

Untersuchungen zur Phylogenie und Domestikation des Hauspferdes (*Equus ferus f. caballus*)

Stammesentwicklung und geografische Verteilung

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Jansen

aus

Mönchengladbach

Bonn, September 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. K. Olek

2. Referent: Prof. Dr. C. M. Naumann

Tag der Promotion: 21.11.2002

Inhalt

| | |
|---|-----------|
| Verzeichnis der Abkürzungen..... | I |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| Fragestellung..... | 2 |
| 2. Theoretisches und Grundlagen der Arbeit..... | 3 |
| 2.1 Die Geschichte der Pferdezucht..... | 3 |
| 2.1.1 Fossile Pferde..... | 3 |
| 2.1.2 Prähistorische Funde..... | 3 |
| 2.1.3 Spuren früher Domestikation..... | 4 |
| 2.1.4 Die Stammform des Hauspferdes..... | 5 |
| 2.1.5 Rassen..... | 6 |
| 2.1.5.1 Begriffsdefinition..... | 6 |
| 2.1.5.2 Heute lebende Pferderassen (Zuchtrassen, sowie Unterarten)..... | 7 |
| 2.2 Mitochondrien..... | 16 |
| 2.2.1 Allgemeines und Funktion..... | 16 |
| 2.2.2 Mitochondriale DNA..... | 17 |
| 2.3 Phylogenetische Untersuchungen an der mitochondrialen DNA..... | 19 |
| 2.3.1 Untersuchungen am Cytochrom <i>b</i> Gen..... | 20 |
| 2.3.2 Untersuchungen an anderen codierenden Bereichen der mitochondrialen DNA..... | 20 |
| 2.3.3 Untersuchungen an der D-loop..... | 21 |
| 2.3.4 Beispiele für Untersuchungen an der gesamten mitochondrialen DNA..... | 22 |
| 2.4 Phylogenetische Untersuchungen mittels anderer Systeme..... | 22 |
| 2.4.1 Blutgruppentypisierung und Untersuchung von Proteinpolymorphismen in Blut..... | 22 |
| 2.4.2 Mikrosatellitentypisierung..... | 23 |
| 2.4.3 Untersuchungen am Y-Chromosom..... | 24 |
| 2.5 Methoden phylogenetischer Analyse..... | 25 |
| 2.5.1 Distance-Matrix-Methoden..... | 25 |
| 2.5.1.1 Unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA)..... | 25 |
| 2.5.1.2 Fitch-Margoliash-Algorithmus..... | 26 |
| 2.5.1.3 Neighbour-Joining-Methode..... | 26 |
| 2.5.2 Parsimony-Methoden..... | 26 |
| 2.5.3 Maximum-Likelihood-Methoden..... | 27 |
| 2.5.4 Network..... | 28 |
| 2.5.4.1 Der Reduced-Median-Algorithmus..... | 28 |
| 2.5.4.2 Der Median-Joining-Algorithmus..... | 29 |
| 2.6 Die Polymerasekettenreaktion..... | 29 |
| 2.7 Die DNA-Sequenzierung..... | 31 |
| 2.7.1 Die Sequenzierreaktion..... | 31 |
| 2.7.2 Die gelelektrophoretische Auftrennung der sequenzierten Proben und die Auswertung der erhaltenen Daten..... | 31 |
| 3. Material und Methoden..... | 33 |
| 3.1 Proben..... | 33 |
| 3.2 Materialien..... | 35 |
| 3.2.1 Chemikalien und Enzyme..... | 35 |
| 3.2.2 Puffer und Lösungen..... | 35 |
| 3.2.3 Oligonukleotide..... | 37 |
| 3.2.4 Arbeitsgeräte..... | 37 |
| 3.3 Methoden..... | 38 |

| | |
|---|------------|
| 3.3.1 DNA-Isolierung..... | 38 |
| 3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration..... | 38 |
| 3.3.3 Amplifikation und Sequenzierung..... | 38 |
| 3.3.3.1 PCR zur Amplifikation des 1. Fragments (HVR1) aus der mitochondrialen D-loop..... | 38 |
| 3.3.3.2 PCR zur Amplifikation des 2. Fragments (HVR2) aus der mitochondrialen D-loop..... | 39 |
| 3.3.3.3 Sequenzierung der PCR-Produkte von HVR1 und HVR2..... | 40 |
| 3.3.3.4 Amplifikation des repetitiven Bereichs in der D-loop (np16101-np164452) | 41 |
| 3.3.4 Verarbeitung und Analyse der Sequenzdaten..... | 42 |
| 3.3.4.1 Alignment..... | 42 |
| 3.3.4.2 Phylogenetische Analyse..... | 42 |
| 3.3.5 Verarbeitung und Analyse der Daten aus der Typisierung des Oktarepeats. | 43 |
| 4 Ergebnisse..... | 44 |
| 4.1 Methodisches..... | 44 |
| 4.1.1 Sequenzierung der hypervariablen Regionen der mitochondrialen D-loop... | 44 |
| 4.1.1.1 Sequenzierung des Bereichs zwischen tRNA ^{Pro} und dem large CSB (HVR1)..... | 44 |
| 4.1.1.2 Sequenzierung des Bereichs zwischen np 15803 und 16101 (HVR2)..... | 45 |
| 4.1.2 Typisierung des mitochondrialen Oktarepeats..... | 45 |
| 4.2 Auswertung der Ergebnisse | 47 |
| 4.2.1 Auswertung und Vergleich der Ergebnisse der Sequenzierung von HVR1 und HVR2..... | 47 |
| 4.2.2 Auswertung mittels des Network-Programm-Pakets..... | 50 |
| 4.2.2.1 Erstellung und Interpretation eines Equiden-Netzwerks..... | 51 |
| 4.2.2.2 Erstellung und Interpretation eines Pferde-Netzwerks..... | 55 |
| 4.2.2.3 Geografische Analyse der Expansion..... | 58 |
| 5. Diskussion..... | 75 |
| 5.1 Methoden..... | 75 |
| 5.1.1 Sequenzierung der hypervariablen Regionen der mitochondrialen D-loop... | 75 |
| 5.1.2 Typisierung des repetitiven Bereichs der mitochondrialen D-loop..... | 76 |
| 5.2 Auswertung..... | 77 |
| 5.2.1 Auswertung durch Vergleich der Sequenzen in einem Alignment..... | 77 |
| 5.2.2 Phylogenetische Analyse..... | 78 |
| 5.2.3 Bestimmung der Mutationsrate und Koaleszenzzeiten..... | 79 |
| 5.2.4 Das Pferde-Netzwerk..... | 81 |
| 5.2.5 Geografische Analyse..... | 85 |
| 5.2.5.1 Sorraias und Koniks, Gruppe A1..... | 85 |
| 5.2.5.2 Die mongolischen Wildpferde als Stammform des Hauspferdes, Gruppe A2..... | 86 |
| 5.2.5.3 Der Ursprung der Mustangs, Gruppen A3 und D..... | 87 |
| 5.2.5.4 Eine genetisch heterogene Population: das arabische Pferd..... | 89 |
| 5.2.5.5 Ein nordischer Mikrohaplotyp? Die Gruppe C1..... | 90 |
| 5.2.5.6 Eine alte Warmblutzucht: der Senner, Gruppe G..... | 91 |
| 5.2.6 Interdisziplinäre Betrachtungen: Molekularbiologie, Populationsgenetik, Archäologie, Ethnologie und Ethologie. Welche Schlüsse sind möglich?..... | 92 |
| 6. Ausblick..... | 96 |
| 7. Zusammenfassung..... | 97 |
| 8. Literatur..... | 98 |
| 9. Anhang..... | 108 |
| 1. Anhang, Alignment von veröffentlichten Equidensequenzen..... | 108 |
| 2. Anhang, Tabelle der Sequenzdaten aller verwendeten Proben..... | 116 |
| 10. Danksagung..... | 180 |

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------------------------------|--|
| A | Adenin |
| bp | Basenpaar |
| C | Cytosin |
| ca. | cirka |
| cm | Zentimeter |
| dATP | Desoxyadenosin-5'-Triphosphat |
| dCTP | Desoxycytidin-5'-Triphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosin-5'-Triphosphat |
| dNTP | Desoxynukleosid-5'-Triphosphat |
| dTTP | Desoxythymidin-5'-Triphosphat |
| EDTA | 1,2-Diaminoethantetraessigsäure (Ethylendiaminotetraessigsäure) |
| g | Gravitationsbeschleunigung |
| G | Guanin |
| H ₂ O _{ster.} | Entionisiertes, steriles Wasser |
| HVR | Hypervariable Region |
| Jhdt. | Jahrhundert |
| kb | Kilobasen, 1000 bp |
| large CSB loop | grosser konservierter Sequenzblock in der mitochondrialen D- |
| Mio. | Millionen |
| min | Minute |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| μ | Mikro (10 ⁻⁶) |
| m | Milli (10 ⁻³) |
| n | Nano (10 ⁻⁹) |
| nDNA | nukleare DNA, im Zellkern lokalisierte DNA |
| np | Nukleotidposition |
| OD | Optische Dichte |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>S</u> ulfate) |

| | |
|------|---|
| sec | Sekunde |
| SSC | Standard-Saline-Citrat-Puffer |
| SSCP | Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (<i>single strand conformation polymorphism</i>) |
| T | Thymin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| U | Unit (Enzymeinheit) |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |

1. Einleitung

Die Entwicklung der Menschen hätte ohne Pferde mit Sicherheit einen anderen Verlauf genommen. Kein anderes Tier hat aufgrund seiner Eigenschaften, zunächst als Jagdbeute, dann als Zug-, Last- und Reittier sowie als domestizierter Nahrungslieferant, die zivilisatorische Entwicklung der Menschheit so beeinflusst, wie das Pferd (BOWLING, RUVINSKY, 2000^a). Es fungierte gewissermaßen als Zivilisationsmotor. Zeitpunkt und Ort der Domestikation des Pferdes ist immer noch umstritten (ANTHONNY ET AL., 1991, LEVINE, 1999¹). Selbst die Entwicklung der Equiden insgesamt ist immer noch Gegenstand akademischen Disputs, obwohl die Gattung Equus als die am besten studierte aller Gattungen gilt (MACFADDEN, 1992). Unbestritten ist lediglich, dass das Pferd vor 4000 Jahren bereits domestiziert war. Ein Streitwagengrab bei Sintašta, südlich des Urals gelegen, beweist dies (LEVINE, 1999²). Welchen Weg die einzelnen Pferdepopulationen seit ihrer Entstehung genommen haben, wann und wo sie domestiziert wurden und welches Schicksal sie seitdem ereilt hat, liegt immer noch im Dunkel der Geschichte verborgen.

Wir wissen tatsächlich viel weniger über die Geschichte der Pferde und der Pferderassen als im allgemeinen angenommen wird. Die Zuchtgeschichte der heutigen Zuchtrassen reicht kaum mehr als 300 Jahre zurück (NISSEN, 1998). Wie und nach welchen Maßgaben zuvor Zucht betrieben wurde, ist weitgehend unbekannt. Es ist lediglich überliefert, dass es den Begriff „Rasse“, wie wir ihn heute verstehen, nicht gab. Häufig werden Legenden herangezogen, um die Besonderheit der einen oder anderen Population hervorzuheben. Diese Legenden halten jedoch im allgemeinen der kritischen Überprüfung nicht stand (BOWLING ET AL., 2000, SCHÄFER, 1980). Wildpopulationen von Pferden finden in historischen Dokumenten kaum Erwähnung. Zumeist wurden sie, wenn überhaupt, nur in Nebensätzen in einer solchen Weise erwähnt, dass uns heute eine Identifikation des einen oder anderen Prototyps nicht möglich ist. Eine der wenigen Ausnahmen stellt hier vielleicht das Exmoor Pony dar, weil dokumentiert ist, dass bereits vor ca. 1000 Jahren wilde Pferde im Hochmoor von Exmoor lebten. Wilhelm der Eroberer erklärte Exmoor zum „Royal Forest“, was so viel wie königliches Jagdgebiet bedeutet. Es ist überliefert, dass bereits damals dort eine Ponypopulation lebte, die als Jagdbeute für den König reserviert war. Damit gehört das Exmoor Pony mit zu den historisch am weitesten zurückverfolgbaren Populationen oder Rassen überhaupt.

Heute hat das Pferd in vielen Ländern seine Rolle in der Landwirtschaft und als Kriegsmittel verloren. Es ist nur dem Pferdesport, der sich langsam entwickelnden sogenannten „sanften“ Land- und Waldwirtschaft und dem zunehmenden Bewusstsein für die Verantwortung zur Erhaltung des „genepools“ zu verdanken, dass heute in vielen Erhaltungs- und Zuchtbemühungen selten gewordene Populationen, Rassen oder Schläge vor dem Aussterben bewahrt werden. Auf der anderen Seite ist in manchen Ländern der Pferdesport zu einem erheblichen Wirtschaftsfaktor geworden. Als Beispiele seien hier die Vollblutzucht in England, die Warmblutzucht in Deutschland und insbesondere die Zucht des Quarter Horses in den USA aufgeführt. Im Jahr 2001 leben gemäß der FAOSTAT-Datenbank weltweit rund 58 Millionen Pferde (<http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>).

Fragestellung:

Ziel dieser Studie ist es, durch die Sequenzierung eines Bereichs des mitochondrialen D-loops die Hypothese der einzigen Domestikation des Pferdes in der eurasischen Steppe und die verwandtschaftlichen Beziehungen einzelner Rassen zu überprüfen. Dazu soll zunächst mittels des zuvor erwähnten Werkzeugs die verwandtschaftliche Beziehung der Populationen weitgehender aufgeklärt werden, als dies bisher gelang. Nach Überprüfung der bis jetzt veröffentlichten Mutationsraten des mitochondrialen D-loops soll der Entstehungszeitpunkt der aufzufindenden maternalen Linien bestimmt werden. Weiterhin soll durch Analyse der verfügbaren Angaben bezüglich des geographischen Ursprungs der einzelnen Individuen und der damit verbundenen Sequenzmuster untersucht werden, ob sich bestimmte Typen oder Rassen auf eine konkrete Region zurückführen lassen. Das Auffinden einer solchen Region würde für eine bodenständige Population sprechen und/oder auf ein Domestikationszentrum hinweisen.

2 Theoretisches und Grundlagen der Arbeit

2.1 Die Geschichte der Pferdezucht

2.1.1 Fossile Pferde

Die Geschichte der Pferde oder besser der Equiden ist in der Literatur nicht unumstritten (MACFADDEN, 1992, S. 12). Als letzter gemeinsamer Vorfahre aller Equiden wurde bis zum Jahr 2000 im allgemeinen *Equus simplicidens* angenommen (EISENMANN, 1992, AZZAROLI, 1995), wovon das bisher älteste Fossil in Idaho (Hagermann Quarry) gefunden und auf 3,7 Mio. Jahre datiert wurde. Manche Autoren nehmen jedoch die als Vorfahre von *E. simplicidens* angenommene Gattung *Dinohippus*, welche vor 8-5 Mio. Jahren lebte, als letzten gemeinsamen Vorfahren aller Equiden an (GROVES & RYDER, 2000). Es gilt als gesichert, dass sich alle Vorfahren der Equiden in Amerika entwickelt haben (MACFADDEN, 1992, S.12, FORSTEN, 1992, EISENMANN, 1992). Die weitere Entwicklung der Equiden ist immer noch Gegenstand der Diskussion. Bereits der Zeitraum, in dem die ersten Equiden über eine angenommene Landbrücke in der Beringstrasse nach Eurasien gelangt sind, wird von den einzelnen Autoren unterschiedlich festgelegt. Er reicht von 4 Mio. Jahren bis zu 2,5 Mio. Jahren. Erste caballine Fossilien wurden auf 1,3 - 1,9 Mio. Jahre datiert, sichere Datierungen wurden jedoch nur mit Fossilien, die 0,6 - 0,7 Mio. Jahre alt sind, erreicht (EISENMANN, 1992). Eine detaillierte Darstellung dieser Debatte würde den Rahmen dieser Schrift sprengen, daher sei auf den guten Überblick über die einzelnen Befunde, der sich in EISENMANN (1992) und FORSTEN (1992) findet, verwiesen.

Eine neuere Studie von EISENMANN & BAYLAC (2000) kommt im Gegensatz zu dem zuvor Beschriebenen durch eine Multivarianzanalyse von insgesamt 258 Schädeln zu dem Schluss, dass sich die modernen Equiden erst vor ca. 1,5 Mio. Jahre aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelten. Die erwähnte Studie liefert jedoch keine Antwort auf die Frage, wer der letzte gemeinsame Vorfahr aller Equiden war.

2.1.2 Prähistorische Funde

Bereits früheste humanoide Artefakte dokumentieren, dass Pferde bereits vor mehr als 35.000 Jahren eine wichtige Rolle in der Menschheitsentwicklung spielten. Höhlenzeichnungen an

vielen Orten, zum Beispiel in Les Combarelles, Frankreich (Alter ca. 100.000 Jahre) und Altamira, Spanien (Alter ca. 35.000 Jahre), dokumentieren dies in eindrucksvoller Weise. Dabei wurden die Zeichnungen in Les Combarelles wahrscheinlich von Neandertalern angefertigt. Die Pferdezeichnungen im Kontext mit anderen Spezies (z.B. Auerochsen und Wildschweine) in Altamira zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt das Pferd wahrscheinlich ausschließlich als Jagdwild diente (MACFADDEN, 1992, S. 1-3).

2.1.3 Spuren früher Domestikation

Gewöhnlich wird Domestikation als die kontrollierte Zucht von Pflanzen und Tieren aufgefasst. Nahezu jedes Tier kann eingefangen, gezähmt und als Haustier gehalten werden, was jedoch nicht mit Domestikation gleichzusetzen ist. Die kontrollierte Zucht, die Fähigkeit, eine lebende Population unter der Obhut des Menschen über mehrere Generationen aufrecht zu erhalten, ist wesentlicher Punkt der Domestikation und benötigt weitergehendes Wissen, als ein Tier einzufangen und zu zähmen (LEVINE, 1999¹).

Die früheste Geschichte der Domestikation des Pferdes ist bis heute Gegenstand der Forschung und noch nicht abschließend geklärt.

Manche Autoren beschreiben unter Berufung auf Arbeiten von d'Andrade aus den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts eine Domestikation des Pferdes in der mittleren Steinzeit auf der iberischen Halbinsel (OELKE, 1997). Diese Theorie beruht neben gefundenen Höhlenzeichnungen, die nicht exakt datierbar sind, im wesentlichen auf einem Artefakt, welches als Hellebarde interpretiert wurde, und steinzeitlichen Werkzeugen, die in nahezu unveränderter Form bis in die Neuzeit zur Herstellung von Seilen aus Pferdehaaren verwendet wurden (D'ANDRADE, 1973). Dennoch wird ein frühes Domestikationszentrum aus der Iberischen Halbinsel als archäologisch umstrittene Theorie aufgefasst (Levine, persönliche Mitteilung).

Siedlungsfunde in der Nähe von Derejevka (südliche Ukraine) wurden in mehreren Veröffentlichungen von Anthonny und Kollegen (z.B. ANTHONNY ET AL., 1991) als Beweis der frühesten Domestikation des Pferdes um 4000 v. Chr. beschrieben. Diese Darstellung wurde jedoch später widerlegt (LEVINE, 1999¹). Die Domestikation des Pferdes bei Derejevka um 4000 v. Chr. gilt heute als nicht sicher.

Der früheste, archäologisch unumstrittene Beweis für die Domestikation des Pferdes ist ein Streitwagengrab in Sintašta (in der Steppe südlich des Urals gelegen). Dieses Grab wurde auf ca. 2000 v.Chr. datiert (LEVINE; 1999¹). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass das Pferd bereits zuvor domestiziert wurde, um zunächst als Nahrungslieferant und Reittier zu dienen.

Das domestizierte Pferd erreichte Ägypten gegen Ende der Hyksos Dynastie (ca. 1580 v.Chr.). Überlieferungen beschreiben es als seltenes Tier (BOWLING, RUVINSKY, 2000^a). Dennoch wird die russische Steppe noch für lange Zeit als ein wichtiges Zentrum für die Pferdezucht angesehen. Einen Hinweis hierfür mag Philipp von Mazedonien, der Vater von Alexander dem Grossen liefern: Er importierte Tausende von Pferden aus dem skythischen Reich, das im Gebiet des heutigen Rumäniens, der Ukraine und Südrusslands lag (CLUTTON-BROCK, 1987).

2.1.4 Die Stammform des Hauspferdes

Der Exkurs über die Geschichte des Pferdes wäre ohne eine Diskussion, welches Urfeld die Stammform gewesen sein mag, nicht vollständig.

Es ist heute eine Wildform des Pferdes bekannt: das heute noch in zoologischen Gärten und in zwei Auswilderungsprojekten in der Mongolei existierende mongolische Wildpferd, auch Przewalski-Pferd und in der Mongolei Takh genannt, *Equus ferus przewalskii* (OAKENFULL & RYDER, 1998). Es werden in der Literatur weitere Wildformen diskutiert, z.B. der Tarpan, *Equus ferus ferus* (GROVES & RYDER, 2000), dessen Status als Urform jedoch nicht unumstritten ist. Häufig werden unter Berufung auf die Arbeiten von Ebhardt 4 Typen diskutiert (z.B. OELKE, 1997), die jeweils auf eine Urform zurückzuführen sind: Typ I, das Pony, als dessen Repräsentant häufig das Exmoor Pony betrachtet wird; Typ II, das schwere - oder Tundrenpferd, als dessen Repräsentant das Mongolische Wildpferd zu betrachten ist; Typ III das Ramskopfpferd („Ur-Warmblüter“), heutiger Repräsentant ist z.B. der Lusitano; Typ IV, der Protoaraber (Primitivaraber, „Ur-Vollblüter“), als heute lebender Vertreter kann das kaspische Pferd oder auch der Achal Tekkiner betrachtet werden. Andere Autoren (z.B. NOBIS, 1992) lehnen diese Hypothese als wissenschaftlich nicht haltbar ab, weil sie archäologisch als nicht beweisbar gilt.

Neuere Untersuchungen schließen das Mongolische Wildpferd als Stammform des Hauspferdes weitgehend aus. Die Argumentation fußt zum einen auf dem unterschiedlichen Karyotyp (GROVES & RYDER, 2000): Während das Mongolische Wildpferd 66

Chromosomen besitzt, weist das Hauspferd nur 64 Chromosomen auf. Zum anderen fußt die Argumentation gegen das Mongolische Wildpferd als Stammform des Hauspferdes auf einer phylogenetischen Untersuchung mittels Sequenzierung mitochondrialer DNA (ISHIDA ET AL., 1995). Ergebnis dieser Studie ist, dass das gefundene Sequenzmuster nicht ancestral zu allen modernen Pferden sein kann. Neuere Studien, wie z.B. auch diese Schrift, bestätigen den Befund. Es gibt noch weitere, ethologische Hinweise. Zwar wissen wir nichts über das Verhalten der in 2.1.3 beschriebenen verschiedenen Wildpferd-Formen, aber es gibt eine inzwischen hundertjährige Erfahrung mit mongolischen Wildpferden in Gefangenschaft. In ihrer Zähmbarkeit ähneln die Mongolischen Wildpferde dem Zebra (BOWLING & RUVINSKY, 2000^a). In diesem Licht erscheint die Annahme des Mongolischen Wildpferdes als Stammform des Hauspferdes als unwahrscheinlich.

Heute leben ca. 1100 mongolische Wildpferde, die von 13 Individuen abstammen, jedoch überlebte nicht jede Linie dieser Gründertiere bis in die heutige Zeit (OAKENFULL & RYDER, 1998).

2.1.5 Rassen

2.1.5.1 Begriffsdefinition

Nissen definiert den Rassebegriff wie folgt: „Mit dem Begriff der ‚Rasse‘ bezeichnen wir alle Tiere einer Art, die sich durch gleiche Erbanlagen und damit Entwicklung gleicher Eigenschaften unter ähnlichen Milieubedingungen von dem Rest der Art unterscheiden und sich aufgrund dieser Erbanlagen zu einer Population zusammenfassen lassen. Rassen entstehen durch Selektion in eine bestimmte Richtung und durch isolierte Vermehrung. Es ist eine Sache der Übereinkunft, des Herkommens, der Zweckmäßigkeit, manchmal auch Zufall oder Willkür, nach welchen Kriterien man Tiere der selben Art unter einem Rassebegriff zusammenfaßt. Derartige Zusammenfassungen können erfolgen nach ökologischen oder morphologischen Merkmalen, nach bestimmten Rassekennzeichen, wie zum Beispiel Farben, nach dem Verbreitungsgebiet zu Lokalrassen oder zu sogenannten geographischen Rassen, nach physiologischen Fähigkeiten, nach Leistungsanlagen oder nach Abstammung, in der Regel nach mehreren Kriterien.“ (NISSEN, 1998, S. 9)

Man kann aus dieser Passage den Eindruck gewinnen, dass „Rasse“ ein ausschließlich durch menschliche Definition zustande kommender Begriff ist. Dieser Eindruck besteht aber nur im

Deutschen Sprachgebrauch. Dem Deutschen Wort „Rasse“ stehen im angelsächsischen Sprachraum die Begriffe „breed“ für Zuchtrasse und „race“ für Rasse allgemein, eher in Bezug auf natürliche Rasse, also Subspezies verwendet, gegenüber. Zur Vermeidung von Mißverständnissen sollte man die Begriffe „Zuchtrasse“ und „Subspezies“ bzw. „Unterart“ verwenden. Schließlich sind auch natürliche Rassen bekannt, als ein Beispiel soll hier das Steppenzebra (*Equus burchelli*) mit seinen insgesamt sieben Unterarten erwähnt werden, die sich nur im Grenzbereich ihrer jeweiligen Verbreitungsgebiete kreuzen.

In diesem Zusammenhang sei noch kurz der Begriff „Art“ erläutert:

Das biologische Spezies Konzept von MAYR (1942) besagt, dass unterschiedliche Arten sich unter natürlichen Bedingungen nicht kreuzen. Dies kann sich zum einen darin bedingen, dass die Nachkommen einer solchen Paarung steril sind, zum anderen jedoch auch, dass das Paarungsverhalten so unterschiedlich ist, dass es unter natürlichen Bedingungen nicht zu einer Kopulation kommen kann. Häufig wird die Fertilität der Nachkommen als Indikator herangezogen. Dieses kann nach dem Mayr'schen Konzept zwar als hinreichender, aber nicht als notwendiger Beweis dienen, ob es sich um Angehörige eine Art handelt oder nicht. Wesentlicher Bestandteil des Konzepts ist die Voraussetzung der natürlichen Umweltbedingungen (GROVES & RYDER 2000). Bei einer Verpaarung von zwei Individuen in Gefangenschaft liegen diese selbstverständlich nicht vor.

2.1.5.2 Heute lebende Pferderassen (Zuchtrassen sowie Unterarten)

Die dokumentierte Geschichte der einzelnen modernen Zuchtrassen reicht nicht weit zurück. In Europa herrschte bis in das 17. Jahrhundert hinein weitgehend nicht-selektive Kreuzungszucht vor (NISSEN, 1998). Erst mit dem Einsetzen der Industrialisierung und der darauf folgenden Landflucht wurden tierzüchterische Methoden entwickelt, die auf ein vorhersehbares, rationell produzierbares Tier abzielten. Einer der ersten Züchter, die gegen Ende des 18. Jahrhunderts nach modernen Methoden vorgingen, also Analyse der Abstammung und Bewertung der Vorfahren sowie Inzucht zur Erzeugung des gewünschten Phänotyps, war Robert Blackwell aus Dishley in Leicestershire. Unter anderem legte er den Grundstein für die Rasse der Shire Horses. In dieser Zeit wurde auch das General Stud Book, das Stutbuch der Englischen Vollblüter gegründet (NISSEN, ebd.), welches eines der ältesten Stutbücher ist. Pferderassen nach heutiger Definition existieren also erst seit ca. 200 - 250 Jahren. Die Ursprungspopulationen der einzelnen Rassen liegen im Dunkel der Geschichte.

Zwar existieren einige Rassen, denen nachgesagt wird, sie entstammten der Urpopulation der jeweiligen Gegend, dieses ist im Einzelfall jedoch nicht immer haltbar. Im allgemeinen geht man aber von bodenständigen Stuten als Basis für die jeweilige Rasse aus.

Nachfolgend sollen nun die wichtigsten der in dieser Studie untersuchten Pferderassen vorgestellt werden:

2.1.5.2.1 Andalusier und Lusitanos

Andalusier und Lusitanos sind das klassische Beispiel für moderne Pferderassen. Zwar ist überliefert, dass seit 149 v.Chr. die iberische Halbinsel ein Hochzuchtgebiet für Pferde ist (EDWARDS, 1999), der Name für die gezüchteten Tiere war jedoch über Jahrhunderte hinweg „iberisches Pferd“. Andalusier und Lusitano gehören eigentlich derselben Rasse an wie z.B. Kartäuser, Alter Real, Zapatero usw., sie repräsentieren lediglich regionale Schläge. Der Ursprung der Pferde ist unklar. Manche Autoren stellen das Berberpferd als Vorfahre der iberischen Pferde dar (EDWARDS, 1999), andere hingegen beschreiben das Sorraia Pferd als Vorfahr (KAPITZKE, 1993). Dritte behaupten wiederum unter Berufung auf islamische Chronisten, dass die iberischen Pferde bis zur Neuzeit so gut wie überhaupt keinen Einfluss von Berber- oder Araberpferden hatten und der Einfluss eher in entgegengesetzter Richtung verlief (SCHÄFER, 1980). Sicher ist, dass in vielen modernen Pferderassen „iberisches Blut fließt“, als Beispiel seien die Lippizaner erwähnt. Die einzelnen Zuchtlinien der Andalusier sind heute in unterschiedlichem Umfang vom arabischen Pferd beeinflusst. Die Zuchtzentren liegen heute immer noch in Andalusien bzw. in Portugal.

2.1.5.2.2 Das arabische Pferd

Das arabische Pferd gilt als eine der ältesten Reinzuchtrassen der Welt. Die mütterliche Linie mancher Stute soll durch mündliche Überlieferung bis in Mohammeds Zeit (um 600 n. Chr.) zurückverfolgbar sein. Dokumentiert wurden die mütterlichen Linien jedoch erst in der Neuzeit. Der Legende nach sollen die fünf besten Stuten aus dem Besitz des Propheten den Grundstein der edelsten Stammlinien bilden. Diese Verknüpfung von religiösem Glauben und historischer Überlieferung lässt jedoch den Wahrheitsgehalt in Zweifel ziehen. Eine Studie von BOWLING ET AL. (2000) zeigte, dass Tiere, bei denen eine gemeinsame maternale Linie überliefert ist, einen unterschiedlichen Mikrohaplotypen in der mitochondrialen D-loop (vgl. 2.3.3) aufweisen. Dies zeigt, dass die mündlichen Überlieferungen über die mütterliche

Linie der einzelnen Pferde tatsächlich unzuverlässig ist. Sicher ist, dass seit Jahrhunderten Pferde von den auf der arabischen Halbinsel ansässigen Beduinenstämmen gezüchtet werden (KAPITZKE, 1993). Weiterhin wurde bereits oben ausgeführt, dass die ersten Pferde um 1.600 v.Chr. Ägypten erreichten, also zuvor den vorderen Orient passiert haben müssen. ANTHONY ET AL. (1991) postulieren, dass die ersten domestizierten Pferde aus der südrussischen Steppe dorthin gerieten. Somit könnte man auch nicht ohne Berechtigung vermuten, dass das Araberpferd gemeinsame Vorfahren mit dem Achal-Tekkiner oder dem kaspischen Pferd hat. Wenn auch diese verwandtschaftliche Beziehung möglicherweise in vorgeschichtlicher Zeit liegt. Der Araber wird heute weltweit mehr oder weniger reinrassig gezüchtet, verschiedene Zuchtlinien sind Anglo-Araber, Asil-Araber, Shagya-Araber und Vollblutaraber.

2.1.5.2.3 Das Berberpferd

Diese Rasse wird ebenfalls im allgemeinen als sehr alt beschrieben. Es ist sicher, dass eine vom arabischen Pferd deutlich unterscheidbare Zuchtrasse zur Zeit der islamischen Eroberungszüge im 7. und 8. Jahrhundert in Nordafrika existierte. Kaum mehr ist überliefert. Häufig wird der Einfluss von Berberpferden auf die iberischen Pferderassen und das englische Vollblut dargestellt (z.B. EDWARDS, 1999). Die Zuchtzentren dieser Rasse liegen immer noch im Ursprungsgebiet, Algerien, Marokko und Tunesien.

2.1.5.2.4 Das Dülmener Pferd

Das Dülmener Pferd aus dem Merfelder Bruch, der seit dem 19. Jhdt. im Besitz der Herzöge von Croy ist, gilt als bodenständige Rasse. Zwar ist der Ursprung der Population nicht gesichert, der Bestand aber seit über 600 Jahren dokumentiert. Zur Vermeidung von zu starker Inzucht wurden früher Exmoor-Hengste eingekreuzt, auch ist ein iberischer Einfluss dokumentiert. Seit mindestens 30 Jahren werden Konik-Hengste zur Zucht verwendet (BRUNS, 1970; ZEEB, 1965).

2.1.5.2.5 Das Exmoor Pony

Das Exmoor Pony, eine in Südwestengland beheimatete Population, hat mit Sicherheit eine sehr alte Geschichte. Arbeiten von J. und M. Speed um 1950 zeigten, dass 120.000 Jahre alte Knochenfunde in der Nähe von Brighton kaum von den Knochen moderner Exmoor Ponies

unterscheidbar sind. Jüngere Funde aus Alaska, die auf ein Alter von etwa 27.000 Jahren datiert wurden, waren sogar identisch (BAKER, 1993). Aus diesem Grund wird das Exmoor Pony häufig als Primitivpferd im Sinne einer Urform des Pferdes beschrieben. Inwiefern Exmoor Ponies in der Antike durch iberische Pferde beeinflusst wurden, ist nicht mehr nachvollziehbar, da nicht bekannt ist, welche keltischen Stämme, wann und woher kommend, in Britannien eingewandert sind. Sicher ist nur, dass der Stamm der Brigantier ursprünglich von der iberischen Halbinsel stammte und von dort her einen Teil der Vorfahren der Welsh Ponies mitbrachte (NISSEN, 1998). Wilhelm der Eroberer erklärte Exmoor zum „Royal Forest“, was königliches Jagdgebiet bedeutet. Dieser Status blieb bis 1818 erhalten, als das britische Königshaus das Gebiet mit den Tieren verkaufte. Somit ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass die Exmoor Ponies bis zu diesem Zeitpunkt von anderen Rassen wenig beeinflusst blieben. Was danach geschah ist nicht genau bekannt. Man weiss nur, dass die Ponies, die vom letzten Forstmeister, Sir Thomas Acland, gekauft wurden, zur Erhaltung der Rasse in einer Reinzucht gehalten wurden. Diese Tiere stellen die wesentliche Basis der modernen Exmoor-Ponies dar. Wie stark die gesamte Population von anderen Rassen beeinflusst wurde, ist unbekannt. Bemerkenswert ist der fast völlige Zusammenbruch der Population zum Ende des zweiten Weltkrieges. Ein Teil der Tiere wurde aufgrund der schlechten Nahrungsversorgung der Bevölkerung gestohlen und geschlachtet, ein anderer Teil wurde von den alliierten Truppen als lebendige Zielscheibe verwendet und zu Übungszwecken vor der Invasion in die Normandie abgeschossen. Nach dem Ende des Krieges wurden noch 50 Tiere gezählt. Alle heute lebenden Exmoor Ponies gehen auf diese 50 Tiere zurück (BAKER ET AL., 1998). Heute leben in Exmoor Forest ca. 200 Tiere.

2.1.5.2.6 Das Fjord Pferd

Diese nordische Ponyrasse stammt aus dem norwegischen „Vestland“, also Westnorwegen, das vom 15. bis ins 19. Jhd. das Hochzuchtgebiet Norwegens war. Der Ursprung dieser Rasse ist nicht genau bekannt, es wird jedoch allgemein angenommen, dass sie auf eine bodenständige Population zurückgeht, wenn auch iberische Einflüsse bekannt sind. Die erste planmäßige Zucht begann zum Beginn des 19. Jahrhunderts (NISSEN, 1998).

2.1.5.2.7 Das Friesische Pferd

Das Friesische Pferd stammt vermutlich von einem bodenständigen, schweren Schlag des im Mittelalter in Deutschland weit verbreiteten inländischen Pferdes ab. Im 15. und 16. Jhdt. wurden „orientalische“ Pferde eingekreuzt. Zum Anfang des 20. Jahrhunderts ist die Rasse wegen des mangelnden Bedarfs an schwereren Arbeitspferden fast ausgestorben. Eine relativ kleine Gruppe niederländischer Bauern, die noch Friesische Pferde besaßen, gründeten 1913 einen Zuchtverband und bauten die Zucht mit Oldenburger Hengsten wieder auf (SILVER, 1989, NISSEN, 1997).

2.1.5.2.8 Das Highland Pony

Vermutlich hat diese Rasse den gleichen Ursprung wie das Exmoor-Pony. Jedoch wurden die Highland Ponies seit dem Mittelalter intensiv gezüchtet. Es ist bekannt, dass iberische Pferde eingekreuzt wurden. 1923 wurde die Highland Pony Society gegründet, die seither für eine planmäßige Zucht sorgt (NISSEN, 1998).

2.1.5.2.9 Der Holsteiner

Die Rasse geht auf eine mittelalterliche bodenständige Warmblutzucht zurück. Im 16. und 17. Jhdt. wurden im verstärkten Maße iberische und neapolitanische Pferde eingekreuzt, im 19. Jhdt. zur „Veredelung“ englische Vollblüter. Holsteiner Hengste wurden und werden als Beschäler in vielen anderen Warmblutrassen eingesetzt (KAPITZKE, 1993).

2.1.5.2.10 Das Island Pony

Island wurde im 9. Jhdt. von Wikingern aus dem Gebiet des heutigen Norwegens in Besitz genommen, die zum ersten mal Pferde dorthin brachten. Der genaue Ursprung dieser Ponies ist unklar, jedoch wird angenommen, dass sie größtenteils vom nordischen Ponytyp waren. Es ist bekannt, dass in früheren Jahrhunderten Pferde anderer Rassen nach Island verbracht wurden, seit 1909 besteht jedoch ein generelles Importverbot für Pferde nach Island. (NISSEN, 1998).

2.1.5.2.11 Das Kaspische Pferd

Bereits in Mesopotamien wurden kleine, schlanke Pferde vom Typ des Kaspischen Pferdes verwendet. Es wird manchmal als „Ur-Araber“ bezeichnet, steht aber auf jeden Fall im Typ dem Arabischen Pferd sehr nahe. Die Rasse galt lange Zeit als ausgestorben, bis in den 60'er Jahren des 20. Jahrhunderts einige kleine Pferde in Dörfern am Kaspischen Meer von L. L. Firouz entdeckt wurden, die die Basis der heutigen Zucht von Kaspischen Pferden bildeten (EDWARDS, 1999, NISSEN, 1973, SILVER, 1989).

2.1.5.2.12 Der Konik

Der Name Konik wird sehr häufig zusammen mit dem Namen Tarpan erwähnt (NISSEN, 1973, KAPITZKE, 1993, EDWARDS, 1999). Die Rasse gilt allgemein als domestizierter Nachfahre des Tarpans und wird daher auch manchmal als Primitivpferd, also eine wenig durchgezüchtete Rasse mit atavistischen Merkmalen, beschrieben. Die moderne Geschichte des Koniks begann 1780, als die letzten in Polen lebenden Tarpane eingefangen und in einem Wildpark bei Bilgoraj (Südpolen) angesiedelt wurden. In Polen wurden zu dieser Zeit sowohl die Tarpane als auch der dort vorhandene Landschlag "Konijk", was soviel wie Pferdchen heißt, genannt. 1806 waren jedoch die Mittel des Wildparkbesitzers erschöpft und die Pferde wurden an die umliegenden Bauernhöfe verschenkt. Die nachfolgenden Generationen behielten jedoch das Erscheinungsbild weitgehend bei. Der Grund dafür ist darin zu suchen, dass der Landstrich um Bilgoraj recht abgeschieden liegt und der dort vorhandene Landschlag ohnehin vom Tarpan geprägt gewesen sein soll (NISSEN, 1999, <http://www.pferdezeitung.de/Rassen/33/Gesamttext>). Es leben heute ca. 1400 Koniks in Europa. Der größte Bestand existiert in Polen (ca. 700 Tiere).

2.1.5.2.13 Der Mustang

Pferde waren auf dem amerikanischen Kontinent zum Ende der letzten Eiszeit ausgestorben. Die Mustangs stammen von entlaufenen Hauspferden ab, die seit dem 16. Jahrhundert von Europäern nach Amerika gebracht wurden. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gab es ca. 1 Mio. Mustangs. In den folgenden Jahrzehnten wurde der Bestand für die Produktion von Nahrung für Mensch und Tier so drastisch dezimiert, dass die Mustangs im Dezember 1971 durch ein Gesetz als „lebende Symbole des historischen und Pioniergeistes des (amerikanischen) Westens“ unter Schutz gestellt wurden. Der heutige Bestand ist relativ stabil und wird in

verschiedenen sogenannten Herd Management Areas verwaltet. Es gibt auch private Zuchtbemühungen, die bestimmte Phänotypen erhalten wollen (OELKE, 1997).

