

BIOCHEMISCHE GENEPOLYMORPHISMEN IM OESTERREICHISCHEN LIPIZZANERPFERD

Polimorfismos genéticos en los caballos de Lipizza austriacos

Biochemical gene polymorphisms in Austrian Lipizzan horses

W. SCHLEGER *

AUFGABENSTELLUNG

1972 wurden bei 763 Lipizzanern aus Österreich, Ungarn und der Tschechoslowakei sowie bei Haflingern, Norikern und Österreichischen Trabern Protein- und Enzym polymorphismen hinsichtlich ihrer Eignung zum Einsatz in der Abstammungskontrolle untersucht. Es wurden bei Auswertung von Hämoglobin, Transferrin, Albumin, Präalbumin und Serumesterase sowie Katalase und Ceruloplasminen in den verschiedenen Rassen Ausschlußchancenwerte von 65 bis 70 % errechnet (SCHLEGER, 1972).

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere biochemische polymorphe Systeme im Blutserum und Erythrozytenhämolysat bei Lipizzanern des Bundesgestütes Piber erfaßt und gleichzeitig auch die erythrozytären Blutgruppenfaktoren im Blutgruppenlabor Schweden (SANDBERG) untersucht und ihre Aussagewerte beim Einsatz in der Abstammungskontrolle gegenübergestellt werden. Ferner sollten durch ein EDV-Programm alle 54 Allele in 16 genetischen Systemen auf allfällige Koppelungsbeziehungen überprüft, der tatsächliche Heterozygotiegrad der Tiere errechnet und dieser dem im Nachkommen geschätzten gegenübergestellt werden sowie Beziehungen zwischen Fruchtbarkeitskriterien und der Heterozygotie der Elterntiere und Foeten untersucht werden.

TIERMATERIAL UND METHODIK

Von 74 Nachkommen — der Nachzucht von drei Jahrgängen (1970-1973) aus 12 Hengsten und 31 Mutterstuten — sowie 19 Einzeltieren, insgesamt also 136 Tieren

* Blutgruppenlaboratorium am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Tierärztlichen Hochschule Wien, A 1030 Wien, Linke Bahngasse 11, Oesterreich.

der Lipizzanerherde, wurden Blutproben entnommen: jeweils zwei Proben mit *Alsever*-Lösung für die Tests der erythrozytären Blutgruppen und biochemischen Polymorphismen im Erythrozytenhämolysat und zwei Proben Normalblut zur Bestimmung der genetischen Systeme im Blutserum. Das Blutgruppenlaboratorium in Schweden erhielt die Proben aller Tiere par avion zugesandt. Unabhängig voneinander wurden in den beiden Laboratorien (Uppsala und Wien) nachstehende Bestimmungen durchgeführt: Schweden untersuchte mit 16 verschiedenen Testreagenten Blutgruppenfaktoren in sechs genetischen Systemen sowie die biochemischen Systeme *Hb*, *Tf*, *Alb*, *Est*, *6-PGD* und *SEP* (analog Wien), ferner zusätzlich *PGM* und *CA*. Ergebnislisten wurden zur Auswertung an uns gesandt. In Wien wurden neben den vorgenannten 6 Systemen noch die Präalbumine und Katalase bestimmt.

Die Techniken der Darstellung der in Wien bestimmten Polymorphismen sind bei SCHLEGER (1972) beschrieben. Die *SEP* wurde mit geringfügigen Modifikationen nach DOGRUL (1969), die *6-PGD* nach BENGSSON und SANDBERG (1972) durchgeführt. Als Trägermedium wurden jeweils Stärkekegelplatten (*Biotestgel*[®]-Stärke, Frankfurt a. M., *BRD*) von der Größe 190 × 120 × 4 mm für alle Systeme bei Zimmertemperatur im Niederspannungs-Elektrophoresegerät (Kaiblinger, München, *BRD*) verwendet. Jeweils 6 Einzelproben und eine Kontrolle konnten in einem Pherogramm erfaßt werden.

Joul 'sche-Wärme-empfindliche Systeme liefen auf 180 × 320 × 4 mm Gelplatten im Pherograph-Mini-68-Elektrophoresegerät für Hoch- und Niederspannungen (Hormuth-Vetter, Wieslach, *BRD*) mit Kühlaggregat. Hier konnten je Pherogramm bis zu 30 Proben und eine Kontrolle in einem Arbeitsgang getestet werden. Die Arbeitstemperatur läßt sich von +5° bis -15°C bei einer Fehlerabweichung von ± 5°C; 5°C einstellen (Dia, Pherogramm mit Platte).

