässt oder ausschliesst.

Unsere Ergebnisse erlauben es aus genetischer Sicht nicht, von einer eigenständigen *Einsiedler* Pferdepopulation innerhalb phänotypisch ähnlicher Warmblutpferdepopulationen zu sprechen. Jedoch könnten Resultate aus der vorliegenden Studie dem Klostergestüt und interessierten privaten Züchtern neue Impulse geben, eine Zuchttradition zu reaktivieren,

systematisch verbleibende *Einsiedler*-Stutenlinien zu bewahren und allenfalls eine eigenständige Population aufzubauen.

## Dank

Wir bedanken uns herzlich beim Kloster Einsiedeln insbesondere bei Abt M. Werlen und Pater Th. Locher, den Betreibern des klösterlichen Marstalles (Frau U. Kälin; ehemals Herr G. Wehrle) sowie der Pferdezuchtgenossenschaft Einsiedeln (Frau B. Bisig), für ihr Interesse an unserer Arbeit und ihre Unterstützung bei der Zusammenstellung der Daten. Weiter bedanken wir uns bei den vielen PferdebesitzerInnen, die uns ihre Tiere zur Verfügung gestellt und damit die Untersuchung erst ermöglicht haben. Ein Dankeschön geht ebenfalls an Dr. D. Burger und den MitarbeiterInnen des Reproduktionszentrums im Haras National, Avenches VD für die Mithilfe bei der Blutprobensammlung. Die vorliegende Studie entstand im Rahmen einer Dissertation an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich und der ETH Zürich und wurde vom Bundesamt für Landwirtschaft mit einem Beitrag an die Materialkosten unterstützt.

### Recherche moléculaire chez le cheval de *Einsiedler*

Dans le cas du demi-sang *Einsiedler* la question suivante s'est posée: Est-il possible de différencier avec des techniques de la biologie moléculaire cette ancienne «lignée chevaline», marquée par le monastère d'Einsiedeln, d'autres populations de chevaux? L'élevage des *Einsiedler* se distingue en particulier par une sélection en lignée passant par les juments. Au premier plan de la recherche se trouvent deux lignées de juments de *Einsiedler*, dont les données des origines permettent de remonter le cours de l'histoire jusqu'à la moitié du 19<sup>e</sup> siècle (N=28). Les chevaux de comparaison étaient avant tout des représentants de populations de demi-sangs mais aussi de races de types différents (N = 52). Les résultats ont montré que les variations des haplotypes du génome mitochondrial n'étaient guère appropriées afin de délimiter les populations chevalines analysées. Des chevaux de races des plus éloignées peuvent posséder des bouts de séquences

### Analisti genetico-molecolare nel cavallo di razza *Einsiedler*

Prendendo come esempio il cavallo a sangue caldo *Einsiedler* ci si è posta la domanda se, con tecniche di biologia molecolare, quest'antico «tipo di cavallo» (allevamento del convento di Einsiedeln) era differenziabile da altre popolazioni di cavalli. L'*Einsiedler* si distingue sull'allevamento sistematico delle linee dalla parte delle giumente. La ricerca è avvenuta in primo piano partendo da due linee delle giumente *Einsiedler*, che sulla base delle registrazioni riguardanti l'origine (n = 28) sono ricostruibili fino alla metà del 19<sup>imo</sup> secolo. Queste sono state paragonate a rappresentanti di razze a sangue caldo e anche a cavalli di altro tipo (n = 52). Le variazioni del genoma mitocondriale sono state dimostrate solo parzialmente idonee per la delimitazione della popolazione dei cavalli analizzata. Cavalli di razze diverse possono possedere frammenti di sequenze di mtDNA identiche. Entrambe le linee delle giumente *Einsiedler* coniugavano aplo-



de mtDNA identiques. Les deux lignées de juments de *Einsiedler* portent des haplotypes qu'on retrouve aujourd'hui prépondérant chez les races ibériques. Ce résultat est une indication à ce qui concerne le patrimoine génétique du *Einsiedler*. Le type haploïde mtDNA de la lignée de la jument *Klima* a un bout de séquence commun avec *E. ferus przewalskii*. Au niveau de la phylogénèse cet haplotype semble donc d'être ancien. Sur le plan des marqueurs microsatellites les résultats ont montré que des chevaux des deux lignées de *Einsiedler* pouvaient être distingués de races de types différents mais pas de demi-sangs européens comparables et du pur-sang anglais.

tipi che oggi si riscontrano prevalentemente nelle razze di cavalli iberiche. Questa è un'indicazione dell'origine genetica dell'*Einsiedler*. La linea delle giumente *Klima* contiene un'omologo con *E. ferus przewalskii* e quindi vecchi frammenti di sequenze di mtDNA filogenetici.

L'analisi di dati microsatelliti ha rilevato che si possono certamente delimitare entrambe le linee delle giumente *Einsiedler* da cavalli di altro tipo ma non da razze paragonabili europee a sangue caldo e purosangue inglesi.