2.1.5.2.14 Der Noriker

Diese Rasse soll auf das schwere römische Kavalleriepferd zurückgehen, dass unter anderem in der Provinz Noricum, im heutigen Österreich gezüchtet wurde. Schwere Pferde sind für diese Region seit der Zeit Karls des Großen dokumentiert. Im 16. Und 17. Jhdt. wurde die Rasse durch Einkreuzung iberisch beeinflusster Rassen, Neapolitaner, Kladruber, „veredelt“. Noriker spielen auch heute noch als Rückepferde eine wesentliche Rolle in der Waldwirtschaft im Gebirge (KAPITZKE; 1993).

2.1.5.2.15 Der Oldenburger

Im Ursprung ähnelt der Oldenburger dem Holsteiner. Die alte bodenständige Warmblutzucht aus dem Oldenburger Land wurde im 17. Jhdt. aus bodenständigen Pferden durch Einkreuzung von Neapolitanern, iberischen – und „orientalischen“ Pferden zum Kutschpferd entwickelt. Seit den 60´er Jahren des 20. Jahrhunderts erfuhr die Rasse durch Einkreuzung unterschiedlicher, leichterer Rassen eine Umzüchtung zum leichteren Reitpferd (KAPITZKE, 1993)

2.1.5.2.16 Das Rheinisch-Deutsche Kaltblut

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurde diese Rasse aus bodenständigen Stuten und belgischen Kaltbluthengsten entwickelt. Das 1839 gegründete Landgestüt Wickrath (heute ein Stadtteil von Mönchengladbach) war das wichtigste Zuchtzentrum. Aufgrund des mangelnden Bedarfs an schweren Arbeitspferden ist der Bestand auf wenige Tiere zusammengeschrumpft (KAPITZKE, 1993, SILVER, 1989).

2.1.5.2.17 Der Rottaler

Diese Warmblutrassen wurde im 18. Jhdt. aus bodenständigen Stuten, deren Ursprünge auf das 10. Jhdt. zurückgehen sollen, und Deckhengsten aus der Normandie, Zweibrücken, England und Oldenburg-Ostfriesland begründet. 1906 wurde der Rottaler Warmblutpferdezuchtverein gegründet, der die Zuchtrichtlinien für diese Rasse festlegte. Nach dem 2. Weltkrieg wurde

beschlossen, die Bayerische Warmblutzucht auf der Basis von Hannoveranern neu aufzubauen, wodurch die Rottaler durch Verdrängungszucht fast völlig verschwanden. Erst 1994 wurde eine Erhaltungszucht für diese vom Aussterben bedrohte Rasse begründet (SCHERLING, 1995; NISSEN, 1997).

2.1.5.2.18 Das Shetland Pony

Der Ursprung dieser Rasse ist unklar, jedoch ist belegt, dass die Wikinger, als sie die Shetland-Inseln eroberten, dort ungewöhnlich kleine Pferde vorfanden. Die Rasse wurde nicht rein erhalten. Es ist überliefert, dass bereits um 850 Lofoten-Ponies eingekreuzt wurden. Auch sind Kreuzungsversuche mit Fjord-Hengsten, Mustangs und Arabern bekannt. 1890 wurde mit der Gründung der Shetland Pony Stud Book Society die Kreuzungszucht durch Reinzucht der Rasse ersetzt (NISSEN, 1998).

2.1.5.2.19 Das Shire Horse

Shire Horses werden heute weltweit gezüchtet, größtes Renommee haben immer noch die Pferde aus Großbritannien. Diese Rasse sei hier stellvertretend für die vielen Kaltblutrasen etwas ausführlicher vorgestellt. Der genaue Ursprung des Shire Horse ist unbekannt. Es soll allerdings unter anderem friesische Stuten als Vorfahren haben. Es ist sicher, dass schwere Pferde bereits in der Antike Verwendung fanden. Schon die Römer benötigten schwere Pferde, um die gepanzerten Reiter zu tragen und Streitwagen über raues Gelände zu ziehen. Es ist überliefert, dass römische Hilfstruppen, die aus Friesen bestanden, ihre schweren Pferde nach Britannien mitgebracht haben sollen (NISSEN, 1998). Sicher ist, dass nach dem Ende der Punischen Kriege (149 v. Chr.) die iberische Halbinsel zum Zentrum der Zucht von römischen Kavalleriepferden wurde (EDWARDS, 1999). Da die Römer über Jahrhunderte die britische Hauptinsel besetzt hielten, ist die Vermutung naheliegend, dass zum einen Pferde iberischen Ursprungs nach Britannien gerieten und zum anderen nach der römischen Besatzung Pferde aus römischen Beständen in Britannien verblieben. Auch dürften durch die Invasionen der Angeln, Sachsen, Jüten und Normannen im Mittelalter weitere schwere Pferde auf die britische Hauptinsel gebracht worden sein. Archäologische Funde deuten jedoch drauf hin, dass bereits vor der Domestikation ein schwerer Pferdetyp auf den britischen Inseln heimisch war (NISSEN, 1998). Andererseits wird in der römischen Literatur das Pferd der britischen Kelten als Pony beschrieben (NISSEN, 1998). Die (Früh-) Geschichte legt also die

Vermutung nahe, dass das Shire Horse zumindest von Rassen aus anderen Gegenden der Welt beeinflusst wurde.

2.1.5.2.20 Der Senner

Dokumente aus dem Mittelalter weisen nach, dass bereits im 12. Jahrhundert im Gebiet der Senne (Ostwestfalen) grosse Pferdeherden lebten. Auch ist eine intensive Pferdezucht im Mittelalter überliefert. Seit dem 10. Jahrhundert ist das Gebiet der Senne im Besitz der Herren zur Lippe. Aus der Zucht der in diesem Gebiet lebenden Tiere stammen alle heute lebenden Senner ab. Bis zum 17. Jahrhundert wurden iberische Hengste eingekreuzt, danach vorwiegend arabische Vollbluthengste und seit Ende des 18. Jahrhunderts englische Vollbluthengste. Das Stutbuch ist seit dem Anfang des 17. Jahrhunderts geschlossen (M. Vogt, persönliche Mitteilung). Alle heute existierenden Senner gehen auf die Stammstute David (geb.: 1725) zurück (VOGT, 1995; NISSEN, 1997).

2.1.5.2.21 Das Sorraia Pferd

Der Ursprung dieser Rasse ist umstritten. Während einige Autoren sie als verwilderte Hauspferde auffassen (NOBIS, 1992), beschreiben sie andere Autoren als Primitivpferde, deren wilde Vorfahren die Entwicklung der iberischen Reitpferde maßgeblich beeinflusst haben (D'ANDRADE, 1945; LOCH, 1986). Die Sorrais gehen auf 11 Pferde (7 Stuten, 4 Hengste) zurück, die um 1930 von Ruy d'Andrade im Gebiet am Fluss Sorraia, daher der Name, gekauft wurden. Diese gekauften Tiere glichen den Individuen einer phänotypisch deutlich von iberischen Zuchtpferden unterscheidbaren Wildpopulation, die 10 Jahre zuvor von d'Andrade nahe Corouche beobachtet wurden. Die Zahl der Pferde dieser Rasse ist gering, etwa 200 Tiere, weswegen die Rasse als bedroht betrachtet werden muss (OELKE, 1997). Fast alle heute lebenden Sorrais befinden sich im Besitz privater Züchter. Zwei der wenigen Ausnahmen sind das portugiesische Nationalgestüt und der Tierpark in Springe.

2.1.5.2.22 Der Trakehner

Die ursprünglich Ostpreußische Rasse geht auf die alte Landrasse des Schweikens zurück. Dem Schweiken wird nachgesagt, unmittelbar vom Tarpan abzustammen. Jedoch ist auch bekannt, dass Pferde anderer Rassen die Basis der Zucht mit begründeten. Starker Einfluss von „orientalischen Pferden“ und englischen Vollblütern zur Veredelung der Rasse ist

dokumentiert. Das spätere Hauptgestüt Trakehnen wurde 1732 von Friedrich Wilhelm I. gegründet und im 2. Weltkrieg zerstört. Es gelang ca. 1000 Tiere nach Westdeutschland zu verbringen, die die Basis der heutigen Trakehnerzucht bildeten (KAPITZKE, 1993).

2.1.5.2.23 Das Welsh Pony

Das Welsh Pony zählt zu den ältesten Zuchtrassen. Möglicherweise entstand der Typ durch Einkreuzung von iberischen Pferden in der späten Bronze- oder frühen Eisenzeit durch die Brigantier. Es gilt als ziemlich sicher, dass während der römischen Besetzung Britanniens ein Gestüt am Lake Bala in Merionethshire eingerichtet wurde. Die Zucht von Ponies in Wales ist seit dem Mittelalter dokumentiert. Ebenso ist dokumentiert, dass die Rasse bis in das frühe 19. Jhd. von „orientalischen“- und Vollblutpferden beeinflusst wurde (NISSEN, 1998)

2.2 Mitochondrien

2.2.1 Allgemeines und Funktion

Die Mitochondrien sind mit einer Doppelmembran umgebene Organellen aerober, eukaryotischer Zellen. In der Matrix der Mitochondrien sind die Enzyme des Citrat-Zyklus, des Fettsäureabbaus durch β -Oxidation, Teile des Harnstoffzyklus und des Abbaus einiger Aminosäuren lokalisiert. Der Matrixraum ist durch mehrfach eingestülpte Membranen (Cristae) unterteilt. In der Membran befinden sich die Enzymkomplexe der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung), des ATP-Systems und die Transportsysteme für ATP, ADP, Phosphat und verschiedene Substrate. Aufgabe der Mitochondrien ist die Energiegewinnung. In ihnen wird der größte Teil des allgemeinen Energieäquivalents ATP synthetisiert.

Die oxidative Phosphorylierung umfaßt fünf kompliziert zusammengesetzte Enzymkomplexe:

- Komplex 1 (NADH:Ubichinon-Oxidoreductase)
- Komplex 2 (Succinat:Ubichinon-Oxidoreductase)
- Komplex 3 (Ubichinol:Cytochrom c-Oxidoreductase)
- Komplex 4 (Cytochrom c-Oxidase)
- Komplex 5 (ATP-Synthase)

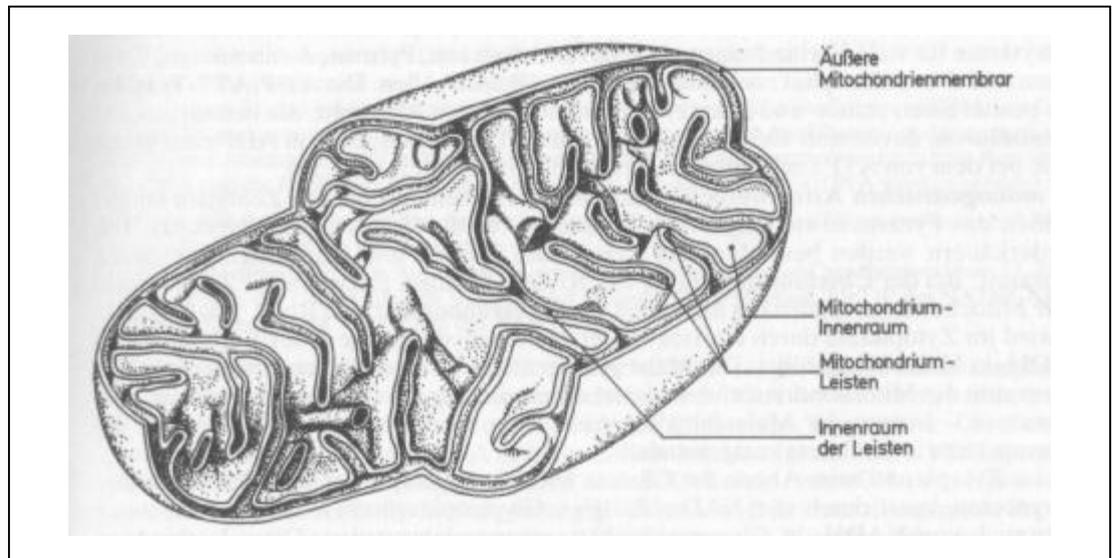


Abb. 2.1: Schema des Aufbaus eines Mitochondriums mit seinen Cristae, aus: Schenck & Kolb (1990), S. 33

Auf diesem Stoffwechselweg wird diejenige Energie nutzbar gemacht, die während des Elektronentransports bei der Oxidation der Fettsäuren und Zucker geliefert wird. Die Kette umfaßt die Komplexe 1 bis 4. Die gewonnene Energie wird zum Komplex 5 transportiert, um ATP zu synthetisieren. Mitochondriales ATP wird mit Hilfe des Adenin-Nucleotid-Translocators (ANT) gegen cytosolisches ADP ausgetauscht.

Die meisten Zelltypen enthalten bis zu 10.000 Mitochondrien. Eine Ausnahme sind die Spermien, die nur bis zu 100 enthalten. Letzteres ist der eigentliche Grund dafür, daß von mitochondrialen Genen codierte Merkmale maternal vererbt werden: dringt bei der Befruchtung ein Spermium in eine Eizelle ein, so spielt zahlenmäßig die Mitochondrienausstattung des Spermiums keine Rolle. Darüber hinaus werden die paternalen Mitochondrien nach der Befruchtung der Eizelle durch spezifische Mechanismen abgebaut (KANEDA, 1995).

2.2.2 Mitochondriale DNA

Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom, das sich in Form eines ringförmig geschlossenen DNA-Moleküls darstellt. Die Größe des Moleküls unterscheidet sich bei den verschiedenen Organismen deutlich: während der DNA-Strang bei Hefen sehr groß ist, z.B. bei *Saccharomyces cerevisiae*, der Bierhefe, 84 kb, ist das DNA-Molekül bei Säugern relativ klein (um 16 kb). Das Mitochondriengenom ist inzwischen bei vielen Spezies komplett sequenziert. Bekannt sind auch die Sequenzen des menschlichen Mitochondriengenoms (ANDERSON ET

AL., 1981) und die des Pferdes (XU & ARNASON, 1994). Die mtDNA codiert für eine 12S- und eine 16S-rRNA, 22 tRNAs und 13 Polypeptide. Alle Polypeptide sind Komponenten der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Das heisst, die meisten Gene dienen der Energieversorgung der Zelle.

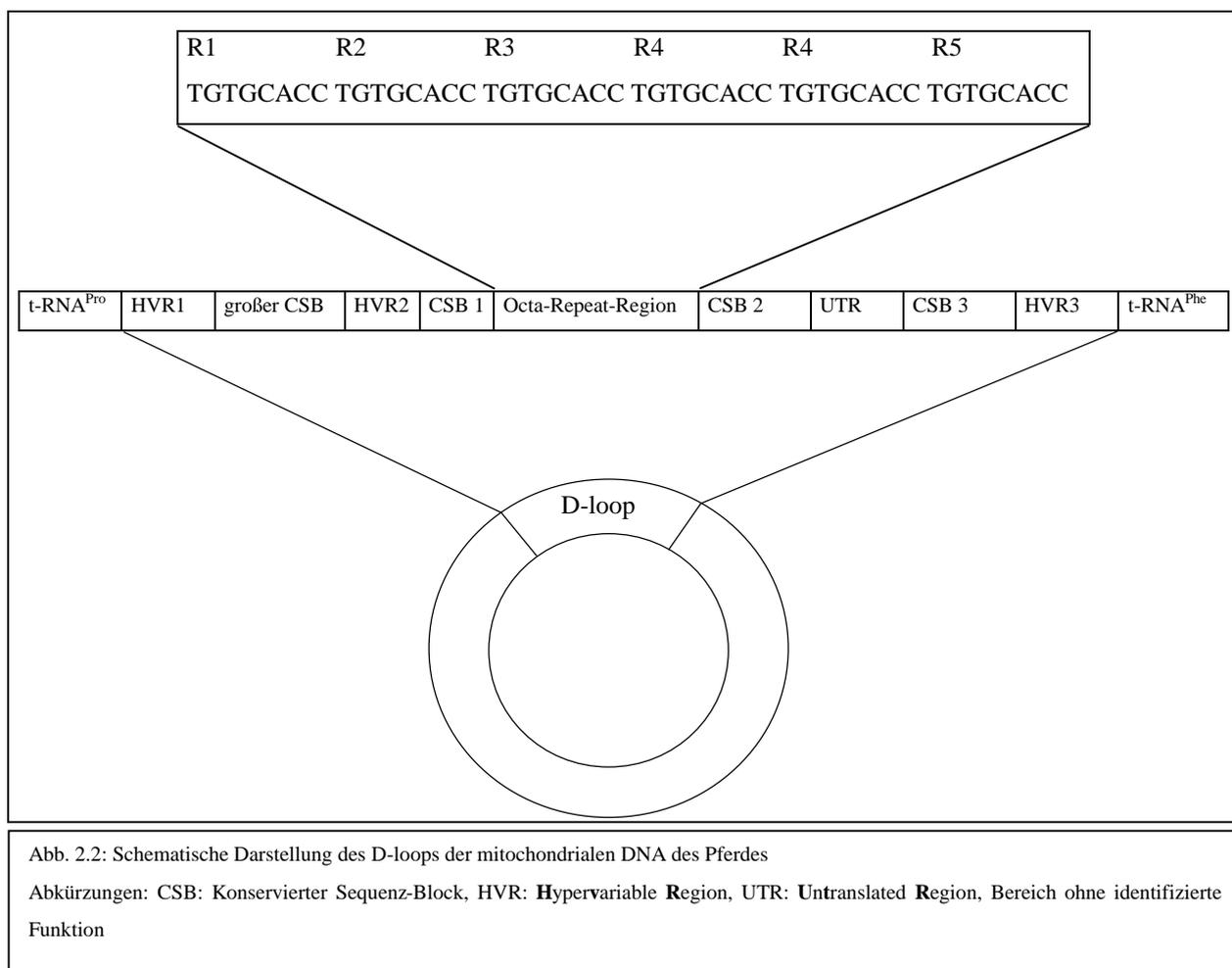
- Von den 40 Polypeptiden des Komplex 1 sind 7, nämlich ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6, von der mtDNA codiert.
- Komplex 2 ist ausschliesslich durch die nDNA codiert.
- Komplex 3 ist aus 10 Polypeptiden aufgebaut, eines, Cytochrom b, ist in der mtDNA codiert.
- Bei den 13 Untereinheiten, die den Komplex 4 bilden, werden 3 (Cytochrom c-Oxidase 1, 2, 3) durch die mtDNA codiert.
- 2 der 13 Polypeptide des Komplex 5 werden (ATPase 6 und 8) von der mtDNA codiert.

Die für die Biosynthese der mitochondrialen Polypeptide selbst erforderlichen rRNAs und tRNAs bzw. deren Gene sind Teil des mitochondrialen Genoms.

Die Transkription von mtDNA-Genen wird von unmittelbar nebeneinander liegenden Promotoren gesteuert. Beide liegen in einer Region, die man „D-loop“ (Displacement Loop) nennt. Sie kontrollieren jeweils den sogenannten schweren Strang (Guanin-reich) und den Cytosin-reichen leichten Strang. Die Promotoren bewirken die Synthese kontinuierlicher polycistronischer Transkripte, die erst in reife, funktionstüchtige rRNAs, tRNAs und mRNAs gespalten werden. Die Kontrollregion enthält auch den Replikationsursprung des schweren Strangs, im englischen Sprachgebrauch O_H genannt. Der Replikationsursprung des leichten Strangs ist in einer völlig anderen Position zu finden (bei Projektion auf eine Uhr, bei ca. 8 Uhr).

Ein bemerkenswerter Befund in der D-loop-Region ist ein Bereich repetitiver DNA. Beim Pferd besteht diese aus dem Sequenzmuster TGT GCA CC. Dieser repetitive Bereich, im folgenden „Oktarepeat“ genannt, zeichnet sich durch eine extreme Mutabilität aus. XU UND ÁRNASON (1994) beschrieben, dass sie in der DNA eines Individuums Repeatlängen zwischen 2 und 29 Oktarepeats gefunden haben.

Wegen nicht so effektiver Reparaturmechanismen, wegen der fehlenden Histone und der permanenten Einwirkung der Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung, also der Sauerstoffradikale, ist die Mutationsrate der mtDNA etwa zehnmals höher als die der nDNA.



Es entstehen in jedem Organismus auf somatischer Ebene dauernd neue mtDNA-Mutationen. Sie werden im Laufe der Zellteilung willkürlich an die Tochterzellen weitergegeben. Die Tatsache, daß im Anschluß an Neumutation und Zellteilung das entsprechende Gewebe sowohl mutierte als auch nichtmutierte Mitochondrien enthält, nennt man Heteroplasmie. Mit zunehmendem Alter steigt in einem vorgegebenen Individuum die Anzahl der Mutationen in der mitochondrialen DNA. Viele pathogene Defekte in der mtDNA kommen deswegen erst bei höherem Alter des betroffenen Individuums zur Geltung, weil im Laufe der Zeit der Anteil der mutierten DNA gegenüber der gesunden DNA steigt.

2.3 Phylogenetische Untersuchungen an der mitochondrialen DNA

Aufgrund der Tatsache, dass man bei der mtDNA strikt maternal vererbte Mikrohaplotypen beobachtet, die im Vergleich zur nDNA eine erhöhte Mutationsfrequenz aufweisen, ist die mtDNA ein bevorzugtes Objekt phylogenetischer Untersuchungen. Dabei ist zu unterscheiden, welcher Bereich der mtDNA untersucht wird.

2.3.1 Untersuchungen am Cytochrom b Gen

Zur Untersuchung der verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen verschiedenen Arten oder Gattungen bedient man sich häufig des Cytochrom b-Locus (z.B. KOCHER ET AL., 1989). Dieser Genort hat gegenüber dem nichtcodierenden Bereich der D-loop den Vorteil einer moderateren Mutationsrate, die sich alleine schon aus der Funktion bzw. dem Erhalt der biologischen Funktion des dort codierten Proteins bedingt. Die höchste Mutationsrate wird auf den dritten Positionen der jeweiligen Codons beobachtet. Dieses ist im biologischen Sinne unkritisch, da im mitochondrialen Genom nur die ersten beiden Nukleotide der jeweiligen Triplets codierend sind. Es wurde mehrfach gezeigt, dass dies ein grundsätzliches Phänomen in der mitochondrialen Genetik ist (KIMURA, 1983, S. 95, NEI, 1987, S. 72, IRWIN ET AL., 1991). Bereiche, die für die Funktion des Proteins unabdingbar sind, erweisen sich sogar als hochgradig konserviert (KOCHER ET AL., 1989). Führt man jedoch Untersuchungen innerhalb einer Art durch, um verschiedene Populationen zu vergleichen, so stellt man fest, dass der Cytochrom b-Locus, wenn er im Einzelfall nicht sogar monomorph ist, nur eine relativ geringe Mutationsrate hat (KIKKAWA ET AL., 1997, ISHIDA ET AL., 1996).

2.3.2 Untersuchungen an anderen codieren Bereichen der mitochondrialen DNA

Andere Loci der mtDNA als D-loop oder Cytochrom b wurden bei Equiden bisher nur selten untersucht. Die Arbeiten von OAKENFULL & RYDER (1998) an dem Gen für die 12S rRNA und von LISTER ET AL. (1998) an dem Gen für die 16S rRNA zeigten, dass diese Bereiche innerhalb einer Art keine phylogenetische Information liefern. Auch zeigten Untersuchungen an den tRNA's für Tryptophan, Alanin, Asparagin, Cystein und Tyrosin bei Rindern völlige Homologie (PEGORARO ET AL., 1996).

Völlig anders verhält es sich jedoch auch hier, wenn man die phylogenetischen Beziehungen verschiedener Spezies zueinander vergleichen will. Zur Aufklärung der phylogenetischen Beziehung der Equiden untersuchten OAKENFULL ET AL. (2000) die Sequenzen aus der 12S rRNA und der D-loop. Wesentliche Aussage dieser Arbeit über die Verwendbarkeit der verschiedenen Bereiche der mtDNA ist, dass die 12S rRNA besser geeignet ist, um in phylogenetischen Bäumen die Knoten zwischen den verschiedenen Spezies aufzulösen. Die D-loop hingegen liefert eine bessere Auflösung an den Spitzen der Äste in einem phylogenetischen Baum.

2.3.3 Untersuchungen an der D-loop

Die mitochondriale D-loop wird sehr häufig zur Untersuchung phylogenetischer Beziehungen herangezogen. Wie in 2.2.2 dargestellt, lassen sich beim Pferd Bereiche erkennen, die sich in ihrer Mutationsfrequenz unterscheiden. Den Bereich höchster Mutationsfrequenz findet man in der HVR1 (ISHIDA ET AL., 1994), der Oktarepeatbereich zeichnet sich durch eine starke Heteroplasmie aus (XU & ARNASON, 1994). Bereiche niedrigerer Mutationsfrequenz findet man in den konservierten Sequenzblöcken. Im grossen konservierten Sequenzblock ist der Replikationsursprung des schweren Stranges lokalisiert. Die D-loop anderer Säuger ist sehr ähnlich aufgebaut.

Die erste Studie, bei der die D-loop Sequenz verschiedener Pferde verglichen wurde, stammt von ISHIDA ET AL. (1994). Es wurde jedoch keine Aussage über die phylogenetische Beziehung der einzelnen Probanden gemacht. Spätere Arbeiten untersuchten die D-loop unter verschiedenen Aspekten der Phylogenie bei Pferden. BOWLING ET AL. (2000) untersuchten die mütterliche Verwandtschaft bei in den USA gezüchteten Araberpferden, ISHIDA ET AL. (1995) versuchten, die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Equiden aufzuklären und zu überprüfen, ob das mongolische Wildpferd der Vorfahre des Hauspferdes sei. Obwohl die Studie wegen ihrer geringen Probenzahl, insgesamt wurden die Sequenzen von 9 Individuen untersucht, in späteren Veröffentlichungen kritisiert wurde (z.B.: OAKENFULL & RYDER, 1998), so ist die zentrale Aussage nicht widerlegbar, dass das mongolische Wildpferd kein Vorfahr der Hauspferde im allgemeinen sein kann und bestenfalls einen geringen Einfluss auf die mongolische Pferdezucht hatte. KAVAR ET AL. (1999) überprüften die historischen Überlieferungen bezüglich der Ursprünge der Lipizzaner. Die gefundenen Gemeinsamkeiten der Mikrohaplotypen von Lipizzanern mit anderen Rassen, sofern eine Verwandtschaft nicht dokumentiert war, wurden durch Kreuzungen vor der Ausbildung der einzelnen Rassen oder Überdauern von mitochondrialen Archaotypen innerhalb der jeweiligen Rassen begründet. KIM ET AL. (1999) versuchten den Ursprung des Cheju Pferdes, einer Insel-Rasse in Korea aufzuklären. Sie widersprachen im Einklang mit den vorhandenen archäologischen Befunden den historischen Überlieferungen, dass das Cheju Pferd ausschließlich mongolischen Ursprungs sei. Die neueste und bisher ausführlichste Arbeit über die Phylogenie der Pferde stammt von VILÀ ET AL. (2001). In dieser Studie wurden insgesamt 191 Proben von Pferden aus verschiedenen Rassen, einem mongolischen Wildpferd, 8 archäologischen Proben aus Schweden und Estland im Alter von um 1.000 Jahre und 8 Proben im Alter von 12.000 bis

28.000 Jahren, die im Permafrostboden in der Nähe von Fairbanks, Alaska, gefunden worden sind, untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass aufgrund der relativ geringen gefundenen Diversität bei den Permafrostproben und der hohen Diversität der Proben von heute lebenden Pferden das Pferd mehrfach domestiziert worden sein muss, und zwar aus unterschiedlichen Populationen.

2.3.4 Beispiele für Untersuchungen an der gesamten mitochondrialen DNA

Die gesamte mitochondriale DNA wurde zunächst nur durch Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (RFLP) untersucht. Später wurde auch die gesamte mtDNA sequenziert. Aus den vielen veröffentlichten Studien sollen zwei Beispiele die Ergebnisse illustrieren:

Bei der ersten phylogenetischen Untersuchung bei Equiden von GEORGE & RYDER (1986) wurde durch eine RFLP-Untersuchung unter der Annahme einer Substitutionsrate von 0,02 Substitutionen pro 1 MJ bestimmt, dass der letzte gemeinsame Vorfahre aller Equiden vor ungefähr 3,9 MJ gelebt haben soll. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Vorfahren von Pferd, Halbesel und Esel sich innerhalb der nächsten 0,5 MJ entwickelten. Der letzte gemeinsame Vorfahr der Zebras soll vor ungefähr 2,8 MJ gelebt haben.

Eine neuere Studie beim Menschen (INGMAN ET AL., 2000) erbrachte durch Sequenzierung des gesamten codierenden Bereichs der mtDNA einen weiteren Beweis, dass der moderne Mensch sich in Afrika entwickelte und von dort ausgehend die Erde bevölkerte.

2.4 Phylogenetische Untersuchungen mittels anderer Systeme

2.4.1 Blutgruppentypisierung und Untersuchung von Proteinpolymorphismen im Blut

Bei dieser Technik werden im allgemeinen die gleichen Markersysteme verwendet wie bei der Abstammungsbegutachtung: 7 Blutgruppensysteme [EAA (Erythrocyte Antigen A), EAC, EAD, EAK, EAP, EAQ, EAU] und 8 Proteinpolymorphismen [Albumin (ALB), A1B-Glycoprotein (A12B), Serum Carboxylesterase (ES), Vitamin D bindendes Protein (GC), Hämoglobin alpha (HBA), 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (6-PGD), Protease Inhibitor

(PI), Transferrin (TF)]. Manchmal werden die Systeme noch durch weitere Proteinpolymorphismen ergänzt.

Zum Studium von Populationen wertet man die Ergebnisse hinsichtlich der genetischen Diversität (Heterozygotität und effektive Zahl von Allelen in der Population) und der verwandtschaftlichen Beziehung der Populationen aus.

Die genetische Diversität wird häufig als Maß für die Bedrohung – gerade seltener Rassen – verwendet. Dazu werden die Heterozygotität und die effektive Anzahl von Allelen in der zu untersuchenden Population bestimmt und mit den Durchschnittswerten für alle Populationen verglichen. Werden deutlich geringere Werte als die Durchschnittswerte beobachtet, so wird dies als Indikator für den Verlust von genetischer Diversität gedeutet und somit unmittelbar auf die Bedrohung dieser seltenen Population geschlossen.

Zur Untersuchung der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen Populationen werden die erhobenen Daten mit Statistikprogrammen wie z.B. UPGMA (s.u.), PAUP, GENEPOP oder PHYLIP ausgewertet und die verwandtschaftlichen Beziehungen in der Form eines phylogenetischen Baums dargestellt. (SANDBERG & COTHRAN, 2000)

2.4.2 Mikrosatellitentypisierung

Wie die Blutmarkersysteme (2.4.1) wurden die verwendeten Mikrosatellitensysteme zur Abstammungs- oder Identitätsbegutachtung entwickelt. Bei Pferden wird in der Regel der von der ISAG (International Society for Animal Genetics) empfohlene und als Typisierungskit kommerziell erhältliche Markersatz, bestehend aus den Mikrosatelliten VHL20, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, AHT4, AHT5, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7 und ASB2, für phylogenetische Untersuchungen verwendet (z.B. BAKER ET AL., 1998). VILÀ ET AL. (2001) verwendeten in ihrer Studie einen Markersatz bestehend aus 15 Mikrosatelliten (HMS1, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7, HTG6, HTG8, HTG10, HTG14, HTG15, LEO34, LEO37, LEO38, LEO39, LEO40). Alle Studien verwendeten zur Analyse der erhaltenen Datensätze die unter 2.4.1 erwähnten, gängigen Statistikprogramme, was letztlich stets zur Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen in Form eines phylogenetischen Baums führte.

Alle Methoden, die auf autosomal lokalisierten Markersystemen beruhen, sind mit dem Nachteil behaftet, dass die Marker rekombinieren. Somit kann die Geschichte einer Rasse nicht zweifelsfrei rekonstruiert werden, da Allele im Laufe der Generationen gemäß den

Mendelschen Gesetzen verschwinden können. Desweiteren wurde, wie bereits in 2.1.5.2 beschrieben, in der Pferdezucht bis in das 17. Jhdt. hinein Kreuzungszucht betrieben. Man wird in modernen Zuchtpferderassen also Allele aus allen Ursprungspopulationen in beliebiger Kombination finden, sofern sie nicht wieder verschwunden sind, ohne entscheiden zu können, welches Allel welcher Population ursprünglich entstammt. Weiterhin wurde in der Pferdezucht seit dem 19. Jhdt. zum Teil eine intensive Reinzucht betrieben. Dies hatte zur Folge, dass manche Populationen abgeschlossen wurden. Dadurch ist für diese Populationen mit Sicherheit ein Founder-Effekt zu beobachten, der mit einer reduzierten Allelfrequenz für die einzelnen Marker einher geht.

Ein strikt maternal vererbtes Markersystem, wie z.B. der in dieser Studie untersuchte Bereich der mitochondrialen D-loop, hat hingegen den Vorteil, dass es nicht rekombiniert. Weiterhin stellt die mtDNA einen stabilen Haplotypen mit moderater Mutationsfrequenz dar. Schließlich wurde die Pferdezucht in Bezug auf die Geschlechter über die Jahrhunderte häufig sehr konservativ betrieben: während die Hengste zumeist zur Einkreuzung von genetischem Material aus anderen Populationen verwendet wurden, waren die zur Zucht verwendeten Stuten meist bodenständig. Der große Nachteil hierbei ist natürlich, dass bei einer Untersuchung der mtDNA der Einfluss der paternalen Linie völlig außer acht gelassen wird. Zwar ist eine solche Betrachtung prinzipiell durch Untersuchungen am Y-Chromosom (siehe 2.4.3) möglich, jedoch würde auch hier aufgrund der oben erwähnten Tatsachen in Bezug auf die Zuchtgeschichte der Pferde ein eher inkonsistentes, ja verwirrendes Bild erwartet werden.

2.4.3 Untersuchungen am Y-Chromosom

Y-chromosomale Markersysteme wurden für das Pferd bisher noch nicht entwickelt.

Durch seinen paternalen (nicht rekombinanten) Erbgang ist das Y-Chromosom, ebenso wie die mtDNA, im allgemeinen ideal für phylogenetische Untersuchungen.

Beim Menschen wurden bisher 3 unterschiedliche Y-chromosomale Markersysteme untersucht: ein biallelisches Markersystem (HAMMER, 1995; UNDERHILL ET AL., 1997), eine Minisatellitsequenz (JOBLING ET AL., 1998) und mehrere Mikrosatelliten (KAYSER ET AL., 1997). Als Beispiel soll eine neuere Arbeit (FORSTER ET AL., 2000) dienen: Forster und Kollegen fassten diese drei Markersysteme zusammen und ermittelten aus den erhaltenen Datensätzen mittels Network 2.0 ein phylogenetisches Netzwerk, dass die Phylogenie der Menschheit, gemäß dem Stand der Forschung, korrekt wiedergibt.

2.5 Methoden phylogenetischer Analyse

Hier soll nur ein sehr kurzer Abriss der unterschiedlichen Methoden gegeben werden. Eine erschöpfende Erörterung würde den Rahmen der vorliegenden Schrift sprengen und ist auch nicht Gegenstand der Studie. Ziel dieses Kapitels ist der Versuch einer anschaulichen Darstellung der prinzipiellen Vorgehensweise bei den jeweiligen Methoden. Für weiterführende Informationen, wie zum Beispiel die mathematische Beschreibung der Algorithmen, kann WEIR (1996) und die darin enthaltene Bibliographie konsultiert werden sowie die zitierten Veröffentlichungen.

2.5.1 Distance-Matrix-Methoden

Distance-Matrix-Methoden basieren grundsätzlich auf Sätzen paarweiser genetischer Distanzen, die zwischen zwei taxonomischen Einheiten, zumeist Individuen, aber auch Gruppen gleicher Merkmale, berechnet werden. Diese Distanzen basieren immer auf genetischen Modellen und beziehen sich zumeist auf die Anzahl der Änderungen zwischen den taxonomischen Einheiten. Folglich basiert die Qualität der resultierenden phylogenetischen Bäume auf der Qualität des genetischen Modells und der Güte der Bestimmung der genetischen Distanz.

2.5.1.1 Unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA)

UPGMA ist eine bei phylogenetischen Untersuchungen häufig verwendete Methode. Sie definiert den Abstand zwischen zwei Gruppen als den Durchschnitt der paarweisen Abstände, z.B. Unterschiede in DNA-Sequenzen, aller Mitglieder der beiden Gruppen. Dabei ist wesentlich, dass die Mutationsrate über den gesamten Datensatz konstant ist, da ansonsten die Ergebnisse verfälscht würden.

Bei dem Algorithmus wird so verfahren, dass zunächst eine Matrix mit den paarweisen Distanzen, z.B. Anzahl der unterschiedlichen Mutationen, erstellt wird. Daraufhin wird das Paar aufgesucht, dessen Distanz die kleinste ist (Paar 1). Die Matrix reduziert sich auf die Distanzen der taxonomischen Einheiten zu Paar 1. Nachfolgend wird die Einheit aufgesucht, die die geringste Distanz zu Paar 1 hat (Paar 2). Die Matrix reduziert sich auf die Distanzen der verbleibenden Einheiten zu Paar 2 und so fort.

2.5.1.2 Fitch-Margoliash-Algorithmus

Prinzipiell basiert der Fitch-Margoliash-Algorithmus auf UPGMA. Der Unterschied dazu beruht auf der Tatsache, dass keine konstante Mutationsrate zwingend vorausgesetzt wird. Vielmehr wird für jedes gefundene Paar der gemeinsame Vorfahr gewissermaßen rekonstruiert. Dieser – angenommene – Vorfahr wird auf die halbe Distanz zwischen den Einheiten des jeweiligen Paares gesetzt und dient als Verknüpfungspunkt zwischen dem jeweiligen Paar mit der geringsten Distanz und der verbleibenden Matrix (vgl. 2.5.1.1). Dadurch wird die zwingende Vorgabe einer konstanten Mutationsrate auf das jeweilige Paar mit der geringsten genetischen Distanz reduziert.

2.5.1.3 Neighbour-Joining-Methode

Ziel dieser Methode ist es, durch Identifizierung engster Paare, also Nachbarn, einen phylogenetischen Baum zu erzeugen, dessen Astlängen so kurz wie möglich sind. Als benachbartes Paar werden zwei Einheiten definiert, die durch einen Knoten in einem nicht gewurzelten, bifurcalen phylogenetischen Baum verbunden sind.

Zunächst beginnt die Methode mit der Annahme einer sternartigen Phylogenie. Nachfolgend wird das engste Paar, also die nächsten Nachbarn, identifiziert und zu einer kombinierten Einheit (Einheit 1) zusammengefasst. Darauf wird der nächste Nachbar zur Einheit 1 identifiziert und mit dieser zur nächsten kombinierten Einheit zusammengefasst. Dieser Algorithmus wird so lange durchgeführt, bis letztlich drei kombinierte Einheiten übrig bleiben.

2.5.2 Parsimony-Methoden

Im Gegensatz zu Distance-Matrix-Methoden werden bei Parsimony-Methoden die diskreten Werte, die die einzelnen taxonomischen Einheiten unterscheiden, verwendet. Man verwendet also keine Zusammenfassung der jeweiligen Unterschiede, z.B. die Anzahl der gegenseitigen Abweichungen in den jeweiligen Sequenzmustern, sondern die Unterschiede selbst, z.B. die jeweiligen Sequenzmuster, um eine phylogenetische Beziehungen zwischen den Einheiten zu bestimmen. Für jede mögliche Baumstruktur werden an jedem Knoten die Sequenzen in der Art und Weise verglichen, so dass die geringste Anzahl an Änderungen im Sequenzmuster die

Sequenzen der unmittelbar benachbarten Individuen liefert. Daraus wird die gesamte Anzahl an Änderungen bestimmt, die notwendig ist, um durch den ganzen Baum zu wandern. Der phylogenetische Baum, der die geringste Gesamtzahl an Änderungen aufweist, ist der „most parsimonous tree“.

2.5.3 Maximum-Likelihood-Methoden

Diese Methoden basieren auf dem Versuch, die Schwächen und Grenzen der zuvor vorgestellten Methoden zu umgehen. Sie verwenden die diskreten Daten, im Gegensatz zu den Distance-Matrix-Methoden und Standard-Statistik-Methoden, sowie Wahrscheinlichkeitsmodelle, im Gegensatz zu Parsimony-Methoden.

Bei den Maximum-Likelihood Methoden wird immer ein Baum als phylogenetische Struktur vorausgesetzt, und anschließend wird der Baum mit den Astlängen ausgewählt, der, bezogen auf die jeweiligen Astlängen, die höchste Wahrscheinlichkeit besitzt. Gemäß dieses Verfahrens werden alle möglichen phylogenetischen Bäume erstellt und der mit der höchsten Wahrscheinlichkeit ausgewählt. Dieser Baum wird als die beste Abschätzung betrachtet.