Die ermittelten Phänotypen der Einzeltiere entsprechen dem Genotyp bei allen dem kodominanten Erbgang folgenden Systemen (*Hb*, *Tf*, *Alb*, *Präalb*, *SEP*, *6-PGD*, *PGM*, *Ca* und *Katalase*). Die Genfrequenzschätzungen wurden nach der für Familienuntersuchungen besonders geeigneten «maximum-likelihood-Methode» nach LI (1955) durchgeführt. Diese Methode bedient sich vorliegender Mütter-Nachkommen-Paare und berücksichtigt so die Verwandtschaft der untersuchten Tiere in einer Population mit Panmixie. Sie ist der allgemein üblichen Genfrequenzschätzung durch einfaches Auszählen der einzelnen Gene aus den Genotypen überlegen.

Die Serumesterase wird durch vier Allele kontrolliert, von welchen sich drei (*Est^f*, *Est^t* und *Est^s*) kodominant verhalten, während das *Est^o*-Allel einen rezessiven Erbgang aufweist. Die Genfrequenzschätzung in diesem System müßte nach der Allokationsmethode nach NEIMANN-SORENSEN (1958) für Iterationszuordnung der bestimmten Phänotypen erfolgen. Im Tiermaterial konnten jedoch nur die beiden Allele *Est^f* und *Est^t* nachgewiesen werden.

In allen Systemen wurde das genetische Gleichgewicht der Population nach HARDY-WEINBERG überprüft und die Ausschlußchancen in Paternitätsfragen nach den Formeln von GAHNE (1961) bzw. JAMIESON (1965) berechnet.

Die Stärke einer Koppelung zwischen zwei *Loci* bestimmt der Austausch, der die Rekombinationshäufigkeit (*r*) wiedergibt, also die Zahl der cross-over Gameten, die in den Nachkommen andere Genotypenkombinationen als in den Eltern vorkommen lassen. Nach einem von LARSEN und CAWOOD (1970) erstellten EDV-Programm für das Erkennen von Koppelungen zwischen Blutgruppen- bzw. Serum-

loci bei Rindern wurden alle 16 untersuchten Genloci gegeneinander überprüft. In kleinen Stichproben, wie sie das vorliegende Material etwa darstellt, würde ein $r = > 0.10$ eine enge Koppelung anzeigen.

Der Heterozygotiegrad der Vater- und Muttertiere konnte aus den bekannten Genotypen der 16 Genloci in % errechnet und mit den je Elterntier erhobenen Fruchtbarkeitsdaten in einem least-square-Analyse-Programm in Beziehung gebracht werden. Als Fruchtbarkeitskriterium diente die Anzahl von notwendigen Belegungen je erfolgter Geburt, einerseits für die Mutterstuten (insgesamt 256 Geburten), andererseits aber auch für die Vätertiere. Analoge Untersuchungen bei Rindern brachten signifikante Zusammenhänge zwischen Heterozygotiegrad und Fruchtbarkeit, wobei die Fruchtbarkeit von Kühen mit höherem *HG* linear signifikant besser ist [Besamungsindex (*BI*) 1.4 bei *HG* = 60 %, *BI* 1.8 bei *HG* = 30 %]. Auch die Zwischenkalbezeit war bei den Tieren mit hoher Heterozygotie im Durchschnitt elf Tage kürzer (Vortrag Davis 1974, SCHLEGER, MAYRHOFER, PIRCHNER).

Für die 74 Nachkommen aus direkten Abstammungen wurde der tatsächliche Heterozygotiegrad mit dem aus den Eltern für den prospektiven Foetus geschätzten Heterozygotiegrad verglichen (SCHLEGER, 1973, EVT Tagung Wien).

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Tabelle 1 zeigt die bei den 136 Lipizzanern erhobenen Genfrequenzen der 54 Allele in 16 genetischen Systemen, die errechnete Ausschlußchance beim Einsatz in der Abstammungskontrolle für jedes System sowie die Gesamtausschlußchancen der 6 Blutgruppensysteme bzw. der 10 biochemischen Systeme und die kombinierte Gesamtausschlußchance für die untersuchte Population. Diese beträgt $P_{BG} + P_{SC} = 93$ %, und damit etwa die Aussagekraft der Untersuchungen in der Rinderabstammungskontrolle (= ca. 95 %). Ein Vergleich der unterschiedlichen Genfrequenzen mit früheren Untersuchungen an anderen Rassen (SCHLEGER, 1972), aber auch mit den Angaben anderer Autoren, bringt je System geringgradige \pm Abweichungen der Einsatzeffizienz, die Gesamtausschlußchance bleibt aber in etwa gleich. Z. B.: 5 Systeme (28 Allele) im Sechrassenvergleich (Haflinger, Noriker, Traber, und die Lipizzanergruppen aus Österreich, der Tschechoslowakei und Ungarn); Ausschlußchancen: 70 : 71 : 70 : 68 : 68 : 66 %.