## Literatur

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F.: GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, F, 1996–2002.
- Bjornstad G., Gunby E., Roed K.H.: Genetic structure of Norwegian horse breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 2000, 117: 307–317.
- Bjornstad G., Roed K.H.: Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Anim. Genet.* 2001, 32: 59–65.
- Bjornstad G., Roed, K. H.: Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. *Anim. Genet.* 2002, 33: 4, 264–270.
- Bjornstad G., Nilsen N.O., Roed K.H.: Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses. *Anim. Genet.* 2003, 34: 55–58.
- Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J. R., Cavalli-Sforza L.L.: High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature.* 1994, 368: 455–457.
- Bruford MW, Bradley DG., Luikart: DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Genet.* 2003, 4: 900–910.
- Buck P.D.: Die Schweizerische Halbblutzucht mit Rücksicht auf die Landesverteidigung. Berichte der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. Verlagsanstalt Benzinger und Co. AG, CH, 1932.
- Cañon J., Checa M. L., Carleos C., Vega-Pla J. L., Vallejo M., Dunner S.: The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim. Genet.* 2000, 31: 39–48.
- Cavalli-Sforza L.L.: The DNA revolution in population genetics. *Trends Genet.* 1998, 14: 2, 60–65.
- Cunningham E.P., Dooley J.J., Splan R.K., Bradley D.G.: Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to thoroughbred horses. *Anim. Genet.* 2001, 32: 360–364.
- Clutton-Brock J.: Horse Power: A history of the horse and the donkey in human societies. Natural History Museum Publication, London, UK, 1992.
- Driscoll C.A., Menotti-Raymond M., Nelson G., Goldstein D., O'Brien S.J.: Genomic microsatellites as evolutionary chronometers: a test in wild cats. *Genome Res.* 2002, 12: 414–423.
- Felsenstein J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Genomes sciences, Department of Genetics, University of Washington, USA, 2002.
- Glowatzki-Mullis M. L., Muntwyler J., Pfister W., Marti E., Rieder S., Poncet P.A., Gaillard C.: Genetic diversity among horse populations based on 50 microsatellites with special focus on the Franches-Montagnes breed. In review 2005.
- Guldener G.: Geschichte der Einsiedler Pferdezucht. Dissertation, Universität Zürich, CH, 1990.
- Hill E.W., Bradley D.G., Al-Barody M., Ertugrul O., Splan R.K., Zakharov I., Cunningham E.P.: History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Anim. Genet.* 2002, 33: 287–294.
- Huber, A. Pater: 1000 Jahre Kloster Einsiedeln. Ede-Verlag, CH, 1966.
- Jansen T., Forster P., Levine M.A., Oelke H., Hurler M., Renfrew C., Weber J., Olek K.: Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99: 10905–10910.
- Kavar T., Brem G., Habe F., Sölkner J., Dövc P.: History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Genet. Sel. Evol.* 2002, 34: 635–648.
- Kelly L., Postiglioni A., De Andrés Cara D.F., Vega-Pla J.L., Gagliardi R., Biagetti R., Franco J.: Genetic characterisation of

Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. *Res. Vet. Sci.* 2002, 72: 69–73.

Kim K.I., Yang Y.H., Lee S.S., Park C., Ma R., Bouzat J.L., Lewin H.A.: Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* 1999, 30: 102–108.

Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A.: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86: 6196–6200.

Krüger K.: Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen zur Phylogenie der Equiden unter besonderer Berücksichtigung von *E. hemionus kulan* und *E. hemionus onager*. Dissertation, Universität und ETH Zürich, CH, 2003.

Manel S., Berthier P., Luikart G.: Detecting Wildlife Poaching: Identifying the Origin of Individuals with Bayesian Assignment Tests and Multilocus Genotypes. *Conserv. Biol.* 2002, 16: 3, 650–659.

Mirol P.M., Garcia P.P., Vega-Pla J.L., Dulout F.N.: Phylogenetic relationships of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. *Anim. Genet.* 2002, 33: 356–363.

Nei M.: Analysis of gene diversity in subdivided populations. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 1973, 70: 3321–3323.

Nei M.: F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 1977, 41: 225–233.

Oakenfull E.A., Ryder O.A.: Mitochondrial control region and 12S rRNA variation in Przewalski's horse (*Equus przewalskii*). *Anim. Genet.* 1998, 29: 456–459.

Oakenfull E.A., Lim H.N., Ryder O.A.: A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of equids. *Conserv. Genet.* 2000, 1: 341–355.

Park S.D.E.: Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Dissertation, University of Dublin, IRL, 2001.

Parker H.G., Kim L.V., Sutter N.B., Carlson S., Lorentzen T.D., Malek T.B., Johnson G.S., DeFrance H.B., Ostrander E.A., Kruglyak L.: Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science.* 2004, 304: 1160–1164.

Raymond M., Rousset F.: GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 1995, 86: 248–249.

Riggenbach Ch.: Molekulargenetische Untersuchungen beim Einsiedlerpferd. Dissertation, Universität Zürich und ETH Zürich, CH, 2004.

Rizzoli A.: Les débuts de l'élevage chevalin en Suisse: 1850–1910. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 2004, 1: 27–32.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G.: The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997, 24: 4876–4882.

Tozaki T., Takezaki N., Hasegawa T., Ishida N., Urosawa M., Tomita M., Saitou N., Mukoyama H.: Microsatellite Variation in Japanese and Asian Horses and Their Phylogenetic Relationship Using a European Horse Outgroup. *J. Hered.* 2003, 94: 374–380.

Vilà C., Leonard J.A., Gotherstrom A., Marklund S., Sandberg K., Liden K., Wayne R.K., Ellegren H.: Widespread origins of domestic horse lineages. *Science.* 2001, 291: 474–477.

Xu X., Arnason U.: The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene.* 1994, 148: 357–362.

Zischler H., Geisert H., von Haeseler A., Paabo S.: A nuclear 'fossil' of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature.* 1995, 30: 489–492.

## Korrespondenzadresse

Dr. Stefan Rieder, Schweizerische Hochschule für Landwirtschaft, Länggasse 85, CH-3052 Zollikofen  
Tel.: 031 910 22 65, Fax: 031 910 22 99, stefan.rieder@alumni.ethz.ch

Manuskripteingang: 16. Juli 2004

Angenommen: 20. Oktober 2004