Bei DNA-Sequenzen berechnet die Methode die Wahrscheinlichkeit, dass sich die DNA-Sequenz eines Individuums durch Mutation in einer vorgegebenen Zeit in die Sequenz eines anderen Individuums umwandelt. Dabei setzen die verwendeten Modelle voraus, dass jede Nukleotidposition unabhängig mit der gleichen Wahrscheinlichkeit mutieren kann. Die Kombination der jeweiligen wahrscheinlichen Umwandlungen von DNA-Sequenzen führen jeweils zu einem möglichen phylogenetischen Baum mit einem diskreten Wahrscheinlichkeitswert.

Hauptproblem der Maximum-Likelihood-Methoden ist, dass sie eine enorme Rechnerkapazität erfordert: die Anzahl der möglichen ungewurzelten, bifurcalen Bäume bei n unterschiedlichen Sequenzen berechnet sich gemäß $(2n-5)!/[(n-3)!2^{n-3}]$. Für $n = 3, 4, 6, 8$ und 10 entwickelt sich die Anzahl der möglichen Bäume zu 1, 3, 105, 10.395, 2.027.025. Man erkennt leicht, dass auch ein moderner Computer mit der Berechnung eines phylogenetischen Baumes nach der Maximum-Likelihood-Methode bei einer signifikanten Stichprobengröße einige Zeit beschäftigt sein wird. Daher verwenden die gängigen Programme nur einen Teil der Gesamtzahl der möglichen Bäume. Ein weiteres Problem stellt die Voraussetzung der gleichen Wahrscheinlichkeit unabhängiger Mutationen für jede Nukleotidposition dar. Tatsächlich ist dies nur sehr selten der Fall. Auch in der 1. hypervariablen Region der D-loop

des Pferdes mutiert nicht jede Position mit der gleichen Wahrscheinlichkeit (vgl. Sequenzen im Anhang). Vielmehr ist es so, dass manche Bereiche häufiger mutieren, während andere Sequenzabschnitte nur selten oder gar nicht mutieren.

2.5.4 Network

Das Network-Programmpaket kann mit zwei Algorithmen arbeiten, die inhaltlich verwandt sind: dem Reduced-Median-Algorithmus (BANDEL ET AL., 1995) und dem Median-Joining-Algorithmus (BANDEL ET AL., 1999).

2.5.4.1 Der Reduced-Median-Algorithmus

Der Reduced-Median-Algorithmus verwendet diskrete Merkmale, im Gegensatz zu Distance-Matrix-Methoden, und ist daher der Familie der Parsimony-Methoden zuzurechnen. Der Algorithmus ist ausschliesslich für binäre Datensätze vorgesehen. Sogenannte "Multistates" führen zu fehlerhaften phylogenetischen Netzwerken.

Die Verfahrensweise des Reduced-Median-Algorithmus stellt sich so dar, dass die einzelnen Taxa (DNA-Sequenzen, Mikrosatelliten Größen oder RFLP-Daten) aufgrund ihrer jeweiligen Merkmale nacheinander aufgespalten werden. Dabei treten, wie bei allen Parsimony-Methoden wenn man alle 'most-parsimonous-trees' berücksichtigt, manchmal bei Verzweigungen Konflikte auf, die im Netzwerk als Retikulation (2- oder mehr-dimensionale Aufspaltung) dargestellt werden, wie z.B. in Abbildung 2.3.1. Diese Konflikte entstehen zum Beispiel bei Parallelmutationen.

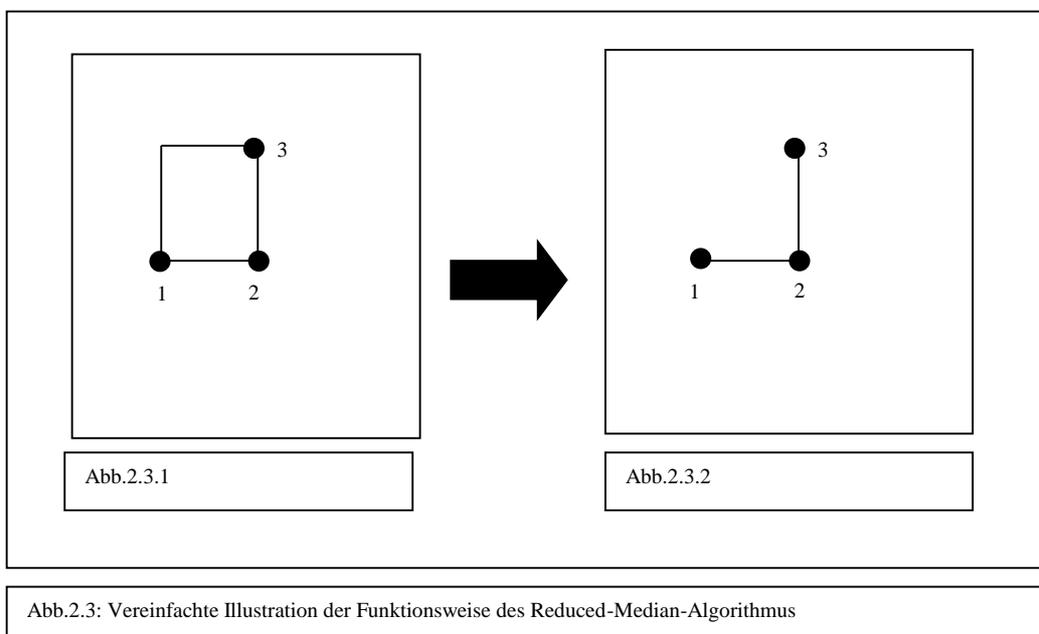


Abb.2.3: Vereinfachte Illustration der Funktionsweise des Reduced-Median-Algorithmus

Angenommen, eine Parallelmutation verursachte die in Abb. 2.3.1 dargestellte Aufspaltung in einem Netzwerk. Der Reduced-Median-Algorithmus überprüft diese Retikulation nachfolgend auf zwei Bedingungen: a) müssen mindestens zwei Merkmale einem dritten Merkmal in der Retikulation widersprechen, und b) müssen in diesem Beispiel von 1 und 2 mehr Verzweigungen abgehen als von 3. Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, werden die Äste von 1 zu 3 aufgelöst (Abb. 2.3.2). Ohne Reduktion der Verknüpfungen entspricht das erhaltene Netzwerk allen most-parsimonious-trees.

2.5.4.2 Der Median-Joining-Algorithmus

Der Median-Joining-Algorithmus ist mit dem oben vorgestellten Reduced-Median-Algorithmus eng verwandt. Sie unterscheiden sich in drei wesentlichen Punkten:

1. Median-Joining lässt auch nicht-binäre Datensätze, also auch sogenannte "Multistates" zu;
2. die Berechnung des Netzwerks erfolgt in zwei Schritten: Zunächst werden die einzelnen Taxa nach gemeinsamen Triplets von Typen in minimalen Abstand untersucht und gemäss der Triplets gruppiert. Nachfolgend werden die einzelnen Gruppen von Taxa mit gemeinsamen Triplets über postulierte Sequenzen (mediane Vektoren) verknüpft, bis letztlich ein phylogenetischer Baum bzw. ein phylogenetisches Netzwerk entsteht, das alle Taxa enthält;
3. Der Algorithmus liefert nur bei relativ kurzen Astlängen sinnvolle Netzwerke (Dr. Forster, persönliche Mitteilung).

2.6 Die Polymerasekettenreaktion

Die von MULLIS UND FALOONA 1987 veröffentlichte Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) hat die Molekularbiologie revolutioniert. Durch die Einführung von thermostabilen DNA-Polymerasen wurde die PCR automatisierbar und so zu einer Standard-Labormethode. Es lassen sich leicht Abschnitte aus einem vollständigen DNA-Strang in vitro um den Faktor 2×10^5 bis 5×10^5 selektiv vervielfältigen (SAIKI ET AL., 1988). Die Anwendung des Prinzips der PCR reicht von der normalen Amplifikation von Fragmenten bis zu 2 kb, über die Synthese von Fragmenten bis zu 30 kb Größe (z.B. mit Expand™ 20 kb^{PLUS} PCR System, Roche), bis hin zur Sequenzierung der gewünschten Abschnitte (2.6).

Der PCR liegt die Eigenschaft einer jeden DNA-Polymerase zugrunde, dass sie einzelsträngige DNA als Matrize zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzt und dabei einen doppelsträngigen Abschnitt als Startpunkt für die Synthese benötigt. Dies wird in der Laborpraxis so realisiert, dass man doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf Temperaturen nahe dem Siedepunkt denaturiert und anschließend durch Abkühlen mit einem den die Zielsequenz flankierenden DNA-Abschnitt komplementären Oligonukleotid („Primer“) hybridisiert („annealing“). Anschließend erhöht man die Temperatur auf das Temperaturoptimum der Polymerase zur Synthese des der Matrize komplementären Stranges („Kettenfortpflanzung“, „extension“). Darauf wird die neu synthetisierte, doppelsträngige DNA wieder denaturiert und so weiter. Im allgemeinen wird diese Abfolge von Inkubationsschritten 25 - 30 mal wiederholt („cycling“). Voraussetzung des Vorganges ist, dass die Sequenz, die die zu amplifizierende Sequenz eingrenzt, bekannt ist, damit das spezifische Oligonukleotid synthetisiert werden kann. Die im Regelfall verwendete DNA-Polymerase wurde zuerst aus dem an heißen Quellen lebenden Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isoliert, daher der Kurzname „Taq-DNA-Polymerase“. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass sie extrem hitzestabil ist, wodurch sie für die PCR hervorragend geeignet ist. Ihre Aktivität nimmt über Stunden – auch bei hohen Temperaturen – nicht wesentlich ab, wodurch eine einmalige Enzymzugabe für alle Polymerisierungszyklen ausreichend ist. Die Fehlerquote beim Einbau der Nukleotide liegt bei Taq-DNA-Polymerase in der Größenordnung von 10^{-9} . Dies kann bei der Amplifikation von sehr geringen DNA-Mengen zu einem erheblichen Problem führen. In einem solchen Fall empfiehlt sich die Verwendung von sogenannten „proof-reading“-Polymerasen, wie z.B. Pfx-DNA-Polymerase (Life Technologies) oder Pwo-DNA-Polymerase (Roche). Diese Polymerasen besitzen zusätzlich noch eine 3‘-5‘ Exonuklease-Aktivität. Das Produkt der PCR wird also durch Abbau und Neuaufbau überprüft. Die Fehlerquote dieser Polymerasen liegt nach Herstellerangaben (Life Technologies) in der Größenordnung von 10^{-10} .

2.7 Die DNA-Sequenzierung

2.7.1 Die Sequenzierreaktion

Der Sequenzierreaktion liegt das gleiche Prinzip zugrunde wie der Polymerasekettenreaktion. Sie unterscheidet sich von der PCR durch die Zugabe von nur einem Primer und Didesoxynucleotiden zum Reaktionsgemisch (Kettenabbruchverfahren nach SANGER ET AL., 1977). Diese verhindern nach ihrem Einbau in den neu synthetisierten DNA-Strang durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe die Fortsetzung der Kettenreaktion. Der Einbau erfolgt zufällig und so ist das Ergebnis der Sequenzierreaktion ein Gemisch von DNA-Einzelsträngen unterschiedlicher Länge.

2.7.2 Die gelelektrophoretische Auftrennung der sequenzierten Proben und die Auswertung der erhaltenen Daten

Die nach 2.6.1 erhaltenen DNA-Einzelstränge werden bei einem DNA-Sequenzierer vom Typ 373A der Firma ABI besonders effizient auf siebenprozentigen denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) aufgetrennt. Die Effizienz beruht neben einer hohen Trennleistung eines 7% PAA-Gels auf der denaturierenden Wirkung von zugesetztem Harnstoff und einer Elektrophoresetemperatur von 40 °C. Unter den denaturierenden Bedingungen wird die Bildung von doppelsträngigen DNA-Abschnitten und die Ausbildung von Sekundärstrukturen in den Einzelsträngen verhindert und so auf dem Gel ein scharfes Bandenmuster erhalten.

Zur Markierung haben sich zwei Verfahren etabliert:

- Markierung des Primers:

Hierbei werden zur Sequenzierung des gewünschten DNA-Abschnittes vier Sequenzierreaktionen durchgeführt, wobei jeder Reaktion ein anderes Didesoxynucleotid zugefügt wird (sogenannte „Vier-Topf-Reaktion“). Die Primer sind bei diesem Verfahren mit radioaktiven Isotopen, Digoxigenin oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Bei der Markierung mit radioaktiven Isotopen oder Digoxigenin wird jeder Sequenzierreaktionsansatz auf eine andere Bahn eines PAA-Gels aufgetragen, wodurch sich

nach Elektrophorese und Detektion der DNA-Fragmente auf einem Röntgenfilm die Sequenz der Proben durch Ablesen der nächsthöheren Banden bestimmen läßt.

Bei der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen werden alle vier Reaktionsansätze auf eine Bahn eines PAA-Gels aufgetragen und die Sequenz der Probe während der Elektrophorese von einem Sequenziergerät (s.u.) abgelesen.

- Markierung der Didesoxynukleotide:

Hierbei werden bei einer Sequenzierreaktion anstelle der unmarkierten- mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide zugesetzt. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen handelt es sich bei dem verwendeten Kit der Firma ABI um 6-Carboxyrhodamin-Derivate: Adenin ist mit R6G, Cytosin mit ROX, Guanin mit R 110 und Thymin mit TAMRA markiert. In unserem Arbeitskreis wird zur Elektrophorese bzw. Detektion und Dokumentation der Sequenzierprodukte ein „DNA-Sequencer 373A“ der Firma „Applied Biosystems“ („ABI“) eingesetzt. Bei diesem Gerät werden die an die Sequenzierprodukte gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Argonlaser, dessen Hauptemission bei Wellenlängen zwischen 488 nm und 514 nm liegt, angeregt und die daraus resultierende Fluoreszenz von einem Photomultiplier registriert. Dieser ist auf einem beweglichen Schlitten befestigt, auf dem sich auch der letzte von drei Spiegeln und das Filterrad, welche zum zur Diskriminierung zwischen den verschiedenen Wellenlängen des Lasers notwendigen System gehören, befinden. Der Photomultiplier wandelt das Lichtsignal in ein digitales um und leitet dieses an einen Computer weiter, der aus dieser Abfolge von Signalen ein Gelbild generiert. Als Computerausdruck erhält man einen Graphen, auf dem Peaks in vier verschiedenen Farben abgebildet sind, für jede Base wird eine andere Farbe verwendet, und über den jeweiligen Peaks die Angabe der zu dem Signal gehörigen Base. Die Sequenz kann also direkt abgelesen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Proben

Zur Untersuchung des hochpolymorphen Bereichs der mitochondrialen D-loop wurden Proben von 328 Pferden aus 25 Rassen untersucht. Die meisten Proben wurden freundlicherweise von privaten Züchtern, Gestüten, Zuchtverbänden und des Koordinators für Pferde von der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V. (GEH) zur Verfügung gestellt. Das Probenmaterial wurde noch durch solche aus der Abstammungsdiagnostik der IMD GmbH ergänzt, welche in der Studie anonymisiert bearbeitet wurden.

Im einzelnen waren dies:

| | |
|--|---|
| Trakehner Zuchtverband, Oldenburg | 5 Trakehner |
| Oldenburger Zuchtverband e.V., Vechta | 1 Oldenburger |
| Holsteiner Zuchtverband e.V., Kiel | 10 Holsteiner |
| Pferdestammbuch Weser-Ems e.V., Oldenburg | 2 Isländer 2 Shetland Ponies 1 Friese 2 Welsh Ponies |
| Isländer Pferde Zuchtverband e.V., Stimpfach | 8 Isländer |
| Westfälisches Pferdestammbuch, Münster | 12 Dülmener Pferde |
| H. Oelke, Halver: (die von Herrn Oelke eingesandten Proben stammten nicht ausschliesslich aus seinem Besitz. Vielmehr nutzte er seine viel- fältigen Kontakte zu Pferdebesitzern in Deutschland, Grossbritannien, Spanien, Portugal, USA, um uns das benötigte Probenmaterial zu beschaffen.) | 21 Mustangs aus dem Kiger HMA 15 Mustangs aus dem Sulphur Springs HMA 33 Mustangs aus anderen HMA's bzw. aus Nachzuchten 18 Sorraia-Pferde 7 Exmoor Ponies 10 Lusitanos 8 Andalusier 3 Mongolische Wildpferde |

| | |
|---|---|
| | 5 Koniks |
| | 3 Vollblut-Araber |
| | 5 Araber/Berber-Kreuzungen |
| | 3 Berber-Pferde |
| | 2 Norwegische Fjord-Pferde |
| | 7 Kaspische Pferde |
| Prof. Ouragh, Rabat, Marokko | 10 Araber |
| | 11 Berber-Pferde |
| | 3 Araber/Berber-Kreuzungen |
| Dr. Rathke, Eitorf | 6 Andalusier |
| H. Lorenz, Bollschweil (Vorsitzender de Deutschen Rennvereins für Arabische Vollblüter e.V.) | 6 Araber |
| Dr. Radjai, Rheinstetten | 11 Asil-Araber |
| M. Vogt, Uslar (Koordinator für Pferde bei der GEH) | 24 Rheinisch-Deutsche-Kaltblüter 19 Senner |
| Dr. Söntgen, Wachtberg (Vorsitzende des Deutschen Shire Horse Vereins e.V) | 3 Shire Horses |
| B. Arnold, Fernwald-Steinbach | 3 Shire Horses |
| Fam. Schützinger, Kaprun, Österreich | 5 Noriker |
| U. Beling, Hamburg | 3 Shire Horses |
| E. Schön-Petersen | 10 Norwegische Fjord-Pferde |
| Prof Macgregor, Leicester, Grossbritannien | 6 Exmoor Ponies |
| Dr. Scherling, Beutelsbach, (Rassebetreuer für Rottaler Pferde bei der GEH) | 9 Rottaler Pferde |
| C. Zimdars, Düsseldorf | 8 Scottish Highland Ponies |
| Anonyme - bzw. Einzelproben | 6 Mustangs aus verschiedenen HMAs |

1 Norwegisches Fjord-Pferd

1 Frieze

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien und Enzyme

Folgende Chemikalien und Enzyme wurden verwendet:

Amersham Pharmacia, Freiburg: dNTP's, Oligonukleotide

Biozym: Sequagel 6%

Biomaster, Köln: bioTaq DNA Polymerase

Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe: Oligonukleotide, Pfx DNA Polymerase

Kodak International Biotech., New Haven USA: Ammoniumpersulfat, Formamid, TEMED

Metabion, Martinsried: Oligonukleotide

Microsynth, Balgach CH: Oligonukleotide

PE Applied Biosystems, Weiterstadt: Dye primer cycle sequencing ready reaction kit

Peqlab, Erlangen: Pwo DNA Polymerase

Quiagen, Hilden: PCR Purification Kit, DNA Purification Kit

Roche, Mannheim: Proteinase K, Pwo DNA Polymerase

Roth, Karlsruhe: Borsäure, Ethanol, Isopropanol, Natriumcitrat, Natriumchlorid, Tris

Serva, Darmstadt: Agarose, Bromphenolblau, Ethidiumbromid, Natriumdodecylsulfat

3.2.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Falls notwendig wurden sie autoklaviert.

Puffer für die Gelelektrophorese:

| | | |
|------------------------------|----------------------------------|-------------|
| 50 x TAE-Puffer: | Tris | 2 M |
| | Essigsäure | 1 M |
| | EDTA | 50 mM, pH 8 |
| 10 X TBE-Puffer: | Tris | 0,9 M |
| | Borsäure | 0,9 M |
| | EDTA | 20 mM, pH 8 |
| Acrylamid- Stammlsg. 40%: | Acrylamid | 38 g |
| | Bisacrylamid | 2 g |
| | in 100 ml H ₂ O demin | |

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml

Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung:

| | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------|
| Lysispuffer: | NaCl | 100 mM |
| | EDTA | 25 mM |
| Proteinase K- Stammlösung: | | 20 mg/ml |
| SDS-Lösung 10%: | Natriumdodecylsulfat | 10 g |
| | in 100 ml H ₂ O demin. | |

3.2.3 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden zur Amplifikation des Fragments aus der mitochondrialen D-loop verwendet:

| Name | Sequenz 5'->3'-Richtung |
|------------|--|
| HMT1 | AGG ACT ATC AAA GGA GAA GCT CTA |
| HMT2 | CCT GAA GAA AGA ACC AGA TGC CA |
| M13-HMT | TGT AAA ACG GCC AGT ACC ATC AAC ACC CAA AGC |
| HMT3 | TGT CCC AAT CCT CGC TCC |
| HMT4 | TAT CAC TGC TGT GTC CCG |
| M13-HMT3 | TGT AAA ACG GCC AGT CAT CCA AAC GTG GGG GGT TT |
| Fam-HMTR-F | Fam-GTC CAT GGT AGC GGA CAT AG |
| HMTR-R | GCA AGA TTG TGT TGA ATG TAC AT |

3.2.4 Arbeitsgeräte

| | |
|-----------------------|-----------------------------|
| Autoklav: | Technorama |
| Elektrophoresekammer: | Biorad DNA Sub Cell |
| Feinwaage: | Kern 510-63 |
| Kühlzentrifuge: | Sigma 3K30 |
| Leuchttisch: | Biometra Fluo-Link TFL-20M |
| Magnetrührer: | Ikamag Reo |
| Schüttler: | GFL 3015 |
| Sequenzierautomat: | ABI 373 A |
| Spannungsgeräte: | Biorad Power Pac 300 |
| Thermocycler: | Biometra Trio - Thermoblock |
| Tischzentrifuge: | Eppendorf Centrifuge 5415C |
| Waage: | Kern Typ 510-63 |
| Wasserbad: | Köttermann 3047 |

3.3 Methoden

3.3.1 DNA-Isolierung

Die Gesamt-DNA wurde aus 6 Haarwurzeln unter Verwendung von 200 µl Lysis-Puffer und 1 µl Proteinase K-Lösung isoliert. Nach einer Inkubation bei 60 °C für 3-12 Stunden wurden die Proben mit dem QIAmp Blood Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurden dem Lysis-Inkubationsansatz 200 µl Puffer AL (Bestandteil des Kits) und 200 µl Ethanol zugefügt. Anschliessend wurde gemäss des Protokolls des Herstellers zur Aufreinigung von DNA aus Blut verfahren, mit der Modifikation, dass das Elutionsvolumen, zur Aufnahme der aufgereinigten DNA, 50 µl betrug.

3.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch mit Hilfe des Pharmacia GeneQuant bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Unter den gegebenen Bedingungen entsprach gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz 1 OD einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

3.3.3 Amplifikation und Sequenzierung

3.3.3.1 PCR zur Amplifikation des 1. Fragments (HVRI) aus der mitochondrialen D-loop

Die zu sequenzierenden Fragmente wurden mittels einer zweistufigen, sogenannten Semi-nested PCR-Strategie generiert.

Die Primer der ersten PCR (HMT1 und HMT2, bzw. P1 und P2) wurden ISHIDA ET AL. (1994) entnommen.

Zur Amplifikation des zu untersuchenden Fragments der mitochondrialen D-loop wurden 1-5 µl Gesamt-DNA (entspr. 20-100 ng), 50 µM der jeweiligen Primer, 0,2 µM dNTP-Mix, 5 µl 10 X PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂-Lösung, 1 U bioTaq™ DNA-Polymerase in 50 µl Gesamtvolumen zusammengegeben. Das Fragment wurde gemäß dem folgenden Thermocycler-Programm amplifiziert: Initiale Denaturierung: 94 °C für 5 Min., 32 Zyklen zu 94 °C für 1 Min., 60 °C für 1 Min., 72 °C für 1 Min., finale Extension: 72 °C für 5 Min.. Das

Amplifikat (469 bp, Pos. 15395-15862 entsprechend der von XU & ARNASON (1994) veröffentlichten Sequenz) wurde auf einem einprozentigen Agarosegel überprüft.

Für die zweite Amplifikation wurde ein neuer, eingerückter Primer (M13-HMT) hergestellt, der am 5'-Ende zusätzlich die -21-M13-Standardsequenz trägt, die in der nachfolgenden Sequenzierung als Primersequenz diente. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

1 µl des Amplifikats der ersten PCR, 5 µM M13-HMT, 50 µM HMT2, 25 nM dNTP-Mix, 5 µl 10 X PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂-Lösung und 1 U bioTaq™ DNA Polymerase wurden in einem Gesamtvolumen zu 50 µl zusammengegeben und entsprechend den folgenden Inkubationsschritten amplifiziert: Initiale Denaturierung: 94 °C für 3 Min., 32 Zyklen zu 94 °C für 30 Sek., 50 °C für 50 Sek., 72 °C für 2 Min., finale Extension: 72 °C für 5 Min.. Wiederum wurde das Amplifikat (455 bp, Pos. 15425-15862 gemäß der von XU & ARNASON (1994) veröffentlichten Sequenz plus 18 bp -21 M13-Primer) auf einem einprozentigen Agarosegel überprüft.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des Qiagen PCR-Purification Kits aufgereinigt und mit 30 µl H₂O_{ster.} eluiert.

3.3.3.2 PCR zur Amplifikation des Fragments (HVR2) aus der mitochondrialen D-loop

Wie bereits bei HVRI beschrieben, wurde auch bei der Amplifikation dieses Fragments nach einer sogenannten Semi-nested PCR-Strategie vorgegangen. Die benötigten Primer (HMT3, HMT4 und M13-HMT3) wurden nach der von XU & ARNASON (1994) veröffentlichten Sequenz hergestellt. Zur Amplifikation wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 2-8 µl Gesamt-DNA (entspr. 40-160 ng), je 15 µM der Primer HMT3 und HMT4, 0,2 µM dNTP-Mix, 5 µl 10X PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂-Lösung und 1 U bio-Taq™ DNA-Polymerase vereinigt. Die verschiedenen Inkubationen wurden wie folgt durchgeführt: Initiale Denaturierung: 94 °C für 5 Min., 30 Zyklen zu: 94 °C für 1 Min., 64 °C für 1 Min., 72 °C für 1 Min., finale Extension bei 72 °C für 10 Min.. Das Amplifikat in der Größe von 1133 bp (Pos. 15780-253, gemäß XU & ARNASON, 1994) wurde auf einem einprozentigen Agarosegel überprüft.

Das Produkt dieser 1. PCR wurde ohne weitere Aufreinigung als Templat dem Reaktionsmix für eine 2. PCR zugefügt, der sich wie folgt zusammensetzte: 2-5 µl Templat, 25 nM dNTP-

Mix, 5 μ M M13-HMT3, 50 μ M HMT4, 5 μ l 10X PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂-Lösung und 1 U bio-Taq™ DNA-Polymerase, das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches betrug 50 μ l.

Der Thermocycler, in dem die Inkubationen durchgeführt wurden, war wie folgt programmiert: 94 °C für 5 Min., 33 Zyklen zu 94 °C für 1,5 Min., 64 °C für 1,5 Min., 72 °C für 1 Min., finale Extension ebenfalls bei 72 °C für 10 Min.. Das Produkt dieser Amplifikation (1107 bp, Pos. 15806-253 entsprechend der von XU & ARNASON (1994) veröffentlichten Sequenz plus 18 bp –21 M13-Primer) wurde wiederum auf einem einprozentigen Agarosegel überprüft.

Wie bei 3.3.3.1 beschrieben, wurde das Amplifikat aufgereinigt.

3.3.3.3 Sequenzierung der PCR-Produkte von HVR1 und HVR2

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem Dye Primer Ready Reaction Kit nach Protokoll der Firma PE Applied Biosystems durchgeführt.

Die Sequenzierprodukte wurden auf einem siebenprozentigen denaturierendem Polyacrylamid-Gel mit einem ABI 373A DNA Sequenzierautomaten aufgetrennt. Das Sequenziergel war wie folgt zusammengesetzt:

| | |
|------------------------|-------------|
| Harnstoff | 30 g |
| Acrylamid-Stammlösung. | 10,5 ml |
| 10 x TBE-Puffer | 6 ml |
| A. demin. | 22 ml |
| APS 10% | 220 μ l |
| TEMED | 25 μ l |

Die Datenanalyse erfolgte automatisch mit Hilfe der Sequence Analysis Software der Firma Applied Biosystems.

3.3.3.4 Amplifikation der repetitiven Bereichs in der D-loop (np16101-np16452)

Im Rahmen der Experimente zur Amplifikation des repetitiven Bereichs in der D-loop, im nachfolgenden Oktarepeat genannt, wurde mit verschiedenen DNA-Polymerasen gearbeitet. Es wurde zunächst Taq DNA-Polymerase verwendet und im nachfolgenden sogenannte Proofreading-DNA-Polymerasen. Die verwendeten Primer wurden entsprechend der von XU & ARNASON (1994) veröffentlichten Sequenz hergestellt.

3.3.3.4.1 Amplifikation des Oktarepeats mit Taq DNA-Polymerase

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 20 ng DNA, je 50 µM Fam-HMTR-F und HMTR-R, 0,2 µM dNTP-Mix, 5 µl 10X PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂-Lösung und 1 U bio-Taq DNA-PolymeraseTM zusammengegeben. Das Reaktionsgemisch wurde wie folgt inkubiert: 94°C für 5 Min., 30 Zyklen zu 94 °C für 30 Sek., 62 °C für 30 Sek., 72 °C für 1 Min., finale Extension bei 72 °C für 5 Min.. Die aus der Amplifikation erhaltenen Produkte wurden ohne weitere Aufreinigung auf einem sechsprozentigen denaturierenden Polyacrylamid-Gel (Sequagel 6%, Biozym, Zusammensetzung nach Angaben des Herstellers) mit einem ABI 373A DNA Sequenzierautomaten aufgetrennt (s.u.).

3.3.3.4.2 Amplifikation des Oktarepeats mit sogenannten Proof-reading DNA-Polymerasen

Die PCR-Bedingungen glichen sich weitgehend mit denen der Amplifikation mit Taq-Polymerase. Die einzigen Unterschiede hierbei waren, dass anstelle von MgCl₂-Lösung, MgSO₄-Lösung und eine höhere Polymerasen-Konzentration (2,5 U) eingesetzt wurde. Weiterhin liegt das Temperaturoptimum zur Elongation für alle verwendeten Proofreading-Polymerasen (Pfu-Polymerase, Peqlab, Pwo-Polymerase, Roche, Pfx-Polymerase, Life Technologies) bei 68 °C. Die Reaktionsbedingungen von 3.3.3.4.1 wurden wie beschrieben modifiziert, alle anderen Bedingungen wurden beibehalten.

3.3.4 *Verarbeitung und Analyse der Sequenzdaten*

3.3.4.1 Alignment

Zur weiteren Verarbeitung mussten die Sequenzdaten zunächst in einem Alignment zur Deckung gebracht werden. Dies geschah bei den Sequenzen aus Pferden durch die Sequence Editor Software (Version 1.0.3) der Firma Applied Biosystems. Hierin wurden unmittelbar die Sequenz-Dateien aus der Sequenzierung geladen und die einzelnen Sequenzen durch Vergleich gegen die Referenz (XU & ARNASON, 1994) mit dieser zur Deckung gebracht. Durch den Befehl „create shadows“ generiert das Programm unter jeder Sequenz eine neue Zeile, wo unter jedem Nukleotid entweder durch einen Strich (-) Identität zur Referenz oder durch einen Stern (*) ein Unterschied zur Referenz markiert wurde.

Zu einem späteren Zeitpunkt des Projekts wurden veröffentlichte Sequenzdaten von Equiden und die eines Rhinoceros als Outgroup in die Analyse mit einbezogen. Hierbei gelang ein korrektes Alignment durch unmittelbaren Vergleich im Sequence-Editor-Programm nicht mehr, da die Unterschiede zwischen den Sequenzen der Referenz (einem Pferd) und anderer Equiden zu groß waren. In diesen Fällen wurde ein Internet-Dienst namens DiAlign (<http://www.gsf.de/biodiv/dialign.html>) in Anspruch genommen. Zwar waren die von diesem Dienst erhaltenen Alignments nicht immer optimal, jedoch gelang es leicht, in einer Nachbearbeitung durch unmittelbaren Sequenzvergleich, Fehler im Alignment zu eliminieren. Aus diesen Alignments wurde die Unterschiede zur Referenz in einer Excel-Tabelle in der Form von z.B. 15494.C | 15495.C | 15496.G usw. notiert. Diese Excel-Tabelle war die zentrale Datei für alle nachfolgenden Analysen. In ihr wurden alle Informationen über die untersuchten Proben, inklusive der geographischen Koordinaten des Ursprungs des ältesten dokumentierten maternalen Vorfahren, vermerkt.

3.3.4.2 Phylogenetische Analyse

Die Phylogenetische Analyse wurde mit den Programm-Paketen Network 2.0E (DOS-Version) bzw. Network 3.111 (Windows-Version) durchgeführt. Beide Programme sind unter der Internet-Adresse <http://www.fluxus-engineering.com> frei zugänglich.

3.3.5 Verarbeitung und Analyse der Daten aus der Typisierung des Oktarepeats

Wie unter 3.3.3.4.1 beschrieben, wurden die aus der Amplifikation erhaltenen Fragmente auf einem sechsprozentigen Polyacrylamid-Gel mit einem ABI 373A DNA Sequenzierautomaten aufgetrennt. Die Visualisierung und Grössenberechnung der Banden erfolgte mit Hilfe der Genescan Software der Firma Applied Biosystems. So konnten elektronisch gespeicherte Elektropherogramme erhalten werden, die zur weiteren Analyse in das Programm Genotyper der Firma Applied Biosystems importiert wurden. Dieses Programm zeichnet sich durch eine relativ leichte Bedienbarkeit aus: mehrere Elektropherogramme können auf einem Ausdruck untereinander abgebildet werden. Dabei können die Größen der einzelnen Banden im Elektropherogramm durch sogenannte „Flags“ auf dem Monitor bzw. dem Ausdruck dargestellt werden. Alle in Kapitel 4 dargestellten Ergebnisse der Typisierung des Oktarepeats sind Ausdrücke aus dem Programm Genotyper. Weiterhin bietet Genotyper die Möglichkeit der Erstellung einer Tabelle, die die Größen der einzelnen Banden beinhaltet. Diese Tabelle ist exportierbar und bietet so die Möglichkeit der Digitalisierung und Datenbankverwaltung der erhaltenen Daten.

4 Ergebnisse

4.1 Methodisches

4.1.1 Sequenzierung der hypervariablen Regionen der mitochondrialen D-loop

4.1.1.1 Sequenzierung des Bereichs zwischen tRNA^{Pro} und dem large CSB (HVR1)

Es gelang, durch die semi-nested PCR-Strategie das gewünschte Fragment selektiv zu amplifizieren. Die etwas aufwendige zweistufige Strategie erwies sich bei schwierigen Templaten (degradierte DNA aus verunreinigten Haarwurzelpollen) als sehr vorteilhaft, weil sich durch Variation des eingesetzten Volumens des Produktes der ersten PCR als Templat der zweiten PCR, die Konzentration und die Qualität des Produktes der zweiten PCR sehr gut ansteuern liess. Es zeigte sich, dass bei stark degradierter DNA häufig kein Produkt nach der ersten PCR bei der Kontrolle auf dem Agarosegel zu beobachten war und sich aus einem solchen Produkt auch keine Sequenz erhalten ließ. In diesem Fall wurden 5 µl dieses Produkts als Templat in der zweiten PCR eingesetzt, und es wurde in der Regel so das gewünschte Produkt erhalten, sofern die DNA nicht vollständig degradiert war. Der Effekt von degradierter DNA auf die daraus erhaltene Sequenz war im allgemeinen in der Art, dass vermehrt sogenannte false stops, unerwünschte Abbrüche der Kettenreaktion aufgrund von Sekundärstrukturen, auftraten und dadurch die Länge der auswertbaren Sequenz drastisch reduziert wurde. Die Abbildungen 4.1 und 4.2 illustrieren den Befund.

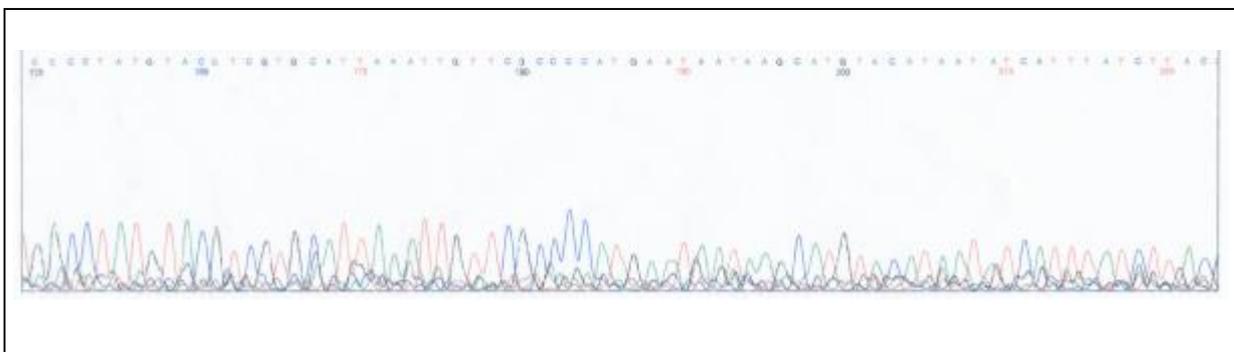


Abb. 4.1: Sequenz von JMU35, Einsatz von 2µl Template in der 2. PCR

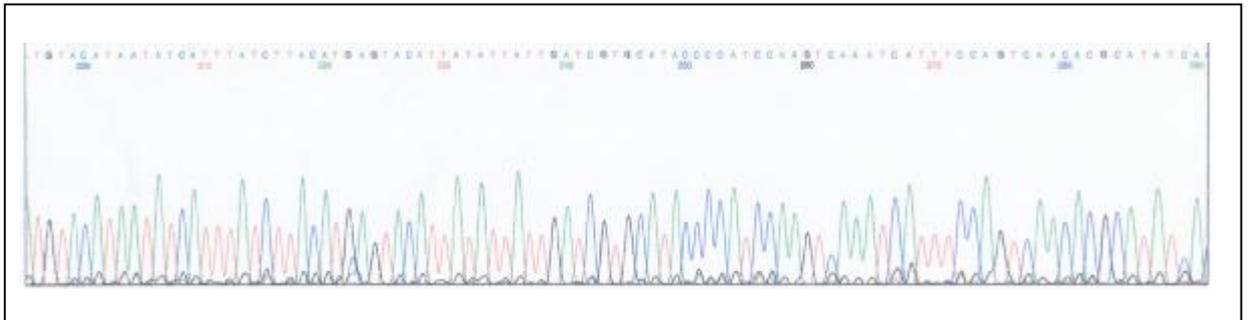


Abb. 4.2: Sequenz von JMU35, Einsatz von 5µl Template in der 2. PCR

4.1.1.2 Sequenzierung des Bereichs zwischen np 15803 und 16101 (HVR2)

Durch die Erfahrung, die bei der Optimierung der Sequenzierungsstrategie für HVR1 gesammelt wurde, liess sich sehr schnell die Amplifikation und Sequenzierung des Fragments für HVR2 optimieren. Die Strategie ist also leicht übertragbar auf verwandte Systeme.