Für die Analyse der Pferdefamilien auf allfällige Koppelungen zwischen den 16 Genloci wurden die ermittelten Phänotypen in den Nachkommen einzelner Väter in Parenterale und Rekombinante unterteilt. Diese Werte wurden in das EDV-Programm von LARSEN (1970) eingelesen. Die gefundenen Rekombinationsraten lassen sich nicht von einer solchen von 0.5 — die eine Unabhängigkeit der Loci ausweisen würde — unterscheiden.

Aus den bekannten Genotypen der untersuchten Systeme der Elterntiere läßt sich der Heterozygotiegrad des prospektiven Foetus schätzen. Dieser geschätzte Heterozygotiegrad hat mit dem tatsächlich feststellbaren im geborenen Nachkommen eine hohe Korrelation. Derartige Untersuchungen unter Einbeziehung von elf Blutgruppensystemen und des *Hb*-Systems bei Rindern — hier wurden in einer Fleckviehpopulation bei 154 Nachkommen aus 12 Stieren und 154 Kühen die beiden Heterozygotiegradwerte gegenübergestellt — brachten eine Korrelation $r =$

0.75 (SCHLEGER, 1973). Der Einsatz von 16 Systemen erhöhte diese auf $r = 0.92$. Der durchschnittliche Heterozygotiegrad der Nachkommenpopulation läßt sich bei gezielter Anpaarung der zur Verfügung stehenden Tiere gegenüber der Elternpopulation anheben. Dies ist dann von Bedeutung, wenn zwischen hoher Hetero-

TABELLE 1
136 LIPIZZANER (1973)

Genfrequenzen BG-Systeme				Genfrequenzen biochemische Systeme				
System + Faktor	Allel	Frequenz	P in %	System	Allel	Frequenz	P in %	
J	$J_2 E'$	0.114	37.33	Hb	A	0.848	11.23	
	$D_1 E'$	0.210			a	0.152		
	D_1	$S_9 E'$		0.022	Tf	D	0.213	
	E_1	E'		0.294		F	0.185	
	E_2	$J_2 E_2$		0.018		H	0.123	
	E'	$J_2 S_9 E_2$		0.004		M	0.000	
	S_9	$E_1 E_2$		0.073		O	0.417	
	E_2	0.265	R	0.062		34.42		
A	A_1	0.390	33.68	Pre	F	0.108		
	A_1	H_1			0.294	I	0.415	
	H_1	A'			0.070	L	0.368	
	A'	$H_1 A'$			0.066	S	0.109	30.84
		a			0.180			
Q	S_{11}	0.092	14.78	Alb	F	0.150		
	Q_1	S_{12}			0.022	S	0.850	11.25
	S_{11}	$Q_1 S_{11}$		0.000	Est	F	0.223	
	S_{12}	$Q_1 S_{11} S_{12}$		0.015		I	0.777	
		$Q_1 S_{12}$		0.048		S	0.000	
		q		0.823		—	0.000	14.32
P	P_1	0.364	5.66	SEP	A	0.049		
	P_1	P'			0.000	B	0.951	4.44
	P'	p		0.636				
K	K	0.000	0.00	6-PGD	F	0.888		
	K	k			1.000	S	0.112	8.96
C	C	0.616	1.33	PGM	F	0.026		
	c	c			0.384	S	0.974	2.47
6	26		67.03	Cat	A	0.151		
	16				B	0.849	11.18	
10			79.63	CA	F	0.163		
					I	0.837	11.78	

Gesamtsumme = 16 genetische Systeme (54 Allele)

$$P_{BG\ 6} + P_{bioch\ 10} = 93.28\ %$$

zygotie und Leistungsmerkmalen Beziehungen bestehen. Nun ist doch die Überlegenheit von Heterozygoten zumindestens hinsichtlich der Fitness, also vor allen hinsichtlich des Reproduktionsvermögens, wozu noch Vitalität und Resistenzkomponenten kommen, bekannt und wird hypothetisch mit besserer Pufferung gegenüber den vielfältigen Umwelteinwirkungen erklärt (LEWONTIN, 1957). Vor allem Eigenschaften mit niedriger Heritabilität wie etwa die Fruchtbarkeit (0.05-0.10), aber auch die Milchleistung (0.2-0.3) sind weitestgehend fitnessabhängig, Während Eigenschaften mit hohen Erblichkeitswerten wie z. B. die Milchezusammensetzung (0.4-0.5) oder die Schlachtqualität (0.5-0.6) als fitnessunabhängig gelten.