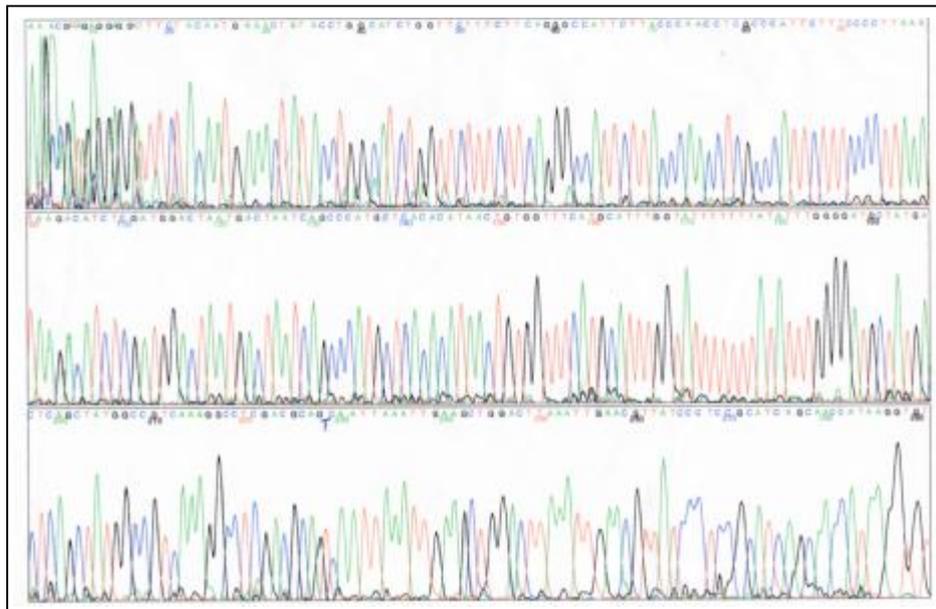
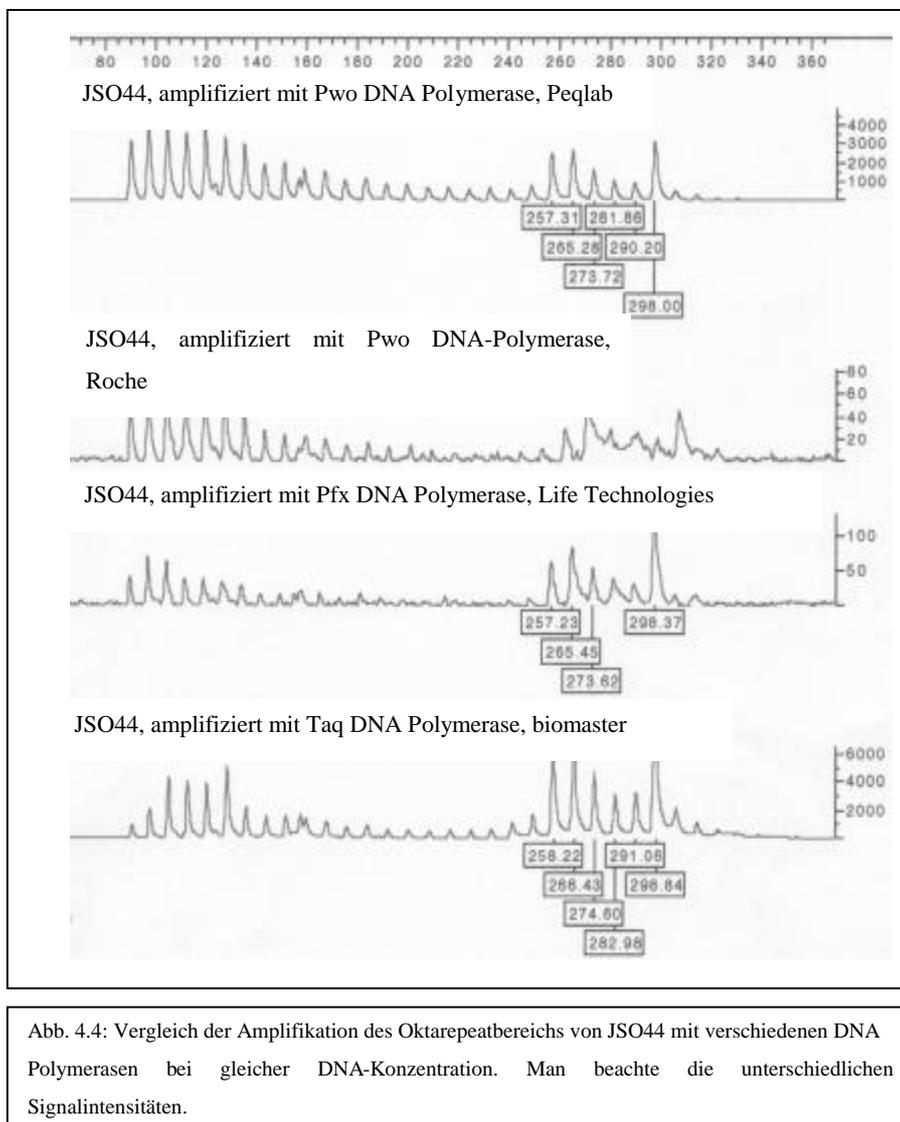


Abb. 4.3: Ausschnitt aus der Sequenz der HVR2 von JMU10

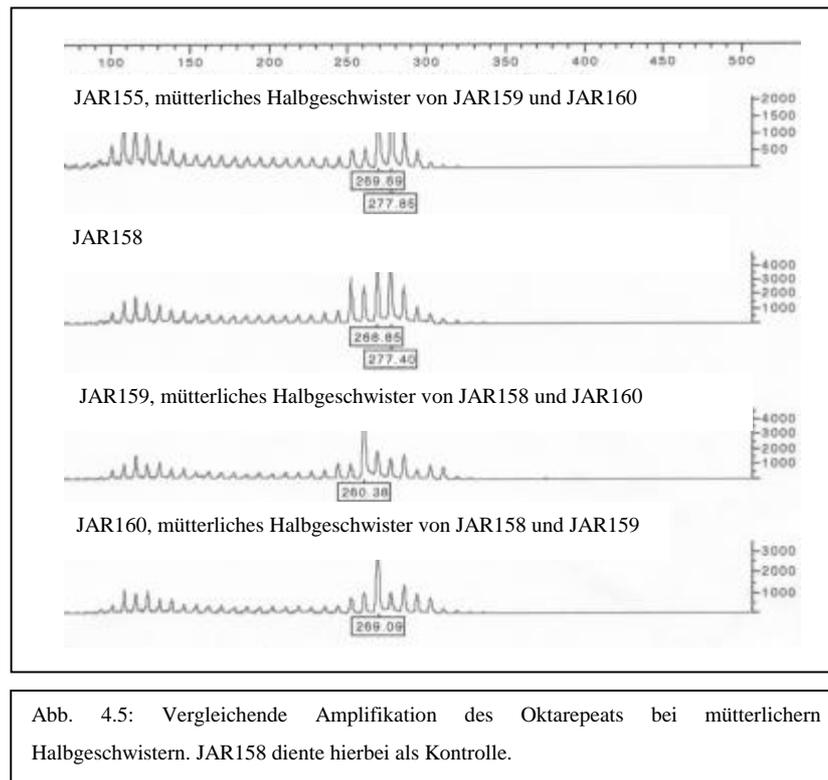
4.1.2 Typisierung des mitochondrialen Oktarepeats

Die Amplifikation des Oktarepeat-Bereichs erwies sich als relativ schwierig. Es wurden stets sehr viele Banden im Abstand von 8 bp beobachtet, so dass zunächst auf ein Amplifikationsartefakt durch die verwendete Taq-Polymerase geschlossen wurde. Bei der

darauf folgenden Verwendung von sogenannten „Proofreading-Polymerasen“ wurden weiterhin Amplifikationsprodukte in gleicher Anzahl und Grösse erhalten. Jedoch wurde bei zwei der drei verwendeten Polymerasen (vgl. Material und Methoden) eine drastisch Einbuße in der Signalintensität beobachtet. Dies ist bei der verwendeten Pfx DNA-Polymerase um so bemerkenswerter, als dass sie zur Verhinderung unerwünschter Abbaureaktionen in inaktivierter Form bei der Zusammenstellung der PCR verwendet und erst durch einen verlängerten initialen Denaturierungsschritt aktiviert wurde. Die besten Ergebnisse bei der Amplifikation mit Proofreading-Polymerasen wurden mit der Pwo DNA Polymerase der Firma Peqlab erreicht (Abb.: 4.4).



Trotz der wenig befriedigenden Ergebnisse wurde nachfolgend untersucht, ob sich die gefundenen Bandenmuster stabil vererben. Zu diesem Zweck wurden drei mütterliche Halbgeschwister untersucht (Abb. 4.5).



Aufgrund der Tatsache, dass sich die Zusammensetzung, sowohl in Bezug auf die unterschiedlichen Längen als auch auf deren prozentuale Zusammensetzung, des Oktarepeats nicht stabil vererbt, wurde an diesem Punkt die Untersuchung hierzu beendet.

4.2 Auswertung der Ergebnisse

4.2.1 Auswertung und Vergleich der Ergebnisse der Sequenzierung von HVR1 und HVR2

Bereits der Vergleich der erhaltenen Sequenzen aus der HVR1 unmittelbar nach dem Alignment (siehe Anhang) fiel auf, dass in verschiedenen Rassen auffällige Sequenzmuster bei einer großen Probenzahl auftraten. Als Beispiel dienen hier die Proben von Sorraias, in Tabelle 4.1 repräsentiert durch die Proben JSO47-JSO50, und Mustangs aus dem Sulphur Springs Herd Management Area (JMU14 & JMU15 in Tabelle 4.1); das letztere Muster trat auch bei den Berberpferden und iberischen Reitpferden vorwiegend auf. Ein Alignment von allen Sequenzen, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, findet sich im Anhang. In

Tabelle 4.1 ist auch das Ergebnis der Sequenzierung der HVR2 für die aufgeführten Individuen aufgelistet. Die Sequenzierung der HVR2 geschah mit der Intention, eine Gruppierung nach Massgabe der jeweiligen Rassen zu erreichen, da dies alleine durch Sequenzierung der HVR1 nicht gelang. Dieses Ziel wurde jedoch auch durch die Sequenzierung der HVR2 nicht erreicht. Vielmehr wurde erkannt, dass durch die Sequenzierung der HVR2 die Gruppierung, die bereits aus der Sequenz der HVR1 erhalten wurde, eine weitere Aufspaltung, die auch höhere Feinauflösung im phylogenetischen Sinne genannt werden könnte, erhalten wird.

Aufgrund der angedeuteten Auffälligkeiten ließen sich durch die Auswertung per Auge vier Gruppen nach der Sequenzierung der HVR1 differenzieren (vgl. Anhang):

1. Senner: Bei allen Sennern war das grundlegende Muster 15495 T>C, 15598 T>C, 15602 C>T, 15615 A>G, 15616 A>G, 15659 T>C, 15703 T>C, 15720 G>A, zu finden. Außer bei den Sennern trat dieses Muster nur noch bei zwei arabischen Pferden aus der Studie von BOWLING ET AL. (2000) und bei einem Rheinisch Deutschen Kaltblut aus der hier vorgestellten Studie auf. Bei Vernachlässigung von 15598 T>C fällt noch ein Lipizzaner aus der Studie von KAVAR ET AL. (1999) in diese Gruppe.

2. Sorraias: Das hier zu Grunde liegende Sequenzmuster wurde zuerst bei Sorraia-Pferden gefunden. Da es sich bei dieser Population wahrscheinlich um keine Zuchtrasse im engeren Sinne handelt, diente sie als Namensgeber für das Sequenzmuster, welches sich aus 15495 T>C, 15542 T>C, 15597 A>G, 15650 A>G, 15666 G>A, 15720 G>A zusammensetzt. Neben den Sorraia-Pferden fand sich dieses Sequenzmuster auch noch bei einigen modernen Zuchtrassen, wie zum Beispiel Arabern, interessanterweise aber auch beim größeren Teil der Koniks (drei von fünf). Der Konik wird häufig als Nachfahre des Tarpans als Primitivrasse aufgefasst (vgl. 2.1.5.2.12).

3. Mongolische Wildpferde: Dieses Sequenzmuster fand sich exklusiv in dieser Population: 15495 T>C, 15542 T>C, 15595 A>G, 15602 C>T, 15650 A>G, 15666 G>A 15720 G>A.

| Probe | HVR1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | HVR2 | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| | 15494 | 15495 | 15496 | 15542 | 15534 | 15585 | 15597 | 15602 | 15603 | 15604 | 15615 | 15635 | 15649 | 15650 | 15666 | 15672 | 15699 | 15703 | 15707 | 15720 | 15771 | | 15870 | 15871 | 15956 | 15974 | 16031 | 16055 | 16068 | 16074 | 16079 | 16104 | 16111 | 16113 | |
| Referenz | T | T | A | C | C | G | A | C | T | G | A | C | A | A | G | G | C | T | C | G | C | | C | C | A | C | T | A | T | G | A | C | G | G | |
| JMU1 | | C | | | | | | | | | | | | G | A | | | | | A | | | T | | | | | G | | | | | | | |
| JKO2 | | C | | T | | | G | T | | | | | | G | A | A | | | C | | | | T | T | | | | | | | | | | A | A |
| JKO3 | | C | | T | | A | G | T | | | G | T | | G | A | | | | C | | | | T | | | | C | | | A | | | | | A |
| JMU4 | | C | | | | | | | | | | | | G | A | | | | | | | | | | | | | G | | | G | | | A | A |
| JMU14 | C | C | C | | T | | | T | C | A | | | G | | | | | | | | A | T | | T | T | G | T | | | C | | | T | | A |
| JMU15 | C | C | C | | T | | | T | C | | | | G | | | | A | | G | A | | | T | T | G | T | | | C | | | T | | | |
| JMU31 | | C | | T | | A | G | T | | | | | | G | A | | | | C | | | | T | | | | | | | | | | | | A |
| JMU32 | | C | | T | | A | G | T | | | | | | G | A | | | | C | | | | T | | | | | | | | | | | | A |
| JSO47 | | C | | T | | | G | T | | | | | | G | A | | | | C | | | | | | | | | | | | | | | | A |
| JSO48 | | C | | T | | | G | T | | | | | | G | A | | | | C | | | | | | | | | | | | | | | | A |
| JSO49 | | C | | T | | | G | T | | | | | | G | A | | | | C | | | | | | | | | | | | | | | | A |
| JSO50 | | C | | T | | | G | T | | | | | | G | A | | | | C | | | | | | | | | | | | | | | | A |

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der Sequenzen der HVR1 und HVR2 von 12 ausgewählten Individuen

4. Berber & iberische Pferde: Bei der Auswertung der Sequenzen fiel dieses Sequenzmuster am stärksten auf. In allen bisher veröffentlichten Studien, inklusive der hier vorliegenden, fand sich dieses Muster bei insgesamt 176 von 654 (26,9 %) untersuchten Individuen. Bereits die ersten drei Abweichungen von der Referenz determinieren diese Gruppierung. Das grundlegende Sequenzmuster setzt sich aus 15494 T>C, 15495 T>C, 15496 A>G, 15534 C>T, 15649 A>G zusammen. Bei der Suche nach diesem Muster in den verschiedenen Rassen fiel auf, dass sich dieses bei den meisten der untersuchten iberischen Pferde, Berber, Dülmener Pferde und Mustangs aus dem Sulphur Springs HMA fand. In keiner anderen Population trat dieses Muster so stark hervor. Es ist sogar so, dass in fast keinem anderen Sequenzmuster diese Mutationen, auch nur einzeln, auftreten. Die einzige Ausnahme stellt hierbei die Mutation 15649 A>G dar. Diese Mutation findet sich bei insgesamt vier Proben, die nicht zu dieser Gruppe gehören. Die Beschreibung der Gruppe als "Berber und iberische Pferde" wurde gewählt, da das Sequenzmuster in dieser Studie zuerst bei iberischen Pferden und Berbern gefunden wurde.

4.2.2 Auswertung mittels des Network-Programm-Pakets

Die Auswertung mittels Network erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die verfügbaren Sequenzen aus der D-loop von Pferden einer Network-Analyse unterzogen, woraus ein Netzwerk erhalten wurde, welches im folgenden Pferde-Netzwerk genannt wird, dass auf insgesamt 17 Expansionsereignisse schließen lässt (vgl. 4.2.2.1 zur Begriffsdefinition und 4.2.2.2 für das Netzwerk). Zu einer schlüssigen Interpretation dieser Ergebnisse, inklusive der Bestimmung einer Mutationsrate für den untersuchten Bereich, erwies es sich jedoch als notwendig, eine Wurzelung dieses Netzwerks durchzuführen, also den wahrscheinlichsten Mikrohaplotypen des letzten gemeinsamen Vorfahren zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die in Genbank veröffentlichten D-loop-Sequenzen von Equiden aus OAKENFULL ET AL. (2000), Genbank accession numbers: AF220916 - AF220938, die Sequenz eines Rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*, Genbank accession number: X97336) aus XU ET AL. (1996)² und fünf ausgewählte Sequenzen von Pferden (VPL2, VEC13B VEC14, VEC21, Ref., vgl. Anhang) einer Network-Analyse unterworfen. In die oben beschriebene Analyse wurde die Sequenz eines Rhinoceros integriert, da die Ceratomorpha (Nashörner und Tapire) in der Ordnung der Perissodactyla die nächsten Verwandten der Hippomorpha (Pferdeartige) sind. Der Punkt, an dem das Nashorn in dem Netzwerk anbindet, bestimmt die Sequenz des

letzten gemeinsamen Vorfahren von Nashörnern und Pferdeartigen, also die Wurzel des Netzwerks (im folgenden Equiden-Netzwerk genannt, vgl. 4.2.2.1). Erst die Bestimmung der Wurzel ermöglichte eine erschöpfende Interpretation des Netzwerks

4.2.2.1 Erstellung und Interpretation eines Equiden-Netzwerks

Aus den zuvor beschriebenen mtDNA-Sequenzen wurde mittels Network 3.1.0.0 ein Equiden-Netzwerk erstellt. Es erwies sich dabei als sehr schwierig, die Sequenz des Rhinoceros zu integrieren. Bereits der Versuch eines gemeinsamen Alignments aller verwendeten Sequenzen barg große Probleme. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den mtDNA-Sequenzen der Equiden und des Rhinoceros gelang es nicht, mittels des Programms Sequence-Editor der Firma ABI ein zuverlässiges Alignment zu erstellen. Das daraufhin mittels DiAlign erstellte Alignment erwies sich bei näherer Betrachtung ebenfalls als suboptimal, ließ sich jedoch durch Vergleich der einzelnen Sequenzen im Alignment soweit verbessern, dass eine phylogenetische Analyse möglich wurde (für das Alignment: siehe Anhang). Die Erstellung eines Equiden-Netzwerks zur Wurzelung des Pferde-Netzwerks gelang so lange nicht, bis die Rhinoceros-Sequenz entfernt wurde. Es wurden zur Überprüfung der Robustheit des Netzwerks einzelne Spezies oder einzelne, nicht an der Wurzelung beteiligte, Mutationen entfernt. Dies führte dazu, dass die Wurzel bei den jeweiligen Versuchen an einem völlig anderen Ort zu finden war.

Ein Netzwerk ohne Rhinoceros erwies sich jedoch als robust (Abb. 4.6): Die Entfernung der verwendeten Steppenzebra-Sequenzen führte zum Beispiel weder zu einer Positionsveränderung der verbleibenden Gruppen im Netzwerk, noch veränderte sich die Topographie insgesamt.

Nachfolgend wurde durch Vergleich der Sequenzmuster in dem Alignment mit der Sequenz des Nashorns, gewissermaßen durch „Abzählen“ der Positionen, die Wurzel des Equiden-Netzwerkes bestimmt. Sie liegt sechs Mutationen vor dem Koaleszenzpunkt (mv19) der Bergzebras, Mountain1 - Mountain 4, (Abb. 4.7).

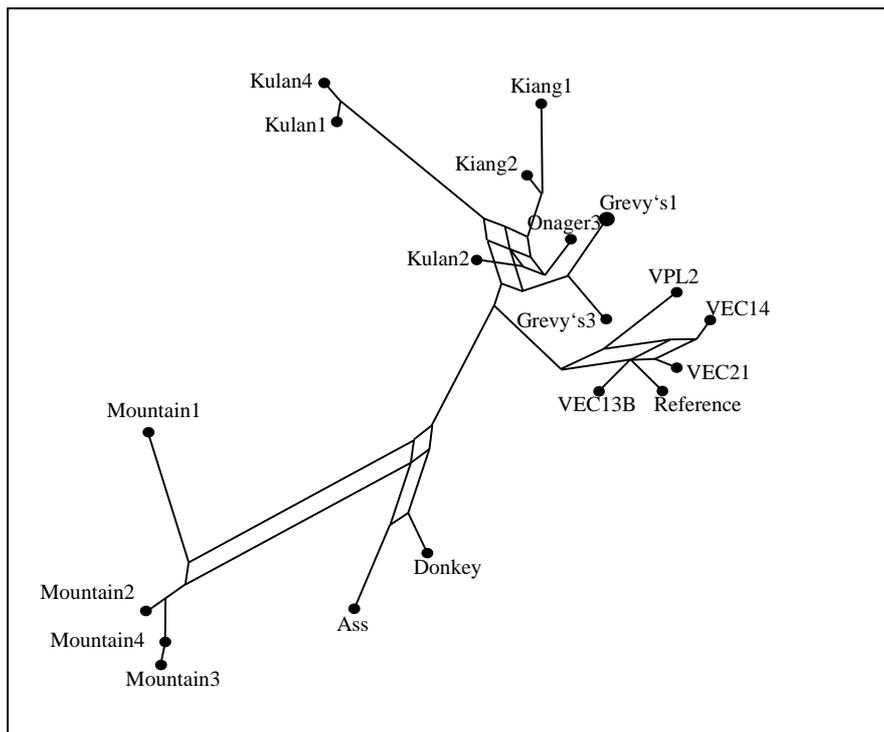


Abb. 4.6: Reduced-Median-Netzwerk, erstellt aus den Equiden-Sequenzen, jedoch ohne Steppenzebras zur Überprüfung der Robustheit, Darstellung vereinfacht.

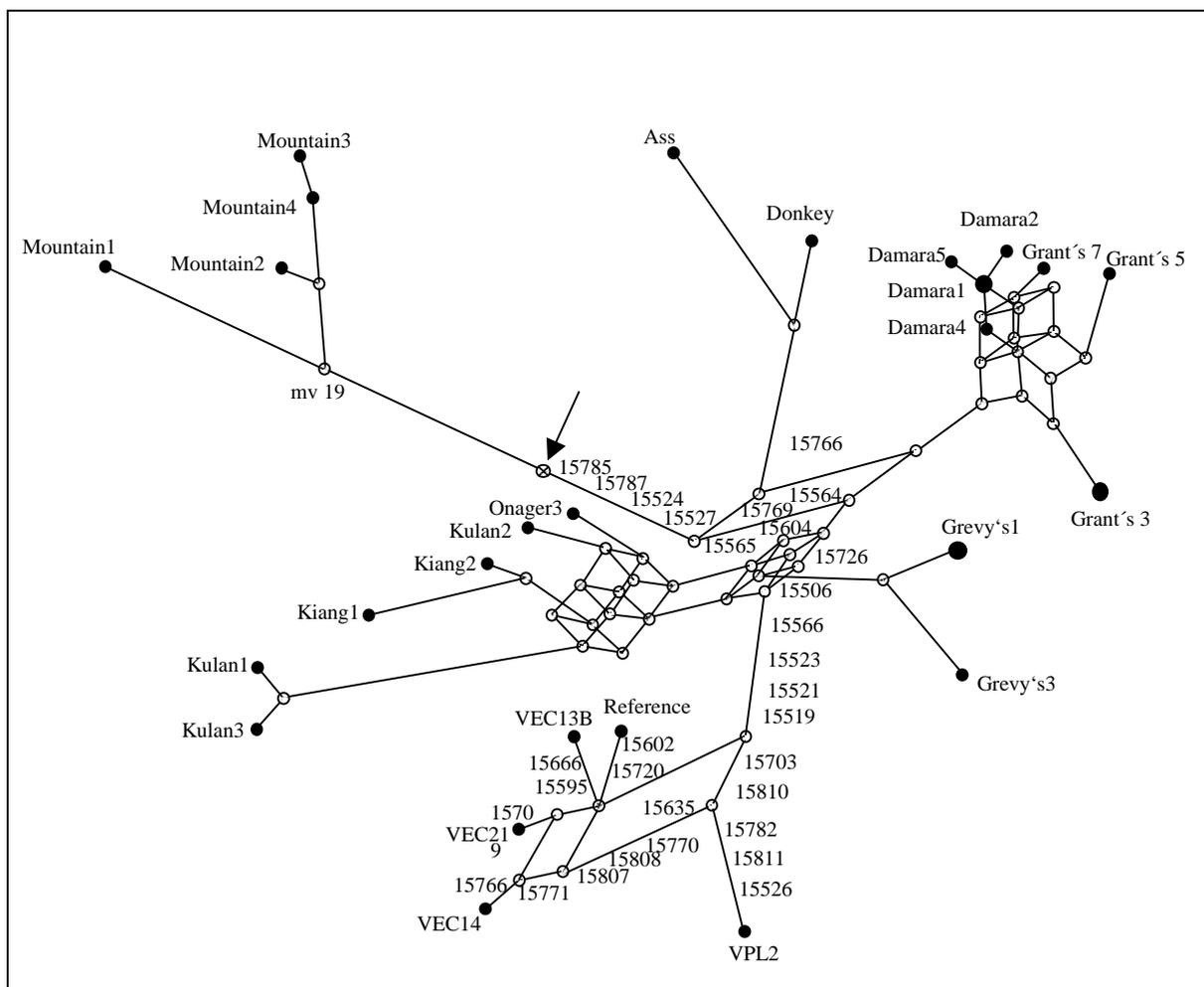


Abb. 4.7: vollständiges Equiden-Netzwerk, erstellt aus veröffentlichten D-loop-Sequenzen. Der eingefügte Pfeil markiert die Wurzel des Netzwerks, also den Punkt, wo das Rhinoceros am Netzwerk andockt.

Aus diesem Netzwerk konnte unter Verwendung der Daten von EISENMANN ET AL. (2000) als jüngste Kalibrierung, 1,0 Mio. Jahre, und der in der Paläontologie allgemein akzeptierten, ältesten Datierung für das Auftreten des ersten Vertreters der Gattung *Equus*, *Equus simplicidens*, als älteste Kalibrierung mit 3,5 Mio. Jahren, in Network 3.111 die Mutationsrate bestimmt werden. Dies geschieht normalerweise auf eine sehr benutzerfreundliche Art. Wenn man das Unterprogramm „Time estimates“ öffnet und darin das zu untersuchende Netzwerk lädt, so kann man nach Festlegung des den letzten gemeinsamen Vorfahren repräsentierenden Knotens und der Knoten der Nachfahren durch Veränderung der Mutationsrate das Alter dieses ursprünglichen Expansionsereignisses so ansteuern, dass man den verwendeten Kalibrationspunkt, hier die gemittelten 2.250.000 Jahre erreicht (vgl. Abb.4.8). Der Begriff "Expansionsereignis" wird hier so definiert, dass ein Individuum oder eine Gruppe mit identischem Mikrohaplotypen zu einem Zeitpunkt in eine Umwelt geriet, die eine starke Vermehrung und darauf folgende Auswanderung und somit weitere Verbreitung der Nachfahren ermöglichte. Dadurch ist ein solcher durch ein Expansionsereignis verbreiteter Mikrohaplotyp in einer Stichprobe vermehrt anzutreffen. Der Zeitpunkt von solchen Ereignissen (ρ) wird im folgenden gemäß FORSTER ET AL. (1996) zu bestimmen sein:

$$\rho = (n_1 \cdot l_1 + n_2 \cdot l_2 + \dots + n_m \cdot l_m) / n.$$

Dabei ist n die Anzahl der Individuen im abgeleiteten Knoten und l die Anzahl der Mutationen zwischen Zentralknoten und abgeleitetem Knoten.

Eine Bestimmung des Expansionszeitpunktes mittels des Network-Programm-Pakets war jedoch hier nicht möglich, da im Equiden-Netzwerk kein diskreter Knoten für den ancestralen Mikrohaplotypen vorlag. Daher war eine Berechnung von ρ gemäß obiger Formel nach manuellem Auszählen der Anzahl der Mutationen zwischen dem Zentralknoten und den abgeleiteten Knoten notwendig. Nachfolgend wurde aus der Division des Kalibrationszeitpunktes durch $\rho = 17,068$ die Mutationszeit bestimmt. Dies führte zu einer (gemittelten) Mutationszeit von 269.045 (± 149.604) Jahren bzw. einer Mutationsrate von $5,4 \times 10^{-8}$ ($\pm 2,6 \times 10^{-8}$) pro Nukleotid und Jahr für den untersuchten Bereich der HVR1 der D-loop der Equiden. Dieser Wert ist vergleichbar mit den veröffentlichten Daten (ISHIDA ET AL., 1995; OAKENFULL ET AL., 2000; LISTER ET AL., 1998; XU & ARNASON, 1994).

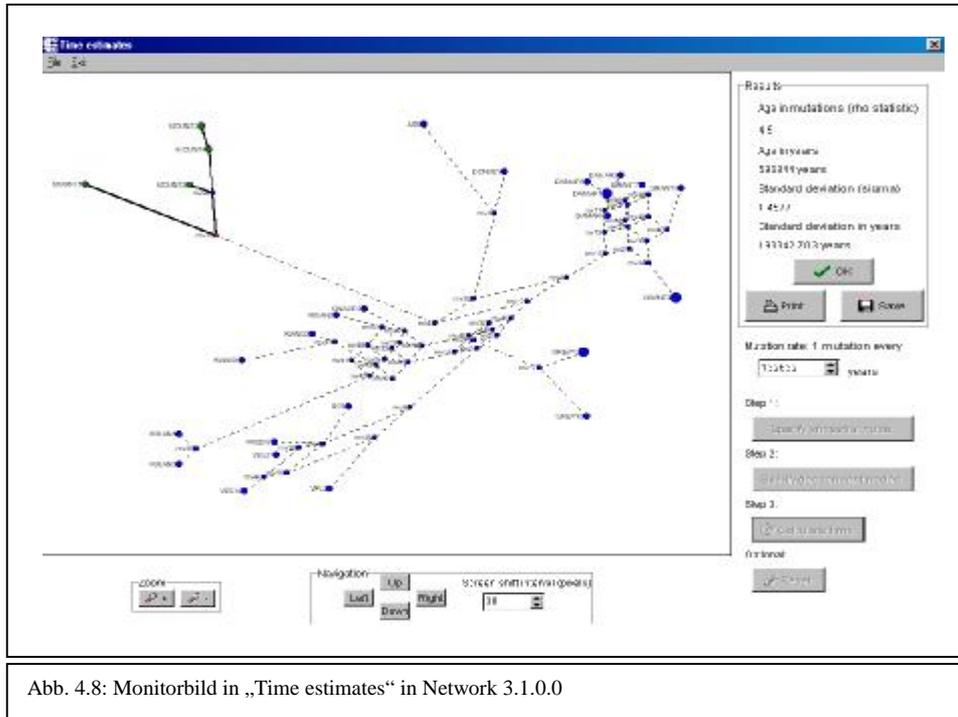


Abb. 4.8: Monitorbild in „Time estimates“ in Network 3.1.0.0

Unter Verwendung dieser Mutationsrate wurden die Koaleszenzzeiten der einzelnen Spezies bestimmt. Der Begriff Koaleszenzzeit beschreibt in diesem Zusammenhang den Zeitpunkt, an dem gemäß der untersuchten Daten und der erhaltenen Mutationsrate der letzte gemeinsame Vorfahr der jeweiligen Spezies gelebt haben muss.

Unter Verwendung von Network 3.111 wurden die Koaleszenzzeiten der verschiedenen Equiden so bestimmt, dass die schnellst mögliche Mutationsrate verwendet wurde (1 Mutation pro 119.441 Jahre, aus der Kalibrierung auf 1 Million Jahre nach EISENMANN ET AL. [2000]), um auf diesem Wege eine Minimalabschätzung zu erhalten (während zuvor sich die Fehlerangaben auf die Mittelung bezogen, bezieht sich die Fehlerangabe ab hier auf die Standardabweichung σ nach SAILLARD ET AL., 2000):

| | |
|--|---|
| Bergzebra (<i>Equus zebra</i>): | 537.485 (\pm 126.691) Jahre, $\rho = 4,50$, $\sigma = 1,0607$ |
| Steppenzebra (<i>E. burchelli</i>): | 517.574 (\pm 98.419) Jahre, $\rho = 4,3333$, $\sigma = 0,8240$ |
| Grevy's Zebra (<i>E. grevyi</i>): | 637.015 (\pm 203.014) Jahre, $\rho = 5,3333$, $\sigma = 1,6997$ |
| Halbesel (<i>E. hemionus</i> & <i>E. kulan</i>): | 966.712 (\pm 145.745) Jahre, $\rho = 7,3333$, $\sigma = 1,1056$ |
| Esel (<i>E. africanus</i>): | 875.897 (\pm 231.298) Jahre, $\rho = 7,50$, $\sigma = 1,9365$ |
| Pferd (<i>E. ferus</i>): | 776.367 (\pm 119.441) Jahre, $\rho = 6,50$, $\sigma = 1,2748$ |

Dabei berechnet sich σ gemäß:

$$\sigma^2 = (n_1^2 * l_1 + n_2^2 * l_2 + \dots + n_m^2 * l_m) / n^2$$

4.2.2.2 Erstellung und Interpretation eines Pferde-Netzwerks

Insgesamt wurden 81 verschiedene Mikrohaplotypen bei domestizierten Pferden, drei bei mongolischen Wildpferden, fünf bei den 1.000-2.000 Jahre alten Proben von archäologischen Fundorten und sieben bei den Pleistozän-Proben identifiziert. Durch Vergleich der Mutationen im Equiden-Netzwerk, die zur Pferdegruppe führen, mit den Mutationen, die im Pferde-Netzwerk von der Outgroup ausgehend in den Teil des Netzwerkes, der die modernen Proben von Pferden beinhaltet, führt, konnte der Knoten A6 als Koaleszenzpunkt des Pferde-Netzwerkes für die modernen Pferde bestimmt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Längen der untersuchten Sequenzbereiche in den Netzwerken, im Equiden-Netzwerk 298 bp, im Pferde-Netzwerk wegen der unterschiedlichen Längen der veröffentlichten Sequenzen nur 247 bp, musste die Mutationsrate zunächst umgerechnet werden, um die Koaleszenzzeit des Pferde-Netzwerkes berechnen zu können. Die gemittelte Mutationsrate für das Pferde-Netzwerk berechnete sich zu $6,5 \times 10^{-8}$ ($\pm 3,1 \times 10^{-8}$) für den untersuchten Bereich, somit die Mutationszeiten zu 1 Mutation pro 99.000 Jahren für den jüngsten Kalibrierungszeitpunkt bzw. 1 Mutation pro 347.000 Jahren für den ältesten Kalibrierungszeitpunkt, welche zu 100.000 Jahren bzw. 350.000 Jahren gerundet wurden. Alle nachfolgenden Berechnungen basieren auf der schnellsten Mutationsrate, um so eine Minimalabschätzung zu erhalten. Ein Vergleich des Transitions-Transversions-Verhältnisses lieferte, dass dieses im Equiden-Netzwerk nicht kleiner ist als im Pferde-Netzwerk. Eine Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse mittels des Modells von TAMURA UND NEI (1993) (gamma-Verteilung) wurde somit als nicht notwendig betrachtet. Die Koaleszenzzeit der heute lebenden Pferde wurde so auf mindestens 342.150 Jahre datiert ($\rho = 3,4215$). Das bedeutet, dass spätestens vor rund 300.000 Jahren das erste moderne Pferd gelebt haben muss. Zur Bestimmung, wie viele Stuten mindestens domestiziert worden sein müssen, um die gefundenen 81 Mikrohaplotypen erklären zu können, wurde die Zahl der Mikrohaplotypen berechnet, die maximal nach der Domestikation entstanden sein können. Dazu wurde der früheste denkbare Domestikationszeitpunkt, das Ende der Eiszeit (9.400 v. Chr.) und die schnellste Mutationsrate verwendet. Es entstanden maximal 11,4 % der gefundenen Mikrohaplotypen

nach der Domestikation. Folglich muss die heute lebende Population domestizierter Pferde auf mindestens 77 genetisch unterschiedliche Stuten zurückgehen. Die hohe Zahl an Gründerstuten macht es völlig unwahrscheinlich, dass das Pferd ausschließlich von einer menschlichen Gemeinschaft zu einem Zeitpunkt an einem Ort erfolgreich domestiziert wurde. Obwohl dieses ein recht ungenauer Ansatz ist, ist der Fehler des erhaltenen Zahlenwerts aufgrund der vergleichsweise langsamen Mutationsrate sehr gering und vernachlässigbar für die daraus folgenden Schlüsse. Die Anzahl der Gründerstuten ist eine Mindestzahl, weil 1. die Möglichkeit von mehreren Gründerstuten mit gleichem Mikrohaplotyp vernachlässigt wird, 2. die schnellste Mutationsrate verwendet wurde, 3. Mikrohaplotypen hoher Frequenz äquivalent zu Mikrohaplotypen niedriger Frequenz betrachtet werden, 4. 9.400 v. Chr. ein recht unwahrscheinlich früher Domestikationszeitpunkt ist und 5. mit Sicherheit nicht alle existierenden Mikrohaplotypen gefunden wurden.

Durch die Identifizierung des Knotens A6 als Wurzel des Pferde-Netzwerks konnte der Ursprung der heute lebenden Pferde in Eurasien bestimmt werden. Das hat wiederum zur Folge, dass die Tiere, deren Überreste aus dem Permafrost-Proben Alaskas geborgen wurden, einen eurasischen Ursprung haben. Dieser Befund macht auch in dem Licht Sinn, dass in dem fraglichen Zeitraum (12.000-28.000 Jahre vor der Gegenwart) Alaska einerseits über eine Landbrücke mit Eurasien verbunden war, andererseits durch mächtige Gletscher, die für Pferde unüberwindbar gewesen sein dürften, vom amerikanischen Kontinent getrennt war (KUNZ & REANIER, 1994; PELTIER, 1994).

Legende zu Abb.4.9: Kreise zeigen existierende Knoten, schwarze Kreise mediane Vektoren. Die mutierten Positionen (minus 15.000), die die einzelnen Gruppen trennen, sind an den entsprechenden Ästen wiedergegeben. Äste mit durchgezogenen Linien verdeutlichen den postulierten maximum-parsimony-tree, gepunktete Äste zeigen die verbleibenden most-parsiminous-trees, gestrichelte/gepunktete Äste markieren unvollständige Sequenzen. Der Pfeil zeigt den Anknüpfungspunkt des Equiden-Netzwerks. Die Probenbezeichnungen setzen sich wie folgt zusammen: erster Buchstabe: Name des Autors; zweiter und dritter Buchstabe: Rassekürzel; Zahl oder weitere Buchstaben: ggfs. abgekürzte Probenbezeichnung des Autors. Nähere Informationen zu den Proben finden sich im Anhang 2.

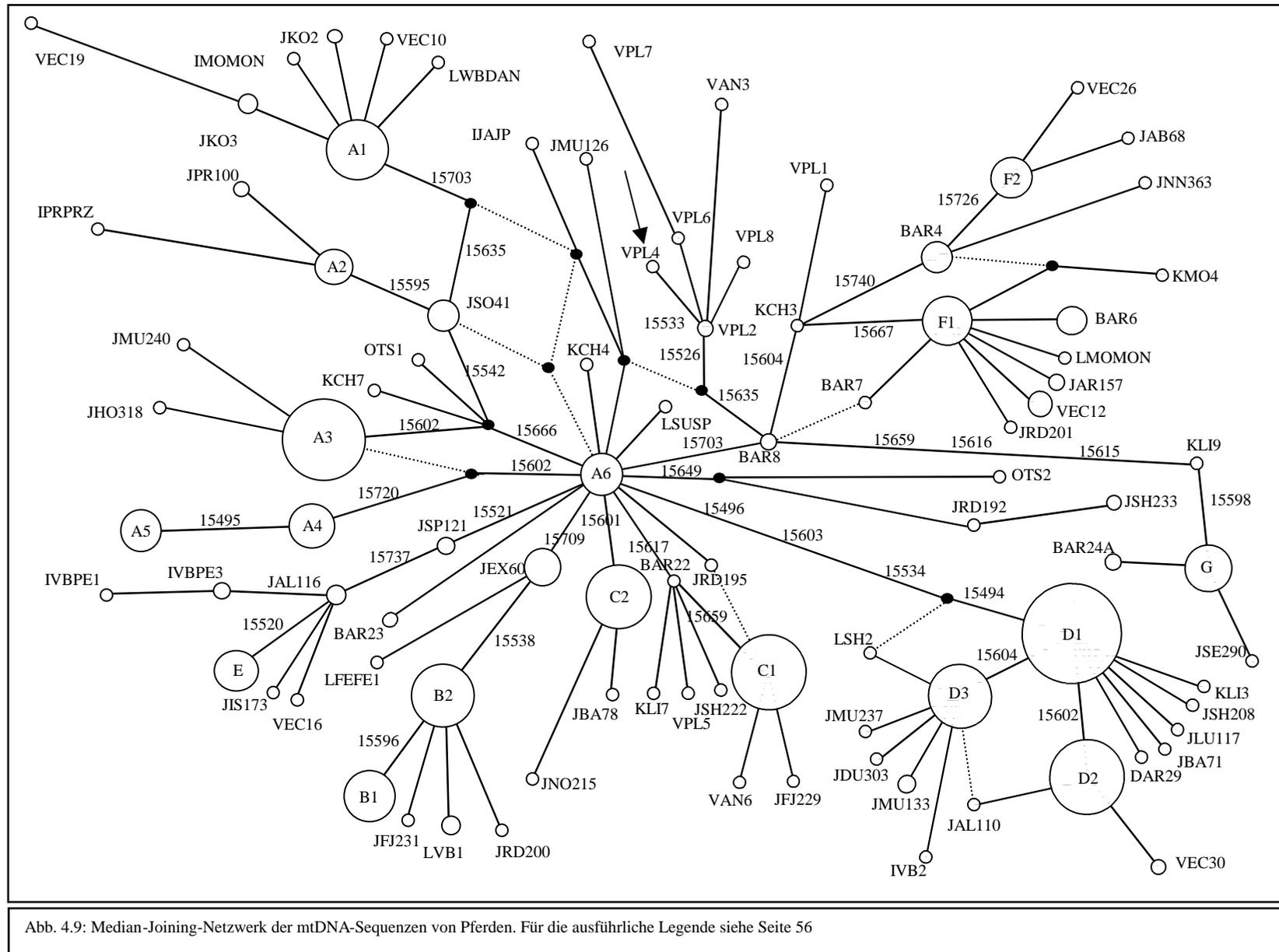


Abb. 4.9: Median-Joining-Netzwerk der mtDNA-Sequenzen von Pferden. Für die ausführliche Legende siehe Seite 56

Auffallend im Pferde-Netzwerk ist, dass insgesamt 17 große Knoten auftreten, von denen sich zumeist einige wenige Knoten ableiten. Diese Knoten wurden als Expansionsereignisse aufgefasst (zur Definition des Begriffes "Expansionsereignis" vgl. 4.2.2.1). Um einen bestimmten Knoten als Expansionsereignis auffassen zu können, wurde, aus Plausibilitätsbetrachtungen heraus, willkürlich die Mindestgröße eines Knotens auf 2% der gesamten untersuchten Stichprobe festgelegt. Dies geschah aus dem Grund, dass zumeist deutlich mehr oder weniger Proben als 2% der Gesamtzahl in einem Knoten aufzufinden sind. Die einzigen Ausnahmen stellen die Knoten JSO41 und BAR4 dar. Folglich findet man das entsprechende Sequenzmuster häufiger in einer Stichprobe. Mikrohaplotypen, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, wurden als "lones" klassifiziert. Diese Klassifizierung ist jedoch nur als Betrachtung aus dem Stand der Dinge heraus zu sehen. Schließlich könnte der eine oder andere Mikrohaplotyp aus der Gruppe der "lones" in einer bisher nicht untersuchten Population überproportional auftreten, so dass möglicherweise weitere Expansionsereignisse aufgefunden werden könnten. Natürlich treten in einer der Mutationsrate entsprechenden Frequenz Mutationen auf, wodurch sich die abgeleiteten Knoten aus den Expansionsereignissen erklären. Das Alter der jeweiligen Expansionsereignisse wurde nach FORSTER ET AL. (1996) berechnet. Die 17 großen Knoten wurden in Anlehnung an VILÀ ET AL. (2001) zu 8 Klassen zusammengefasst und entsprechend bezeichnet. Zur Einordnung der Individuen in die Expansionsereignisse siehe die Tabelle im Anhang. Eine exakte Darstellung der Alter der jeweiligen Expansionsereignisse findet sich im nachfolgenden Kapitel 4.2.2.3 Geografische Analyse der Expansion.

4.2.2.3 Geografische Analyse der Expansion

In der hier dargestellten geografischen Analyse wurden die Individuen gemäß der geografischen Koordinaten ihres Ursprungs auf eine Weltkarte projiziert. Die Darstellung erfolgt in Form von Tortendiagrammen, wobei der jeweilige vollständige Kreis, die „ganze Torte“, die Gesamtanzahl der Individuen, die dieses geografischen Ursprungs sind, repräsentiert. Die Radien der Kreise sind proportional zur Probenzahl. Es wurden primär nur die Individuen berücksichtigt, deren maternale Vorfahren dokumentiert sind. Proben von Individuen unbekannter oder ungenauer Abstammung wurden bei der geografischen Analyse ausgeklammert, jedoch werden alle Proben, die in der jeweiligen Gruppe im Netzwerk

auftreten, in der Legende zu der Projektion erwähnt. In diesem Zusammenhang seien die verwendeten Abkürzungen und Kurznamen erläutert:

- Die Bezeichnung "Pferd" oder "Pony" wird grundsätzlich weggelassen, daraus ergibt sich z.B. aus "arabisches Pferd" der Begriff "Araber" usw.;
- "Rheinländer" steht aus Platzgründen für Rheinisch-Deutsche Kaltblüter;
- "EC" beschreibt von VILÀ ET AL. (2001) veröffentlichte Sequenzen, die Probenbezeichnung folgt den Autorenangaben.

4.3.2.2.1 Dokumentierte geografische Herkunft und Stichprobengröße

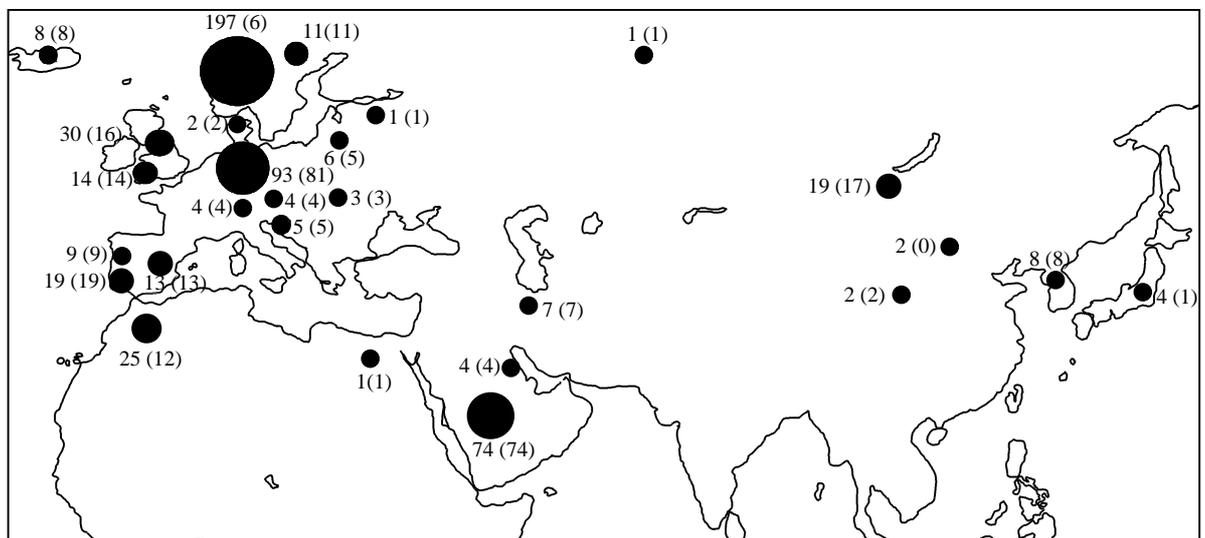


Abb.4.10: Gesamtdarstellung der Proben, die der geographischen Analyse unterzogen wurden, die Zahlen vor den Klammern geben die Gesamtanzahl der Proben aus der jeweiligen Region an, die Zahlen in den Klammern, die Anzahl der Proben, deren maternaler Ursprung dokumentiert ist (insgesamt 335), die Kreisradien sind proportional zur Stichprobengröße.

Aus Abb. 4.10 wird deutlich, dass Proben aus der europäischen, arabischen und nordafrikanischen Hemisphäre sehr gut repräsentiert, während Proben aus dem asiatischen Raum kaum vertreten sind. Der Grund dafür ist ausschließlich in der Verfügbarkeit von Probenmaterial zu suchen. Dennoch konnte durch Verwendung von veröffentlichten DNA-Sequenzen und zusätzliche Information der jeweiligen Autoren ein kleiner Einblick in die asiatischen Populationen gewonnen werden.

4.2.2.3.2 Gruppe A1

In dieser Gruppe sind 61% aller untersuchten Sorraias und 60% aller untersuchten Koniks zu finden. Bemerkenswert ist daran, dass diese Populationen, im Gegensatz zu den anderen in

dieser Gruppe zu findenden Rassen, keiner hochgezüchteten Rasse angehören, vgl 2.1.5.2.12 und 2.1.5.2.21. Man könnte somit eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen diesen beiden Rassen, die möglicherweise sogar eine Unterart der Gattung *Equus ferus* darstellen, diskutieren, trotz ihrer relativ großen geographischen Entfernung. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch noch, dass dieser Gruppe die Gruppe JSO41 (nicht in der geographischen Analyse berücksichtigt, da diese Gruppe mit 8 Individuen zu klein ist) am nächsten ist. In JSO41 finden sich 7 Sorraias, der Rest aller untersuchten Individuen dieser Rasse.

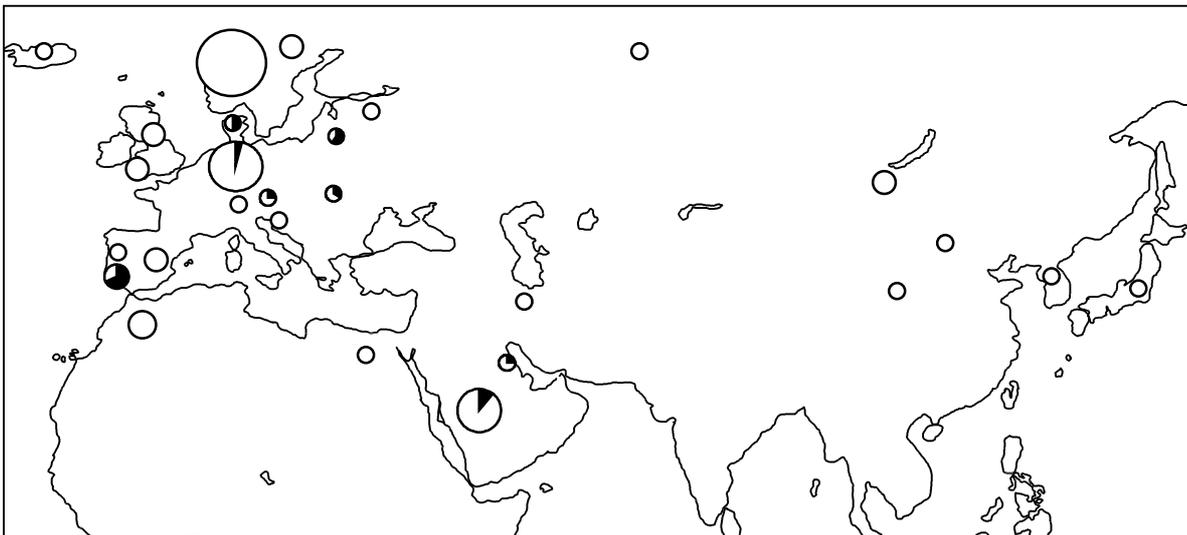


Abb.4.11: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe A1. Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass nicht alle im eingefügten Text beschriebenen Proben in den Tortendiagrammen wiedergegeben wurden, hier wurden nur die Proben berücksichtigt, deren maternaler Ursprung dokumentiert ist.

Alter: $0,195 \pm 0,098$ ($21.000a \pm 11.000a$)

Rassen (% der Rasse): 9 Araber (10%), 1 Holsteiner (10%), 6 Mustangs (8%), 2 Rheinländer (8%), 1 Shetlands (20%), 11 Sorraias (61%), 2 Lipizzaner (15%), 4 EC, 1 Dänisches Warmblut (100%), 3 Koniks (60%), 1 Mongole (17%)

4.2.2.3.3 Gruppe A2

In dieser Gruppe finden sich ausschließlich mongolische Wildpferde. In keinem anderen untersuchten Individuum fand sich der zu Grunde liegende Mikrohaplotyp. Der relativ geringe Abstand dieser Gruppe von JSO41 (1 Mutation) und A1 (3 Mutationen) ist ebenfalls ein bemerkenswerter Befund.

Bei Betrachtung der mtDNA-Sequenzen alleine ist die Vermutung einer verwandtschaftlichen Beziehung zwischen A2 und JSO41, vielleicht auch A1, naheliegend. Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Chromosomenzahl von mongolischen Wildpferden und Hauspferden und des jeweiligen unterschiedlichen Verhaltens ist die Annahme einer parallelen

Entwicklung der Mikrohaplotypen naheliegender. Mit letzter Sicherheit kann jedoch keine der Möglichkeiten favorisiert werden.

Jenseits der Vermutung bezüglich der verwandtschaftlichen Beziehung zwischen den beschriebenen Pferden ist es naheliegend, zu postulieren, dass in der Gruppe A2 ein Mikrohaplotyp eines Basistypen, des schweren Tundrenpferds, gefunden wurde.

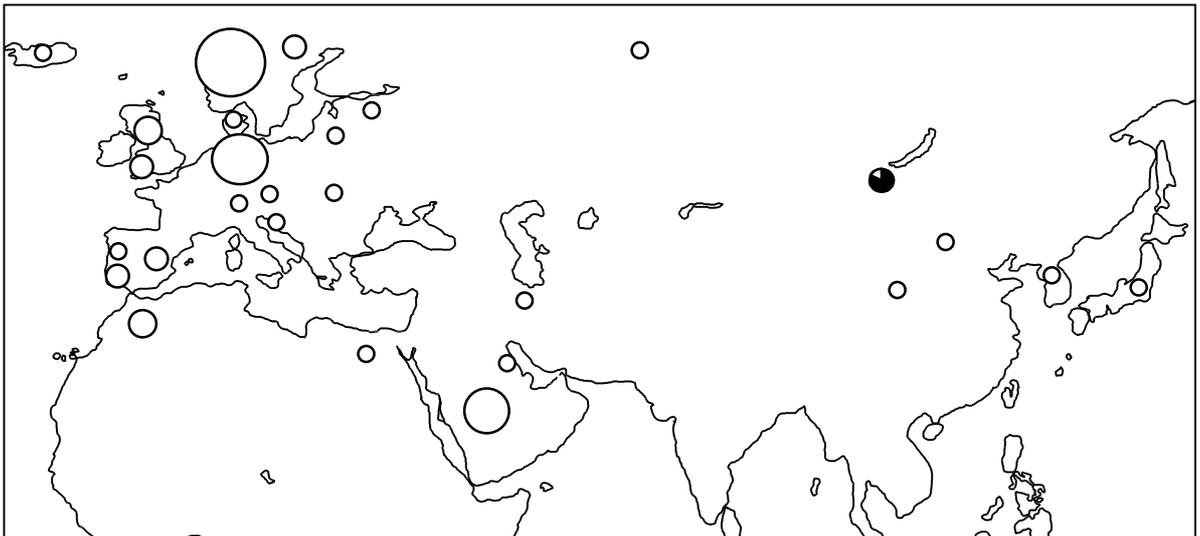


Abb.4.12: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe A2

Alter: $0,286 \pm 0,175$ (31.000a \pm 19.000a)

Rassen (% der Rasse): 14 Mongolische Wildpferde (100%)

4.2.2.3.4 Gruppe A3

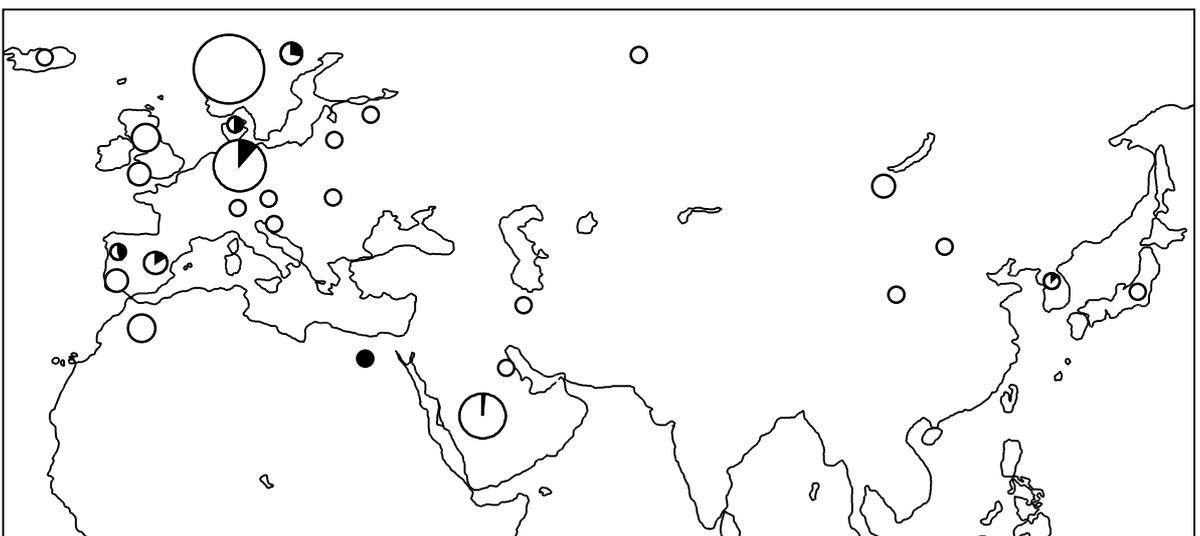


Abb.4.13: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe A3

Alter: $0,048 \pm 0,028$ (5.000a \pm 3.000a)

Rasse (% der Rasse): 6 Araber (6%), 1 Araber-Berber-Kreuz. (14%), 2 Andalusier (14%), 1 Dülmener (10%), 3 Fjord (27%), 5 Holsteiner (50%), 4 Lusitanos (44%), 18 Mustangs (23%), 2 Rheinländer (8%), 1 Trakehner (20%), 1 Lipizzaner (8%), 1 Cheju (14%), 18 EC

In dieser Gruppe finden sich 56% aller Mustangs aus dem Kiger Herd Management Area (HMA) und 44% aller Lusitanos (Ursprungsland: Portugal). Dies lässt zum einen auf einen Founder-Effekt bei der Mustangpopulation schließen, zum anderen auf einen, zumindest teilweisen, iberischen Ursprung der Population. Zwar ist bekannt, dass die Mustangs zumindest teilweise iberischen Ursprungs sind, jedoch ist dies der erste molekularbiologische Hinweis, der durch Sequenzierung der D-loop erhalten wurde. Interessanterweise fand sich der zugrunde liegende Mikrohaplotyp auch bei 50% der untersuchten Holsteiner Pferde. Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, wird die Basis der Deutschen Warmblutzucht im allgemeinen so gesehen, dass die Zuchtlinien auf bodenständige Stuten zurückgehen. Da das Stutbuch der Holsteiner nicht geschlossen ist, ist dieser Befund jedoch nur schwer zu bewerten.

Der auffällige ausgefüllte Kreis, der im Gebiet Ägyptens dargestellt ist, geht auf die einzige Probe aus dieser Region zurück, daher ist dieser Befund wenig signifikant.

4.2.2.3.5 Gruppe A4

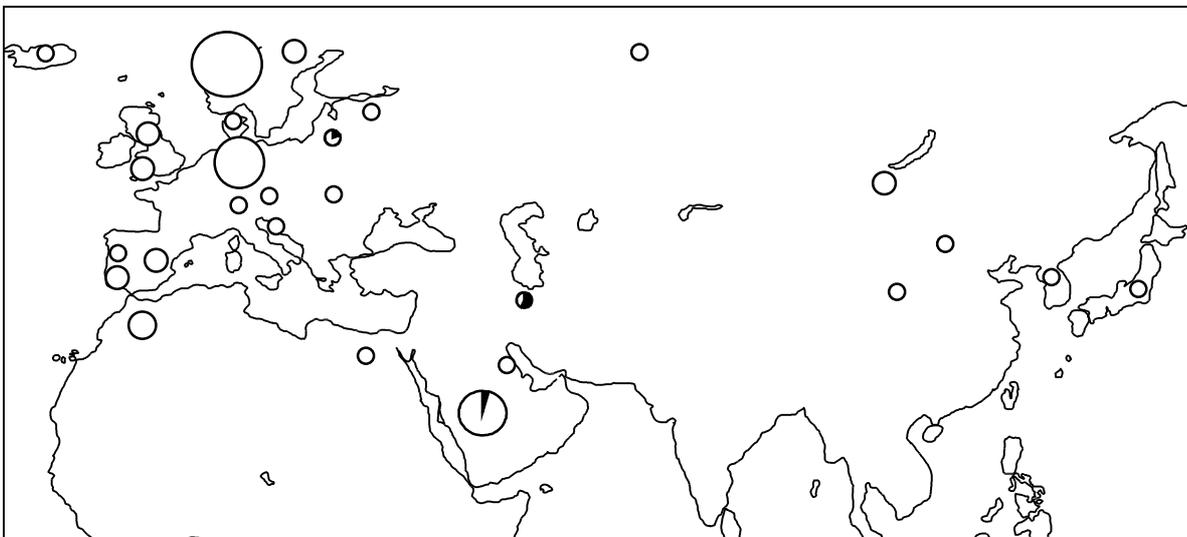


Abb.4.14: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe A4

Alter: 0 ± 0

Rassen (% der Rassen): 3 Araber (3%), 1 NN, 4 Kaspier (57%), 1 Konik (20%), 1 Mustang (1%), 6 EC

Aufgrund der Tatsache, dass außer A5 – ein eigenes, unabhängiges Expansionsereignis – kein weiterer, verwandter Mikrohaplotyp gefunden werden konnte, der aus diesem Expansionsereignis hervorging, ist eine Altersbestimmung für diesen Knoten nicht möglich.

In dieser Gruppe finden sich 57% aller Kaspischen Pferde, die häufig als mögliche „Uraraber“ beschrieben werden. Die weiteren Proben der Kaspischen Pferde finden sich verteilt auf verschiedene Gruppen.

4.2.2.3.6 Gruppe A5

Aufgrund der Tatsache, dass kein verwandter Mikrohaplotyp gefunden werden konnte, der aus diesem Expansionsereignis hervorging, ist eine Altersbestimmung auch hier nicht möglich.

Alle Proben dieser Gruppe mit dokumentierter Herkunft stammen von den britischen Inseln. Mit Ausnahme der EC-Proben und des Mustangs gehören auch die Proben, deren Ursprung nicht dokumentiert ist, britischen Ponyrassen an. Der Schluss ist also naheliegend, dass dieses Expansionsereignis erst in jüngerer Zeit auf den britischen Inseln stattgefunden hat. Zur Erhärtung dieses Schlusses wäre die Untersuchung einer größeren Probenzahl mit dokumentierter Herkunft notwendig.

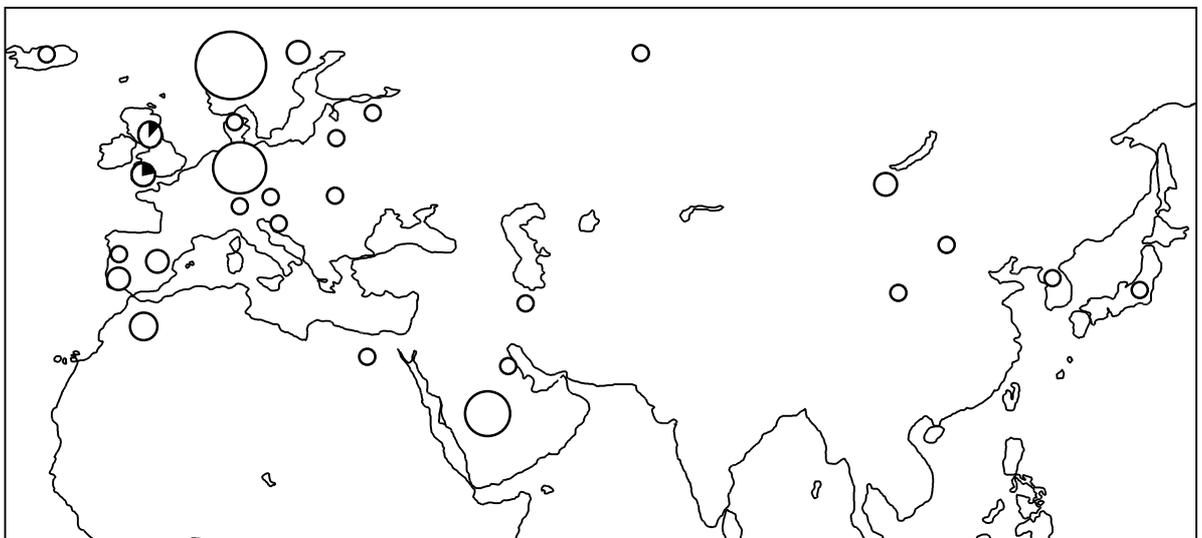


Abb.4.15: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe A5

Alter: 0 ± 0

Rassen (% der Rasse): 3 Exmoors (21%), 1 Mustang (1%), 2 Scottish Highlands (25%), 1 Welsh (50%), 1 Fell (50%), 6 EC

Die Verwendung der Rassenangaben der als EC bezeichneten Proben wurde von den Autoren nur in für die Analyse essenziellen Fällen gestattet. Die Autoren, die diese Sequenzen veröffentlichten, erwähnten die zu den jeweiligen Sequenzmustern gehörigen Rassen in ihrer Veröffentlichung nicht und ich erlangte nur in einer persönlichen Mitteilung darüber Kenntnis (C. Vilà, persönliche Mitteilung). Es ist mir somit nur gestattet, in Einzelfällen die zu den jeweiligen „EC“-Sequenzen gehörigen Rassen anzugeben.

4.2.2.3.7 Gruppe A6

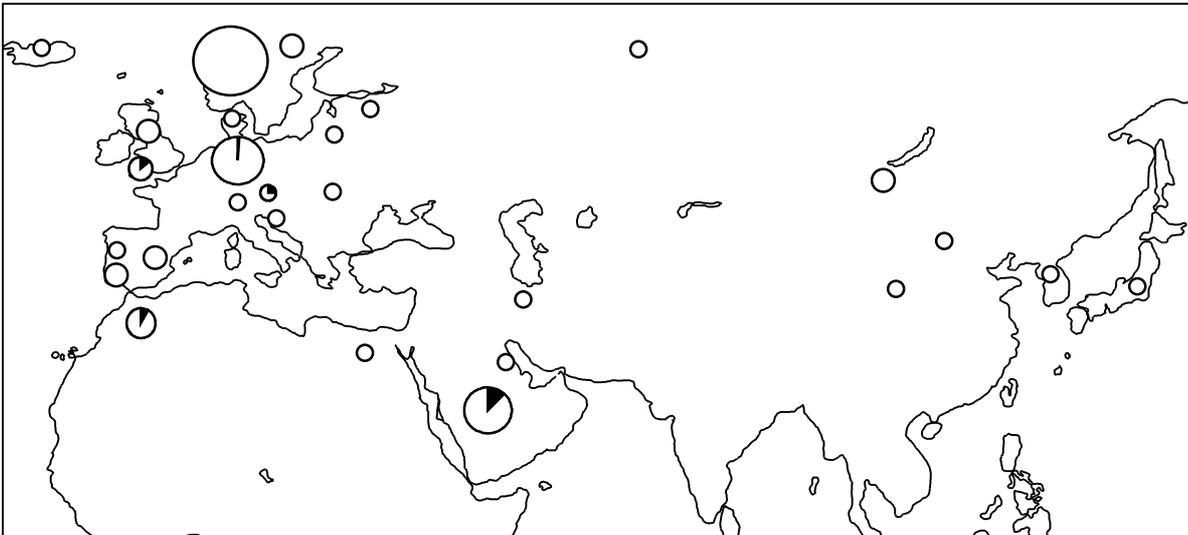


Abb.4.16: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe A6

Alter: $0,156 \pm 0,156$ (17.000a \pm 17.000a)

Rassen (% der Rasse): 9 Araber (10%), 1 Araber-Berber-Kreuz. (14%), 1 Berber (8%), 1 Rottaler (11%), 1 Lipizzaner (8%), 2 Exmoors (14%)

vernachlässigt: 9 EC (-> Nicht gruppierte mtDNA Typen)

A6 wurde als zentraler Knoten des Pferde-Netzwerks identifiziert. Das Sequenzmuster dieses Knotens muss somit gewissermassen als „Ur-Mikrohaplotyp“ der heute lebenden Pferde aufgefasst werden.

Das Alter des Expansionsereignisses als solchem ist aufgrund der sehr hohen Standardabweichung nur schwer zu beurteilen. Der Mikrohaplotyp dieses Knotens ist in vielen Rassen verschiedener Regionen vertreten, ohne an einer Stelle besonders hervorzutreten.

4.2.2.3.8 Gruppe B1

Aufgrund der Tatsache, dass kein verwandter Mikrohaplotyp gefunden werden konnte, der aus diesem Expansionsereignis hervorging, ist eine Altersbestimmung auch hier nicht möglich.

In dieser Gruppe sind nur sehr wenige Pferde vertreten, deren Herkunft gesichert ist. Auch ist die Anzahl der Individuen, deren Rasse bekannt ist, relativ gering. Aus diesen Gründen ist eine Bewertung dieser Gruppe nicht möglich.

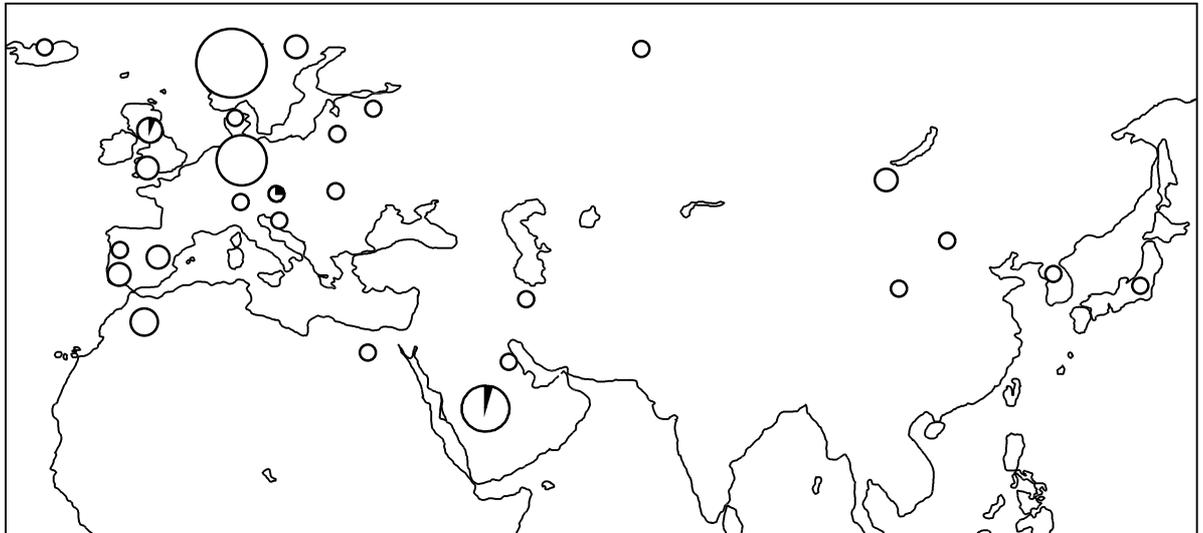


Abb.4.17: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe B1

Alter: 0 ± 0

Rassen (% der Rasse): 5 Araber (5%), 1 Shire (10%), 1 Lipizzaner (8%), 15 EC

4.2.2.3.9 Gruppe B2

Die Gruppe B1 kann in die Analyse dieser Gruppe nicht mit einbezogen werden, da dieser Knoten ein eigenes, unabhängiges Expansionsereignis darstellt.

Neben der relativ weit zurückliegenden Datierung für das Expansionsereignis ist bei dieser Gruppe sehr bemerkenswert, dass die darin vertretenen Individuen unterschiedlichsten Rassen angehören, die vom gesamten eurasischen Kontinent stammen, wobei keine besonders hervortritt. Unter Berücksichtigung des Verhaltens der Pferde lässt sich dieser Befund zwanglos so erklären, dass dieses Expansionsereignis tatsächlich weit vor jedem Domestikationsversuch durch den Menschen stattgefunden hat. Es gehört zum normalen Verhalten der Pferde in freier Wildbahn, dass Hengste Stuten aus den Harems anderer Hengste entführen und dass Jungpferde zumeist während oder kurz nach der Pubertät ihre Sippe verlassen, um sich einer anderen Herde anzuschließen (DUNCAN ET AL., 1992). Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass sich ein sehr frühes Expansionsereignis in vielen Populationen niederschlägt.



Abb.4.18: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe B2

Alter: $0,132 \pm 0,087$ ($14.000a \pm 11.000a$)

Rassen (% der Rassen): 14 Araber (15%), 1 Andalusier (7%), 1 Berber (8%), 1 Frieser (50%), 2 Holsteiner (20%), 1 Noriker (25%), 7 Rheinländer (29%), 1 Cheju (14%), 1 Mongolisches Pferd (17%), 7 EC, 1 Wikinger Pr. (13%), 1 Fjord (9%), 1 Vollblut (20%)

4.2.2.3.10 Gruppe C1

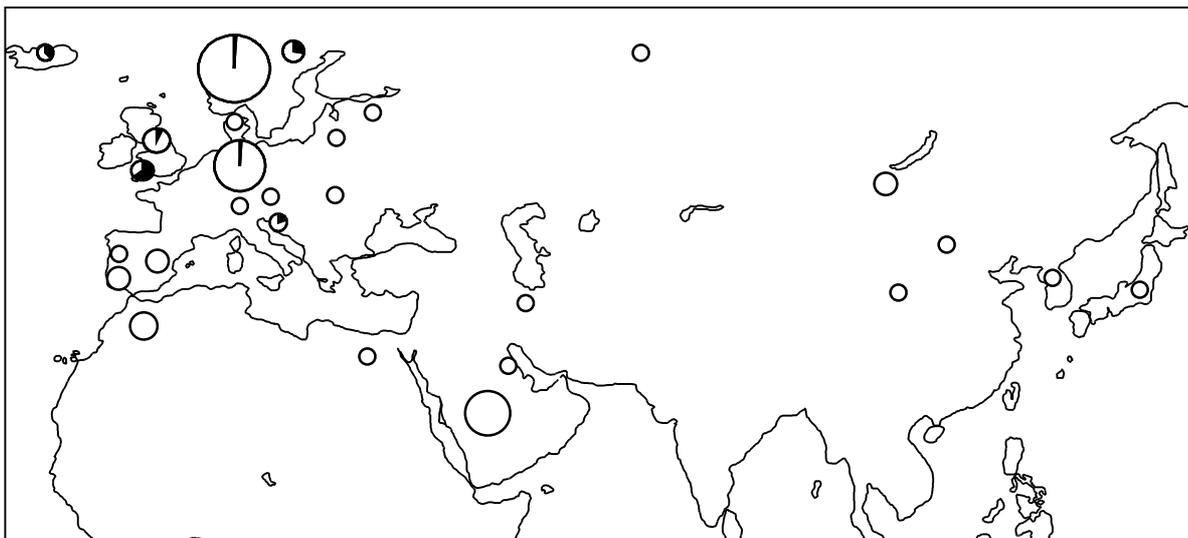


Abb.4.19: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe C1

Alter: $0,022 \pm 0,022$ ($2.000a \pm 2.000a$)

Rassen (% der Rasse): 3 Araber (3%), 9 Exmoors (64%), 3 Fjord (27%), 3 Isländer (38%), 3 Mustangs (4%), 1 Rottaler (11%), 2 Scottish Highlands (40%), 1 Lipizzaner (8%), 2 historische Proben (25%), 21 EC

Es ist sehr augenfällig in dieser Gruppe, dass fast alle Proben mit dokumentierter Herkunft aus Nordeuropa, bzw. dem Mitteleuropa stammen. Außerdem gehört auch der weitaus größte Teil der Individuen mit nicht dokumentierter Herkunft, auch bei den „EC“-Proben, Ponyrassen an. Das Alter des Expansionsereignisses ist aufgrund der sehr hohen Standardabweichung nur

schwer zu beurteilen. Möglicherweise fand die Expansion durch Domestikation statt, mit Sicherheit fand diese Expansion jedoch nach der letzten Eiszeit statt. Dies macht auch in dem Licht Sinn, dass die Regionen, aus denen die Ponyrassen stammen, in der Eiszeit unter einer Eiskecke lagen. Es ist also durchaus ein Szenario vorstellbar, in dem eine Population aus kleinwüchsigen Pferden nach dem Abtauen der eiszeitlichen Gletscher nach Norden wanderte und dort so gute Umweltbedingungen vorgefunden wurden, dass diese Population sich stark ausdehnen konnte. Ein Beweis dafür, dass Pferde, die diesen Mikrohaplotypen aufweisen, schon sehr lange in Nordeuropa leben, ist, dass die 2 historischen Proben (VAN1 und VAN6) in dieser Gruppe von archäologischen Fundorten in Schweden stammen, die auf 200 bis 500 n. Chr. Datiert wurden (VILÀ ET AL., 2001).

Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass mit dem Sequenzmuster, das der Gruppe C1 zugrunde liegt, möglicherweise ein Mikrohaplotyp eines Basistypen, des nordischen Ponys, gefunden wurde.

4.2.2.3.11 Gruppe C2

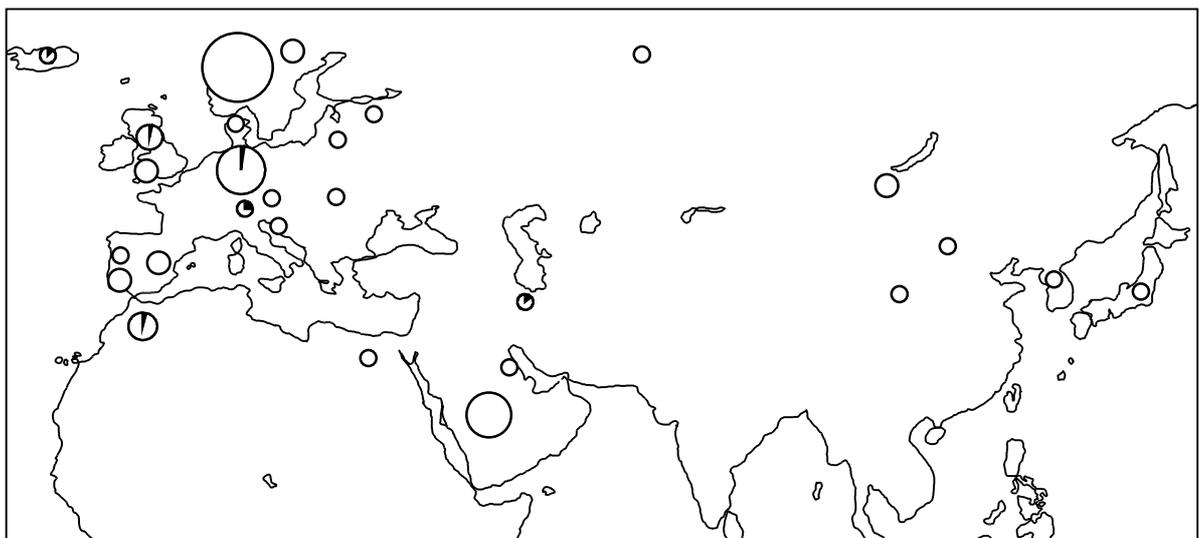


Abb.4.20: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe C2

Alter: $0,077 \pm 0,044$ (8.000a \pm 5.000a)

Rassen (% der Rasse): 1 Isländer (13%), 1 Kaspier (14%), 2 Mustangs (3%), 2 Rheinländer (8%), 1 Scottish Highland (13%), 30 EC, 1 Araber (1%), 1 Noriker (25%)

Diese Gruppe ist leider nur sehr schwach mit Proben besetzt, deren maternale Herkunft dokumentiert, bzw. deren Rassenangabe verfügbar ist. Daher ist eine Bewertung der Gruppe aus diesem Blickwinkel nicht möglich. Das Alter des Expansionsereignisses deutet auf eine

nacheiszeitliche Expansion oder, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, auf eine Ausdehnung der Founderpopulation durch Domestikation hin.

4.2.2.3.12 Gruppe D1

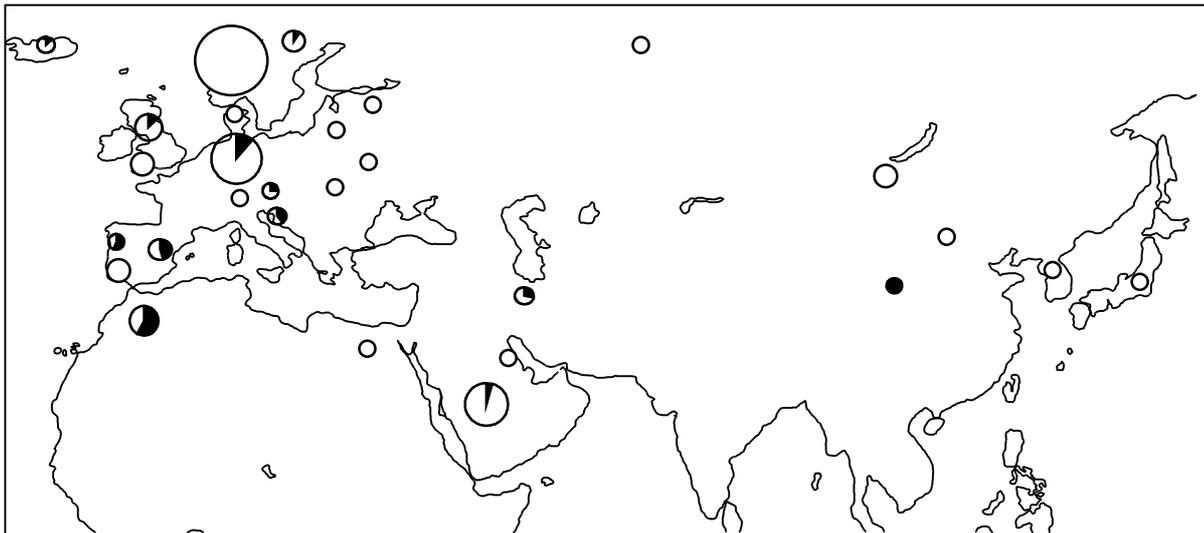


Abb.4.21: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe D1

Alter: $0,060 \pm 0,0274$ (7.000a \pm 3.000a)

Rasse (% der Rasse): 5 Araber (5%), 1 Belgier (100%), 1 Araber-Berber-Kreuz. (14%), 7 Andalusier (50%), 7 Berber (54%), 1 Fjord (9%), 1 Friese (50%), 1 Holsteiner (10%), 1 Isländer (13%), 2 Kaspier (29%), 5 Lusitanos (56%), 24 Mustangs (31%), 2 Rheinländer (8%), 3 Rottaler (33%), 2 Shire (20%), 2 Trakehner (40%), 3 Lipizzaner (23%), 2 Yunnan (100%), 1 Shetland (20%), 1 Wikinger Pr. (13%), 12 EC

Bei der Betrachtung der geographischen Darstellung ist eine Konzentration von Individuen aus dem iberischen und nordafrikanischen Raum auffällig. Hier sind 54% aller untersuchten Berberpferde (70% der Proben, deren Herkunftsland Marokko ist), 50% der untersuchten Andalusier und 56% aller untersuchten Lusitanos zu finden. Bei Betrachtung der Obergruppe D als Ganzes, die Sequenzmuster sind ohnehin recht nahe verwandt, werden die Zahlen noch größer: 62% aller Berberpferde (80% der Tiere aus Marokko), 57% der Andalusier und 56% der Lusitanos sind in der Obergruppe D vertreten. Nur wenige Rassen zeigten ein solch starkes Übergewicht von einem Mikrohaplotypen bei gleichzeitigem definierten Ursprung aus einer Region. Dieser Befund lässt keine andere Deutung zu, als dass eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen Berberpferden und iberischen Pferden existiert. Die Berücksichtigung des Expansionszeitpunktes (7.000 Jahre) legt die Annahme nahe, dass ein, wie auch immer gearteter, Kontakt zwischen iberischer Halbinsel und Nordafrika bestand.