Die 31 Mutterstuten wurden in acht Klassen mit einem

durchschnittlichen Heterozygotiegrad von 25, 30 60 %,
die Nachkommen in sechs Klassen mit 45, 50 70 %
unterteilt.

Je Klasse wurde für die Stuten und Nachkommen die angefallene Zahl der Belegungen bis zu erfolgter Geburt (Konzeptionsrate) zum Heterozygotiegrad in Beziehung gebracht. Ferner wurden Unterschiede zwischen den Hengsten (Zahl aller Belegungen bis Geburt) und der Einfluß der Saison (Jahr). Für relevante Aussagen (wie etwa Rinderuntersuchungen) war das vorliegende Tiermaterial zu klein und damit zu wenig effizient. Die least-square-Varianzanalyse (noch HARVEY, 1960) brachte wohl signifikant bessere Ergebnisse hinsichtlich der Konzeptionsrate der Mutterstuten mit einem höheren Heterozygotiegrad

$$F = 3.613^{**} \quad (FG \ 7/264) \quad P_1 = 2,64$$

Der Heterozygotiegrad der Foeten zeigte

$$F = 1.77 \quad (FG \ 5/264) \quad P_5 = 2.21$$

also keinen gesicherten Effekt, ein Ergebnis, das ebenfalls dem bei den Rinderarbeiten entspricht. Auch zwischen den Hengsten bestand kein Unterschied:

$$F = 1.669 \quad (FG \ 10/236) \quad P_5 = 1.83$$

die Saison aber (Jahre, 1964-1972) hatte mit

$$F = 2.345^{**} \quad (FG \ 10/236) \quad P_1 = 2.32$$

einen hohen Einfluß, wodurch die Aussage betreffs Mutterstutenfruchtbarkeit abgeschwächt erscheint.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei 136 österreichischen Lipizzanerperden wurden in den Blutgruppenlaboratorien Wien und Uppsala (Sandberg) insgesamt 10 biochemische polymorphe Systeme sowie in 6 Systemen die Blutgruppen (16 Faktoren) bestimmt. Die Untersuchungen der biochemischen Systeme *Tf*, *Hb*, *Alb*, *Est*, *6-PGD* und *SEP* (*AP*) erfolgten in beiden Laboratorien und ergaben idente Ergebnisse. In Wien wurden zusätzlich Präalbumin und Catalase, in Uppsala *PGM* und *CA* sowie die

Blutgruppensysteme getestet. Die Tiermaterial rekrutierte sich aus 12 Hengsten, 31 Mutterstuten, 74 Nachkommen aus direkten Abstammungen und 19 Einzeltieren.

Die Genfrequenzen der insgesamt 54 Allele (26 Blutgruppen- und 28 biochemische Systeme) wurden ermittelt, die Ausschlußchance bei Verwendung in Paternitätsfragen je System errechnet. Die Gesamtausschlußchance für 6 Blutgruppensysteme beträgt 67 %, für 10 Serumgruppen 79.6 % und die kombinierte Ausschlußchance $P_{BG} + P_{SG} = 93 \%$.

Die Auswertung der Daten im Kopplungsprogramm ergab keine Kopplungsbeziehungen zwischen den einzelnen Systemen. Die bekannten Genfrequenzen der 54 Allele in 16 verschiedenen genetischen Systemen ermöglichen Untersuchungen von allfälligen Korrelationen zu Leistungs- bzw. Körpereigenschaften, aber auch die Bestimmung des Heterozygotiegrades der Einzelindividuen und der Population. Der tatsächliche Heterozygotiegrad der Mutter- und Vatertiere wird mit erhobenen Fruchtbarkeitsdaten in Beziehung gebracht, der tatsächliche Heterozygotiegrad der Nachkommen mit dem geschätzten des prospektiven Foetus aus Paarungen bekannter Elterntiere verglichen. Es wird auf die Möglichkeiten, durch gezielte Elternzuordnung den Heterozygotiegrad in der Folgegeneration anzuheben, hingewiesen.