Das Sequenzmuster der Gruppe D1 ist bei Individuen aus Südchina bis Island zu finden. Der Befund kann so verstanden werden, dass seit mehr als 2.000 Jahren Pferde auf der iberischen

Halbinsel gezüchtet werden und während der gesamten Zeit von dort exportiert wurden, was auch dokumentiert ist (vgl. Kapitel 2). Möglicherweise haben sich jedoch in dieser Gruppe zwei Effekte überlagert: eine Wildpopulation expandierte vor ca. 7.000 Jahren im iberisch/nordafrikanischen Raum, wanderte teilweise in andere Regionen der Welt und nahm so Einfluss auf andere Wildpopulationen, die zu einem späteren Zeitpunkt domestiziert wurden. Andererseits werden, wie oben dargestellt, bereits seit sehr langer Zeit gezüchtete Pferde von der iberischen Halbinsel exportiert. Auf diese Art nahmen iberische Pferde mit Sicherheit Einfluss auf moderne Pferderassen.

Der auffällige ausgefüllte Kreis, der im südchinesischen Gebiet dargestellt ist, geht auf nur zwei Proben zurück, daher ist dieser Befund wenig signifikant, da hier eher ein Zufall aufgrund zu geringer Probenzahl anzunehmen ist.

4.2.2.3.13 Gruppe D2

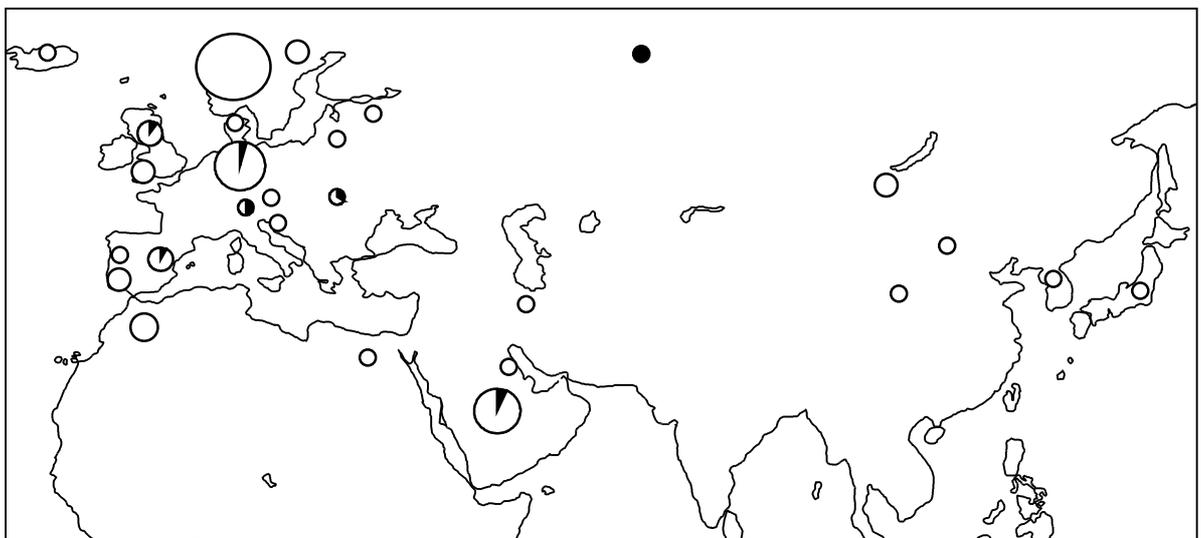


Abb.4.22: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe D2

Alter: $0,063 \pm 0,047$ (7.000a \pm 5.000a)

Rassen (% der Rasse): 6 Araber (6%), 1 Araber-Berber-Keuz. (14%), 6 Mustangs (8%), 2 Noriker (50%), 4 Rheinländer (17%), 3 Scottish Highlands (38%), 1 Lipizzaner (8%), 1 Warmblut (50%), 1 Kasache (100%), 1 Shire (10%), 21 EC, 1 Andalusier (7%)

Das zu Grunde liegende Sequenzmuster ist relativ weit über den europäischen Kontinent verteilt, ohne in einer Rasse besonders hervorzutreten. Da sich dieses Sequenzmuster aber nur durch eine Mutation von dem Sequenzmuster bei D1 unterscheidet, sei hier auf das unter dieser Gruppe Beschriebene verwiesen.

4.2.2.3.14 Gruppe D3

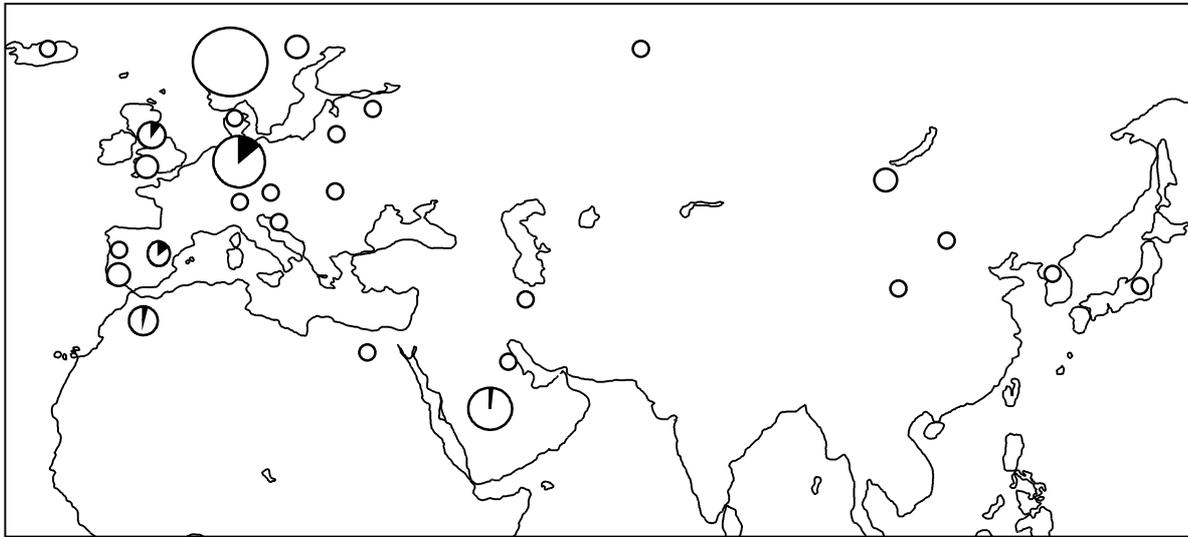


Abb.4.23: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe D3

Alter: $0,2 \pm 0,092$ (22.000a \pm 10.000a)

Rassen (% der Rasse): 1 Araber (1%), 2 Andalusier (14%), 1 Berber (8%), 9 Dölmener (90%), 14 Mustangs (18%), 1 Rheinländer (4%), 2 Rottaler (22%), 3 Shire (30%), 1 Trakehner (20%), 1 Quarter (100%), 2 Vollblüter (40%), 1 Welsh (50%), 6 EC

Sehr augenfällig ist, dass in dieser Gruppe 90% aller untersuchten Dölmener Pferde zu finden sind. Wie in Kapitel 2 beschrieben, ist das Dölmener Pferd eine alte Rasse. Dennoch fällt eine Bewertung dieses Befundes nahezu in den Bereich der Spekulation, da 1. die Wurzeln dieser Rasse aus der Zeit vor dem Mittelalter nicht dokumentiert sind und 2., was schwerer wiegt, die unmittelbare maternale Verwandtschaft der untersuchten Individuen unbekannt ist, da es sich bei den Müttern der Tiere um sogenannte „Wildbahnstuten“ handelt. Der maternale Stammbaum der jeweiligen Individuen ist also nicht dokumentiert. Zwar stammen die Mütter aus dem Merfelder Bruch, jedoch eine maternale Verwandtschaft zwischen den einzelnen Pferden nicht auszuschließen.

In dieser Gruppe finden sich ausschließlich Proben von Individuen, deren maternale Herkunft dokumentiert ist, die aus Mittel- und Südeuropa stammen. Keine Probe lässt sich auf den skandinavischen Raum, Südosteuropa oder Asien zurückführen. Möglicherweise ist dies ein weiteres Indiz für den besonderen Status der Obergruppe D.

Zusammenfassend kann man postulieren, dass mit dem in der Obergruppe D gefundenen Sequenzmuster möglicherweise ein Mikrohaplotyp eines Basistypen, des Urwarmblüters, gefunden wurde.

4.2.2.3.15 Gruppe E

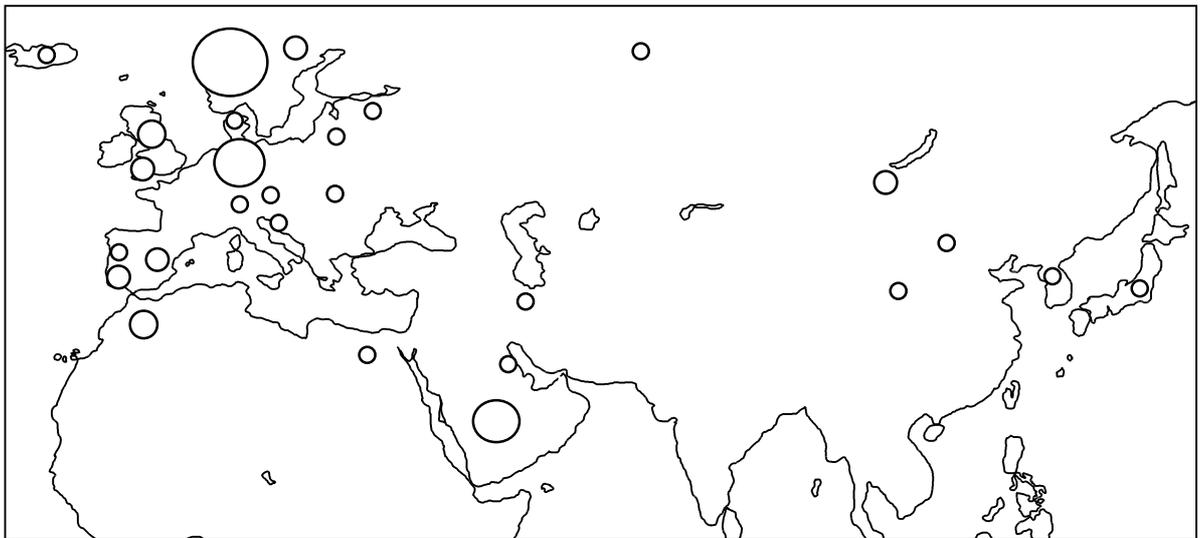


Abb.4.24: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe E

Alter: 0 ± 0

Rassen: 16 EC

Leider sind für diese Gruppe nur begrenzte Angaben über Rasse oder Ursprung der Tiere verfügbar. Die mit EC beschriebenen Proben entstammen ausschließlich nordischen Ponyrassen (Island-, Shetland- und Fjord-Ponies). Dies deutet möglicherweise auf eine bodenständige Population in Nordeuropa hin. Aufgrund der Tatsache, dass kein verwandter Mikrohaplotyp gefunden werden konnte, der aus diesem Expansionsereignis hervorging, ist eine Altersbestimmung dieses Expansionsereignisses nicht möglich. Diese Gruppe entzieht sich also weitgehend einer Bewertung oder Interpretation.

4.2.2.3.16 Gruppe F1

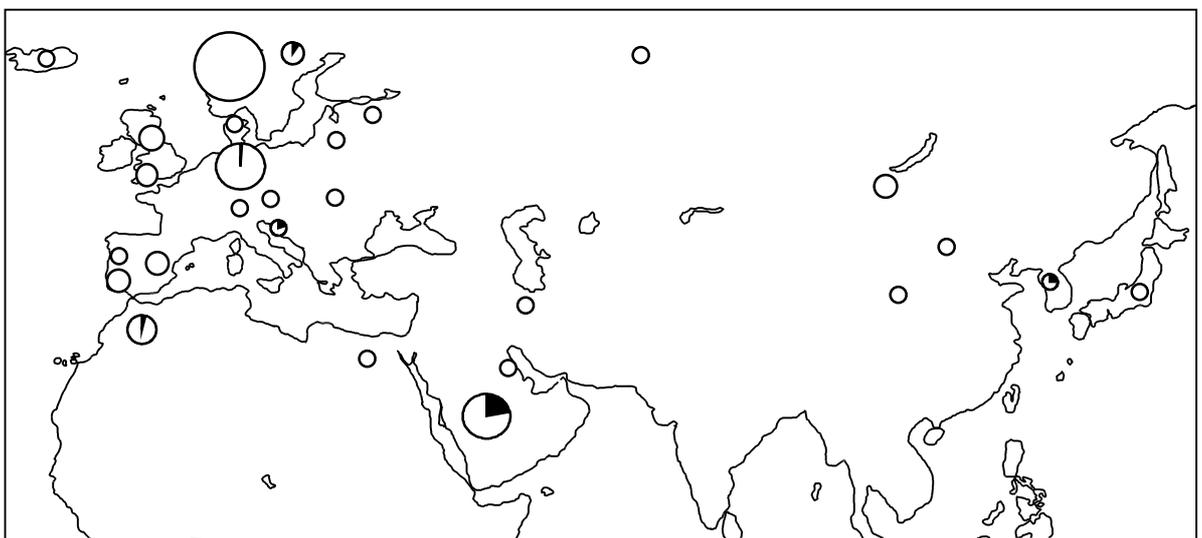


Abb.4.25: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe F1

Alter: $0,474 \pm 0,22$ ($52.000a \pm 24.000a$)

Rassen (% der Rasse): 18 Araber (19%), 2 Araber-Berber Kreuz. (29%), 1 Berber (8%), 1 Fjord (9%), 1 Lipizzaner (8%), 1 Cheju (14%), 9 EC, 2 Mongolen (33%), 1 Rheinländer (4%)

Dieses Expansionsereignis ist das älteste der gesamten Studie. Trotz der Schwierigkeiten, diese Expansion aufgrund der relativ hohen Standardabweichung in einen präzisen (prä-) historischen Kontext zu stellen, so steht doch völlig außer Zweifel, dass gemäß der Datierung dieses Expansionsereignis während der letzten Eiszeit stattgefunden haben muss und nicht erst danach.

Neben der Tatsache, dass der Mikrohaplotyp dieser Gruppe überall auf dem eurasischen Kontinent angetroffen werden kann, vergleiche dazu das bei Gruppe B2 Beschriebene, fällt in dieser Gruppe auf, dass in ihr eine gewisse Konzentration von Araberpferden auftritt. Die angegebenen 19% aus dieser Population ist der größte Anteil von arabischen Pferden in einem Knoten in der Studie.

4.2.2.3.17 Gruppe F2

Dem hier vorgestellten Knoten liegt wahrscheinlich ein postglaziales Expansionsereignis zugrunde. Der Mikrohaplotyp dieses Knotens ist in vielen Rassen verschiedener Regionen vertreten, ohne an einer Stelle besonders hervorzutreten.

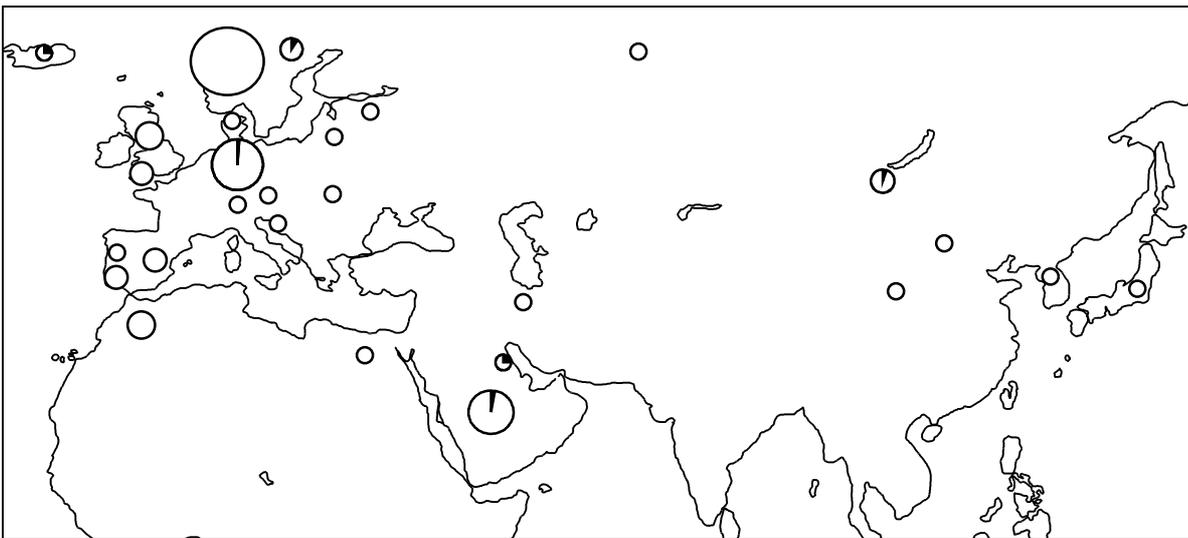
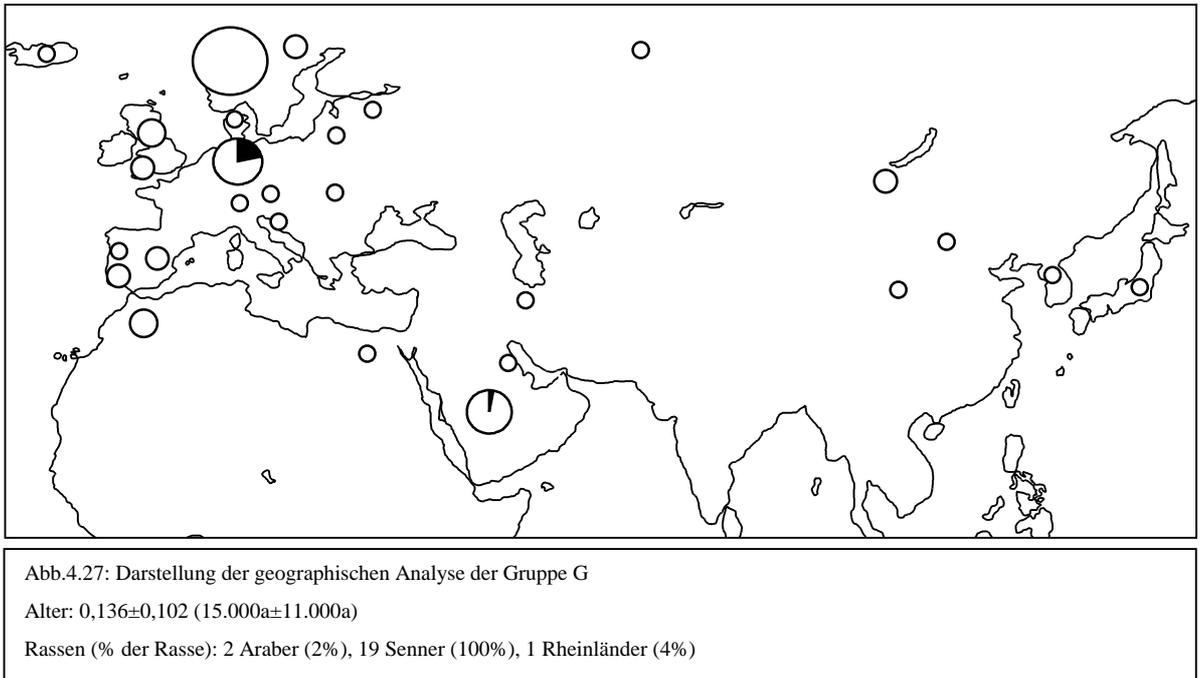


Abb.4.26: Darstellung der geographischen Analyse der Gruppe F2

Alter: $0,118 \pm 0,083$ (13.000a \pm 9.000a)

Rassen (% der Rasse): 3 Araber (3%), 1 Berber (8%), 2 Fjord (18%), 1 Holsteiner (10%), 2 Isländer (25%), 1 Mongole (17%), 1 Shetland (20%), 5 EC, 1 Araber-Berber-Kreuz. (14%)

4.2.2.3.18 Gruppe G



Es ist sehr auffällig, dass in diesem Knoten alle untersuchten Senner zu finden sind. Weiterhin konnte der Mikrohaplotyp der Gruppe nur noch bei einem Rheinsch-Deutschen Kaltblüter und zwei arabischen Pferden gefunden werden, was ebenfalls für den besonderen Status des Sequenzmusters spricht. Dieses Sequenzmuster unterscheidet sich, bei Vernachlässigung von KLI9, in 4 Mutationen von allen anderen untersuchten Proben. Die Gruppe G trennt sich nach der Obergruppe D am deutlichsten von allen anderen untersuchten Proben ab. Jedoch sind hier nur drei Mutationen einzigartig in dem Sequenzmuster. Da die Senner aber eine stark inzüchtigte Population darstellen, alle Tiere gehen auf eine 1725 geborene Stute zurück, kann man nicht zwingend von einem für bodenständige mitteleuropäische Pferde einzigartigen Mikrohaplotypen reden. Dennoch muss man dem Sequenzmuster der Gruppe G einen besonderen Stellenwert in dieser Studie einräumen, der in der Diskussion zu würdigen sein wird.

4.2.2.3.19 Nicht gruppierte mtDNA Typen

Die in Abb. 4.27 dargestellten Proben konnten aus zwei Gründen keiner Gruppe zugeordnet werden: zum einen erreichten einzelne Knoten (JSO41 und BAR4) nicht die in 4.2.2.2 vorgestellte 2% Grenze, zum anderen trennten zu viele Mutationen die einzelnen Proben von den nächsten Gruppen. Die Grenze für die Einbeziehung einer Probe in eine Gruppe wurde aufgrund von Plausibilitätsbetrachtungen, die auf der Mutationsrate basierten, auf 2

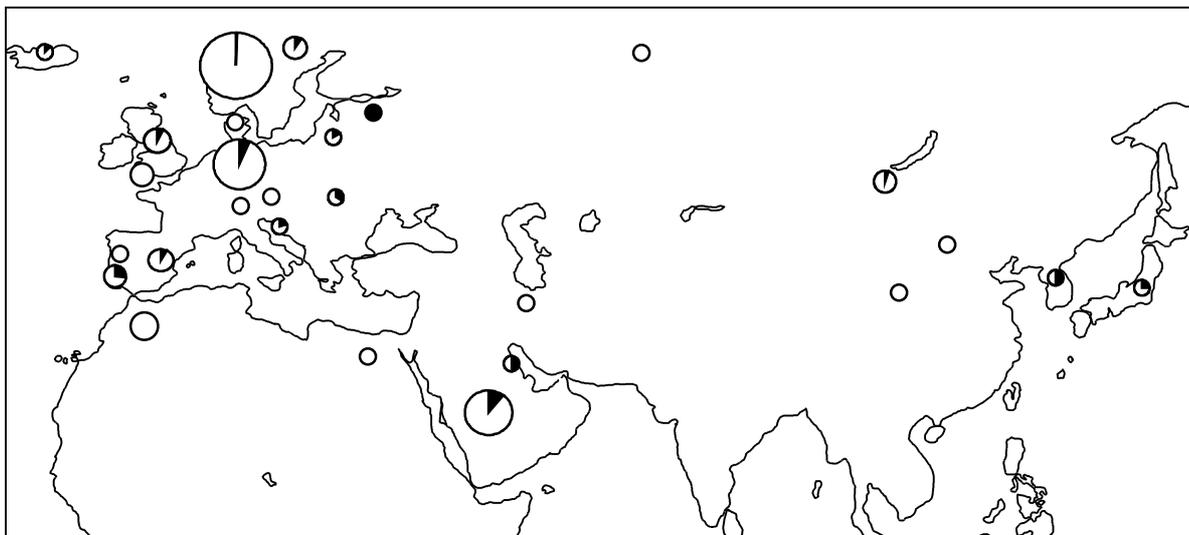


Abb.4.28: Darstellung der geographischen Analyse der nicht gruppierten mtDNA Typen

Alter: Koaleszenz ($377.000a \pm 80.000a$)

Rassen: 1 Andalusier, 11 Araber, 12 EC, 2 Exmoors, 1 Fell, 3 Chejus, 1 Isländer, 3 Japaner, 2 Lipizzaner, 1 Mongole, 1 Mustang, 1 NN, 2 Rheinländer, 1 Rottaler, 2 Shires, 7 Sorraias, 1 Shetland, 1 Tsushima, 1 Konik, 1 Oldenburger, 1 Suffolk Punch, 1 Trakehner

Mutationen festgelegt. Dies ist so zu verstehen, dass aufgrund der sehr langsamen Mutationsrate nicht bestimmt werden kann, ob eine Probe, die in mehr als zwei Positionen vom Sequenzmuster einer Gruppe abweicht, mit Sicherheit aus dem jeweiligen Expansionsereignis stammt, oder ob die jeweilige Probe aufgrund von parallel stattgefundenen Mutationen ihre Position im Netzwerk einnimmt.

5. Diskussion

5.1 *Methoden*

5.1.1 *Sequenzierung der hypervariablen Regionen der mitochondrialen D-loop*

Die verwendete zweistufige PCR-Strategie erscheint auf den ersten Blick unnötig arbeitsaufwendig und umständlich. Schließlich würde bei Verwendung von Dye-Terminatoren die Generierung eines PCR-Produkts ausreichen, um die gewünschten Sequenzbereiche zu untersuchen, was in der Literatur für die hier beschriebene Aufgabenstellung auch hinreichend beschrieben ist (z.B. BOWLING ET AL., 2000). Jedoch bietet die zweistufige Strategie und die Verwendung von Dye-Primern zwei entscheidende Vorteile:

Zunächst erwies sich im Laufe der Studie, dass einzelne Proben, vermutlich aufgrund von mikrobieller Verunreinigung, nur schwer amplifizierbar waren. Trotz aller Bemühungen, durch Aufreinigung und exakte Konzentrationseinstellung des Templats optimale PCR-Bedingungen zu erreichen, konnte nach der ersten Amplifikation bei solchen schwierigen Proben kein beobachtbares Amplifikat erhalten werden. Es gelang jedoch leicht in einer zweiten Amplifikation, bei der ein Primer "ingerückt" war, durch Anpassung der Templatmenge ein spezifisches Amplifikat zu erhalten. Kontrollen der daraus erhaltenen Sequenzen durch eine unabhängige, erneute Aufarbeitung der Probe zeigten die Reproduzierbarkeit der erhaltenen DNA-Sequenzen. Es ist also möglich, durch die hier verwendete Strategie selbst kleinste DNA-Mengen nachzuweisen und zu amplifizieren. Insofern ist die zweistufige PCR-Strategie der einstufigen überlegen. Die extrem hohe Empfindlichkeit der Versuchsdurchführung machte jedoch auch die stetige Kontrolle der Reinheit der Reagenzien durch parallel durchgeführte Nullkontrollen notwendig. DNA-Kontaminationen waren trotz aller Vorsichtsmaßnahmen ein häufiges Problem, das zum Verwerfen von ganzen Versuchsreihen führte. Letztlich wurden die Amplifikationen in den Laborräumen der genFOR GmbH, Grafenschaft, durchgeführt, da hier ansonsten ausschließlich mit humaner DNA gearbeitet wird und somit eine Kontamination durch Pferde-DNA unmöglich wurde.

Im Vergleich zu der oben dargestellten einstufigen Amplifikations- und Sequenzierungsstrategie war ein weiterer Vorteil der hier verwendete Methode die Anwendung der Dye-Primer-Chemie. Zwar erfordert sie entweder die Herstellung eines

spezifischen, markierten Sequenzierungsprimers oder den Einbau einer Universalsequenz in das zu untersuchende DNA-Fragment, z.B. die in dieser Studie verwendete –21-M13-Sequenz, jedoch sind die Ergebnisse der Sequenzierung spezifischer und die Elektropherogramme eindeutiger auszuwerten. Es ist von der Firma ABI (ABI¹; ABI, 1995¹; ABI, 1995²) hinreichend beschrieben, dass bei geeigneten Sequenzen und einem optimalen Templat die Dye-Primer-Chemie der Dye-Terminatorenchemie überlegen ist. Ein Beispiel für eine ungeeignete Sequenz wäre ein DNA-Fragment mit längeren Homopolymerbereichen. Hierbei versagt die Dye-Primer-Chemie. Unter den erwähnten Einschränkungen liefert die Dye-Primer-Chemie Elektropherogramme mit gleichmäßigeren Peakhöhen. Die neuere Generation der Farbmarkierung der Firma ABI, die Big-Dye™-Chemie, hat zwar teilweise das Problem der sehr ungleichmäßigen Peakhöhen, die manchmal die erhaltenen Elektropherogramme mehrdeutig auswertbar machen, beseitigt. Dennoch sind die Sequenzen aus der Dye-Primer-Chemie, bei optimalem Templat, stets eindeutiger. Außerdem ist die Big-Dye™-Chemie auf dem verwendeten halbautomatischen DNA-Sequenzierer des Typs 373A nicht ohne technische Modifikation des Geräts anwendbar.

5.1.2 Typisierung des repetitiven Bereichs der mitochondrialen D-loop

Es konnte klar gezeigt werden, dass dieser Bereich (Oktarepeat) nicht stabil vererbt wird, Ergebnisse von XU & ARNASON (1994) deuten diesen Befund bereits an. Er ist somit weder für eine phylogenetische Studie, noch für eine maternale Abstammungsbegutachtung verwendbar. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist in einer fehlerhaften Replikation des repetitiven Bereichs und wenig effektiven Reparaturmechanismen für die mitochondriale DNA zu suchen. Weiterhin wird dieser Bereich nicht translatiert, wodurch eine Mutation nur einen geringen Einfluss auf die Funktionstüchtigkeit der Atmungskette hat, wenn auch dieser Oktarepeat möglicherweise strukturellen Einfluss auf die Replikation und Translation der mitochondrialen DNA hat.

5.2 Auswertung

5.2.1 Auswertung durch Vergleich der Sequenzen in einem Alignment

Bei einer begrenzten Anzahl von DNA-Sequenzen ließen sich leicht Sequenzmuster erkennen, aufgrund derer eine Gruppierung der Proben möglich wurde. Durch die im Laufe der Studie stetig steigende Probenzahl wurden die Alignments jedoch immer umfangreicher und dadurch unübersichtlicher. Schließlich wurde die Grenze der Auswertbarkeit von Alignments "per Auge" bei ca. 100 Sequenzen erreicht. Es erwies sich als unmöglich, eine Darstellung der Alignments zu wählen, die einen Überblick über die Sequenzen und damit die Erkennbarkeit von Mutationsmustern ermöglicht hätte. Somit erwies sich nach der anfänglich erfolgreichen Gruppierung der Proben durch die Auswertung der Alignments per Auge die Anwendung eines Computerprogramms zur Auswertung als unumgänglich. Die Auswahl des für die Problemstellung geeigneten Programms zeigte sich jedoch nicht unproblematisch. Die Erstellung eines phylogenetischen Baumes mittels Distance-Matrix-Methoden aus dem PHYLIP-Programm-Paket erwies sich als inkonsistent, weil mit der Analyse mittels unmittelbaren Sequenzvergleichs nicht vereinbar. Die Ergebnisse wurden in dieser Schrift nicht vorgestellt, da die Analyse zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Studie durchgeführt wurde und nur die Sequenzen von ca. 60 Proben, also ca. 10 % der endgültig verwendeten mtDNA-Sequenzen, untersucht worden waren. Zusammenfassend lässt sich der Sachverhalt so darstellen, dass der Gruppierung, die durch Auswertung per Auge erhalten worden war, durch die Analyse mittels des PHYLIP-Programm-Pakets in nicht nachvollziehbarer Weise widersprochen wurde. So wurde zum Beispiel die Probe eines Sorraia-Pferdes von identischen Sequenzen durch mehrere signifikante Verzweigungen abgetrennt.

Erst die Anwendung von Merkmalsmethoden, wie sie vom Network-Programm-Paket verwendet werden, lieferten Ergebnisse, die mit der Analyse per Auge in Einklang zu bringen waren, darüber hinaus lieferten sie weiterführende Erkenntnisse. Das Network-Programm-Paket wurde schließlich zur Analyse ausgewählt, da die Ergebnisdarstellung in Form eines phylogenetischen Netzwerks erfolgt, bei dem die für einzelnen Verzweigungen verantwortlichen Mutationen im Netzwerk dargestellt werden. Dies ermöglichte die Eliminierung von unbemerkten Sequenzierungsartefakten und Übertragungsfehlern in den Sequenzen, was die Analysesicherheit erheblich erhöhte. Andere Programme, die diese

Darstellung und die damit verbundene Analysesicherheit boten, konnten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen (Sommer 1998) nicht gefunden werden.

Die Analyse der Sequenzen aus der zweiten hypervariablen Region der mitochondrialen D-loop zeigte, dass durch die zusätzliche Information eine Feindifferenzierung innerhalb der Gruppierungen, die aus den Sequenzierungen der ersten hypervariablen Region erhalten wurden, ermöglicht wird. Diese zusätzliche Information war jedoch für das Ziel dieser Studie, einen tieferen Einblick in die Phylogenie der Pferde, insbesondere die Geschichte der Domestikation des Pferdes und die verwandtschaftliche Beziehung der einzelnen Rassen zueinander zu gewinnen, nicht essenziell. Daher wurde der Abschluss dieser Untersuchungen auf einen späteren Zeitpunkt, die Fortführung des Projekts, verschoben.

5.2.2 *Phylogenetische Analyse*

Die Erstellung des Equiden-Netzwerks zur Bestimmung der Mutationsrate und der Wurzel des Pferde-Netzwerks führte das Network-Programm-Paket an seine Grenzen. Vom Konzept sind die verwendeten Algorithmen für relativ geringe Merkmalsabstände vorgesehen, wie sie zum Beispiel bei Individuen einer Spezies vorliegen. Die Grenze der Leistungsfähigkeit ist erreicht, wenn Spezies innerhalb einer Gattung miteinander verglichen werden und die Algorithmen liefern nur noch unzuverlässige Netzwerke, wenn Individuen anderer Gattungen, wie im Fall des Rhinoceros im Equiden-Netzwerk (Abb. 4.8), in die Analyse mit einbezogen werden. Es ist folglich immer Vorsicht geboten, Ergebnisse aus dem Network-Programm-Paket ohne kritische Überprüfung zu verwenden, wenn man sich über den Bereich des normalen Rahmens hinausbewegt, den das Programm vorsieht. Es wurde in 4.2.2.1 (Erstellung und Interpretation eines Equiden-Netzwerks) hinreichend beschrieben, dass das Rhinoceros nicht in die Analyse durch das Programm mit einbezogen werden konnte. Jedoch erwies sich wiederum die Darstellungsform des Netzwerks, in der die für die jeweilige Ausbildung eines Astes verantwortliche Mutation im Netzwerk abgebildet wird, als äusserst vorteilhaft. Der Abgleich des reinen Equiden-Netzwerks mit der mtDNA-Sequenz des Rhinoceros lies keinen anderen Anknüpfungspunkt und damit auch keine andere Wurzel zu, als die in dem Netzwerk in Abb. 4.8 dargestellte Form. Dennoch kann man das Ergebnis nur als Zwischenstand der Forschung auffassen und keinesfalls als endgültigen Befund bezüglich der Phylogenie der Equiden. In dieser Schrift nicht vorgestellte Versuche, mit veröffentlichten Sequenzen der mitochondrialen 12S rRNA von Equiden, Rhinocerosen und Tapiren ein dem

Netzwerk aus den Sequenzen der D-loop in Bezug auf die Robustheit und Topographie ähnliches Netzwerk zu erstellen, schlugen fehl. Möglicherweise wird die Phylogenie der Equiden erst durch die komplette Sequenzierung der mitochondrialen DNA einer grösseren Anzahl von Individuen der Perissodactyla unter eventueller Einbeziehung im Kerngenom lokalisierter, zum Beispiel Y-chromosomaler, Merkmale unter Verwendung von Programmen, die zur Analyse von phylogenetischen Beziehungen zwischen verschiedenen Spezies konzipiert wurden, endgültig aufgeklärt werden können. Dennoch ist das hier dargestellte Ergebnis konsistent, wie in Abb. 4.6 und 4.7 dargestellt. Die Entfernung einzelner Gruppen, wie an dem Beispiel der Entfernung aller Streppenzebras gezeigt, aus dem Equiden-Netzwerk führt zu keiner Positionsveränderung der verbleibenden Gruppen oder Topographieveränderung des Netzwerks insgesamt.

5.2.3 Bestimmung der Mutationsrate und der Koaleszenzzeiten

Trotz der Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen erscheint die gefundene Mutationszeit von mindestens 1 Mutation pro 119.441 Jahre, bezogen auf das Equiden-Netzwerk, im Vergleich zur humanen Mutationszeit von 1 Mutation pro 20.180 Jahre extrem gering. Dieser Befund ist jedoch sehr leicht dadurch erklärbar, dass die Mutationsrate proportional zur Körperoberfläche und damit dem metabolischen Grundumsatz ist (MARTIN & PALUMBI, 1993). Der Grundumsatz des Pferdes beträgt 48,61 KJ/kg/Tag, der des Menschen 91,2 KJ/kg/Tag (KOLB, 1989). Zur Illustration soll als Beispiel für eine höhere Mutationsrate die Maus herangezogen werden: der Grundumsatz der Maus liegt in der Größenordnung von 1000 KJ/kg/Tag (KOLB, 1989; ECKERT ET AL., 2000), die Mutationszeit liegt, umgerechnet und gerundet, bei 1 Mutation pro 4000 Jahre (NACHMANN ET AL. 1994). Auch wenn die Beziehung zwischen Grundumsatz und Mutationsrate nicht linear ist, so könnte diese Reihe im Reich der Säugetiere beliebig fortgesetzt werden (vgl. MARTIN & PALUMBI, 1993).

Dennoch ist die Mutationsrate mit einer erheblichen Unsicherheit behaftet. Diese Unsicherheit resultiert im wesentlichen aus der unsicheren Kalibrierung mit dem Zeitpunkt des Auftretens des letzten gemeinsamen Vorfahren aller Equiden. Wie in 2.1.1 dargestellt, ist dieser Punkt immer noch Gegenstand des wissenschaftlichen Disputs. In Anbetracht des Zeitraums, über den dieser Disput bereits geführt wird, und der Entwicklung neuerer Methoden zur Untersuchung der Fossilien ist es zweifelhaft, ob in absehbarer Zeit ein zuverlässiger,

allgemein akzeptierter Kalibrationszeitpunkt erhalten werden kann. Nach MACFADDEN (1992) ist der erwähnte wissenschaftliche Disput fast genauso alt wie die Frage nach der Phylogenie des Pferdes und reicht auf jeden Fall in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts zurück. Eine sichere Mutationsrate könnte nach dem heutigen Stand der Forschung nur durch die Sequenzierung aller Mitglieder mehrerer ausgedehnter Stammbäume erhalten werden. Ein solch, finanziell wie personell, aufwendiges Projekt wurde nach meinem Wissen bisher noch nicht in Angriff genommen. Trotz allem ist der gefundene Wert in einer vernünftigen Größenordnung, weil 1. mehrere voneinander unabhängige Veröffentlichungen (ISHIDA ET AL., 1995; OAKENFULL ET AL., 2000; LISTER ET AL., 1998; XU & ARNASON, 1994) durch unterschiedliche Berechnungsansätze vergleichbare Ergebnisse beschreiben und 2. die Überprüfung der Mutationsrate durch die Bestimmung der Koaleszenzzeiten für die einzelnen Spezies zu einer sinnvollen Größe führte. Dies ist zwar kein sicherer Beweis für die Richtigkeit der Mutationsrate, da die Koaleszenzzeiten mit dem selben Datensatz bestimmt wurden wie die Mutationrate selbst, somit z.B. systematische Fehler fortgeführt und nicht überprüft werden können. Jedoch liefern die Koaleszenzzeiten durch den nachfolgenden Vergleich mit paläontologischen Datierungen ein Indiz dafür, ob sich die gefundenen Zeitpunkte in einem realistischen Rahmen bewegen und somit den tatsächlichen Geschehnissen entsprechen können oder ob sie, weil sie im Widerspruch zu allen bisherigen Datierungen stehen, unrealistisch und wahrscheinlich falsch sind. Die gefundenen Koaleszenzzeiten sind mit paläontologischen Datierungen in Einklang zu bringen (vgl. z.B. AZZAROLI, 1995).

Der scheinbare Widerspruch in den Koaleszenzzeiten für die Pferde aus dem Equiden-Netzwerk, rund 776.000 Jahre, und dem Pferde-Netzwerk, rund 342.000 Jahre, löst sich dann auf, wenn man berücksichtigt, dass die Koaleszenzzeiten in unterschiedlichen Kontexten berechnet wurden. Während die Koaleszenzzeit der Pferde aus dem Equiden-Netzwerk als spätester Zeitpunkt aufzufassen ist, wann *Equus ferus* evolviert ist, so beschreibt die Koaleszenzzeit der Pferde aus dem Pferde-Netzwerk den Zeitpunkt, wann der letzte gemeinsame Vorfahr aller heute lebenden Individuen der Spezies *Equus ferus* gelebt haben muss. Ein Widerspruch ist somit nicht vorhanden.

5.2.4 Das Pferde-Netzwerk

Ein sehr auffälliger Befund ist das Auffinden von einer Mindestzahl von 77 Gründerstuten, auf die die heute lebenden Pferdepopulationen zurückgehen. Tatsächlich werden mit hoher Wahrscheinlichkeit vor 4.000 – 6.000 Jahren mehr als 77 Stuten gelebt haben. Jedoch werden diese entweder keine Nachkommen unter den heutigen Pferden haben, ihr Mikrohaplotyp ist nicht unterscheidbar von den gefundenen Sequenzmustern oder der Genotyp dieser Gründerstuten wurde bis heute noch nicht entdeckt. Der Befund wird um so interessanter, wenn man ihn mit jenen der Studien über Rinder, *Bos taurus*, (LOFTUS ET AL., 1994; BRADLEY ET AL., 1996; TROY ET AL., 2001) und Ziegen, *Capra hircus*, vergleicht (MACHUGH & BRADLEY, 2001; LUIKART ET AL., 2001). Beide Spezies lassen sich jeweils auf sehr wenige Gründerlinien zurückführen, deren Expansionen in den Zeitraum der Domestikation der jeweiligen Art fallen. Es lassen sich leicht regionale Ungleichgewichte bei der Verteilung der jeweiligen Mikrohaplotypen feststellen. Aus diesen Ergebnissen ist der Schluss naheliegend, dass die jeweiligen Arten zwei- bis dreimal in jeweils verschiedenen Regionen domestiziert wurden. Demgegenüber steht die gefundene Mindestzahl von 77 Linien beim Pferd in einem relativ komplexen Netzwerk. Zwar liegt der Expansionszeitpunkt für die meisten Linien unter Berücksichtigung der Standardabweichung und der Unsicherheit in der Kalibrierung der Mutationsrate möglicherweise ebenfalls im Zeitraum der Domestikation der Spezies *Equus ferus*, jedoch sprechen die aufgefundenen 17 Gruppierungen im Netzwerk, wovon 16 auf domestizierte Pferde im engeren Sinne zurückgehen, für ein viel komplexeres Geschehen zum Zeitpunkt der Domestikation des Pferdes als dies bei der Domestikation des Rindes und der Ziege war. Weiterhin zeigen Untersuchungen an Wildpferden, dass die genetische Diversität, bezogen auf die mitochondriale DNA, bei Wildpferden sehr gering ist: 8 von 6 Pleistozän-Proben der Studie von VILÁ ET AL. (2001) gruppieren monophyletisch, obwohl sie zum Teil durch 16.000 Jahre getrennt sind (jüngste Probe 12.000 Jahre alt, älteste 28.000 Jahre). Hinzu kommt das Ergebnis der Studie von OAKENFULL & RYDER (1998): drei der überlebenden maternalen Linien beim Mongolischen Wildpferd besitzen einen identischen Mikrohaplotypen, obwohl sie aus mindestens zwei, 45 Jahre auseinander liegenden, Fangaktionen stammen. Die Interpretation des Befundes durch die Autoren, dass diese geringe Diversität durch einen Zusammenbruch der Population am Anfang des 20. Jahrhunderts erklärbar wäre, ist unwahrscheinlich. Es ist dokumentiert, dass zum Ende des 2. Weltkrieges noch 46 Exmoor Pony Stuten lebten (BAKER ET AL. 1998). Obwohl die Zahl

der Exmor Ponies geringer war, als die der mongolischen Wildpferde zum Anfang des 20. Jahrhunderts, ist deren genetische Diversität deutlich höher.

Außerdem lassen sich bei den heute lebenden Pferden teilweise Ungleichgewichte in der regionalen Verteilung der jeweiligen Mikrohaplotypen feststellen. Durch die Einbeziehung der Kenntnis über die Geschichte der jeweiligen Rassen bzw. Populationen konnten Schlüsse aus den gefundenen regionalen Verteilungen gezogen werden. Wie die Rückschlüsse aus diesen Befunden in Bezug auf die Domestikation zu bewerten sind, wird am Ende des Diskussionskapitels, wo alle Befunde in einem archäologischen, ethnologischen und ethologischen Kontext diskutiert werden sollen, erörtert werden (siehe 5.2.6).

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass bisherige Veröffentlichungen die hohe Diversität der Mikrohaplotypen der Pferde durch die fehlende Berechnung von Expansionszeitpunkten und Betrachtung geografischer Verteilungen in einem anderen Licht sehen:

LISTER ET AL. (1998) betrachteten die Divergenz nur aus dem Blickwinkel der Koaleszens der Pferde. Sie schlossen, dass die genetische Diversifizierung bereits während der ersten Expansion von *Equus ferus* auf dem eurasischen Kontinent begann. Die Autoren stellen fest, dass ihre Daten keinen Hinweis auf eine einzelne Domestikation oder auf ein multiregionales Domestikationsszenario liefern. Jedoch übersahen sie, dass aufgrund der geringen Probenzahl von 29 modernen Pferden in dieser Studie Verteilungsungleichgewichte bei den Mikrohaplotypen ohnehin nur schwer beobachtbar waren.

VILÀ ET AL. (2001) untersuchten zwar mit 192 modernen Pferden deutlich mehr Proben, blieben aber auch an der Betrachtungsweise der Rassen verhaftet. Unter Berücksichtigung der Zuchtgeschichte verwundert es nicht, dass die einzelnen Rassen nicht als monophyletische Gruppen erscheinen. Allerdings wurde nicht berücksichtigt, dass möglicherweise durch Founder-Effekte, die unter Umständen weit vor der Domestikation zu suchen sind, in bestimmten Regionen einzelne Mikrohaplotypen vermehrt aufzufinden sind. Auf die fehlerhafte Wurzelung des phylogenetischen Baums in der Studie wurde bereits im Ergebnisteil eingegangen.

Das Auffinden des Knotens A6 als Wurzel des Pferde-Netzwerks, was gleichzeitig das Auffinden des ursprünglichen Mikrohaplotypen für den untersuchten Bereich der D-loop des letzten gemeinsamen maternalen Ahnen (nachfolgend "Ur-Mikrohaplotyp" genannt) aller Pferde bedeutet, ist der erste Befund dieser Art für Pferde. Entweder befassten sich bisherige

Veröffentlichungen nicht mit diesem Thema (BOWLING ET AL., 2000; KAVAR ET AL., 1999) oder sie verwendeten aufgrund unzureichender Kenntnis der Phylogenie der Equiden eine zu weit entfernt verwandte Outgroup, so dass nicht die korrekte Wurzel identifiziert werden konnte (ISHIDA ET AL., 1995; LISTER ET AL., 1998, KIM ET AL., 1999; OAKENFULL & RYDER, 1998; VILÀ ET AL., 2001). Zum Beispiel führte die Verwendung der DNA-Sequenz eines Esels als Outgroup in der Studie von VILÀ ET AL. (2001) zur falschen Klassifizierung der untersuchten Pleistozän-Proben als ancestrales Schwester-Taxon der modernen Pferde. Wenn dies der Fall wäre, müssten die Proben im hier vorgestellten Pferde-Netzwerk viel weiter entfernt von der Wurzel auftreten, als dies tatsächlich der Fall ist. Der in der vorliegenden Studie dargestellte Befund macht auch im erdgeschichtlichen Kontext mehr Sinn: Wie bereits unter 4.2.2.2 beschrieben, war im fraglichen Zeitraum (12.000 – 28.000 Jahre vor der Gegenwart) Alaska einerseits über eine Landbrücke mit dem eurasischen Kontinent verbunden, andererseits durch mächtige Gletscher vom amerikanischen Kontinent getrennt (KUNZ & REANIER, 1994; PELTIER, 1994). Die in der Nähe von Fairbanks aufgefundenen Überreste von pleistozänen Pferden sind somit eindeutig eurasischen Ursprungs, bzw. diese Tiere hatten Vorfahren, die eindeutig vom eurasischen Kontinent stammen. In diesem Zusammenhang ist aber noch erwähnenswert, dass die Betrachtung der acht pleistozänen Proben dieser Studie als eine Population problematisch ist. Die gefundenen Überreste von Pferden wurden auf 10.000 bis 26.000 v.Chr. datiert. Dies ist ein Zeitraum, in dem mit Sicherheit mehr als eine Population in dem Gebiet des heutigen Alaska umherzog. Alleine die Betrachtung des maximalen Altersunterschieds der Proben von 16.000 Jahren macht die Annahme, dass die Individuen einer Population angehörten, sehr unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass die Individuen aus unterschiedlichen Populationen stammen, wie es auch in dem Pferde-Netzwerk der hier vorgestellten Studie beschrieben wird. Umso bemerkenswerter ist es, dass sechs von acht Proben zu einer monophyletischen Gruppe zusammengefasst werden konnten. Ein weiterer in diesem Zusammenhang zu berücksichtigender Aspekt ist, dass Pferde bereits lange vor der Domestikation weit über den eurasischen Kontinent verbreitet waren. Es ist zu erwarten, dass nicht jede maternale Linie der Wildpopulation domestiziert wurde und bis in die heutige Zeit überlebt hat. Folglich verwundert es nicht, dass die meisten untersuchten pleistozänen Individuen keine modernen Nachfahren haben. Wenn aus diesem Befund Schlüsse gezogen werden sollen, wie VILÀ ET AL. (2001) es versuchten, dann könnte man postulieren, dass nur ein Bruchteil der maternalen Linien der eurasischen Wildpopulation domestiziert wurde und nur ein Teil der

möglicherweise domestizierten maternalen Linien bis in die moderne Zeit überlebte, jedoch nicht, dass die pleistozänen Proben ancestrally zu den modernen Pferden sind, dazu ist die Mutationsrate des untersuchten Bereichs zu gering.

Die willkürliche Definition eines Expansionsereignisses als ein mindestens 2% der Gesamtprobenzahl enthaltender Knoten ist nicht unproblematisch und bedarf einer kritischen Würdigung. Wie unter 4.2.2.2 dargestellt, erfolgte die Definition aufgrund von Plausibilitätsbetrachtungen. Es ist sehr auffällig, dass sich nahezu an jedem Ende eines im Netzwerk von der Wurzel ausgehenden Astes ein großer Knoten befindet, der fast immer mehr als 2% der Gesamtprobenzahl beinhaltet und von dem sich zumeist wenige Proben ableiten. Insofern erscheint es plausibel, die Grenze auf 2 % zu definieren. Jedoch darf hierbei nicht außer acht gelassen werden, dass die Probennahme nicht willkürlich und unvoreingenommen durchgeführt wurde. Die untersuchten Proben wurden stets nach Maßgabe ihrer Rasse ausgewählt. Somit ist es durchaus möglich, dass bei Ausdehnung der Studie auf eine größere Probenzahl aus allen verfügbaren Rassen unterschiedlichster Herkunft, eine Verschiebung in der Definition von Expansionsereignissen erfolgt. Manche kleinere Knoten in der Nähe der 2%-Grenze, die bisher als Expansionsereignis aufgefasst wurden, zum Beispiel A4 oder F2, könnten diesen Status verlieren, andere unterhalb der 2%-Grenze, zum Beispiel BAR4 oder auch BAR22, könnten hohe Relevanz bekommen. Die Betrachtung, ob einzelne Knoten als unabhängiges Expansionsereignis angesehen werden oder nicht, kann im Grenzfall also nicht als endgültig, sondern lediglich als "Stand der Forschung" betrachtet werden.

In diesem Zusammenhang muss hervorgehoben werden, dass sich die Datierungen der Expansionsereignisse primär auf die mütterliche Linie bzw. auf den letzten gemeinsamen maternalen Vorfahren der jeweiligen mütterlichen Linie beziehen. Bei der Betrachtung von Populationen sind die Datierungen als Maximalabschätzungen zu betrachten. Mit Sicherheit werden die unterschiedlichen Mikrohaplotypen, sofern sie miteinander verwandt sind, in einer Population evolviert sein. Die beiden mütterlichen Linien werden nachfolgend in derselben Population über einen gewissen Zeitraum koexistiert haben, bevor sie sich trennten und verschiedene Populationen gründeten.

5.2.5 Geografische Analyse

5.2.5.1 Sorraias und Koniks, Gruppe A1

Die in Gruppe A1 interessantesten Populationen sind sicherlich die Sorraias und die Koniks. In Kapitel 2.1.5.2.12 und 2.1.5.2.21 wurde der Ursprung der Populationen hinreichend erläutert. Es ist jedoch trotz aller Inzucht erstaunlich, dass bei den Sorraias nur zwei Mikrohaplotypen gefunden werden konnten, die sich nur durch zwei Mutationen unterscheiden. Nach der ersten Probennahme und der Feststellung von nur zwei maternalen Linien wurden verschiedene Züchter um weitere Proben gebeten, wobei darauf geachtet wurde, dass keine maternale Verwandtschaft zwischen den einzelnen Individuen dokumentiert war. Dennoch konnte kein weiterer Mikrohaplotyp ermittelt werden. Es ist also anzunehmen, dass entweder die in 2.1.5.2.21 erwähnten Gründerstuten miteinander verwandt waren oder, ähnlich wie bei den mongolischen Wildpferden, nur zwei maternale Linien bis in die heutige Zeit überlebt haben. Der Status des Sorraia-Pferds und des Koniks ist nach wie vor umstritten. Manche Autoren (z.B. EDWARDS, 1999) bezeichnen das Sorraia-Pferd, offensichtlich in Ermangelung der tatsächlichen Kenntnis der Rasse sogar als Pony. Der Konik wird im allgemeinen als Nachfahre des Tarpan aufgefassen (z.B. NISSEN, 1973), den manche Autoren als eine Stammform des Hauspferds (z.B. NOBIS; 1992) beschreiben. Andererseits beschreibt NOBIS (1992) das Sorraia-Pferd klar als verwildertes Hauspferd, während andere Autoren (z.B. KAPITZKE; 1993 oder OELKE; 1997) sowohl das Sorraia-Pferd, als auch den Konik als domestizierte Wildpferde bzw. Primitivrassen, die auf Wildpferdpopulationen zurückgehen, beschreiben. Es fällt schwer, sich zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung einer der Parteien in dem stattfindenden Disput anzuschließen, da diese Rassen bisher genetisch nicht erschöpfend untersucht wurden. Jedoch existieren Erfahrungen über die im Vergleich zum Hauspferd unterschiedliche Ethologie des Sorraia-Pferdes: Obwohl Sorraias nicht so schwer zähmbar sind wie mongolische Wildpferde, neigen sie dazu bei Extensivhaltung das Verhalten eines Wildtieres beizubehalten. Auch wenn sie bereits gezähmt wurden und sie nachfolgend wieder nur relativ selten Kontakt zu Menschen haben, scheuen sie und laufen davon, wenn ein Mensch auf sie zugeht, was sie deutlich von verwilderten Hauspferden, wie z.B. Mustangs, unterscheidet (Oelke, persönliche Mitteilung). Weiterhin ist sehr augenfällig, dass sich bisher keine Verwandtschaft von Sorraia-Pferden und iberischen Pferden feststellen ließ, während eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen den untersuchten Sorraias und

Koniks offensichtlich ist, trotz der geringen Probenzahl bei den Koniks. Dieser Befund wird noch signifikanter unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass sowohl die Individuen der iberischen Reitpferde als auch der Koniks nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden. Es wäre also ein extrem unwahrscheinlicher Zufall, wenn eine angenommene Verwandtschaft der Sorraia-Pferde zu den iberischen Reitpferden zufällig nicht aufgedeckt worden wäre, während die gefundene verwandtschaftliche Beziehung zwischen Sorraia und Konik zufälliger Natur wäre. Trotz aller Plausibilität ist zur abschließenden Beurteilung dieses Sachverhalts ein tieferer Einblick in die einzelnen Populationen notwendig: Eine eingehende Stammbaumstudie der lebenden Sorraia-Population mit entsprechender genetischer Untersuchung der einzelnen Stutlinien erscheint hierbei genauso notwendig wie die Untersuchung einer größeren Anzahl von iberischen Reitpferden, Koniks und Huzulen, einem weiteren allgemein angenommenen Nachfahren des Tarpan, um diese Fragestellung umfassend beantworten zu können.

5.2.5.2 Die mongolischen Wildpferde als Stammform des Hauspferdes, Gruppe A2

Wie bereits unter 2.1.4 dargestellt, gilt heute die Annahme des mongolischen Wildpferds als Stammform des Hauspferds als unwahrscheinlich. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen kann das mongolische Wildpferd als alleinige Stammform des Hauspferdes sogar ausgeschlossen werden. Die Annahme von inzwischen ausgestorbenen maternalen Linien der mongolischen Wildpferde, die die Basis der modernen Pferde darstellen, kann zwar mit allen verfügbaren Befunden nicht widerlegt werden. Jedoch sprechen die bisher gefundenen Indizien eindeutig gegen die zuvor erwähnte Annahme: ethologische Unterschiede wurden beschrieben sowie, dass das mongolische Wildpferd ein Chromosomenpaar mehr hat als das Hauspferd und der Mikrohaplotyp im untersuchten Bereich der D-loop, der allen mongolischen Wildpferden zu eigen ist, nicht bei einem anderen Pferd gefunden werden konnte. NISSEN (1998) geht in diesem Zusammenhang sogar noch einen Schritt weiter: "Man kommt fast in Versuchung zu fragen, ob die gemeinhin als 'Urwildpferd' bezeichnete, bisher als Ahn aller Hauspferde angesehene Art überhaupt ein 'echtes' Pferd ist. Sagen wir es scherzhaft und ein wenig überspitzt: Ebensowenig, wie der Neandertaler unser Großvater war, sondern nur sein Vetter, ist vielleicht *Equus przewalskii poljakoff* nicht der Großvater unserer domestizierten Pferde, sondern nur einer seiner Verwandten aus einer Seitenlinie." (S. 53)

5.2.5.3 Der Ursprung der Mustangs, Gruppen A3 und D

Häufig erreichten mich während der Durchführung der Studie Anfragen von Mustangbesitzern aus den USA in Bezug auf den Ursprung ihrer Pferde, im wesentlichen Tiere aus dem Sulphur Springs Herd Management Area (HMA), Utah, und dem Kiger HMA, Oregon. Es ist allgemein bekannt, dass entlaufene Hauspferde die Basis der Mustangpopulation darstellen. Viele Besitzer zielten jedoch mit ihrer Anfrage darauf ab, ob ein iberischer Ursprung des jeweiligen Mustangs nachweisbar sei. Natürlich ist die Aussage schwieriger zu treffen, als sich dies ein Züchter im allgemeinen vorstellt. Dennoch konnten manche Hinweise in dieser Studie gefunden werden, die auf einen tatsächlichen starken iberischen Einfluss auf die untersuchten Mustangpopulationen hindeuten. In erster Linie sind in diesem Zusammenhang die Gruppen A3 und D zu erwähnen. In Gruppe A3 (23% der gesamten Stichprobe von Mustangs) sind nach der Gruppe D die meisten Mustangs aufzufinden. Weiterhin finden sich in dieser Gruppe 44% aller untersuchten Lusitanos (auch 14% der Andalusier), 50% der untersuchten Holsteiner Pferde und 27% der Fjord-Pferde. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist es aus dem historischen Kontext heraus schwierig zu bestimmen, aus welcher Population der gefundene Mikrohaplotyp tatsächlich stammt. Somit können nur begründete Vermutungen Erklärungsansätze liefern.

Fjord-Pferde werden seit langer Zeit rein gezüchtet (NISSEN, 1998). Die Wurzeln dieser Rasse liegen bei den Wikinger-Pferden. Es ist hinreichend bekannt, dass die Wikinger ein kriegerisches Volk waren, das im Mittelalter in vielen Teilen Europas raubend und plündernd umherzog. Folglich ist die Vermutung naheliegend, dass in dieser Population maternale Linien vertreten sind, die nicht nordischen Ursprungs sind, sondern in historischer Zeit aus Mittel- oder gar Südeuropa stammen.

Holsteiner Pferde stammen, wie in 2.1.5.2.9 beschrieben, aus einer bodenständigen Warmblutzucht des 16. und 17. Jahrhunderts. In Kapitel 2.1.5.2 wurde auch beschrieben, dass in Mitteleuropa bis in das 17. Jahrhundert hinein die Kreuzungszucht vorherrschte. Auch wenn im allgemeinen angenommen wird, dass Holsteiner Pferde auf bodenständige Stuten zurückgehen, so fehlt hierfür in Hinblick auf die Zeit vor der Dokumentation von Stammbäumen jeglicher Beweis. Der tatsächliche Ursprung dieser Rasse bleibt nach dem jetzigen Stand der Forschung im Dunkel der Geschichte.

In 2.1.5.2.1 wurde bereits der umstrittene Ursprung der iberischen Pferde beschrieben. Es ist jedoch unbestritten, dass seit der Antike die Iberische Halbinsel ein Zentrum der Zucht von

"warmblütigen" Pferden ist. Wenn auch keine so weit zurückreichenden Stammbäume existieren, so reichen die Überlieferungen über die Zucht von Pferden auf der Iberischen Halbinsel weiter zurück, als dies für die meisten europäischen Rassen der Fall ist. Die Annahme, dass der gefundene Mikrohaplotyp von der Iberischen Halbinsel stammt, ist nicht ohne weiteres von der Hand zu weisen, auch wenn dieses hier nicht bewiesen wird und es fraglich ist, ob der Beweis in Anbetracht des historischen Kontextes überhaupt führbar ist.

Die Gruppe D ist klar iberisch und nordafrikanisch dominiert. Aus keiner anderen Population, mit Ausnahme der Mustangs, findet man in dieser Gruppe so viele Individuen. 80% aller Berber marokkanischen Ursprungs, 57% aller Andalusier und 56% der Lusitanos finden sich in dieser Gruppe. Weiterhin finden sich in dieser Obergruppe, die sich an einem sehr charakteristischen Sequenzmuster erkennen lässt, 57% aller untersuchten Mustangs, aber nur 13% der untersuchten Araber, die nach Ansicht mancher Autoren (z.B. SILVER, 1989) die Basis der iberischen Pferdezucht bildeten. Der hier gefundene Sachverhalt klärt die Unsicherheit in Bezug auf den Ursprung der iberischen Pferderassen in weiten Bereichen auf.

1. Es ist fast mit Sicherheit auszuschließen, dass die bodenständige iberische und nordafrikanische Pferdepopulation in einer Verdrängungszucht durch das arabische Pferd eliminiert wurde, und letzteres die Basis für das Berberpferd oder das iberische Reitpferd darstellt. Die Ergebnisse widersprechen somit eindeutig dem in der hippologischen Literatur häufig zitierten Import von 300.000 Arabischen Pferden nach Spanien (z.B. SILVER, 1989) während der Invasion durch die Mauren im 8. Jhdt.. Nach einer persönlichen Mitteilung von Dr. Olms (Asil-Araber-Verband, Deutschland) sprechen die arabischen Chroniken eher dafür, dass es so viele Pferde auf der gesamten arabischen Halbinsel gar nicht gab. 2. Die verwandtschaftliche Beziehung von iberischen Pferden und Berberpferden kann als nachgewiesen betrachtet werden. In welcher Form diese Populationen miteinander Kontakt hatten, ist noch unklar. Denkbar sind Kontakte in (vor-) römischer Zeit, während der Wanderung der Vandalen nach Nordafrika oder auch während der maurischen Besetzung der iberischen Halbinsel. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass nach SCHÄFER (1980), unter Berufung auf islamische Chronisten aus dem 8. Jhdt., ein nennenswerter Export von Pferden aus Nordafrika nach Spanien durch die Mauren als höchst unwahrscheinlich betrachtet werden kann. 3. In 80% aller untersuchten Mustangs findet sich einer von zwei Mikrohaplotypen, die möglicherweise iberischen Ursprungs sind.

Die hier vorgestellte Idizienkette legt also nahe, dass, neben dem besonderen Status der iberischen Reitpferde und der Berberpferde, iberische Pferde nicht nur historisch den

Grundstock der hier untersuchten Mustangs bilden, sondern tatsächlich die wesentliche Basis der Populationen darstellen.

5.2.5.4 Eine genetisch heterogene Population: das arabische Pferd

B2 (15% der gesamten Stichprobe) ist neben F1 (19% der gesamten Stichprobe) der Knoten, der die meisten arabischen Pferde enthält. Möglicherweise deuten diese Anhäufungen von Proben mit gleichem Mikrohaplotyp auf einen arabischen Ursprung der jeweiligen maternalen Linie hin. In fast allen Knoten des Netzwerks finden sich arabische Pferde, was ein recht auffälliger Befund ist. Dies ist zwanglos dadurch zu erklären, dass das arabische Pferd sicherlich zu den ältesten Zuchtrassen gehört. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass im Laufe der Jahrhunderte einerseits Tiere aus anderen Populationen in diese Zucht aufgenommen wurden, zumal der Begriff „Rasse“ mit Sicherheit in früheren Zeiten bei weitem nicht so dogmatisch gesehen wurde wie heute. Andererseits werden arabische Pferde bereits im Mittelalter als edle Tiere beschrieben, die, wenn auch in eher geringer Zahl, nach Europa exportiert wurden. Zusammenfassend fällt es schwer, eine befriedigende Bewertung dieser Befunde zu finden. Möglicherweise wurden mit B2 und F1 "arabische" Mikrohaplotypen gefunden. Vielleicht geht der Einfluss der arabischen Pferde auf die europäischen Zuchtrassen sogar weiter, als allgemein angenommen (z.B. SILVER, 1989; EDWARDS, 1999). Das Auffinden arabischer Pferde in nahezu allen Knoten lässt auf eine Einkreuzung arabischer Stuten in europäische Zuchtlinien schließen (BOWLING & RUVINSKY, 2000; BOWLING ET AL., 2000). Zwanglos ließe sich dieser Befund aber auch dadurch erklären, dass europäische Stuten in arabische Zuchtlinien eingekreuzt wurden (SCHÄFER, 1980). Unter Berücksichtigung der 5.2.5.3 aufgestellten Hypothese, dass der in Gruppe D gefundene Mikrohaplotyp iberisch-nordafrikanischen Ursprungs ist und dass höchstwahrscheinlich bis in das 18. Jahrhundert hinein die Zucht arabischer Pferde zahlenmäßig überhaupt nicht dazu in der Lage war, so viele Stuten zu exportieren, erscheint es sinnvoll für die Gruppen, in denen arabische Pferde in geringerer Anzahl auftreten, einen europäischen Einfluss auf die Zucht arabischer Pferde zu postulieren.

5.2.5.5 Ein nordischer Mikrohaplotyp? Die Gruppe C1

Die sehr hohe Konzentrierung von Ponyrassen in dieser Gruppe ist sehr augenfällig und bemerkenswert. Es wird in der Literatur häufig der bodenständige Charakter von nordischen Ponyrassen diskutiert, jedoch gelang der molekularbiologische Nachweis nicht mit letzter Sicherheit. Arbeiten von Speed & Speed (zitiert in BAKER, 1993) und BAKER ET AL. (1998) über den Status des Exmoor Ponys deuten zwar auf den besonderen Status dieser Population hin, jedoch kann man aus den Arbeiten keinesfalls den Schluss ziehen, dass die Exmoor Ponies, wie zum Beispiel in der Arbeit von Speed und in BAKER (1993) postuliert, eine bodenständige Population darstellen, die bereits während der letzten Eiszeit in Südengland existierte. Heutzutage wird der alleinige Vergleich von einzelnen Knochen nicht mehr als beweisend für die verwandtschaftliche Beziehung zwischen Populationen betrachtet (z.B. NOBIS, 1992). Auch liefert die Studie von BAKER ET AL. (1998) keine sehr weitreichenden Ergebnisse. Schließlich ist hinreichend bekannt, es wird in der Arbeit auch ausführlich dargestellt, dass nach dem Ende des zweiten Weltkriegs die Gesamtpopulation der Exmoor-Ponies extrem zusammengeschrumpft war. Man kann bei einer nachfolgend rein gezüchteten Population mit so wenigen Gründertieren nur eine reduzierte Allelfrequenz bei den untersuchten Mikrosatelliten-Systemen erwarten. Auch dass die gefundenen Größen charakteristische Abweichungen von der Normalverteilung aufweisen, ist nicht weiter verwunderlich. Wenn aufgrund der limitierten Anzahl von Gründertieren eine limitierte Anzahl von Allelen zu einem "Gen-pool" einer Population beigetragen wird, kann man von einem Founder-Effekt sprechen, aber nicht zwangsläufig auf eine bodenständige Population schließen.

Die Untersuchung von nicht rekombinierenden Markersystemen in mehreren Populationen unterschiedlicher geographischer Herkunft lässt dagegen weitergehende Schlüsse zu, als bei den oben vorgestellten Studien möglich war. Alle untersuchten Proben dieser Gruppe C1, deren regionale maternale Herkunft dokumentiert ist, stammen aus Mittel- und Nordeuropa. Außerdem gehören die Individuen fast ausschließlich Ponyrassen an. Der Befund lässt nur zwei Schlüsse zu: Entweder die untersuchten Individuen dieser Gruppe stammen von einer nach Mittel- und Nordeuropa durch den Menschen importierten maternalen Linie ab, oder sie gehen auf eine bodenständige Population zurück, die in postglazialer Zeit in die beschriebene Region wanderte. Es fällt schwer, nach dem jetzigen Stand der Kenntnis, eine der Möglichkeiten zu favorisieren. Studien an eizeitlichen und nacheiszeitlichen Knochenfunden

zeigen jedoch, dass unterschiedliche Phänotypen, wie zum Beispiel Ponies und warmblütige Formen, bereits lange vor der Domestikation des Pferdes in Europa existierten (EBHARDT, 1962). Dies unterstützt die These, dass die Ponyrassenm möglicherweise auf bodenständige Wildpopulationen zurückgehen. Sicher spricht aber der Befund für einen gemeinsamen Ursprung der Populationen.

5.2.5.6 Eine alte Warmblutzucht: der Senner, Gruppe G

Gruppe G ist sowohl in Bezug auf die Verteilung der Rassen als auch in Bezug auf die geografische Verteilung sehr auffällig. 19 von 22 Proben der Gruppe sind Senner, 20 von 22 Pferden stammen aus Deutschland bzw. aus deutschen Zuchten. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass alle heute lebenden Senner von einer Stute abstammen, die 1725 geboren wurde. Man kann also bei diesem Knoten nur schwerlich von einem Expansionsereignis im phylogenetischen Sinne sprechen, sondern von einem Founder-Effekt. Zwar sind die Begriffe "Expansionsereignis" und "Founder-Effekt" streng genommen nicht trennbar, schließlich ist ein Expansionsereignis, so wie es in 4.2.2.2 definiert wurde, auch nur ein Founder-Effekt. Jedoch wurde der Begriff hier so verwendet, dass bei einem Expansionsereignis aus einer Gruppe von Gründertieren in vorgeschichtlicher Zeit eine Population entstand. Die Senner sind jedoch eine Rasse mit nur geringer Kopfzahl, deren gemeinsamer Vorfahr in geschichtlicher Zeit lebte. Vielmehr ist der Mikrohaplotyp dieser Gruppe im Vergleich zu anderen Populationen überrepräsentiert. Dennoch ist das Sequenzmuster bemerkenswert, weil es relativ selten ist. Außer bei den Sennern und einem Rheinisch-Deutschen Kaltblut findet sich der Mikrohaplotyp nur noch bei zwei arabischen Pferden.

Somit lassen sich zwei Szenarien postulieren, die nach dem Stand der Forschung nicht überprüfbar sein werden. Entweder deutet das gefundene Sequenzmuster auf den Rest einer ansonsten durch Verdrängungszucht verschwundenen Population, die entweder bodenständig war oder (gemäß LAMPE zitiert in NISSEN, 1997, S. 157) auf römische Kavalleriepferde zurückgeht und einst so zahlreich war, dass sogar einzelne Tiere auf die arabische Halbinsel gelangten, oder im Mittelalter oder in der frühen Neuzeit wurde eine arabische Stute nach Europa exportiert, welche – oder ihre Nachkommen – in die mitteleuropäische Warmblutzucht integriert wurde. Die zweite Alternative ist, wenn auch nicht ganz auszuschließen, die unwahrscheinlichere, da überliefert ist, dass die Zucht stets auf den

vorhandenen Stutenlinien basierte (VOGT zitiert in NISSEN, 1997, S. 158). Die Einkreuzung von Fremdblut erfolgte über die Beschäler. Überlieferungen der Herren zur Lippe berichten sogar, dass aus den Kreuzzügen besonders wertvoll erscheinende orientalische Hengste mitgebracht und in die Zucht integriert wurden (NISSEN, 1997). Es ist bekannt, dass Warmblüter zur "Veredelung" in Kaltblutrassen eingekreuzt wurden. Dadurch ist das Auffinden des Mikrohaplotypen der Gruppe G in einem Rheinisch-Deutschen Kaltblüter erklärbar. Da jedoch das Stutbuch der Senner bei einem Brand zum Teil vernichtet wurde, ist man heute auf die Überlieferungen der Zuchtleiter angewiesen. Man wird wahrscheinlich nie mehr den Ursprung dieses Mikrohaplotypen, auch wegen des möglichen Einflusses römischer Kavalleriepferde zu einer Zeit, als noch keine Aufzeichnungen geführt wurden, mit letzter Sicherheit bestimmen können.

5.2.6 Interdisziplinäre Betrachtungen: Molekularbiologie, Populationsgenetik, Archäologie, Ethnologie und Ethologie. Welche Schlüsse sind möglich?

In 4.2.2 wurde bereits dargestellt, dass die 81 gefundenen Mikrohaplotypen der domestizierten Pferde unter Berücksichtigung der Mutationsrate für die mitochondriale D-loop auf mindestens 77 genetisch verschiedene Gründerstuten für die heute lebenden Pferde zurückgehen müssen. Im natürlichen Habitat leben Pferde in Kleingruppen, die im allgemeinen aus einem dominanten Hengst, ein bis sechs Stuten (nach Untersuchungen an Mustangpopulationen im Durchschnitt zwei) und deren Nachkommen bestehen. Die männlichen Nachkommen verlassen ihre Sippe kurz nach dem Eintreten der Pubertät, die weiblichen Nachkommen entweder zu Beginn der Pubertät oder nach der Geburt ihres ersten eigenen Nachkommens. Die Junghengste schließen sich zu sogenannten Junggesellenherden zusammen, Jungstuten schließen sich anderen Herden an (DUCAN ET AL., 1992). Dies bedeutet, dass, um die Basis aller heute lebenden Pferde bilden zu können, insgesamt ca. 39 genetisch verschiedener Kleinherden oder rund 200 Pferde eingefangen, erfolgreich gezähmt und domestiziert worden sein müssen. Wahrscheinlich war die tatsächliche Anzahl noch viel größer, da zu vermuten ist, dass nicht jede maternale Linie bis in die heutige Zeit überlebt hat, nicht jede maternale Linie mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen wurde und offensichtlich die genetische Diversität bei Wildpferden relativ gering ist. Es ist unwahrscheinlich, dass eine einzelne jungsteinzeitliche oder kupferzeitliche Gesellschaft von "Fußgängern" in der Lage gewesen wäre, eine solch große Anzahl an Tieren in einem relativ

kurzen Zeitraum von wenigen Generationen erfolgreich einzufangen, zu zähmen und zu züchten. Dies bedeutet, dass die häufig in der Literatur diskutierte, einmalige Domestikation des Pferdes in der eurasischen Steppe als widerlegt betrachtet werden kann. Vielmehr erscheint in dem Licht der hier vorliegenden Ergebnisse ein anderes Szenario als wahrscheinlicher: Die Berücksichtigung der geographischen Verteilung der Gruppen C1 (mittel- bzw. nordeuropäische Ponyrassen) und D1 (vorwiegend iberische Reitpferde und Berber) legt die Annahme von zwei Domestikationszentren in Europa, eines im Gebiet der iberischen Halbinsel bzw. Nordafrikas und eines im Gebiet Nordeuropas nahe. Schließlich ist bekannt, dass bereits im 3. Jahrhundert v. Chr. auf der iberischen Halbinsel von den Römern ein Zuchtzentrum aufgebaut wurde. Dies wäre mit Sicherheit nicht geschehen, wenn von den Römern keine qualitätvollen zuchtfähige, also domestizierte Pferde vorgefunden worden wären. Die große Unsicherheit in der Datierung der Expansionsereignisse lässt jedoch keinesfalls den Schluss zu, wann genau ein Domestikationsereignis stattgefunden haben mag. Auch schließen die beiden hier postulierten Domestikationszentren in Süd- bzw. Nordeuropa nicht die Existenz eines Domestikationszentrums in der eurasischen Steppe aus.

LEVINE (1999¹) beschrieb in ihrer Studie, dass die ersten Schritte der Domestikation vermutlich einen weiteren Schritt beinhalteten: Der erste Schritt zur Domestikation des Pferdes wird mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Zähmung von Fohlen, deren Mütter bei der Jagd getötet worden waren, gelegen haben. Diese Tiere wurden eher als "Streicheltiere" (engl.: "pets") als als Haustiere im landwirtschaftlichen Sinne gehalten (LEVINE, 1999¹). Erst im Laufe der Zeit, bei wahrscheinlich mehrfacher Wiederholung des Zähmungsvorgangs, wurde der Nutzen der "Streicheltiere" erkannt und mit den Versuchen zur Domestikation begonnen (LEVINE, 1999¹). Jungtiere lassen sich deutlich leichter zähmen als Alttiere. Hengste, die in zu jungen Jahren aus ihrer Herde entfernt wurden, sind aber selten erfolgreiche Deckhengste, da sie kein normales Paarungsverhalten von älteren Hengsten lernen konnten (LEVINE, 1999¹). Zusammenfassend würde die Annahme einer einmaligen Domestikation des Pferdes in der eurasischen Steppe und der nachfolgende Export der domestizierten Tiere in alle Regionen der Welt bedeuten, dass extrem viele Herden in der eurasischen Steppe abgeschlachtet worden sind. Die Fohlen werden von den Alttieren im Falle der Bedrohung verteidigt, so dass sowohl die Hengste als auch die Stuten getötet werden müssten, um an Jungtiere zu gelangen, die man zähmen und züchten müsste. In diesem Dilemma ist auch der Grund für die im Vergleich zu den anderen Haustieren (Hund, Rind, Schwein, Ziege) sehr späte Domestikation des Pferdes zu suchen. Als Fluchttiere, die ihren Nachwuchs im Falle

eines unausweichlichen Angriffs verbissen verteidigen und in einem komplexen Sozialsystem leben, wobei die Jungtiere erst ein normales Sozialverhalten erlernen müssen, dürften Pferde nur sehr schwer zu domestizieren gewesen sein. Boyd & Houpt (1994) beschreiben massive Störungen im Sozialverhalten bei den ersten eingefangenen Mongolischen Wildpferden, die zur Zucht verwendet werden sollten, was zu ständigen Fehlschlägen bei den Zuchtbemühungen führte. Die Unterart wäre fast ausgestorben, hätten die Zuchtleiter nicht rechtzeitig erkannt, dass die Ursachen für die Störungen im Sozialverhalten in den unzureichenden Haltungsbedingungen lagen. Solange die Anforderungen an ein funktionierendes Sozialgefüge nicht erfüllt sind, können Wildpferde in Gefangenschaft nicht gezüchtet werden. Somit ist es durchaus möglich, dass das Wissen der Domestikation des Pferdes nur einmal entwickelt wurde und nachfolgend dieses „know how“ an andere Kulturen weiter gegeben wurde.