RESUMEN

En 136 caballos lipizzanos austriacos se reconocieron seis sistemas de grupos sanguíneos (16 factores) y 10 sistemas polimórficos bioquímicos. Se fijaron 26 alleles (?) de grupos sanguíneos y 28 de grupos de suero y se calcularon la frecuencia de genes y la posibilidad de exclusión en cuestiones de paternidad en cada sistema. La determinación de los fenotipos ofrece en el control de descendencia de los caballos una seguridad de exclusión para el reconocimiento de datos de descendencia erróneos del 93 %. Entre los 16 *locis* de gene no existen relaciones de acoplamiento. El grado de heterozigotidad de los animales padres y el de la población es determinable y ofrece al emparejamiento programado la posibilidad de subir el grado medio de heterozigotidad en la generación siguiente.

La fertilidad de los animales hembras sube notablemente con un grado de heterozigotidad alto. El grado de heterozigotidad de los fetos no tiene ninguna influencia. Entre los caballos instalados como padres no existen diferencias. La temporada tuvo una notable influencia sobre el material animal en cuestión.

SUMMARY

On a material of 136 horses of the Austrian Lipizzan breed, the bloodgroup laboratories in Vienna and in Uppsala determined altogether 10 biochemical polymorphous systems and carried out bloodtyping of 6 systems (16 factors). Investigations of the biochemical systems *Tf*, *Hb*, *Alb*, *Est*, *6-PGD* and *AP* was done in both laboratories, bringing identical results. Additionally, the Vienna laboratory tested pre-albumin and catalase, Uppsala *PGM* and *CA* as well as the blood group systems. The material of these investigations was comprised of 12 stallions, 31 mares, their 74 progeny, and 19 individual animals.

The gene frequencies of the altogether 54 alleles (26 bloodgroup systems, 28 biochemical systems) were determined, the chances of exclusion of wrong pater-

nity per system calculated. For 6 bloodgroup systems the total chance of exclusion is 67 %, for 10 serum groups 79 %, and the combined chance of exclusion, $P_{GB} + P_{GS} = 93$ %.

Evaluation of the data in the linkage programme revealed no linkage relations between the individual systems. The known gene frequencies of the 54 alleles in 16 different genetic systems permit the investigations of any possible relations to performance- or physical traits as well as the determination of the heterozygosity degree in individuals and in the population. The actual heterozygosity degree of the dams and sires is correlated with the obtained fecundity data, the actual heterozygosity degree of progeny compared with the estimated degree of heterozygosity of the prospective foetus from matings of known parents. Possibilities are pointed out for increasing the heterozygosity degree in the progeny by aimed choice of parents.

L I T E R A T U R

1. BENGSSON, S., and SANDBERG, K. (1972): Phosphoglucomutase polymorphism in Swedish horses. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, 3.
2. BENGSSON, S., and SANDBERG, K. (1973): A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme systems. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, 4.
3. DOGRUL, F. (1969): Polymorphismus der sauren Erythrozyten-Phosphatase beim Rind. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, 56, 8.
4. GAHNE, B. (1961): Studies of transferrins in serum and milk of Swedish cattle. *Anim. Prod.*, 3.
5. HARVEY, W. R. (1960): Least-square analysis of data with unequal frequencies. *Agric. Res. Service*, 20, 8.
6. JAMIESON, A. (1965): The genetics of transferrins in cattle. *Heredity* (Lond.), 20.
7. LARSEN, B., and CAWOOD, P. B. (1970): Nogle computer-programmer til genetiske undersøgelser af bovine blodtypedata. *Aarsberetn. Inst. Sterilitetsforsken.*
8. LEVONTIN, R. C. (1957): The adaptations of populations to varying environments. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 22, Vol. 27.
9. LI, C. C. (1955): *Population Genetics*. The University of Chicago Press, Chicago-London.
10. NEIMANN-SØRENSEN, A. (1958): *Blood Groups of Cattle*. A/S Carl Fr. Mortensen, Copenhagen.
11. SCHLEGER, W. (1972): *Genetischer Polymorphismus im Serum und Erythrozytenhämolyse beim Pferd*. Habil. Med. Vet., Wien.
12. SCHLEGER, W. (1973): *Relations between estimated and actual degree of heterozygosity in horse and cattle*. Vortrag, EVT-Tagung, Wien.
13. SCHLEGER, W.; MAYRHOFER, G., and PIRCHNER, F. (1974): *Relationship between heterozygosity as estimated from genetic markers and performance of dairy cattle*. Vortrag XIVth Int. Conf. Anim. Blood. Groups and Biochem. Polymorphisms., Davis (USA).