Die archäologischen Fundorte bei Derejevka und Botai sind als Domestikationszentren sehr umstritten (ANTHONY & BROWN, 1991 vs. LEVINE, 1999¹). LEVINE (1999¹) lieferte eindeutige Befunde, dass die Funde eher für eine Jäger- als für eine Hirtenkultur an diesen Fundorten sprechen, auch wenn sie grundsätzlich nicht die Existenz von domestizierten Pferden in dieser Epoche ausschließen. Hinweise auf domestizierte Pferde werden jedoch an diesen Fundorten durch die unerhörte Menge an Knochen von aller Wahrscheinlichkeit nach gejagten Pferden verdeckt (LEVINE, 1999¹). Es ist auch unrealistisch zu behaupten, dass zuerst Streitwagen gefahren wurden und Pferde danach erst geritten wurden (NOBIS, 1992). Der Fund eines Streitwagengrabes bei Sintašta aus der Zeit um 2000 v. Chr. ist zwar der früheste unumstrittene archäologische Beweis für die Domestikation des Pferdes, er beschreibt aber nicht den Zeitpunkt der Domestikation. Eine Herde zu lenken und im Griff zu halten, ist zu Fuß oder vom gezogenen Wagen aus unmöglich. Während ihrer Interviews für ihre 1999 veröffentlichte Studie, befragte Dr. Levine ihre Gesprächspartner auch nach der Möglichkeit, eine Herde von einem von Pferden, Halbeseln oder Rindern gezogenen Wagen aus zu leiten und gegebenenfalls einzelne Tiere herauszufangen. Die Interviewpartner reagierten auf diese nach ihrer Sicht naive und einfältige Frage mit Unverständnis und Gelächter (Levine, persönliche Mitteilung). Pferde müssen vor der Entwicklung des Streitwagens gerittenen worden sein. Der Schluss, dass zuerst Streitwagen gefahren wurden, ist eher auf eine fehlerhafte Interpretation von fehlenden Artefakten zurückzuführen. Man kann schließlich Pferde auch ohne Sattel und mit Zaumzeug aus Pflanzenfasern, Tierhaaren oder Leder ohne Gebisse reiten, was mit Sicherheit am Anfang der Domestikation der Fall

gewesen sein wird (LEVINE, 1999¹). Solche Artefakte sind jedoch archäologisch nur höchst selten nachweisbar. Zum Beispiel sind Indianer, obwohl sie sehr schnell das Reiten lernten, auch meistens ohne Sattel geritten. Die hier vorgestellte Indizienkette zeigt, dass das Pferd vor 2.000 v. Chr. domestiziert worden sein muss. Dieses Ereignis muss in einer früheren Epoche gelegen haben. Weiterhin existieren, wenn auch umstrittene, Hinweise, die eine Domestikation des Hauspferdes bereits im 5. Jahrtausend v. Chr. in Iberien möglich erscheinen lassen (D'ANDRADE; 1973).

Wenn das Pferd nur einmal domestiziert wurde und der jeweilige Typ (Pony, Warmblüter etc.) nur durch Zucht erreicht worden wäre, müssten alle gefundenen Mikrohaplotypen über alle Populationen nahezu gleichmäßig verteilt sein; es dürften kaum Ungleichgewichte in der Verteilung über die einzelnen Regionen oder auch Rassen aufzufinden sein. In der vorliegenden Studie wurden aber regionale Ungleichgewichte nachgewiesen.

Zusammenfassend lassen sich die hier diskutierten Befunde aus den unterschiedlichen Disziplinen wie folgt darstellen:

1. Es ist nicht genau bekannt, wann und wo das Pferd zum ersten mal domestiziert wurde.
2. Aufgrund des komplexen Sozialverhaltens des Pferdes, der hohen genetischen Diversität und der geografischen Verteilungsungleichgewichte der Mikrohaplotypen ist es unwahrscheinlich, dass Pferde nur an einem Ort domestiziert und von dort ausgehend domestizierte Pferde exportiert wurden.
3. Mögliche frühe Orte unabhängiger Domestikation liegen in der eurasischen Steppe, Mittel- oder Nordeuropa und auf der Iberischen Halbinsel beziehungsweise in Nordafrika.
4. Eine präzise Bestimmung von Domestikationsorten und -zeitpunkten wird nur durch zukünftige, interdisziplinär angesiedelte Projekte durchgeführt werden können.

6. Ausblick

Es wurde bereits in dieser Schrift angedeutet, dass verschiedene Untersuchungen fortgeführt werden müssen, um ein abschließendes Bild über die Domestikation des Pferdes zu erhalten.

Als wichtigster Punkt ist hierbei die exakte Bestimmung der Mutationsrate der mitochondrialen DNA herauszustellen. Nur durch eine exakt bestimmte Mutationrate könnten Expansionszeitpunkte mit Sicherheit bestimmt werden. Die paläontologische Forschung lässt jedoch in absehbarer Zeit keine exaktere Datierung des letzten gemeinsamen Vorfahren der Equiden und damit keine präzisere Kalibrierung der Mutationsrate erwarten. Somit verbleibt nur eine Bestimmung der mitochondrialen Mutationsrate aus intensiven Stammbaumstudien. Ein solches Forschungsprojekt wurde nach meinem Wissen bis heute noch nicht in Angriff genommen.

Außerdem sind weitere Untersuchungen an einer größeren Zahl von Individuen, insbesondere aus dem asiatischen Raum, notwendig, um einen tieferen Einblick in die Verwandtschaft der verschiedenen maternalen Linien zu erhalten und das Domestikationsszenario auf dem asiatischen Kontinent aufzuklären. Erst durch den Nachweis der Anwesenheit oder der Abwesenheit von den bei den nordischen Ponyrassen und bei den iberischen Reitpferden und Berberpferden gefundenen Mikrohaplotypen im Gebiet der eurasischen Steppe, könnte das in dieser Schrift vorgestellte Domestikationsszenario mit letzter Sicherheit bewiesen werden. Weiterhin ist durch eine deutlich erhöhte Probenzahl eine geringere Standardabweichung in den Datierungen der Expansionsereignisse und damit eine erhöhte Sicherheit zu erwarten.

Schließlich erscheint es notwendig, archäologische Proben genetisch zu untersuchen, um die bisherigen Ergebnisse zu überprüfen. Auch hier könnte durch die Anwesenheit oder Abwesenheit der hier vorgestellten Mikrohaplotypen bei den zu untersuchenden Proben ein tieferer Einblick in das Domestikationsszenario gewährt und die hier vorgestellten Ergebnisse verifiziert oder auch falsifiziert werden. Es wurde bereits weiter oben angedeutet, dass nur durch eine Kooperation aller in diesem Themenbereich involvierten wissenschaftlichen Disziplinen ein abschließendes Bild über die Domestikation des Hauspferdes gefunden werden kann.

7. Zusammenfassung

Durch Sequenzierung und phylogenetische Analyse eines 247 bp großen Fragments aus dem ersten hypervariablen Bereich der mitochondrialen D-loop von insgesamt 654 Individuen, wovon die Proben von 318 Individuen neu sequenziert wurden, die restlichen mitochondrialen DNA (mtDNA)-Sequenzen stammten aus Veröffentlichungen, konnte ein eingehender Blick auf die Entwicklungsgeschichte des Hauspferdes erhalten werden. Aus der phylogenetischen Analyse mit dem Network Programm Paket (Version 3.1.0.0) konnten 84 verschiedene Mikrohaplotypen heute lebender Pferde, einschließlich des Mongolischen Wildpferdes, und 17 unabhängige Expansionsereignisse identifiziert werden. Die Kombination der molekularbiologischen Ergebnisse mit Forschungsergebnissen aus der Archäologie, Ethologie, Ethnologie und Populationsgenetik widerlegt die Annahme einer einmaligen Domestikation des Hauspferdes in der eurasischen Steppe. Es wurden Hinweise auf weitere Domestikationszentren in Mittel- bzw. Nordeuropa und in Nordafrika bzw. auf der iberischen Halbinsel gefunden. Überraschenderweise konnte kein wesentlicher Kontakt zwischen dem Sorraia Pferd, einer südiberischen Population, und dem Iberischen Reitpferd gefunden werden; es wurde jedoch der Hinweis auf eine mögliche verwandtschaftliche Beziehung zwischen dem Sorraia und dem Konik, einer polnischen Rasse, gefunden. Das iberische Reitpferd hingegen weist eine verwandtschaftliche Beziehung zum Berberpferd auf. Aufgrund der z.Zt. nicht präzise bestimmbarer Mutationsrate der mt-DNA, ist der exakte Zeitpunkt der einzelnen Expansionen, aus dem vermutlich weitere Erkenntnisse in Bezug auf die Domestikation erhalten werden könnten, nicht zu ermitteln. Weitergehende, interdisziplinär angelegte Studien erweisen sich als notwendig, um das Szenario der Domestikation des Pferdes endgültig aufzuklären.

8. Literatur:

Einführende und allgemeine Literatur:

Brand K. (1992): Taschenbuch der Biochemie und Molekularbiologie. Quelle und Meyer, Wiesbaden, UTB

dtv-Atlas Weltgeschichte (2000): Band 1, Von den Anfängen bis zur Französischen Revolution, 34. Auflage, Deutscher Taschenbuch Verlag, München

Lewin B. (1998): Molekularbiologie der Gene, übersetzt von K. Beginnen, B. Bettenhausen, S. Hatrung, J. Karow, L. Seidler, J. Wißmann, M., Yiallourous. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg

Stryer L. (1996): Biochemie, 4.Auflage, übersetzt von G. Stoll, B. Pfeiffer, J. Guglielmi. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg

Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. (1993): Rekombinierte DNA, 2. Auflage, übersetzt von M. Pohlmann, I. Glomp, S. Schneider. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg

Zitierte Literatur:

- ABI¹ **ABI PRISM**, Mitochondrial DNA Sequencing, Technical Booklet, Perkin Elmer Corporation, ohne Jahresangabe
- ABI (1995¹) **ABI PRISM** (1995): DNA Sequencing, Chemistry Guide Version A, Perkin Elmer Corporation
- ABI (1995²) **ABI PRISM** (1995): Comparative PCR Sequencing, A Guide to Sequencing-Based Mutation Detection, Perkin Elmer Corporation
- ANDERSON ET AL. (1981) **Anderson S., Bankier A.T., Barrel B.G., deBruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Epperon I.C., Nierlich D.P., Rose B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G.** (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial Genome. Nature **290**, 457-465
- ANTHONY ET AL. (1991) **Anthony D., Telegin D.Y., Brown D.** (1991): Origin of horseback riding. Scientific American **225**, 44-48

-
- AZZAROLI (1995) **Azzaroli A.** (1995): A Synopsis of the Quaternary species of Equus in North America. Bull. Soc. Pal. It. **34** (2), 205-221
- BAKER (1993) **Baker S.** (1993): Survival of the Fittest- A Natural History of the Exmoor Pony, Exmoor Books, Halls Grove, Großbritannien
- BAKER ET AL. (1998) **Baker S., Greig C., Macgregor H., Swan A.** (1998): Exmoor Ponies - Britain's prehistoric wild horses? British Wildlife **9** (5), 304-313
- BANDELT ET AL. (1995) **Bandelt H.-J., Forster P., Sykes B.C., Richards M.B.** (1995): Mitochondrial Portraits of Human Populations Using Median Networks. Genetics **141**, 743-753
- BANDELT ET AL. (1999) **Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.** (1999): Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. Mol. Biol. Evol. **16** (1), 37-48
- BOWER (1993) **Bower B.** 1993: Ancient figurine lists horses' profile. Science news **143**, 22, zitiert in: Bowling, Ruvinsky (2000)^a
- BOWLING ET AL. (2000) **Bowling A.T., Del Valle A., Bowling M.** (2000): A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. Anim. Genet. **31**, 1-7
- BOWLING, RUVINSKY (2000) **Bowling A.T., Ruvinsky A.** (2000): Preface, vii-viii, in: The genetics of the horse edited by A.T. Bowling and A. Ruvinsky, CABI Publishing, Oxon, Großbritannien
- BOWLING, RUVINSKY (2000)^a **Bowling A.T., Ruvinsky A.** (2000): Genetic Aspects of Domestication, breeds and their origins in: The genetics of the horse, 25-51, edited by A.T. Bowling and A. Ruvinsky, CABI Publishing, Oxon, Großbritannien
- BRADLEY ET AL. (1996) **Bradley D.G., MacHugh D.E., Cunningham P., Loftus R.T.** (1996): Mitochondrial diversity and the origin of African and European cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 5131-5135
- BRUNS (1970) **Bruns U.** (1970): Das Jahr der Pferde. Albert Müller Verlag, Rüslikon, Schweiz

-
- BOYD & HOUPPT (1994) **Boyd L., Houpt K. A.** (1994) in: Przewalski's Horse, the History and Biology of an Endangered Species, S. 195-228, eds. Boyd, L., Houpt, K. A., State University of New York Press, Albany
- CLUTTON-BROCK (1987) **Clutton-Brock J.** (1987): A natural history of domesticated animals. Cambridge University Press, British Museum (Natural History), Stockbridge, Großbritannien zitiert in: Bowling, Ruvinsky(2000)^a
- D'ANDRADE (1945) **d'Andrade R.** (1945): O Cavalo Do Sorraia. Separata do Boletim Pecuário, **XIII, Lx.**, 1-13
- D'ANDRADE (1973) **d'Andrade F.** (1973): A short history of the spanish horse and the iberian "Gineta" horsemanship for which this horse is adapted, Lissabon, Portugal
- DUNCAN ET AL. (1992) **Duncan P., Ryder O., Asa C., Feh C.** (1992) The Nature and Value of Zebras, Asses, and Horses in: Zebras, Asses, and Horses – An Action Plan for the Conservation of Wild Equids, edited by Patrick Duncan, IUCN, Gland, Schweiz
- EBHARDT (1962) **Ebhardt, H.** (1962): Säugetierkundl. Mitteil. **X**, 145-168
- ECKERT ET AL. (2000) **Eckert R., Randall D., Burggren W., French K.** (2000): Tierphysiologie, 3. Auflage, übersetzt von R. Apfelbach, U. Gansloßer, W. Harder, M. Koch, E. Müller, E. Pröve, K. Reutter, D. Schild, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- EDWARDS (1999) **Edwards E.H.** (1999): Die BLV Enzyklopädie der Pferde, übersetzt von S. Müller, BLV Verlag, München
- EISENMANN (1992) **Eisenmann V.** (1992): Origins, dispersals, and migrations of Equus (Mammalia, Perissodactyla), Courier Forsch.-Inst. Senckenberg **153**, 161-170
- EISENMANN & BAYLAC (2000) **Eisenmann V., Baylac M.** (2000): Extant and fossil Equus (Mammalia, Perissodactyla) skulls: morphometric definition of the subgenus Equus. Zoologica Scripta **29**, 89-100

-
- FORSTEN (1992) **Forsten A.** (1992): Early Equus dispersal and taxonomy: conflicting opinions, *Courier Forsch.-Inst. Senckenberg* **153**, 171-176
- FORSTER ET AL. (1996) **Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H.-J.** (1996): Origin and Evolution of Native American mtDNA Variation: A Reappraisal. *Am. J. Hum. Genet.* **59**, 935-945
- FORSTER ET AL. (2000) **Forster P., Röhl A., Lünemann P., Brinkmann C., Zerjal T., Tyler-Smith C., Brinkmann B.** (2000): A Short Tandem Repeat-Based Phylogeny for the Human Y Chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 182-196
- GEORGE & RYDER (1986) **George M. jr., Ryder O.A.** (1986): Mitochondrial DNA in the Genus Equus. *Mol. Biol. Evol.* **3** (6), 535-546
- GROVES & RYDER (2000) **Groves C.P., Ryder O.A.** (2000): Systematics and phylogeny of the horse in:
The genetics of the horse, 1-24, edited by A.T. Bowling and A. Ruvinsky, CABI Publishing, Oxon, Großbritannien
- HAMMER (1995) **Hammer M.F.** (1995): A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature* **396**, 376-378
- INGMAN ET AL. (2000) **Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S., Gyllensten U.** (2000): Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* **408**, 708-713
- IRWIN ET AL. (1991) **Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C.** (1991): Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 128-144
- ISHIDA ET AL (1994): **Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, Sakagami M, Onishi A, Inumaru S, Komatsu M, Mukoyama H** (1994) Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Anim. Genet.* **25**, 215-221
- ISHIDA ET AL. (1995) **Ishida N., Oyunsuren T., Mashima S., Mukoyama H., Saitou N.** (1995): Mitochondrial DNA sequences of various species of the genus Equus with special reference to the phylogenetic relationship between Przewalskii's wild horse and domestic horse. *J. Mol. Evol.* **41**, 180-188

-
- ISHIDA ET AL. (1996) **Ishida N., Hasegawa T., Oyunsuren T., Mukoyama H.** (1996): PCR-RFLP analysis of the cytochrome b gene in horse mitochondrial DNA. *Anim. Genet.* **27**, 359-363
- JOBLING ET AL. (1998) **Jobling M.A., Bouzekri N., Taylor P.G.** (1998): Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (DYF155S1). *Hum. Mol. Genet.* **7**, 643-653
- KANEDA (1995) **Kaneda H., Hayashi J.-I., Takahama S., Taya C., Fischer-Lindahl K., Yonekawa H.** (1995): Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4542-4546
- KAPITZKE (1993) **Kapitzke G.** (1993): *Das Pferd von A - Z: Rassen, Zucht Haltung.* 4. Auflage, BLV Verlag, München
- KAVAR ET AL. (1999) **Kavar T., Habe F., Brem F., Dovic P.** (1999): Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. *Anim. Genet.* **30**, 423-440
- KAYSER ET AL. (1997) **Kayser M., Caglià A., Corach D., Fretwell N., Gehrig C., Graziosi G., Heidorn F. et al.** (1997): Evaluation of Y-chromosomal STR's: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.* **110**, 125-133, 141-149
- KIKKAWA ET AL. (1997) **Kikkawa Y., Yonekawa H., Suzuki H., Amano T.** (1997): Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoas based on variants in the mitochondrial gene for cytochrome b. *Anim. Genet.* **28**, 195-201
- KIM ET AL. (1999) **Kim K.-I., Yang Y.-H., Lee S.-S., Park C., Ma R., Bouzat J.L., Lewin H.A.** (1999): Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* **30**, 102-108
- KIMURA (1983) **Kimura M.** (1983): *The neutral theory of molecular evolution.* Cambridge University Press, Cambridge, Großbritannien

-
- KOCHER ET AL. (1989) **Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X., Wilson A.C.** (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6196-6200
- KOLB (1989) **Kolb E.** (1989): *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Teil II*, berab. von H. Gürtler, H.-A. Ketz, E. Kolb, L. Schröder, H. Seidel, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- KUNZ & REANIER (1994) **Kunz M.L., Reanier R.E.** (1994): Paleoindians in Beringia: evidence from Arctic Alaska. *Science* **263**, 660-662
- LEVINE (1999)¹ **Levine M.A.** (1999): Botai and the Origins of Horse Domestication. *J. Anthropol. Arch.* **18**, 29-78
- LEVINE (1999)² **Levine M.A.** (1999): The Origins of Horse Husbandry on the Eurasian Steppe in: Late prehistoric exploitation of the Eurasian steppe, edited by M. Levine, Y. Rassamakin, A. Kislenko, N. Tatarintseva, McDonald Institute Monographs, Cambridge
- LISTER ET AL. (1998) **Lister A.M., Kadwell M., Kaagan L.M., Jordan W.C., Richards M.B., Stanley H.F.** (1998): Ancient and modern DNA in a study of horse domestication. *Ancient Biomolecules* **2**, 267-280
- LOCH (1986) **Loch S.** (1986): *The Royal Horse of Europe*. J.A. Allen Verlag, London, Großbritannien
- LOFTUS ET AL. (1994) **Loftus R.T., MacHugh D.E., Bradley D.G., Sharp P.M., Cunningham P.** (1994): Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2757-2761
- LUIKART ET AL. (2001) **Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne J.-D., Bouvet J., Taberlet P.** (2001): Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5927-5932

-
- MACFADDEN (1992) **Mac Fadden B.J.** (1992): Fossil horses: systematics, paleobiology, and evolution of the family equus, Cambridge University Press
- MACHUGH & BRADLEY (2001) **MacHugh D.E., Bradley D.G.** (2001): Livestock genetic origins: Goats buck the trend (Kommentar zur LUIKART ET AL., 2001). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 5382-5384
- MARTIN & PALUMBI (1993) **Martin A.P., Palumbi S.R.** (1993): Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 4087-4091
- MAYR (1994) **Mayr E.** (1942): Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York zitiert in: Groves & Ryder (2000)
- MULLIS & FALOONA (1985) **Mullis K., Faloona F.** (1985): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. **55**, 335-350
- NACHMANN ET AL. (1994) **Nachmann M.W., Boyer S.N., Searle J.B., Aqardo C.F.** (1994): Mitochondrial DNA Variation and the Evolution of Robertsonian chromosomal Races of House Mice, *Mus domesticus*. Genetics **136**, 1105-1120
- NEI (1987) **Nei M.** (1987): Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, USA
- NISSEN (1999) **Nissen J.** (1999) Enzyklopädie der Pferderassen: Europa, Band 3, Spanien, Portugal, Italien, Schweiz, Österreich, Osteuropa. Kosmos Verlag, Stuttgart
- NISSEN (1998) **Nissen J.** (1998) Enzyklopädie der Pferderassen: Europa, Band 2, Island, Skandinavien, Grossbritannien, Irland, Frankreich. Kosmos Verlag, Stuttgart
- NISSEN (1997) **Nissen J.** (1997): Enzyklopädie der Pferderassen: Europa, Band 1, Deutschland, Belgien, Niederlande, Luxemburg. Kosmos Verlag, Stuttgart
- NISSEN (1973) **Nissen J.** (1973): Welches Pferd ist das? Frackh'sche Verlagshandlung, Stuttgart

-
- NOBIS (1992) **Nobis G.** (1992): Die Geschichte des Pferdes - seine Evolution und Domestikation. In: Handbuch Pferd: Zucht, Haltung, Ausbildung, Sport, Medizin, Recht, Fachred. P. Thein, 4. Auflage, BLV Verlag, München
- OAKENFULL ET AL. (2000) **Oakenfull E.A., Lim H.N., Ryder O.A.** (2000): A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of Equus. *Conserv. Genet.* **1**, 341-355
- OAKENFULL & RYDER (1998) **Oakenfull E.A., Ryder O.A.** (1998): Mitochondrial control region and 12S rRNA variation in Przewalski's horse (*Equus przewalskii*). *Anim. Genet.* **29**, 456-459
- OELKE (1997) **Oelke H.** (1997): Born Survivors On The Eve Of Extinction - Can Iberia's Wild Horse Survive Among America's Mustangs? Kierdorf Verlag, Wipperfürth
- PEGORARO ET AL. (1996) **Pegoraro L., Yang Z., Samaké S., Meirelles F.V., Bordignon V., Moquin L., Smith L.C.** (1996): Sequence comparison of mitochondrial tRNA genes and origin of light strand replication in *Bos taurus* and Nellore (*Bos indicus*) breeds. *Anim. Genet.* **27**, 91-94
- PELTIER (1994) **Peltier W.R.** (1994): Ice age paleogeography. *Science* **265**, 195-201
- SAIKI ET AL. (1988) **Saiki R.K., Gelfand D.D., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T. Mullis K.B., Erlich H.A.** (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- SAILLARD ET AL. (2000) **Saillard J., Forster P., Lynnerup N., Bandelt H.-J., Nørby S.** (2000): mtDNA Variation among Greenland Eskimos: The Edge of the Beringian Expansion. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 718-726
- SANDBERG & COTHRAN (2000) **Sandberg K., Cothran E.G.** (2000) Blood Groups and Biochemical Polymorphisms in: The genetics of the horse, 85-108, edited by A.T. Bowling and A. Ruvinsky, CABI Publishing, Oxon, Großbritannien

-
- SANGER ET AL. (1977) **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5497
- SCHENK & KOLB (1990) **Schenck M.** (1990): Grundriß der physiologischen Chemie, bearbeitet von E. Kolb, 8. überarbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena
- SCHÄFER (1980) **Schäfer M.** (1980): Andalusische Pferde, Nymphenburger Verlag
- SCHERLING (1995) **Scherling A.** (1995): Rottaler in: Homepage der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V.
<http://www.genres.de/tgr/geh-pfer/rartik.htm>
- SILVER (1989) **Silver C.** (1989): Pferderassen der Welt, 3. Auflage, BLV-Verlag, München
- TAMURA UND NEI (1993) **Tamura K., Nei M.** (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. **10**, 512-526
- TROY ET AL. (2001) **Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C., Bradley D.G.** (2001): Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. Nature **410**, 1088-1091
- UNDERHILL ET AL. (1997) **Underhill P.A., Jin L., Lin A.A., Mehdi S.Q., Jenkins T., Vollrath T., Davis R.W. et al.** (1997): Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. Genome Res. **7**, 996-1005
- VILÀ ET AL. (2001) Vilà C., Leonard J.A., Götherström A., Marklund S., **Sandberg K., Lindén K., Wayne R.K., Ellegren H.** (2001): Widespread origins of domestic horse lineages. Science **291**, 474-477

-
- VOGT (1995) **Vogt M.** (1995): Der Senner - die älteste Reitpferdezucht in Deutschland. In: Homepage der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V.
<http://www.genres.de/tgr/geh-pfer/sebr.htm>
- WEIR (1996) **Weir B.S.** (1996): Genetic Data Analysis II, Methods for Discrete Population Genetic Data, Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA
- XU & ARNASON (1994) **Xu X, Árnason Ú** (1994) The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* **148**, 357-362
- XU ET AL. (1996)¹ Xu X., Gullberg A., Arnason U. (1996) The Complete Mitochondrial DNA (mtDNA) of the Donkey and mtDNA Comparisons Among Four Closely Related Mammalian Species-Pairs. *J. Mol. Evol.* **43**, 438-446
- XU ET AL. (1996)² **Xu X., Janke A., Árnason Ú.** (1996): The complete mitochondrial DNA sequence of the greater indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*, and the phylogenetic relationship among Carnivora, Perissodactyla, and Artiodactyla (+ Cetacea). *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1167-1173
- ZEEB (1965) **Zeeb K.** (1965): Wildpferde in Dülmen. Hallwag Verlag, Bern, Schweiz

9. Anhang

1. Anhang

Alignment von veröffentlichten Equidensequenzen

```

Ref 15498 CCTCAT GTGCTATGTC AGTATCAGA- -----TT ATACCCCAc ataacaccat acccacctga
Donkey 1 CCTCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCCGC ACAACACCAT ATCAGCTCAA
Ass 1 CCTCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCCGC ACAACATCAT ACCAGCTCAA
Damara1 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCTATG -TAGCATTAT A-CAGCTCAA
Damara2 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCTATG -TAGTATTAT A-CAGCTCAA
Damara3 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCTATG -TAGCATTAT A-CAGCTCAA
Damara4 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCTATG -TAGTATTAT A-CAGCTCAA
Damara5 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCTATG -TATTATTAT A-CAGCTCAA
Grant3 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACATCCCTATG -TAGTATTAT A-CAGTTCAA
Grant5 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACATCCCTATG -TAGTATTAT A-CAGTTCAA
Grant6 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACATCCCTATG -TAGTATTAT A-CAGTTCAA
Grant7 1 CCTCAT GTACCATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCTATG -TAGTATTAT A-CAGCTCAA
Grevy1 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCT-C ACAGTATCAT ATTAGCTCAA
Grevy2 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCT-C ACAGTATCAT ATTAGCTCAA
Grevy3 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCT-C ACAGCATCAT GTTAGCTCAA
Mountain1 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AC ATGCCCTA-C GCAATACCAT GCCAACTCAT
Mountain2 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AC ATGCCCTA-C GCAATACCAT GCCAACTCAT
Mountain3 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AC ATGCCCTA-C GCAATACCAT GCCAACTCAT
Mountain4 1 CCTCAT GTACTATGTC AGTATTAAA- -----AC ATGCCCTA-C GCAATACCAT GCCAACTCAT
Kiang1 1 CCCCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCCC-- -----
Kiang2 1 CCCCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCCC-- -----
Kulan1 1 CCCCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCCC-- -----
Kulan2 1 CCCCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCCC-- -----
Kulan3 1 CCCCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ACACCCCC-- -----
Onager3 1 CCCCAT GTGCTATGTC AGTATTAAA- -----AT ATACCCCC-- -----
Rhino 1 ct--AT GTAACATGCC AGTATTAGtg actcctatAT GTCTCATACA T-AATATATT A-CATCACAC
*****
*****
*****
**

```

| | | | | | | | |
|-----------|-------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| Ref | 15652 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Donkey | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Ass | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Damara1 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Damara2 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Damara3 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Damara4 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Damara5 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grant3 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grant5 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grant6 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grant7 | 153 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grevy1 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grevy2 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Grevy3 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Mountain1 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Mountain2 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Mountain3 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Mountain4 | 154 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Kiang1 | 128 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Kiang2 | 128 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Kulan1 | 128 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Kulan2 | 128 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Kulan3 | 128 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Onager3 | 128 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Rhino | 164 | aagcattaag | cacagtgtat | gaatatacctc | gacccaagcg | atggttgatta | atattgcata |

| | | | | | | | |
|-----------|-------|------------|------------|------------|-------------|-----------|------------|
| Ref | 15652 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Donkey | 154 | -TACATCATA | TTATTGATCG | TACATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACACG |
| Ass | 154 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACATG |
| Damara1 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACACG |
| Damara2 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACACG |
| Damara3 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACACG |
| Damara4 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Damara5 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TACATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACACG |
| Grant3 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACATG |
| Grant5 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATTTAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Grant6 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACATG |
| Grant7 | 153 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACACG |
| Grevy1 | 154 | -TACATTATA | TTATTAATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Grevy2 | 154 | -TACATTATA | TTATTAATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Grevy3 | 154 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Mountain1 | 154 | -TACATCATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCCAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACATG |
| Mountain2 | 154 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCTAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACATG |
| Mountain3 | 154 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCTAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACATG |
| Mountain4 | 154 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATCCTAGTCA | AATCATTTC | AGCCAACATG |
| Kiang1 | 128 | -TACATTATA | TTATTAATCG | TGCATACCCC | ATTTCGgTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Kiang2 | 128 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATTTCGAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Kulan1 | 128 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATTCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Kulan2 | 128 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATTCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Kulan3 | 128 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATTCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Onager3 | 128 | -TACATTATA | TTATTGATCG | TGCATACCCC | ATTTAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACACG |
| Rhino | 224 | gTACATACAG | TCATTGATCG | TACATACCCC | ATTCAAGTCA | AATCATTTC | AGTCAACATG |
| | | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| | | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| | | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| | | ***** | ***** | ***** | ** | ***** | ***** |
| | | ***** | ***** | ***** | ** | ***** | ** |

| | | | | | | | |
|-----------|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ref | 15721 | CATATCACAG | CCCATGTTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Donkey | 213 | CATATCACCA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAATCCC |
| Ass | 213 | CATATCATAA | CCTATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAATCCC |
| Damara1 | 212 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Damara2 | 212 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Damara3 | 212 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Damara4 | 212 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Damara5 | 212 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grant3 | 212 | CATATCACAA | CCTATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grant5 | 212 | CATATCACAA | CCTATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grant6 | 212 | CATATCACAA | CCTATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grant7 | 212 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grevy1 | 213 | CATATCACAA | CCCATGTCCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grevy2 | 213 | CATATCACAA | CCCATGTCCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Grevy3 | 213 | CATATCATAA | CCCATGTTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Mountain1 | 213 | CGTATCACAA | CCTTTATTCC | ACGA-GCTTA | GTCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAATCCC |
| Mountain2 | 213 | CGTATCACAA | CCCTTATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAATCCC |
| Mountain3 | 213 | CGTATCACAG | CCATTATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAATCCC |
| Mountain4 | 213 | CGTATCACAG | CCATTATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAATCCC |
| Kiang1 | 197 | CATATCACAA | CCCATGTTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Kiang2 | 197 | CATATCATGA | CCCATGTTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Kulan1 | 197 | CATATCACGA | CCCATGTCCC | ACGA-GCTTA | GTCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Kulan2 | 197 | CGTATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Kulan3 | 197 | CATATCACGA | CCCATGTCCC | ACGA-GCTTA | GTCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Onager3 | 197 | CATATCACAA | CCCATATTCC | ACGA-GCTTA | ATCACCAAGC | CGCGGGAAAT | CAGCAACCCT |
| Rhino | 284 | CGTATCATAA | CCAATAGTCC | gtaccGCTTA | ATCAGCAAGC | CGCGGGAAAT | CATCAACCCT |
| | | ***** | ***** | **** | ***** | ***** | ***** |
| | | ***** | ***** | **** | ***** | ***** | ***** |
| | | ***** | ***** | **** | ***** | ***** | ***** |
| | | ***** | ** * **** | **** | ***** | ***** | ***** |
| | | | | ** | **** | ***** | ***** |

| | | | | | | | |
|-----------|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Ref | 15780 | CCCAACTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCCAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAA-T |
| Donkey | 272 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACGG-T |
| Ass | 272 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Damara1 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTCOA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Damara2 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTCOA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Damara3 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTCOA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Damara4 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTCOA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Damara5 | 271 | TCCAACTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTCOA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Grant3 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Grant5 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Grant6 | 271 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Grant7 | 271 | TCCAACTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Grevy1 | 272 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCCAA | ATGTGGGGGT | TTCTATAA-C |
| Grevy2 | 272 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCCAA | ATGTGGGGGT | TTCTATAA-C |
| Grevy3 | 272 | TCCAATTACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCCAA | ATGTGGGGGT | TTCTATAA-T |
| Mountain1 | 272 | TCCAAT-TCG | TGTCCTAGTT | CTCGCTCCGG | GCCCA-TTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Mountain2 | 272 | TCCAATGTGC | TGTCCTAGTT | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Mountain3 | 272 | TCCAAT-TCG | TGTCCTAGTT | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Mountain4 | 272 | TCCAAT-TCG | TGTCCTAGTT | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ACGTGGGGGT | TTCTACAG-T |
| Kiang1 | 256 | TCCAA-TACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ATGTGGGGGT | TTCTATAG-T |
| Kiang2 | 256 | TCCAA-TACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTTAA | ATGTGGGGGT | TTCTATAG-T |
| Kulan1 | 256 | TCCAA-TACG | TATCCCAGTC | CTCGCTCCGG | GCCCATCTAA | ATGTGGGGGT | TTCTACAA-T |
| Kulan2 | 256 | TCCAA-TACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATCTAA | ATGTGGGGGT | TTCTATAA-C |
| Kulan3 | 256 | TCCAA-TACG | TATCCCAGTC | CTCGCTCCGG | GCCCATCTAA | ATGTGGGGGT | TTCTACAA-T |
| Onager3 | 256 | TCCAA-TACG | TGTCCCAATC | CTCGCTCCGG | GCCCATTCOA | ATGTGGGGGT | TTCTATAA-C |
| Rhino | 344 | CTCAcccaa- | TGCCCTCGTT | CTCGCTCCGG | GCCCA-TGAA | CTGTGGGGGT | TTCTATgctT |
| | | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** * |
| | | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** * |
| | | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** * |
| | | | ** ***** | ***** | ***** | ***** | ***** * |

| | | |
|-----------|-------|---------------|
| Ref | 15839 | GAAACTATAC CT |
| Donkey | 331 | GAAACTATAC CT |
| Ass | 331 | GAAACTATAC CT |
| Damara1 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Damara2 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Damara3 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Damara4 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Damara5 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Grant3 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Grant5 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Grant6 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Grant7 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Grevy1 | 332 | AGAACTATAC CT |
| Grevy2 | 332 | AGAACTATAC CT |
| Grevy3 | 332 | GAAACTATAC CT |
| Mountain1 | 330 | GAAACTATAC CT |
| Mountain2 | 332 | GAAACTATAC CT |
| Mountain3 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Moutain4 | 331 | GAAACTATAC CT |
| Kiang1 | 314 | GAAACTATAC CT |
| Kiang2 | 314 | GAAACTATAC CT |
| Kulan1 | 314 | GAAACTATAC CT |
| Kulan2 | 314 | GGAACTATAC CT |
| Kulan3 | 314 | GAAACTATAC CT |
| Onager3 | 314 | GGAACTATAT CT |
| Rhino | 402 | GAAACTATAC CT |
| | | ***** ** |
| | | ***** ** |
| | | ***** ** |
| | | ***** ** |
| | | ***** ** |

Die verwendeten Sequenzen stammen aus:

OAKENFULL ET AL. (2000), Acc.-no.'s:

AF220923 (Damara1), AF220919 (Damara2), AF220921 (Damara3), AF220922 (Damara4),
 AF220924 (Damara5), AF220920 (Grant2), AF220916 (Grant5), AF220917 (Grant6),
 AF220918 (Grant7), AF220930 (Grevy1), AF220928 (Grevy2), AF220929 (Grevy3),
 AF220932 (Kiang1), AF220933 (Kiang2), AF220934 (Kulan1), AF220936 (Kulan2),
 AF220935 (Kulan3), AF220931 (Mountain1), AF220926 (Mountain2), AF220927
 (Mountain3), AF220925 (Mountain4), AF220937 (Onager3), AF220938 (Ass);

XU ET AL. (1996)¹, Acc.-no.:

X97337 (Donkey);

XU & ARNASON (1994), Acc.-no.:

X79547 (Reference).

2. Anhang:

Tabelle der Sequenzdaten aller verwendeten Proben

Verwendete Abkürzungen:

n. c.: nicht zitiert (not cited);

n. f.: nicht gefunden (not found);

out: im Bereich der Outgroup;

n. s.: Sequenz nicht im Dendrogramm erwähnt (not shown);

Herkunft ?: Herkunft nicht dokumentiert

10. Danksagung

Zunächst möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Olek für die Überlassung dieses spannenden Themas die Begleitung und die stetige Hilfe bei allen möglichen auftretenden Problemen während dieses langen Weges bedanken.

Herrn Prof. Dr. Naumann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die Hilfe bei der Lösung von organisatorischen Problemen.

Mein ganz besonderer Dank gilt selbstverständlich meiner Frau: Ohne ihre stetige Unterstützung und ihre Rücksichtnahme auf die Belange des Projekts, wäre mir eine erfolgreiche Beendigung der vorliegenden Arbeit mit Sicherheit nicht gelungen. In diesem Zusammenhang sei auch meiner Familie dafür gedankt, dass sie da waren und mir immer unterstützend zur Seite standen.

Einen unschätzbaren Beitrag zu diesem Projekt hat Herr Hardy Oelke geleistet. Nicht nur, dass er den zündenden Gedanken geliefert hat, auch sein Engagement bei der Beschaffung von Probenmaterial und seine ständige Diskussionsbereitschaft über zoologische Fragen im allgemeinen und hippologische Fragen im besonderen, haben zum Erfolg des Projekts wesentlich beigetragen.

Wesentlichen Beitrag zum Erfolg hatte auch Herr Dr. Peter Forster. Die Bereitstellung des Network-Programm-Pakets zu einem Zeitpunkt als es noch nicht veröffentlicht war, sowie die stete beratende Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse der Analyse machten es erst möglich, das gesamte Potenzial der erhobenen Daten auszuschöpfen.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Herrn Dr. Günter Braunschweiger. In einer Phase als ständige DNA-Kontaminationen den Fortgang des Projekts gefährdeten, half er mir durch die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in den Räumen seines Betriebs aus der Misere hinaus.

Natürlich gilt mein Dank auch den vielen Pferdebesitzern, die mir unentgeltlich Proben ihrer Tiere zur Verfügung stellten, sowie bereitwillig Auskunft über die Stammbäume der Tiere gaben, sofern sie nicht sogar Kopien der Zuchtpapiere den Proben beifügten. Ihre Namen wurden im Kapitel 3.1 aufgeführt. Auch möchte ich den Personen danken, die ihre Kontakte zu Pferdezüchtern nutzten, um weitere Proben von Pferden bestimmter Rassen zu beschaffen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Matthias Vogt, auch für die zusätzlichen Informationen über die Senner und Herrn Dr. Olms für die Beschaffung von zusätzlichen Informationen über die Zuchtgeschichte der arabischen Pferde.

Für die zusätzlichen Informationen in Bezug auf ihre Veröffentlichungen möchte ich Frau Dr. Marsha Levine, Herrn Michael Bowling, Herrn Dr. Carles Vilà, Herrn Prof. Dr. Herbert Macgregor, Herrn Dr. Adrian Lister, Frau Sue Baker, Frau Dr. Anne Oakenfull, Frau Dr. Verà Eisenmann und Herrn Prof. Dr. Kye-II Kim danken.

Herrn Dr. Jürgen Weber möchte ich für die Vorarbeiten zu der vorliegenden Studie, sowie seine stete Diskussionsbereitschaft zur Lösung von labortechnischen Problemen danken. Schließlich war er in seiner Funktion als Laborleiter wesentlich für die sehr angenehme, kollegiale Atmosphäre im Labor des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Olek verantwortlich. Auch hierfür meinen Dank.

Schließlich möchte ich noch den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Olek für die herzliche und kollegiale Atmosphäre danken. Ihre Gegenwart machte so manchen erfolglosen Labortag erträglicher.

Lebenslauf:

Name: Thomas Jansen

Anschrift: Höninger Weg 218b
50969 Köln
Tel.: 0221-363925
e-mail: ti.tho@gmx.de

geboren: 01. Februar 1967 in Mönchengladbach

Familienstand: Verheiratet

Eltern: Doris Jansen, geb. Beneke, Rentnerin, zuvor Verkäuferin
Josef Jansen, Arbeiter, verst. 1986

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung: 1973 bis 1977: Besuch der Franz-Wamich-Grundschule in Mönchengladbach
1977 bis 1987: Besuch des Städtischen Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Mönchengladbach

Schulabschluss: 25. Mai 1987 mit allgemeiner Hochschulreife

Zivildienst: 03. August 1987 bis 31. März 1989 in der Schule für Körperbehinderte Kinder (später: Rheinische Schule für Körperbehinderte Kinder)

Studium: 01. April 1989: Aufnahme des Studiums der Lebensmittelchemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
01. Oktober 1991: Wechsel zum Studiengang Chemie (Diplom)
28. Oktober 1991: Abschluss des Grundstudiums

Studienabschluss: 22. März 1996 mit dem Diplom

Thema der Diplomarbeit: „Isolierung und Sequenzierung von Mikrosatellitsequenzen aus einer genomischen Bibliothek eines Hundes (Canis familiaris)“